



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0068452
(43) 공개일자 2017년06월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7008019
- (22) 출원일자(국제) 2015년09월08일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년03월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/049018
- (87) 국제공개번호 WO 2016/040373
국제공개일자 2016년03월17일
- (30) 우선권주장
62/047,562 2014년09월08일 미국(US)
- (71) 출원인
미라젠 세라퓨틱스 인코포레이티드
미국 콜로라도 80301 볼더 룩아웃 로드 6200
- (72) 발명자
몽고메리 리스티 엘
미국 콜로라도 80301 볼더 스위트 100 룩아웃 로드 6200 미라젠 세라퓨틱스 인코포레이티드 내
돌비 크리스티나
미국 콜로라도 80301 볼더 스위트 100 룩아웃 로드 6200 미라젠 세라퓨틱스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
석혜선, 김용인

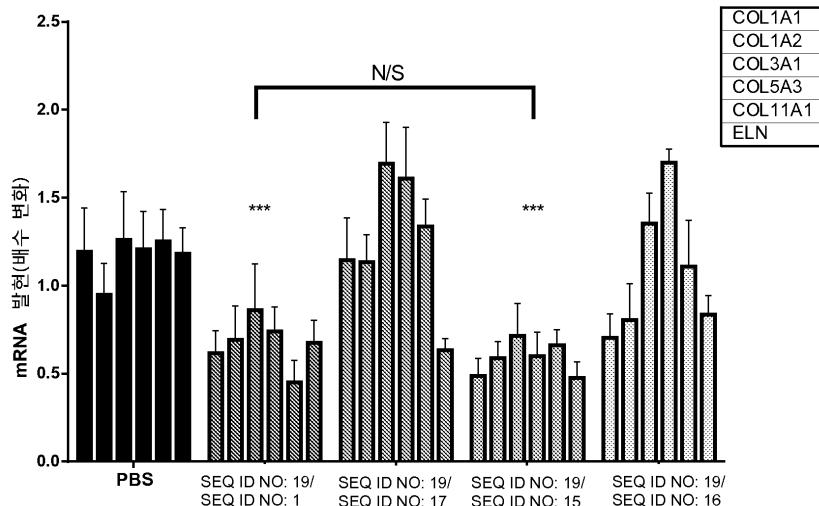
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 MIR-29 모방체 및 이의 용도

(57) 요 약

본 발명은 miRNA의 합성 올리고뉴클레오티드 모방체에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 miR-29의 이중 가닥, 화학 변형 올리고뉴클레오티드 모방체를 제공한다. 모방체를 포함하는 약학적 조성물 및 조직 섬유성 질환과 같은 세포의 기질 유전자의 이상과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는데 이의 용도가 또한 기술된다.

대 표 도 - 도13



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61K 9/007 (2013.01)

C12N 2310/113 (2013.01)

C12N 2310/141 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/3231 (2013.01)

C12N 2310/343 (2013.01)

C12N 2310/346 (2013.01)

C12N 2320/51 (2013.01)

(72) 발명자

반 루이 에바

미국 콜로라도 80301 볼더 스위트 100 룩아웃 로드

6200 미라젠 세러퓨틱스 인코포레이티드 내

갈란트-뱀 코리

미국 콜로라도 80301 볼더 스위트 100 룩아웃 로드
6200 미라젠 세러퓨틱스 인코포레이티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

성숙한 miR-29a, miR-29b 또는 miR-29c 서열을 포함하는 약 23개 내지 약 26개의 리보뉴클레오티드의 제 1 가닥; 및

제 1 가닥에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하며 적어도 하나의 변형 뉴클레오티드를 가지는 약 22개 내지 약 23개의 리보뉴클레오티드의 제 2 가닥을 포함하며, 제 1 가닥은 제 2 가닥에 대해 3' 뉴클레오티드 오버행을 갖는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

제 1 가닥은 하나 이상의 2'-플루오로 뉴클레오티드를 갖는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

제 1 가닥은 변형 뉴클레오티드를 갖지 않는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

제 2 가닥에서 적어도 하나의 변형 뉴클레오티드는 2'-0-메틸 변형 뉴클레오티드인 miR-29 모방체 화합물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

제 2 가닥은 제 1 가닥에 대해 1개, 2개 또는 3개의 미스매치를 갖는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

제 2 가닥은 제 1 가닥에 대해 3' 말단으로부터의 위치 4, 13 및/또는 16에 미스매치를 함유하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

제 2 가닥은 이의 3' 또는 5' 말단에서 콜레스테롤 분자에 연결되는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

콜레스테롤 분자는 적어도 6개의 탄소 링커를 통해 제 2 가닥에 연결되는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

제 1 가닥에 3' 오버행을 포함하는 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결되는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

제 1 가닥은 성숙한 miR-29b 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

제 1 가닥은 SEQ ID NO: 2, 18-21 또는 31-34로부터 선택된 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

제 2 가닥은 1, 8-17 또는 28-30으로부터 선택된 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 13

제 10 항에 있어서,

제 1 가닥은 SEQ ID NO: 19의 서열을 포함하며 제 2 가닥은 SEQ ID NO: 1의 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 14

제 10 항에 있어서,

제 1 가닥은 SEQ ID NO: 19의 서열을 포함하며 제 2 가닥은 SEQ ID NO: 15의 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 15

제 10 항에 있어서,

제 1 가닥은 SEQ ID NO: 33의 서열을 포함하며 제 2 가닥은 SEQ ID NO: 1의 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 16

제 10 항에 있어서,

제 1 가닥은 SEQ ID NO: 34의 서열을 포함하며 제 2 가닥은 SEQ ID NO: 1의 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 17

제 1 항에 있어서,

제 1 가닥은 성숙한 miR-29a 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

제 1 가닥은 SEQ ID NO: 6, 7 또는 27의 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

제 2 가닥은 SEQ ID NO: 3-5로부터 선택된 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 20

제 17 항에 있어서,

제 1 가닥은 SEQ ID NO: 27의 서열을 포함하며 제 2 가닥은 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 21

제 1 항에 있어서,

제 1 가닥은 성숙한 miR-29c 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

제 1 가닥은 SEQ ID NO: 25, 26 또는 35의 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 23

제 19 항에 있어서,

제 2 가닥은 SEQ ID NO: 22-24로부터 선택된 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 24

제 21 항에 있어서,

제 1 가닥은 SEQ ID NO: 35의 서열을 포함하며 제 2 가닥은 SEQ ID NO: 24의 서열을 포함하는 miR-29 모방체 화합물.

청구항 25

유효량의 제 1 항의 miR-29 모방체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 26

제 25 항에 있어서,

조성물은 흡입 조성물인 약학적 조성물.

청구항 27

세포를 제 1 항의 miR-29 모방체 화합물 또는 제 25 항의 약학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하여 세포에서 세포외 기질 유전자를 조절하는 방법.

청구항 28

제 27 항에 있어서,

세포는 포유류 세포인 방법.

청구항 29

제 28 항에 있어서,

세포는 섬유아세포 또는 상피 세포인 방법.

청구항 30

제 27 항에 있어서,

세포는 생체 내(in vivo) 또는 생체 외(ex vivo)인 방법.

청구항 31

대상에게 제 1 항의 miR-29 모방체 화합물 또는 제 25 항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하여 필요한 대상에서 조직 섬유증을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 32

제 31 항에 있어서,

조직 섬유증은 심장 섬유증, 폐 섬유증, 신장 섬유증, 간 섬유증, 경피증, 안구 섬유증, 피부 섬유증인 방법.

청구항 33

제 32 항에 있어서,

피부 섬유증은 비대성 흉터, 켈로이드, 손, 관절 또는 힘줄 섬유증 및 폐로니병으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 34

제 31 항에 있어서,

투여는 흡입에 의하는 방법.

청구항 35

제 31 항에 있어서,

miR-29 모방체 화합물 또는 약학적 조성물은 정량 흡입기, 견조 분말 흡입기, 분무기, 열 기화기, 연무 흡입기, 열 에어로졸 흡입기, 또는 전기유체역학 기반 용액 분무 흡입기에 의해 투여되는 방법.

청구항 36

miR-29 효현제 또는 miR-29 길항제를 이용한 치료 효과를 평가하는 방법으로서, 이 방법은 miR-29 효현제 또는 miR-29 길항제로 치료하기 전의 대상의 세포 또는 세포의 섬유화 조직에서 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계로서, 하나 이상의 유전자는 miR-29에 의해 변조된 유전자 세트로부터 선택된다; miR-29 효현제 또는 miR-29 길항제로 치료 후 대상의 세포/섬유화 조직에서 동일한 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 치료 전후의 발현 수준에 기초하여 치료가 효과적, 덜 효과적 또는 효과적이지 않다는 것을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서,

miR-29에 의해 변조된 하나 이상의 유전자는 표 5로부터 선택되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 내에서 miRNA 활성을 증가시키는 합성 miRNA 모방체 또는 promiR에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 miR-29 모방체 및 콜라겐 침착 및 섬유증과 같은 관련 질환을 감소시키는데 있어 이들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유전학 또는 마이크로 RNA(miRNA)의 약리학적 변조를 사용하여 동물 질환 모델에서 수집된 기능의 이득 또는 손실 데이터에 기초하여, miRNA가 질환 동안 중요한 참여자임이 현재 잘 인정되고 있다. 최근의 긍정적인 임상 효능 데이터 (Janssen et al, 2013)와 결합된 이들 연구는 차기 부류의 치료제가 되기 위한 miRNA의 관련성 및 miRNA에 대한 실행가능성을 강조한다. 실제로, miRNA는 작고 알려진 서열을 포함한다는 점에서 치료 중재 단계로서 여러 이점을 가진다. 또한, 단일 miRNA가 생물학적 경로 내에서 여러 표적 mRNA를 조절할 수 있기 때문에, 원칙적으로 miRNA의 변조는 전체 유전자 네트워크에 영향을 미치고 복잡한 질환 표현형을 변형시킨다(van Rooij

& Olson, 2012).

[0003] antimiR이라 불리는 단일 가닥 miRNA 억제제를 사용하는 많은 연구가 치료 효능을 나타내지만, miRNA의 기능을 회복시키거나 증가시키기 위한 시도는 뒤떨어져 있다(van Rooij et al, 2012). 현재, miRNA 기능은 바이러스 과 발현 또는 합성 이중 가닥 miRNA를 사용함으로써 증가될 수 있다. 지금까지 생체 내에서 활성을 복원하기 위해 주어진 miRNA의 발현을 유도하기 위해 아데노 관련 바이러스(AAV)의 사용은 간세포 암 및 폐암(Kasinski & Slack, 2012; Kota et al, 2009) 및 척수 및 구근 근위축(Miyazaki et al, 2012)의 생쥐 모델에서 효과적인 것으로 밝혀진 반면, miRNA 수준을 증가시키기 위한 제제화되지 않은 합성 올리고뉴클레오티드 기반 접근법의 사용은 대해서는 잘 연구되지 않았다.

[0004] 마이크로RNA-29(miR-29) 패밀리는 세포의 기질 단백질을 조절하는 그의 능력에 대해 잘 특징화 되어있다(He et al, 2013). 이 패밀리는 두 개의 바이시스트론 클러스터(miR-29a/-29b-1 및 miR-29b-2/-29c)로 표현되며, 서열이 대부분 균일하나 성숙 miRNA의 3' 영역에서 다른 구성원 사이에 단지 적은 미스매치를 가진 miR-29a, -29b 및 -29c로 구성된다(van Rooij et al, 2008). 모든 세 구성원은 상이한 형태의 조직 섬유화가 감소하고 miR-29 수준을 증가시키는 치료 효과는 심장(van Rooij et al, 2008), 신장(Qin et al, 2011; Wang et al, 2012; Xiao et al, 2012), 간(Roderburg et al., 2011; Sekiya et al, 2011; Zhang et al, 2012), 폐(Cushing et al, 2011; Xiao et al, 2012) 및 전신 경화증(Maurer et al, 2010)에 대해 입증되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 생체 내에서 miR-29 활성을 효과적으로 증가시킬 수 있는 miR-29의 합성 올리고뉴클레오티드 모방체에 대한 필요성이 당업계에 존재한다. 이러한 miR-29 모방체 또는 miR-29 promiR은 다양한 조직 섬유증 질환을 치료하는데 유용하다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 안정성 및 세포 흡수에 대한 변형을 갖는 miRNA 모방체가 miR-29의 내인성 기능을 복제하기 위해 사용될 수 있다는 발견에 부분적으로 기초한다. 예를 들어, 폐 섬유증의 환경에서 miR-29b 모방체에 의한 치료는 miR-29의 블레오마이신 유도 감소를 회복하고 폐 섬유증을 차단하고 역전시키며, 이는 질환 진행 동안 유도된 miR-29 표적 유전자의 억제와 일치한다. 유사하게, miR-29b 모방체에 의한 피부 절개의 치료는 세포의 기질 유전자 및 섬유화 과정에 관여하는 다른 유전자의 발현을 하향 조절한다. 따라서, 본 발명은 이중 가닥 RNA miR-29 모방체 화합물을 제공한다.

[0007] 일부 실시태양에서, miR-29 모방체 화합물은 (a) 성숙한 miR-29a, miR-29b 또는 miR-29c 서열을 포함하는 약 23개 내지 약 26개의 리보뉴클레오티드의 제 1 가닥; 및 (b) 상기 제 1 가닥에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 약 22개 내지 약 23개의 리보뉴클레오티드의 제 2 가닥을 포함하고, 제 1 가닥은 제 2 가닥에 대해 3' 뉴클레오티드 오버행을 갖는다. 특정 실시태양에서, 제 1 가닥 및 제 2 가닥은 하나 이상의 변형 뉴클레오티드를 함유한다. 변형 뉴클레오티드는 2'-알킬 (2'-0-메틸) 또는 2'-플루오로 변형과 같은 2' 당 변형일 수 있다. 한 실시태양에서, 제 1 가닥은 하나 이상의 2'-플루오로 변형을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 제 2 가닥은 하나 이상의 2'-0-메틸 변형을 갖는다. 일부 실시태양에서, 제 2 가닥은 제 1 가닥에 대해 하나, 둘, 셋 또는 그 이상의 미스매치를 갖는다. 한 실시태양에서, miR-29 모방체 화합물의 제 2 가닥은 제 1 가닥에 대해 (제 2 가닥의) 3' 말단으로부터의 위치 4, 13 및/또는 16에 미스매치를 함유한다.

[0008] 한 실시태양에서, miR-29 모방체 화합물의 제 2 가닥은 이의 3' 말단에서 콜레스테롤 분자에 연결된다. 특정 실시태양에서, 콜레스테롤 분자는 적어도 6개의 탄소 링커를 통해 제 2 가닥에 연결된다. 링커는 절단 가능한 링커일 수 있다.

[0009] 한 실시태양에서, 제 1 가닥에 3' 오버행을 포함하는 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결된다.

[0010] 한 실시태양에서, miR-29 모방체 화합물은 SEQ ID NO: 27의 서열을 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함하는 제 2 가닥을 포함한다.

[0011] 다른 실시태양에서, miR-29 모방체 화합물은 SEQ ID NO: 19의 서열을 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 1의

서열을 포함하는 제 2 가닥을 포함한다.

[0012] 또 다른 실시태양에서, miR-29 모방체 화합물은 SEQ ID NO: 19의 서열을 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 15의 서열을 포함하는 제 2 가닥을 포함한다.

[0013] 또 다른 실시태양에서, miR-29 모방체 화합물은 SEQ ID NO: 33의 서열을 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 1의 서열을 포함하는 제 2 가닥을 포함한다.

[0014] 또 다른 실시태양에서, miR-29 모방체 화합물은 SEQ ID NO: 34의 서열을 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 1의 서열을 포함하는 제 2 가닥을 포함한다.

[0015] 또 다른 실시태양에서, miR-29 모방체 화합물은 SEQ ID NO: 35의 서열을 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 24의 서열을 포함하는 제 2 가닥을 포함한다.

[0016] 본 발명은 본 발명에 기술된 유효량의 miR-29 모방체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 특정 실시태양에서, 약학적 조성물은 폐, 비강, 비강 내 또는 안구 전달용으로 제제화되며, 분말, 수용액, 수성 에어로졸, 점비액, 에어로졸 및/또는 점안액의 형태일 수 있다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 분무기, 정량 흡입기, 건조 분말 흡입기 또는 연무 흡입기와 같은 흡입 시스템으로 투여된다.

[0017] 본 발명은 또한 세포를 본 발명에 기술된 miR-29 모방체 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하여 세포에서 세포외 기질 유전자를 조절하는 방법을 포함한다. 한 실시태양에서, 세포외 기질 유전자의 발현 또는 활성은 miR-29 모방체 화합물 또는 조성물과의 접촉 후에 감소한다. 일부 실시태양에서, 세포외 기질 유전자는 Col1a1 및 Col3a1과 같은 콜라겐 유전자이다. 세포는 생체 외(in vitro), 생체 내(in vivo) 또는 생체 외(ex vivo)일 수 있다.

[0018] 본 발명은 필요한 대상에서 조직 섬유증을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 한 실시태양에서, 상기 방법은 본 발명에 기술된 miR-29 모방체 화합물을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시태양에서, 조직 섬유증은 심장 섬유증, 폐 섬유증, 신장 섬유증, 간 섬유증, 안구 섬유증, 비대성 흉터 및 켈로이드, 손, 관절 또는 힘줄 섬유증, 폐로니병을 포함하는 피부 섬유증 또는 경피증이다. 한 실시태양에서, 조직 섬유증은 특발성 폐 섬유증(IPF)이다.

[0019] 특정 실시태양에서, 조직 섬유증을 치료 또는 예방하는 방법은 폐, 비강 또는 비강 내 경로를 통해 본 발명에 기술된 miR-29 모방체 화합물 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시태양에서, miR-29 모방체 화합물 또는 조성물은 흡입을 통해 전달된다.

[0020] 본 발명은 또한 세포를 본 발명에 기술된 miR-29 모방체 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하여 세포에서 비-세포 외 기질 유전자를 조절하는 방법을 포함한다. 한 실시태양에서, 비-세포외 기질 유전자의 발현 또는 활성은 miR-29 모방체 화합물 또는 조성물과의 접촉 후에 증가한다. 일부 실시태양에서, 비-세포외 기질 유전자는 Itga3 또는 Numb와 같은 유전자이다. 세포는 생체 외(in vitro), 생체 내(in vivo) 또는 생체 외(ex vivo)일 수 있다.

[0021] 본 발명은 또한 miR-29 효현제 또는 miR-29 길항제로 치료 효과를 평가하는 방법을 제공하며, 이 방법은 miR-29 효현제 또는 miR-29 길항제로 치료하기 전의 대상의 세포 또는 세포의 섬유화 조직에서 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계로서, 하나 이상의 유전자는 miR-29에 의해 변조된 유전자 세트로부터 선택된다; miR-29 효현제 또는 miR-29 길항제로 치료 후 대상의 세포/섬유화 조직에서 동일한 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 치료 전후의 발현 수준에 기초하여 치료가 효과적, 덜 효과적 또는 효과적이지 않다는 것을 측정하는 단계를 포함한다. 한 실시태양에서, miR-29에 의해 변조된 하나 이상의 유전자는 표 5로부터 선택된다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 내용 중에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1a. 이중 가닥 miR-29 모방체 디자인은 3' 말단에 UU 오버행을 가진 miR-29b와 동일하며, 안정성을 높이기 위해 변형되고 5' 말단에서 화학적으로 인산화된 '가이드 가닥' 또는 '안티센스 가닥' 및 RNA-유도 침묵 복합체(RISC)에 로딩되는 것을 방지할 뿐만 아니라 안정성을 증가시키기 위해 2'-O-Me 변형을 함유하고 증가된 세포

흡수를 위해 콜레스테롤과 연결된 '패신저 가닥' 또는 '센스 가닥'을 함유한다. 이 가닥이 antimiR로서 기능하는 것을 방지하기 위해 센스 가닥에 여러 미스매치가 도입된다.

도 1b. NIH 3T3에서 형질감염 실험은 치료되지 않거나 모의 치료된 세포와 비교하여 miR-29b 모방체의 양 증가와 함께 Col1a1에서 투여량 의존적 감소를 나타낸다. Col1a1을 직접 표적으로 하는 siRNA는 양성 대조군으로 사용되었다. *p <0.05 대 모의, # p<0.05 대 치료되지 않음.

도 1c. 10, 50, 100 또는 125 mpk miR-29b 모방체에 의한 정맥 주사 4일 후 상이한 조직에서 miR-29b에 대한 노던 블롯 분석은 최고 투여량에서 모든 조직에 대한 전달을 나타내며, 가장 효과적인 전달이 생리 식염수 주사 생쥐와 비교하여 폐와 비장에서 일어났다. U6은 로딩 대조군으로 사용된다.

도 1d. miR-29b 모방체의 실시간 정량화는 높은 투여량 수준에서 miR-29b의 증가된 수준을 나타내며 가장 효과적인 전달이 폐 및 비장에 일어났다(그룹당 n=4). *p<0.05 vs 생리 식염수 주사 동물.

도 1e. 125 mpk의 모방체에 의한 정맥 주사 1, 2, 4 및 7일 후 상이한 조직에서 miR-29b에 대한 노던 블롯 분석은 검사된 모든 조직에서 miR-29b 모방체의 존재를 나타내며, 폐와 비장에서 더 길게 탐지된다. U6은 로딩 대조군으로 사용된다.

도 1f. miR-29b 모방체의 실시간 정량화는 측정된 모든 조직에서 miR-29b의 증가된 수준을 나타내며 폐와 비장에서 가장 길게 유지된다(그룹당 n=4). *p<0.05 vs 생리 식염수 주사 동물.

도 2a. 실시간 PCR 분석은 블레오마이신에 대한 반응에서 모든 miR-29 패밀리 구성원의 감소를 나타내지만, miR-29 모방체 치료는 대조군 또는 생리 식염수 주사 동물과 비교하여 miR-29b 수준의 증가된 탐지를 초래하였다. *p<0.05 대 생리 식염수/생리 식염수.

도 2b. 실시간 PCR 분석은 정상 대조군과 비교하여 특발성 폐 섬유증(IPF) 환자의 폐 생검에서 miR-29 수준의 필적할만한 감소를 나타낸다. *p<0.05 대 정상.

도 2c. 트라이크롬(trichrome) 염색에 의한 조직 검사는 블레오마이신에 대한 반응으로 뚜렷한 섬유화 및 염증 반응을 나타내며 이는 miR-29b 모방체 치료로 문화되었다(blunted). 눈금 막대는 100 μm를 나타낸다.

도 2d. 총 콜라겐 함량을 분석하기 위한 하이드록시프롤린 측정은 생리 식염수 및 대조군 치료 그룹 모두에서 블레오마이신 치료 후 현저한 증가를 나타내었으나, 생리 식염수와 블레오마이신 치료 생쥐 사이에 miR-29 모방체 치료 그룹에서의 통계적 차이가 없었다.

도 2e-g. 기관지폐포 세척(BAL) 유체에 대한 사이토카인 측정은 현저히 높은 농도의 IL-12, IL-4 및 G-CSF가 블레오마이신 치료 생쥐로부터의 폐의 BAL 유체에서 탐지되었다는 것을 나타내었고, 이는 miR-29b 모방체에 의해 감소되었다. (n = 4), *p<0.05.

도 2h. 블레오마이신 치료는 BAL 유체에서 면역 세포의 탐지를 증가시키는데, 이는 miR-29b 모방체의 존재에서 현저히 감소되는 반면, 대조군 모방체는 효과가 없었다. (n = 4), *p<0.05 vs 생리 식염수/블레오, *p<0.05 vs 대조군/블레오.

도 3a-b. 실시간 PCR에 의해 측정된 바와 같이 블레오마이신 치료는 Col1a1 및 Col3a1의 발현을 증가시키고, miR-29b 모방체의 존재는 Col1a1 및 Col3a1을 억제한다. MiR-29b 모방체는 기준 조건하에서 표적 억제에 영향을 미치지 않는다. (n = 6-8), *p<0.05.

도 3c. BAL 유체에서 IGF1 수준은 블레오마이신 치료 후에 증가하며 이는 생리 식염수 및 대조군 모방체 치료 생쥐와 비교하여 miR-29 모방체의 존재에서 현저하게 문화되었다. (n = 4), *p<0.05.

도 3d. 면역조직화학은 블레오마이신 치료 후에 IGF1의 강력한 탐지를 나타내었고 이는 생리 식염수 및 대조군 모방체 치료 생쥐와 비교하여 miR-29 모방체 그룹에서 감소되었다. 눈금 막대는 50 μm를 나타낸다.

도 4a. 하이드록시프롤린 평가는 생리 식염수 및 대조군 치료 그룹 모두에서 블레오마이신 치료 후에 현저한 증가를 나타내었으나, 생리 식염수와 블레오마이신 치료 생쥐 사이에 miR-29 모방체 치료 그룹에서의 통계적 차이가 없었다. *P<0.05(n = 8).

도 4b-c. Col1a1(b) 및 Col3a1(c)에 대한 실시간 PCR 분석은 블레오마이신 치료로 현저한 증가를 나타내었다. miR-29b 모방체 치료는 Col1a1 및 Col3a1 모두를 비히를 치료 발현 수준으로 정규화시켰다. *P<0.05 (n = 8).

도 4d. 트라이크롬 염색에 의한 조직 검사는 블레오마이신에 대한 반응으로 강력한 섬유증을 나타내며, 이는 miR-29b 모방체 치료에 의해 둔화되었다.

도 4e-f. IPF 환자의 원발성 폐 섬유아세포를 비히클 또는 TGF- β 로 치료하고 대조군 모방체 또는 miR-29b 모방체로 형질감염시켰다. Colla1(e) 및 Col3a1(f)에 대해 실시간 PCR을 수행하였다. miR-29b 모방체 치료는 두 콜라겐에서 투여량 의존적 감소를 나타내었다.

도 4g-h. A549 세포를 비히클 또는 TGF- β 로 치료하고 대조군 모방체 또는 miR-29b 모방체로 형질감염시켰다. Colla1(g) 및 Col3a1(h)에 대해 실시간 PCR을 수행하였다. miR-29b 모방체 치료는 두 Colla1 및 Col3a1의 발현에서 투여량 의존적 감소를 나타내었다.

도 5. miR-29b 모방체는 독성의 일반적인 징후를 유도하지 않는다. MiR-29b 모방체 치료는 아스파테이트 또는 알라닌 트랜스아미나아제(ALT 및 AST)의 변화의 결여로 나타낸 바와 같이 간 또는 신장 독성의 명백한 징후를 유도하지 않는다. 그룹당 n = 4.

도 6. miR-29b 모방체 투여량의 증가는 기준 조건하에서 유전자 발현의 명백한 변화를 유도하지 못한다. 실시간 PCR 분석은 생리 식염수 주사 생쥐와 비교하여 Colla1 및 Col3a1에 대한 miR-29b 모방체의 증가하는 투여량에 의한 치료 4일 후에 상이한 조직에서 발현에 현저한 변화가 없음을 나타낸다. 그룹당 n = 4, 주사된 생리 식염수에 비해 *p<0.05.

도 7. miR-29b 모방체는 miR-29b를 특이적으로 증가시킨다. MiR-29b 모방체는 생리 식염수 주사 생쥐와 비교하여 miR-29a 또는 miR-29c의 수준에 영향을 주지 않으면서 miR-29b의 수준을 특이적으로 증가시킨다. 1일째 miR-29c의 증가는 실시간 프로브의 일부 교차 반응 때문일 것이다. 그룹당 n = 4.

도 8. miR-29b 모방체는 기준 조건에서 어떠한 표적 변화를 유도하지 않는다. 실시간 PCR 분석은 생리 식염수 주사 생쥐와 비교하여 Colla1 및 Col3a1에 대한 miR-29b 모방체의 125mpk를 주사한 후 지시된 시점에서 중요한 표적 변화가 없음을 나타내었다. 그룹당 n = 4.

도 9. miR-29b 모방체는 RAW 세포의 유전자 발현에 영향을 미친다. 실시간 PCR 분석은 비히클 또는 대조군 모방체에 비해 miR-29b 모방 치료 후에 Csf3, Igf1 및 Kc 발현에 현저한 증가를 나타내었다. 주사된 비히클에 비해 *p <0.05.

도 10a. miR29b 모방체 및 anti miR은 생쥐 피부에서 유전자 발현에 영향을 미친다. 상향 조절된 유전자가 적색으로 표시되고 하향 조절된 유전자가 청색으로 표시되고, 색의 강도가 PBS 조절과 관련된 배수 변화를 나타내는 마이크로 어레이 데이터의 히트맵이 제공된다. 히트맵의 상단 부분(짧은 점선 상자)은 miR-29b 모방체 치료에 의해 억제되고 anti miR-29 치료에 의해 상향 조절되는 유전자를 함유하며, 히트맵의 하단 부분(넓은 점선 상자)은 miR-29b 모방체 치료에 의해 상향 조절되고 anti miR-29 치료에 의해 억제되는 유전자를 함유한다. 모든 배수 변화 및 중요성 값은 표 5에 제공된다.

도 10b. miR29b 모방체 및 anti miR은 생쥐 피부에서 유전자 발현에 영향을 미친다. 도 10a에 도시된 두 그룹에 풍부한 기능 용어의 DAVID 분석(NCBI)이 제공된다. 세포외 매트릭스, (피부) 기능, 접착/세포 시그널링 및 세포 분화/세포 사멸에 대한 유전자 존재론(GO) 용어는 miR-29b 모방체 치료 이후 상부의 음으로 조절된 경로이며 세포질(Nuclear) 구조 및 RNA 프로세싱은 miR-29b 모방체 치료 이후 상부의 양으로 조절된 경로이다. C57BL/6 생쥐에서 피부 및 급성 피부 상처의 마이크로어레이 분석은 SEQ ID NO: 2 및 SEQ ID NO: 1을 포함하는 miR-29b 모방체 및 anti miR-29(SEQ ID NO: 36)에 의한 피내 치료에 의한 228개 유전자의 상호 조절을 나타낸다.

도 11a. 피내 miR-29b 모방체(SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 1) 또는 PBS 대조군으로 치료된 생쥐 절개창의 정량적 실시간(RT)-PCR 분석. 데이터는 각 치료 그룹의 첫 번째 막대는 오른쪽 목록의 첫 번째 유전자 발현 수준 등을 나타내는 그룹화된 막대 그래프로 제공된다. RT-PCR은 콜라겐, 다른 세포외 기질 유전자 및 miR-29b 모방체 치료에 의해 억제된 것으로 이미 나타내어진 다른 직접 및 간접 표적 유전자(도 10a, 히트맵의 상반부)는 급성 피부 상처에서 miR-29b 모방체 치료에 의한 발현에서 투여량 의존적 감소를 나타내는 것을 확인하였다. 두 인자가 평가됨에 따라 치료 및 유전자에 의한 2-원 ANOVA를 사용하는, **** p<0.0001 대 PBS 치료 절개.

도 11b. miR-29b 모방체 치료로 억제되지 않은 것으로 미리 확인된 유전자(도 10a, 히트맵의 하반부)는 정량적 RT-PCR에 의한 miR-29b 모방체 치료에 의한 발현에 투여량 의존적 증가를 나타낸다. 두 인자가 평가됨에 따라 치료 및 유전자에 의한 2-원 ANOVA를 사용하는, *** p<0.001 및 **** p<0.0001 대 PBS 치료 절개. miR-29b 모방체는 급성 피부 상처에서 miR-29 표적 유전자의 발현에 현저하게 영향을 미친다.

도 12. miR-29 모방체의 활성 및 뉴클레오티드 변형의 효과. IMR-90 인간 폐 섬유아세포에서 형질감염 실험은 상이한 miR-29 모방체는 콜라겐 유전자 발현의 억제에 의해 측정된 것과 같이 상이한 활성 수준을 갖는다는 것을 나타낸다. 두 인자가 평가됨에 따라 치료 및 유전자에 의한 2-원 ANOVA를 사용하는, * p<0.05, *** p<0.001 및 **** p<0.0001 대 모의 형질감염.

도 13. 링커 변형에 의한 miR-29b 모방체의 생체 내 활성. 절개창을 가진 생쥐는 콜레스테롤 모이어티와 두 번째/센스 가닥 사이의 결합에서만 상이한 20 nmol의 다양한 miR-29b 모방체로 치료되었다. miR-29b 모방체의 활성은 5개의 콜라겐 합성 유전자의 발현을 측정함으로써 결정되었다.

도 14. miR-29b 모방체의 활성에 대한 5' 인산화의 효과. RAB-9 폐부 섬유아세포는 안티센스 상에 5' 인산화가 있는 (SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 1) 및 5' 인산화가 없는 (SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 1) 다양한 농도의 miR-29b 모방체로 형질감염되었다. miR-29b 모방체의 활성은 3개의 콜라겐 합성 유전자의 발현을 측정함으로써 결정되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

지난 10년 동안 마이크로 RNA(miRNA) 치료제에 대한 큰 열광이 발전되었다. 흥분의 일부는 miRNA가 종종 많은 관련 mRNA를 조절한다는 사실에서 기인한다. 이와 같이, 단일 miRNA의 변조는 특정 질환과 관련된 여러 유전자의 병행 조절을 가능하게 한다. 많은 연구가 miRNA 억제제를 사용하여 치료 효과를 입증하였지만, miRNA의 기능을 회복시키거나 증가시키기 위한 노력은 뒤떨어져 있다.

[0025]

miR-29 패밀리는 조직 섬유증에서 명확한 기능에 대해 많은 주목을 받았다. 이 섬유아세포가 풍부한 miRNA 패밀리는 섬유성 질환에서 하향 조절되어 많은 세포의 기질 유전자의 동등한 증가를 유도한다. 본 발명자들은 합성 RNA 이중 가닥의 투여가 수일 동안 생체 내에서 miR-29 수준을 증가시킬 수 있다는 것을 발견했다. 또한, 블레오마이신-유도 폐 섬유증 동안 이런 miR-29 모방체의 치료적 전달은 기능을 회복시켜 콜라겐 발현을 감소시키고 폐 섬유증을 차단 및 역전시킨다. 또한, 폐부 절개에 대한 본 발명의 miR-29 모방체의 투여는 세포의 기질 유전자 및 섬유화 과정에 관여하는 다른 유전자를 하향 조절한다. 이런 데이터는 miRNA를 치료적으로 증가시키기 위한 효과적인 miRNA 모방체의 설계 가능성을 지원하고 miR-29가 콜라겐 생성 증가와 관련된 다양한 섬유증 질환 및 장애 치료를 위한 강력한 치료 miRNA가 될 것을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 miR-29 모방체, 조성물 및 이의 용도를 제공한다.

[0026]

본 발명에 따른 마이크로RNA 모방체 화합물을 제 1 가닥 및 제 2 가닥을 포함하며, 제 1 가닥은 성숙한 miR-29a, miR-29b 또는 miR-29c 서열을 포함하고, 제 2 가닥은 실질적으로 제 1 가닥에 상보적이고 적어도 하나의 변형 뉴클레오티드를 갖는다. 본 발명 전체에서, "마이크로RNA 모방체 화합물"이라는 용어는 "promiR-29", "miR-29 효현제", "마이크로RNA 효현제", "마이크로RNA 모방체", "miRNA 모방체" 또는 "miR-29 모방체"라는 용어와 상호 교환하여 사용될 수 있고; "제 1 가닥"이라는 용어는 "안티센스 가닥" 또는 "가이드 가닥"이라는 용어와 상호 교환하여 사용될 수 있고; "제 2 가닥"이라는 용어는 "센스 가닥" 또는 "패신저 가닥"이라는 용어와 상호 교환하여 사용될 수 있고, "miR-29 길항제"라는 용어는 "올리고뉴클레오티드 억제제", "anti miR-29" "안티센스 올리고뉴클레오티드", "miR-29 안타고미르" 또는 "안티-마이크로RNA 올리고뉴클레오티드"라는 용어와 상호 교환하여 사용될 수 있다.

[0027]

한 실시태양에서, 마이크로RNA 모방체 화합물의 제 1 가닥은 성숙한 miR-29a, miR-29b 또는 miR-29c의 서열을 포함하는 약 23 내지 약 26개의 뉴클레오티드를 포함하고 제 2 가닥은 제 1 가닥에 부분적으로, 실질적으로 또는 완전히 상보적인 서열을 포함하는 약 22 내지 약 23개 뉴클레오티드를 포함한다. 다양한 실시태양에서, 제 1 가닥은 약 23, 24, 25 또는 26개 뉴클레오티드를 포함할 수 있고 제 2 가닥은 약 22 또는 23개 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0028]

마이크로RNA 모방체 화합물의 제 1 및 제 2 가닥을 형성하는 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 변형 뉴클레오티드 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 마이크로RNA 모방체 화합물의 제 1 가닥 및 제 2 가닥은 리보뉴클레오티드 및/또는 변형 리보뉴클레오티드를 포함한다. "변형 뉴클레오티드"라는 용어는 핵염기 및/또는 당 모이어티가 비 변형 뉴클레오티드에 대한 변형된 뉴클레오티드를 의미한다.

[0029]

특정 실시태양에서, 마이크로RNA 모방체 화합물은 성숙한 miR-29a, miR-29b 또는 miR-29c 서열의 전부 또는 일부와 동일한 서열을 갖는 제 1 가닥 또는 안티센스 가닥 및 서열이 제 1 가닥의 서열에 대해 약 70% 내지 약 100% 상보적인 제 2 가닥 또는 센스 가닥을 갖는다. 한 실시태양에서, miRNA 모방체 화합물의 제 1 가닥은 성숙

한 자연 발생 miR-29a, miR-29b 또는 miR-29c 서열의 전체 서열에 대해 그 사이의 모든 정수를 포함하여 적어도 약 75, 80, 85, 90, 95 또는 100% 동일하다. 특정 실시태양에서, 제 1 가닥은 생쥐, 인간 또는 쥐 miR-29a, miR-29b 또는 miR-29c 서열과 같은 성숙한 자연 발생 miRNA의 서열과 약 또는 적어도 약 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일하다. 선택적으로, 제 1 가닥은 당 업계에 주지된 서열 정렬 알고리즘 및 방법과 비교하여 성숙한 자연 발생 miRNA와 공통으로 20, 21, 22 또는 23개 뉴클레오티드 위치를 포함할 수 있다.

[0030] 제 1 가닥의 서열은 제 1 가닥이 자연 발생 뉴클레오티드 대신에 변형 뉴클레오티드를 포함하는 경우에도 성숙한 miR-29a, miR-29b 또는 miR-29c의 서열과 동일하다고 간주된다. 예를 들어, 성숙한 자연 발생 miRNA 서열이 특정 위치에서 시티딘 뉴클레오티드를 포함하는 경우, 모방체 화합물의 제 1 가닥은 상응하는 위치에, 2'-플루오로-시티딘과 같은 변형 시티딘 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 또는 성숙한 자연 발생 miRNA 서열이 특정 위치에서 우리딘 뉴클레오티드를 포함하는 경우, 모방체 화합물의 제 1 가닥의 miRNA 영역은 상응하는 위치에 2'- 플루오로-우리딘, 2'-0-메틸-우리딘, 5-플루오로우라실, 또는 4-티오우라실과 같은 변형 우리딘 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 따라서, 변형 뉴클레오티드가 성숙 자연 발생 miRNA 서열에 존재하는 뉴클레오티드와 동일한 염기쌍 형성 능력을 갖는 한, 제 1 가닥의 서열은 성숙한 자연 발생 miRNA 서열과 동일하다고 간주된다. 일부 실시태양에서, 제 1 가닥은 5'-말단 잔기의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제 1 가닥은 5'-말단 모노포스페이트를 가질 수 있다. 일부 다른 실시태양에서, 제 1 가닥은 5'-말단 모노포스페이트를 함유하지 않는다.

[0031] 일부 실시태양에서, 마이크로RNA 모방체의 제 2 가닥은 제 1 가닥의 서열에 부분적으로 상보적이다. 예를 들어, 제 2 가닥의 서열은 제 1 가닥의 서열에 그 사이의 모든 값을 포함하여 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상보적이다. 일부 다른 실시태양에서, 제 2 가닥은 제 1 가닥의 서열에 실질적으로 상보적이다. 예를 들어, 제 2 가닥은 제 1 가닥의 서열에 그 사이의 모든 값을 포함하여 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상보적이다. 또 다른 일부 실시태양에서, 제 2 가닥의 서열은 제 1 가닥에 완전히 상보적일 수 있다. 특정 실시태양에서, 제 2 가닥의 상보적인 영역의 약 19, 20, 21, 22 또는 23개 뉴클레오티드는 제 1 가닥에 상보적일 수 있다.

[0032] 제 2 가닥의 서열은 제 2 가닥이 자연 발생 뉴클레오티드 대신에 변형 뉴클레오티드를 포함하는 경우에도 제 1 가닥에 상보적인 것으로 간주된다. 예를 들어, 제 1 가닥 서열이 특정 위치에 구아노신 뉴클레오티드를 포함하는 경우, 제 2 가닥은 상응하는 위치에 2'-0-메틸-시티딘과 같은 변형 시티딘 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0033] 일부 실시태양에서, 제 2 가닥은 제 1 가닥에 대해 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 개의 미스 매치를 포함한다. 즉, 제 1 가닥과 제 2 가닥 사이의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개까지의 뉴클레오티드는 상보적이 아닐 수 있다. 한 실시태양에서, 미스매치는 연속적이지 않고 제 2 가닥 전체에 분포된다. 다른 실시태양에서, 미스매치는 연속적이고 돌출부를 생성할 수 있다. 한 실시태양에서, 제 2 가닥은 제 1 가닥에 대해 3개의 미스매치를 함유한다. 특정 실시태양에서, miR-29a 모방체 또는 miR-29c 모방체의 제 2 가닥은 제 1 가닥에 대해 (제 2 가닥의) 3' 말단으로부터 위치 4, 13 및/또는 16에 미스매치를 함유한다. 한 실시태양에서, miR-29b 모방체의 제 2 가닥은 제 1 가닥에 대해 (제 2 가닥의) 3' 말단으로부터 위치 4, 13 및/또는 16에 미스매치를 함유한다. 다른 실시태양에서, miR-29b 모방체의 제 2 가닥은 제 1 가닥에 대해 (제 2 가닥의) 3' 말단으로부터 위치 4, 9, 10, 11, 13 및/또는 16에 미스매치를 함유한다.

[0034] 일부 실시태양에서, 모방체 화합물의 제 1 및/또는 제 2 가닥은 가닥의 5' 또는 3' 말단에 오버행을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 제 1 가닥은 3' 오버행, 즉 제 2 가닥에 대해 이중 가닥 영역을 넘어 연장되는 단일 가닥 영역을 포함한다. 제 1 가닥의 3' 오버행은 약 1개 뉴클레오티드 내지 약 4개 뉴클레오티드의 범위일 수 있다. 특정 실시태양에서, 제 1 가닥의 3' 오버행은 1 또는 2개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 제 1 가닥에서 3' 오버행을 포함하는 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결된다. 제 1 가닥에 3' 오버행을 포함하는 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 변형 뉴클레오티드 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 제 1 가닥에서 3' 오버행은 2개의 리보뉴클레오티드를 포함한다. 한 실시태양에서, 제 1 가닥의 3' 오버행은 포스포로티오에이트 결합을 통해 연결된 2개의 우리딘 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시태양에서, 제 1 가닥은 오버행을 함유하지 않을 수 있다.

[0035] 한 실시태양에서, 본 발명의 miR-29 모방체의 제 2/센스 가닥의 뉴클레오티드는 포스포다이에스터 결합에 의해 연결되고 제 1/안티센스 가닥의 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 결합을 통해 서로 연결되는 3' 말단에서 마지막 3개 뉴클레오티드를 제외하고 포스포다이에스터 결합에 의해 연결된다.

[0036] 다양한 실시태양에서, 본 발명의 miR-29 모방체는 변형 뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 한 실시태양에서,

모방체의 제 1 가닥은 하나 이상의 2'-플루오로 뉴클레오티드를 포함한다. 다른 실시태양에서, 제 1 가닥은 어떠한 변형 뉴클레오티드를 포함하지 않을 수 있다. 한 실시태양에서, 제 2 가닥은 하나 이상의 2'-O-메틸 변형 뉴클레오티드를 포함한다.

[0037]

다양한 실시태양에서, 본 발명에 따른 miR-29 모방체는 아래 표에 열거된 제 1 및 제 2 가닥을 포함한다. 변형의 정의는 표 4에 제공되어 있다. 이런 miR-29 모방체 화합물은 전문이 참조로 본 발명에 포함되는 WO 2009/018493에 기술된 용도 및 조건을 포함하여, 세포에서 세포외 기질 유전자의 발현을 조절하고, 조직 섬유증, 진피 섬유증과 같은 관련 질환을 치료하는데 유용하다.

표 1

miR-29a 모방체

변형 서열	SEQ ID NO.
제 2/센스/페신저 가닥	
5'-mU.mA.rA.rC.rC.rG.rA.rU.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.mU.rA-3'	4
5'-mU.mA.rA.mC.mC.rG.mU.mU.rA.mC.rA.rG.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mU.rA.cho16-3'	5
5'-mU.mA.rA.rC.rC.rG.rA.rU.rU.rU.rC.rA.rG.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rAs.rUs.rUs.cho16-3'	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
제 1/안티센스/가이드 가닥	
5'-p.rU.rA.rG.rC.rC.rA.rU.rC.rU.rG.rA.rA.rU.rC.rG.rG.rU.rA.rU.rU-3'	6
5'-p.fU.rA.rG.fC.rC.rA.fC.fC.rU.fU.fC.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rG.rG.fU.fU.rAs.rUs.rU-3'	7
5'-fU.rA.rG.fC.rA.fC.fC.rU.fU.fC.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rG.rG.fU.fU.rAs.rUs.rU-3'	27
5'- rU.rA.rG.rC.rA.rC.rU.rC.rU.rG.rA.rA.rU.rC.rG.rU.rU.rA.rU.rU-3'	38

표 2

miR-29b 모방체

변형 서열	SEQ ID NO.
제 2/센스/페신저 가닥	
5'-mA.mA.rC.rA.rC.rU.rG.rA.rU.rU.rU.rC.rA.rA.rU.rG.rG.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.cho16-3'	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.cho16-3'	10
5'-mA.mA.mC.rA.mC.mU.rG.mU.mU.mU.rA.mC.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.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA.cho16-3'	14
5'-mA.mA.mC.rA.mC.mU.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rA.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA.cho16-3'	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.cho16-3'	15
5'-C6Cho1.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.mU.mC.mC.mU.rA.cho19-3'	17
5'- rA.mA.rC.mA.rC.mU.rG.mA.rU.mU.rU.mC.rA.rA.rA.mU.rG.mG.rU.mG.rC.mU.rA.cho16-3'	28
5'- rA.mA.rC.mA.rC.mU.rG.mA.rU.mU.mC.rA.rA.rA.mU.rG.mG.rU.mG.rC.mU.rA.cho16-3'	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.cho1TEG- 3'	30
5'- mA.mA.rC.rA.rC.rU.rG.rA.rU.rU.rC.rA.rA.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rA-3'	39
제 1/안티센스/가이드 가닥	
5'-p.rU.rA.rG.rC.rA.rC.rC.rA.rU.rU.rU.rG.rA.rA.rU.rC.rA.rG.rU.rG.rU.rU.rU- 3'	18
5'-p.fU.rA.rG.fC.rA.fC.fC.rU.fU.fU.fU.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rA.rG.fU.rG.fU.fU.rUs.rU-3'	2
5'-fU.rA.rG.fC.rA.fC.fU.fU.fU.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rA.rG.fU.rG.fU.fU.fU.rUs.rU-3'	19
5'-p.fU.rA.rG.fC.rA.fC.fC.fC.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rA.rG.fU.rG.fU.fU.fU.rUs.rU-3'	20
5'-rU.rA.rG.rC.rA.rC.rU.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rU.rC.rA.rG.rU.rG.rU.rU.rU-3'	21
5'- mU.rA.mG.rC.mA.rC.mU.rU.mU.rG.mA.rA.mA.rU.mC.rA.mG.rU.mG.rU.mU- 3'	31
5'- mU.rA.mG.rC.mA.rC.mU.rU.mU.rG.mA.rA.mA.rU.mC.rA.mG.rU.mG.rU.mUs.rUs.rU- 3'	32
5'- mU.rA.rG.mC.rA.mC.mU.mU.rG.rA.rA.rA.mU.mC.rA.rG.mU.mU.mUs.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.rC.rA.rU.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rU.rC.rA.rG.rU.rG.rU.rU.rU.rU-3'	40

표 3

miR-29c 모방체

[0040]

변형 서열	SEQ ID NO.
제 2/센스/페신저 가닥	
5'-mA.rA.rC.rC.rA.rU.rU.rC.rA.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rA.rU-3'	22
5'-mU.mA.rA.mC.mC.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mU.rA-3'	23
5'-mU.mA.rA.mC.mC.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mU.rA.chol6-3'	24
5'-mA.rA.rC.rC.rG.rA.rU.rU.rC.rA.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rAs.rUs.rUs.chol6-3'	12
5'- mU.mA.rA.rC.rC.rG.rA.rU.rU.rC.rA.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU-3'	41
제 1/안티센스/가이드 가닥	
5'-p.rU.rA.rG.rC.rA.rC.rA.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rU.rC.rG.rG.rU.rA.rU-3'	25
5'-p.fU.rA.rG.fC.rA.fC.fU.fU.fU.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rG.rG.fU.rAs.rUs.rU-3'	26
5'-fU.rA.rG.fC.rA.fC.fU.fU.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rG.rG.fU.fU.rAs.rUs.rU-3'	35
5'- rU.rA.rG.rC.rA.rC.rA.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rU.rC.rG.rG.rU.rA.rU-3'	42

표 4

약어의 정의

[0041]

뉴클레오티드 단위 또는 변형	약어	뉴클레오티드 단위 또는 변형	약어
리보 A	rA	리보 A P=S	rAs
리보 G	rG	리보 G P=S	rGs
리보 C	rC	리보 C P=S	rCs
리보 U	rU	리보 U P=S	rUs
O-메틸 A	mA	O-메틸 A P=S	mAs
O-메틸 G	mG	O-메틸 G P=S	mGs
O-메틸 C	mC	O-메틸 C P=S	mCs
O-메틸 U	mU	O-메틸 U P=S	mUs
플루오로 C	fC	플루오로 C P=S	fCs
플루오로 U	fU	플루오로 U P=S	fUs
데옥시 A	dA	데옥시 A P=S	dAs
데옥시 G	dG	데옥시 G P=S	dGs
데옥시 C	dC	데옥시 C P=S	dCs
데옥시 T	dT	데옥시 T P=S	dTs
모노포스페이트	p		
6개 탄소 링커를 가진 콜레스테롤 접합체	Chol6/C6 chol		
9개 탄소 링커를 가진 콜레스테롤 접합체	Chol9		

[0042]

특정 실시태양에서, miR-29a 모방체는 SEQ ID NO: 27을 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 5를 포함하는 제 2 가닥을 포함한다. 다른 실시태양에서, miR-29a 모방체는 SEQ ID NO: 7을 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 5를 포함하는 제 2 가닥을 포함한다.

[0043]

일부 실시태양에서, miR-29b 모방체는 SEQ ID NO: 19를 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 1을 포함하는 제 2 가닥을 포함한다. 일부 다른 실시태양에서, miR-29b 모방체는 SEQ ID NO: 2를 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 1을 포함하는 제 2 가닥을 포함한다. 또 일부 다른 실시태양에서, miR-29b 모방체는 SEQ ID NO: 19를 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 15를 포함하는 제 2 가닥을 포함한다. 또 일부 다른 실시태양에서, miR-29b 모방체는 SEQ ID NO: 1을 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 15를 포함하는 제 2 가닥을 포함한다.

체는 SEQ ID NO: 33을 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 1을 포함하는 제 2 가닥을 포함한다. 또 일부 다른 실시태양에서, miR-29b 모방체는 SEQ ID NO: 34를 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 1을 포함하는 제 2 가닥을 포함한다. 또 일부 다른 실시태양에서, miR-29b 모방체는 SEQ ID NO: 19를 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 30을 포함하는 제 2 가닥을 포함한다.

[0044] 특정 실시태양에서, miR-29c 모방체는 SEQ ID NO: 35를 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 24를 포함하는 제 2 가닥을 포함한다. 다른 실시태양에서, miR-29c 모방체는 SEQ ID NO: 26을 포함하는 제 1 가닥 및 SEQ ID NO: 24를 포함하는 제 2 가닥을 포함한다.

[0045] 본 발명의 마이크로RNA 모방체 화합물에 사용될 수 있는 변형 뉴클레오티드는 염기 변형 또는 치환을 갖는 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. RNA의 천연 또는 비변형 염기는 푸린 염기 아데닌(A)과 구아닌(G), 피리미딘 염기 시토신(C)과 우라실(U)(DNA에는 티민(T)을 가진다)이다. 대조적으로, 헤테로사이클릭 염기 모이어티로 또한 불리는 변형 염기는 5-메틸시토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 아데닌과 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌과 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5- 할로우라실 및 시토신, 5-프로파인일 우라실 및 시토신 및 피리미딘 염기의 다른 알카인일 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (수도우라실), 4-티오우라실, 8- 할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환 아데닌 및 구아닌, 5- 할로(5-브로모, 5-트라이플루오로메틸 및 다른 5-치환 우라실 및 시토신 포함), 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2- 아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌과 같은 다른 합성 및 자연 핵염기를 포함한다.

[0046] 일부 실시태양에서, 마이크로RNA 모방체 화합물은 변형 당 모이어티를 갖는 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 대표적인 변형 당은 카보사이클릭 또는 비사이클릭 당, 2', 3' 또는 4' 위치 중 하나 이상에 치환기를 갖는 당 및 당의 하나 이상의 수소 원자 대신 치환기를 갖는 당을 포함한다. 특정 실시태양에서, 당은 2' 위치에 치환기를 가짐으로써 변형된다. 추가의 실시태양에서, 당은 3' 위치에 치환기를 가짐으로써 변형된다. 다른 실시태양에서, 당은 4' 위치에 치환기를 가짐으로써 변형된다. 당은 당해 위치 중 하나 이상에서 변형을 가질 수 있거나 또는 RNA 문자가 하나의 위치에서 당 변형을 갖는 하나 이상의 뉴클레오티드 및 다른 위치에서 당 변형을 갖는 하나 이상의 뉴클레오티드를 가질 수 있다는 것도 또한 고려된다.

[0047] miRNA 모방체 화합물에서 고려되는 당 변형은 OH; F; O-, S- 또는 N-알킬; O-, S- 또는 N-알켄일; O-, S- 또는 N-알카인일; 또는 O-알킬-O-알킬로부터 선택된 치환기를 포함하거나 이에 제한되지 않으며, 알킬, 알켄일 및 알카인일은 치환 또는 비치환 C₁ 내지 C₁₀ 알킬 또는 C₂ 내지 C₁₀ 알켄일 및 알카인일일 수 있다.

[0048] 일부 실시태양에서, miRNA 모방체 화합물은 C₁ 내지 C₁₀ 저급 알킬, 치환 저급 알킬, 알켄일, 알카인일, 알카릴, 아랄킬, O-알카릴 또는 O-아랄킬, SH, SCH₃, Cl, Br, CN, OCN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알카릴, 아미노알킬아미노 또는 유사한 치환기로부터 선택된 당 치환기를 가진다. 한 실시태양에서, 변형은 2'-메톡시에톡시(2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로도 공지된 (2'-O-CH₂CH₂OCH₃), 즉 알콕시알콕시기를 포함한다. 또 다른 변형은 2'-다이메틸아미노옥시에톡시, 즉, 2'-DMAOE로 알려진 O(CH₂)₂ON(CH₃)₂ 그룹 및 2'-다이메틸아미노에톡시에톡시(당업계에서 2'-O-다이메틸-아미노-에톡시-에틸 또는 2'-DMAEOE로 공지됨), 즉, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂를 포함한다.

[0049] 2' 위치(2')- 상의 당 치환기는 아라비노(위) 또는 리보(아래) 위치에 있을 수 있다. 하나의 2'-아라비노 변형은 2'-F이다. 다른 유사한 변형이 당 모이어티 상의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오시드 또는 2'-5' 연결을 리고뉴클레오티드에서 당의 3' 위치 및 5' 말단 뉴클레오티드의 5' 위치에서 이루어질 수 있다.

[0050] 특정 실시태양에서, 당 변형은 2'-O-알킬 (예를 들어, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸), 2'-할로(예를 들어, 2'-플루오로, 2'-클로로, 2'-브로모) 및 4' 티오 변형이다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, miR-29a, miR-29b, 또는 miR-29c 모방체 화합물의 제 1 가닥은 하나 이상의 2' 플루오로 뉴클레오티드를 포함한다. 다른 실시태양에서, 모방체 화합물의 제 1 가닥은 변형 뉴클레오티드를 갖지 않는다. 또 다른 실시태양에서, miR-29a, miR-29b, 또는 miR-29c 모방체 화합물의 제 2 가닥은 하나 이상의 2'-O-메틸 변형 뉴클레오티드를 포함한다.

[0051] 본 발명의 마이크로RNA 모방체 화합물의 제 1 및 제 2 가닥은 또한 하나 이상의 포스포로티오에이트, 모르폴리노 또는 포스포노카르복실레이트 결합과 같은 주체 변형을 포함할 수 있다(예를 들어, 전문이 참조로 본 발명에 포함된 미국특허 제6,693,187호 및 제7,067,641호 참조). 예를 들어, 일부 실시태양에서, 제 1 가닥에 3' 오버

행을 포함하는 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결된다.

[0052]

일부 실시태양에서, 마이크로RNA 모방체 화합물은 스테로이드(콜레스테롤), 비타민, 지방산, 탄수화물 또는 클리코시드, 펩타이드, 또는 생체 내 전달과 안정성을 촉진하는 다른 소분자 리간드와 같은 담체 분자에 접합된다. 바람직하게는, 담체 분자는 링커 또는 스페이서 그룹을 통해 3' 또는 5' 말단에서 마이크로RNA 모방체 화합물의 제 2 가닥에 부착된다. 다양한 실시태양에서, 담체 분자는 콜레스테롤, 콜레스테롤 유도체, 콜산 또는 콜산 유도체이다. 전문이 참조로 본 발명에 포함된 미국특허 제7,202,227호에 개시된 담체 분자의 사용이 또한 고려된다. 특정 실시태양에서, 담체 분자는 콜레스테롤이며 적어도 6개의 탄소 링커를 통해 제 2 가닥의 3' 또는 5' 말단에 부착된다. 한 실시태양에서, 담체 분자는 6개 또는 9개의 탄소 링커를 통해 제 2 가닥의 3' 말단에 부착된다. 일부 실시태양에서, 링커는 절단 가능한 링커이다. 다양한 실시태양에서, 링커는 실질적으로 선형인 탄화수소 모이어티를 포함한다. 탄화수소 모이어티는 약 3 내지 약 15개의 탄소 원자를 포함 할 수 있고 에터 또는 티오에터 결합과 같은 비교적 비극성 기를 통해 콜레스테롤에 접합될 수 있다. 특정 실시태양에서, 탄화수소 링커/스페이서는 선택적으로 치환된 C2 내지 C15 포화 또는 불포화 탄화수소 사슬(예를 들어, 알킬렌 또는 알켄일렌)을 포함한다. 전문이 본 발명에 참고로 포함된 미국특허 출원 제2012/0128761호에 기술된 다양한 링커/스페이서기가 본 발명에 사용될 수 있다.

[0053]

다양한 실시태양에서, 본 발명은 본 발명에 기술된 치료적 유효량의 miR-29a, miR-29b 및/또는 miR-29c 모방체의 적어도 하나를 대상에게 투여하는 단계를 포함하여, 필요한 대상에서 섬유성 질환을 치료, 개선 또는 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명의 miR-29 모방체를 사용하여 치료할 수 있는 섬유성 질환은 폐 섬유증, 심장 섬유증, 간 섬유증, 신장 섬유증, 당뇨병성 섬유증, 골격근 섬유증 및 안구 섬유증과 같은 조직 섬유증; 및 켈로이드, 피부 경화증, 전신 경화증(경피증), 비대성 반흔, 순/관절/힘줄 섬유증 및 페이로니 질환과 같은 피부/피부 섬유증을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 한 실시태양에서, 본 발명의 miR-29 모방체를 사용하여 치료된 섬유성 질환은 특발성 폐 섬유증이다. 특정 섬유화 질환을 치료하는데 miR-29 효현제의 사용은 본 발명에 참조로 포함된 미국특허 제8,440,636호에 기술된다.

[0054]

한 실시태양에서, 본 발명의 miR-29 모방체의 투여는 대상의 세포에서 하나 이상의 세포외 기질 유전자의 발현 또는 활성을 감소시킨다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 miR-29 모방체의 투여는 개체의 세포에서 하나 이상의 콜라겐 합성 유전자의 발현 또는 활성을 감소시킨다. 또 다른 실시태양에서, miR-29 모방체의 투여는 피부 발달, 표피 발달, 외배엽 발달 및 세포 항상성에 관여하는 하나 이상의 유전자의 발현 또는 활성을 상향 조절한다. 다양한 유전자의 발현 또는 활성이 본 발명의 miR-29 모방체에 의해 조절되는 대상의 세포는 섬유아세포 및 표피 세포를 포함한다. 일부 실시태양에서, miR-29 모방체의 투여는 섬유증과 관련된 염증 반응을 하향 조절한다. 예를 들어, miR-29 모방체의 투여는 섬유증 환자에서 IL-12, IL-4, GCSF 및 TNF- α 와 같은 전 염증성 사이토카인의 수준을 감소시킨다. miR-29 모방체의 투여는 또한 섬유성 조직 또는 기관에서 호중구, 림프구, 단핵구 및 대식세포와 같은 면역 이팩터 세포의 침윤을 감소시킬 수 있다.

[0055]

특정 실시태양에서, 본 발명은 세포를 본 발명의 miR-29 모방체와 접촉시키는 단계를 포함하여 세포에서 세포외 기질 유전자를 조절하는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 세포를 본 발명의 miR-29 모방체와 접촉시키는 단계를 포함하여 세포에서 콜라겐 합성 유전자를 조절하는 방법을 제공한다. 치료 또는 접촉시, miR-29 모방체는 세포외 기질 유전자 또는 콜라겐 합성 유전자의 발현 또는 활성을 감소시킨다.

[0056]

본 발명에 사용된 용어 "대상" 또는 "환자"는 인간 및 다른 영장류(예를 들어, 침팬지 및 다른 유인원 및 원숭이 종), 농장 동물(예를 들어, 소, 양, 돼지, 염소 및 말), 가정용 포유류(예를 들어, 개 및 고양이), 실험용 동물(예를 들어, 생쥐, 쥐 및 기니피그 등의 설치류) 및 조류(예를 들어, 닭, 칠면조 및 다른 가금류, 오리, 오리, 거위 등과 같은 가정용, 야생용 및 경기용 조류)를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 척추동물을 의미한다. 일부 실시태양에서, 대상은 포유동물이다. 다른 실시태양에서, 대상은 인간이다.

[0057]

또한, 본 발명은 miR-29 효현제(예를 들어, 약물 또는 miR-29 모방체) 또는 miR-29 길항제(예를 들어, 약물 또는 anti miR-29)에 의한 치료 효과를 평가하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 치료 효과를 평가하는 방법은 miR-29 모방체 또는 miR-29 길항제로 치료하기 전에 대상의 세포 또는 섬유성 조직에서 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계로서, 하나 이상의 유전자는 miR-29에 의해 조절되는 유전자 세트, 예를 들어, 표 5에 열거된 유전자로부터 선택된다; miR-29 모방체 또는 miR-29 길항제로 처리한 후 대상의 세포/섬유화 조직에서 동일한 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 치료 전후의 발현 수준에 기초하여 치료가 효과적, 덜 효과적 또는 비효과적인 것을 측정하는 단계를 포함한다. 즉, 한 실시태양에서, 표 5에 열거된 유전자는 miR-29 모방체 또는 miR-29 길항제 치료의 임상 효과에 대한 바이오마커로서 작용한다. 한 실시태

양에서, 치료 전후의 유전자 발현에서 통계적으로 유의한 차이는 치료가 효과적이라는 것을 나타낸다. 다른 실시태양에서, 치료 전후의 유전자의 발현에서 적어도 1배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배 또는 4배의 차이는 치료가 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0058] 또한, 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명에 따른 miR-29a, miR-29b 및/또는 miR-29c의 하나 이상의 마이크로RNA 모방체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0059] 한 실시태양에서, 약학적 조성물은 치료적 유효량의 miR-29a 모방 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하며, 모방체 화합물의 제 1 가닥은 성숙한 miR-29a 서열을 포함하고 제 2 가닥은 제 1 가닥에 실질적으로 상보적이다. 다른 실시태양에서, 약학적 조성물은 치료적 유효량의 miR-29b 모방체 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하며, 모방체 화합물의 제 1 가닥은 성숙한 miR-29b 서열을 포함하고 제 2 가닥은 제 1 가닥에 실질적으로 상보적이다. 또 다른 실시태양에서, 약학적 조성물은 치료적 유효량의 miR-29c 모방체 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하며, 모방체 화합물의 제 1 가닥은 성숙한 miR-29c 서열을 포함하고 제 2 가닥은 제 1 가닥에 실질적으로 상보적이다.

[0060] 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 치료 유효량의 본 발명의 적어도 2개의 마이크로RNA 모방체 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함한다. 예를 들어, 약학적 조성물은 miR-29a 및 miR-29b 모방체; miR-29a 및 miR-29c 모방체; 또는 miR-29b 및 miR-29c 모방체의 조합을 포함한다. 선택적으로, 조성물은 동일한 마이크로RNA의 2개의 모방체를 포함할 수 있다. 또 다른 일부 다른 실시태양에서, 본 발명은 본 발명의 치료적 유효량의 본 발명의 3개의 마이크로RNA 모방체 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 예를 들어, 약학적 조성물은 miR-29a, miR-29b 및 miR-29c 모방체의 조합을 포함할 수 있다.

[0061] 바람직하게는, 본 발명에 따른 적어도 2개의 마이크로RNA 모방체 화합물을 포함하는 약학적 조성물에서, 제 1 및 제 2 모방체 화합물 또는 제 1, 제 2 및 제 3 모방체 화합물은 등물 농도로 존재한다. 약 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:2:1, 1:3:1, 1:4:1, 1:2:3, 1:2:4와 같은 다른 혼합비는 miR-29a, miR-29b 및 miR-29c 모방체 화합물 중 적어도 2개를 포함하는 약학적 조성물을 제조하기 위해 고려된다.

[0062] 일부 실시태양에서, 본 발명의 하나 이상의 마이크로RNA 모방체 화합물은 동시에 그러나 별개의 조성물에 투여될 수 있고, 동시에 모방체 화합물이 짧은 시간 내에, 예를 들어 서로의 약 5, 10, 20 또는 30분 내에 투여되는 것을 참조한다. 일부 다른 실시태양에서, miR-29a, miR-29b 및/또는 miR-29c 모방체 화합물은 상이한 시간에 별개의 조성물에 투여될 수 있다.

[0063] 본 발명은 또한 추가의 치료제가 miR-29a, miR-29b 및/또는 miR-29c 모방체 화합물과 함께 투여될 수 있는 실시태양을 포함한다. 한 실시태양에서, 추가의 치료제는 제 2 항-섬유화제이다. 추가의 치료제는 동시에 그러나 별도의 제형으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 다른 실시태양에서, 추가의 치료제는 miR-29a, miR-29b 및/또는 miR-29c 모방체 화합물의 투여 전후 다른 시간에 투여될 수 있다. 임상 응용이 고려되는 경우, 약학적 조성물은 의도된 응용에 적합한 형태로 제조될 것이다. 일반적으로, 이는 발열 물질뿐만 아니라 인간 또는 동물에게 해를 줄 수 있는 다른 불순물이 본질적으로 없는 조성물의 제조를 수반할 것이다.

[0064] 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드, 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀, 리포솜 및 엑소좀을 포함하는 지질-기반 시스템과 같은 콜로이드 분산 시스템이 miR-29a, miR-29b 및/또는 miR-29c 모방체 화합물을 위한 전달 비히클로서 사용될 수 있다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 miR-29 모방체는 흡입 전달을 위해 에어로졸화될 수 있는 리포솜 입자로 제제화될 수 있다.

[0065] 본 발명의 핵산을 표적 조직으로 전달하기에 적합한 상업적으로 구입가능한 지방 에멀전은 Intralipid®, Liposyn®, Liposyn®II, Liposyn®III, Nutrilipid, 및 다른 유사한 지질 에멀전을 포함한다. 생체 내 전달 비히클로 사용하기 위한 바람직한 콜로이드 시스템은 리포솜(즉, 인공 막소포)이다. 이러한 시스템의 제조 및 사용은 당업계에 주지되어 있다. 예시적인 제제는 또한 전문이 본 발명에 참조로서 포함되는 US 5,981,505; US 6,217,900; US 6,383,512; US 5,783,565; US 7,202,227; US 6,379,965; US 6,127,170; US 5,837,533; US 6,747,014; 및 WO03/093449에서 개시된다.

[0066] 특정 실시태양에서, 전달에 사용되는 리포솜은 미국특허 출원 공개공보 제 20110076322호에 상세히 기술된 SMARTICLES®(Marina Biotech, Inc.)와 같은 친양쪽성 리포솜이다. SMARTICLES®의 표면 전하는 완전히 가역적이라서 이를 핵산 전달에 특히 적합하게 만든다. SMARTICLES®는 주사를 통해 전달되고, 안정적으로 유지되며,

핵산을 전달하기 위해 유리 세포 및 교차 세포막을 응집시킬 수 있다.

[0067] 일반적으로 전달 비히클을 안정하게 하고 표적 세포에 의한 흡수를 허용하는 적절한 염 및 버퍼를 사용하기를 원할 것이다. 본 발명의 수성 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체(carrier) 또는 수성 매질(aqueous medium)에 용해 또는 분산된 miR-29 모방체(예를 들어, 리포솜 또는 다른 복합체)을 포함하는 유효량의 전달 비히클을 포함한다. "약학적으로 허용가능한" 또는 "약리학적으로 허용가능한"이란 문구는 동물 또는 사람에게 투여되었을 때, 해로운, 알레르기, 또는 다른 뜻밖의(untoward) 반응들을 일으키지 않는 분자 독립체(molecular entities) 및 조성물을 나타낸다. 본 발명에 사용된 "약학적으로 허용가능한 담체"는 용매, 버퍼, 용액, 분산매, 코팅, 항균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 및 인간에 투여하기 적합한 약과 같은 약의 제제화에 사용이 허용되는 다른 물질을 포함한다. 약학적 활성 물질들을 위한 이와 같은 매질 및 제제의 사용은 당업계에 주지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 본 발명의 활성 성분과 양립 불가능한 것을 제외하고는, 치료 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 보충적인 활성 성분들은 이들이 조성물의 폴리뉴클레오티드를 불활성화하지 않는 경우 또한 조성물에 혼합될 수 있다.

[0068] 한 실시태양에서, 본 발명의 약학적 조성물은 폐, 비강, 비강 내 또는 안구 전달용으로 제제화되며, 분말, 수용액, 수성 에어로졸, 점비액, 에어로졸 및/또는 점안액의 형태일 수 있다. 비강/비강 내 투여용 고체 제제는 락토오스 또는 텍스트란과 같은 부형제를 함유할 수 있다. 비강/비강 내 투여용 액체 제제는 에어로졸, 점비액 또는 계량 스프레이의 형태로 사용하기 위한 수성 또는 유성 용액일 수 있다. 폐/비강/비강 내 투여용 제제는 또한, 예를 들어, 글리코콜산, 콜산, 타우로 콜산, 에토콜산, 데옥시콜산, 케노데옥시콜산, 데하이드로콜산, 글리코데옥시콜산, 이들 산의 염 및 사이클로텍스트린과 같은 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0069] 일부 실시태양에서, 흡입을 통한 폐/비강/비강 내 투여용 제제는 건조 분말 제제, 리포솜 제제, 나노 혼탁액 제제 또는 미세 혼탁액 제제를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0070] 일부 실시태양에서, 폐/비강/비강 내 전달용 약학적 조성물은 흡입 장치를 사용하여 투여된다. 용어 "흡입 장치"는 miR-29 모방체 조성물을 대상의 호흡 기도에 투여할 수 있는 임의의 장치를 의미한다. 흡입 장치는 정량 흡입기(MDI), 건조 분말 흡입기(DPI), 제트 분무기, 초음파 분무기, 열 기화기, 연무 흡입기, 열 에어로졸 흡입기, 전기유체역학 기반 용액 분무 흡입기와 같은 장치를 포함한다. 흡입 장치는 또한 고효율 분무기를 포함한다. 일부 실시태양에서, 분무기는 제트 분무기, 초음파 분무기, 맥동 막 분무기, 다중 구멍을 갖는 진동 메쉬 또는 플레이트를 포함하는 분무기, 진동 발생기 및 수성 챔버를 포함하는 분무기, 또는 대상의 폐에 에어로졸화 수용액의 흡기 흐름을 돋기 위한 제어 장치 특징을 사용하는 분무기이다. 분무기, 정량 흡입기 및 연무 흡입기는 쉽게 흡입될 수 있는 액적 크기를 포함하는 에어로졸을 형성함으로써 약품을 전달한다.

[0071] 일부 실시태양에서, 고효율 분무기로 투여된 조성물은 하나 이상의 miR-29 모방체 및 정제수, 만니톨, 계면 활성제 및 염화나트륨 및 EDTA 나트륨 등과 같은 염과 같은 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함한다.

[0072] 본 발명의 활성 조성물은 전형적인 약학 제제를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 이들 조성물의 투여는 표적 조직이 그 경로를 통해 이용 가능한 한 임의의 통상적인 경로를 통해 이루어질 수 있다. 경로는 구강, 비강(흡입), 안구 또는 협측이 포함된다. 선택적으로, 투여는 피내, 피하, 근육 내, 복강 내 또는 정맥 내 주사에 의해, 또는 심근 조직으로의 직접 주사에 의한 것일 수 있다. miRNA 모방체를 포함하는 약학적 조성물은 치료제를 심장에 전달하기 위해 관상 순환을 분리하는 카테터 시스템 또는 시스템에 의해 투여될 수도 있다. 심장 및 관상 혈관계에 치료제를 전달하기 위한 다양한 카테터 시스템이 당업계에 공지되어 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 카테터-기반 전달 방법 또는 관상 격리 방법의 일부 비 제한적인 예들은 전문이 본 발명에 참조로서 포함되는 미국특허 제6,416,510호; 미국특허 제6,716,196호; 미국특허 제6,953,466호, WO 2005/082440, WO 2006/089340, 미국특허공보 제2007/0203445호, 미국특허공보 제2006/0148742호, 및 미국특허공보 제2007/0060907호에 개시된다. 이런 조성물은 일반적으로 본 발명에 기재된 바와 같은 약학적으로 허용가능한 조성물로서 투여될 것이다.

[0073] 본 발명의 다른 실시태양에서, 본 발명에 기술된 miR-29 모방체를 포함하는 조성물은 스텐트, 별룬 또는 카테터와 같은 의료 장치용 코팅제로서 제제화될 수 있다. 대상에서 심장 섬유증을 치료하는 방법에 특히 유용하게, miR-29 모방체는 약물 스텐트를 제조하기 위해 금속 스텐트를 코팅하는데 사용될 수 있다. 약물 용출 스텐트는 협착된 또는 병에 걸린 동맥을 개방시켜 유지하고 화합물을 방출하여 세포 증식 및/또는 염증을 예방하기 위한 스캐폴드이다. 모방체 화합물은 효현제 또는 억제제를 시간이 지남에 따라 방출하기 위해 얇은 중합체에 묻혀있는 금속 스텐트에 도포될 수 있다. 장치-기반 전달 방법 및 코팅 장치의 방법은 약물-용출 스텐트 및 다른 이식 가능한 장치와 마찬가지로 당업계에 주지되어 있다. 예를 들어, 미국특허 제7,294,329호, 제7,247,313호, 제

7,236,821호, 제7,244,522호, 제7,105,018호, 제7,087,263호, 제7,083,642호, 제7,055,237호, 제7,041,127호, 제6,716,242호 및 제6,589,286호 및 WO 2004/004602에 개시되어 있다. 따라서, 본 발명은 miR-29 모방체로 코팅된 벌룬, 카테터 또는 스텐트와 같은 의료 장치를 포함한다.

[0074] 살균 주사 용액은 적절한 양의 활성 화합물을 용매에 원하는 임의의 다른 성분(예를 들어, 상기에서 열거한 것)과 함께 혼합함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 다양한 살균 활성 성분들을 기본적인 분산매와 원하는 다른 성분들, 예를 들어 앞에서 열거한 것들을 포함하는 살균 비히클에 혼합함으로써 제조된다.

[0075] 본 발명의 조성물은 일반적으로 중성 또는 염 형태로 제제화될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염은, 예를 들어, 무기산(예를 들어, 염산 또는 인산) 또는 유기산(예를 들어, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만넬산 등)으로부터 유도된 산 부가 염(단백질의 유리 아미노기로 형성됨)을 포함한다. 단백질의 유리 카복실기로 형성된 염은 무기 염기(예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화 제 2 철) 또는 유기 염기(예를 들어, 아이소프로필아민, 트라이메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등)로부터 유도될 수 있다.

[0076] 제제 시에, 용액들은 되도록 투약 제제에 적합한 방식 및 치료에 효과적인 양으로 투여된다. 제제는 주사 가능한 용액, 약물 병출 캡슐 등과 같은 다양한 투약 형태로 쉽게 투여될 수 있다. 수용액에서 비경구적 투여를 위해서, 예를 들어, 용액은 일반적으로 적절하게 완충되고, 액상 희석액은 먼저 예를 들어 충분한 식염수 또는 글루코스로 등장성을 만든다. 이러한 수용액은 예를 들어, 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 안구내 및 복막내 투여에 사용될 수 있다.

[0077] 본 발명은 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되는 다음의 추가적인 실시예에 의해 추가로 예시된다. 당업자는, 본 발명의 관점에서, 본 발명에 개시되며 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 여전히 동등하거나 유사한 결과를 얻는 특정 실시태양에 많은 변화가 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.

[0078] 본 발명의 전체에서 언급된 모든 특허 및 비 특허 문헌은 모든 목적을 위해 그 전문이 본 발명에 참조로 포함된다.

실시예

실시예 1: miR-29 모방체의 생체 외 활성

[0081] 기능 효과를 시험하기 위해, 제 1 가닥으로 SEQ ID NO: 2 및 제 2 가닥으로 SEQ ID NO: 1을 함유하는 miR-29b 모방체를 생쥐 섬유아세포 세포주(NIH 3T3)에 형질감염시키고, miR-29(van Rooij et al, 2008)의 공지된 직접 표적 유전자인 콜라겐1a1(Coll1a1) 발현에 대한 효과는 qPCR을 사용하여 측정하였다. 증가된 양의 miR-29b 모방체는 치료되지 않은, 모의 형질감염된(어떠한 올리고도 없음) 또는 비 표적화 대조군(NTC) 올리고 치료 세포와 비교하여 Coll1a1에 용량 의존적 감소를 보였고, 이는 miR-29b 모방체가 기능적임을 나타내었다. Coll1a1을 직접 표적으로 하는 siRNA를 양성 대조군으로 사용하였다 (도 1b).

실시예 2 : miR-29 모방체의 생체 내 분포, 안정성 및 제거율

[0083] miR-29 모방체의 생체 내 응용가능성 및 분포를 조사하기 위해, 생쥐에게 kg당 제 1 가닥으로 SEQ ID NO: 2 및 제 2 가닥으로 SEQ ID NO: 1을 함유하는 miR-29b 모방체의 10, 50, 100 또는 125mg으로 정맥 내 주사하고 4일 후 희생시켰다.

[0084] TRIzol® 시약(페놀 및 구아닌 아이소티오시아네이트의 용액)(Gibco/BRL)을 사용하여 심장 조직 샘플로부터 총 RNA를 분리하였다. 마이크로RNA를 탐지하는 노던 블롯은 이전에 기술된 바와 같이 수행하였다(van Rooij et al, 2008). U6 프로브를 로딩 대조군(IDT)으로 사용하였다. 표시된 조직의 총 RNA 10 µg을 20% 아크릴아마이드 변성 젤에 넣고 전기영동으로 제타-프로브 GT 계놈 블롯팅 막(Bio-Rad)에 이전하였다. 이전 후, 블롯을 가교 결합시키고 80°C에서 1시간 동안 베이킹하였다. miRNA 탐지의 민감도를 극대화하기 위해, 올리고뉴클레오티드 프로브를 스타파이어 올리고스 키트(Starfire Oligos Kit)(IDT, Coralville, IA) 및 α -³²P dATP(Amersham 또는 Perkin Elmer)로 표지하였다. 프로브를 Rapid-hyb 완충액 (Amersham)에 39°C에서 하룻밤 동안 막에 혼성화시킨 후, 0.1% SDS를 함유하는 0.5x SSC로 39°C에서 10분 동안 2회 세척하였다. 이 블럿을 포스포이미저(Phosphor Imager) 분석(GE HealthCare Life Sciences)에 의해 노출하고 정량화하였고 U6 프로브를 로딩 대조군(ABI)으로 사용하였다. 방사능 신호의 강도는 포스포이미저(phosphor imager) 및 이미지퀀트(ImageQuant)(Bio-Rad)를 사용하여 발현의 배수 변화를 정량화하는데 사용하였다.

[0085] 실시간 PCR 분석을 위해, Trizol(Invitrogen)을 사용하여 심장 조직으로부터 RNA를 추출한 후, 각 조직 샘플로

부터의 1 내지 2 μ g의 RNA를 사용하여 제조사의 규격(Invitrogen) 당 슈퍼 스크립트(Super Script) II 역전사효소를 사용하여 cDNA를 생성시켰다. 태크만 마이크로RNA 분석(Taqman MicroRNA assay(Applied Biosystems, ABI))을 10-100ng의 총 RNA를 사용하여, 제조사의 권장 사항에 따라 miRNA 또는 유전자의 변화를 탐지하는데 사용하였다. U6는 miRNA 분석을 위한 대조군으로 사용되었고 GAPDH는 유전자 분석을 위한 대조군으로 사용되었다.

[0086] 다수의 조직에 대한 노던 블롯 분석은 생리 식염수 대조군과 비교하여 신장 또는 간 샘플에서 miR-29b의 증가를 거의 또는 전혀 나타내지 않았다. 심장 분포가 탐지되었으나, 이것은 매우 가변적인 것으로 보이며 비장 전달은 최고 투여량에서만 관찰될 수 있다. 그러나, 폐로의 전달은 주사 4일 후 전부 3개의 최고 투여량에서 관찰될 수 있다(도 1c). 간 기능(transaminase, ALT)에 대한 영향은 혈장에서 관찰되지 않았으며, 이는 이러한 miRNA 모방체가 이런 투여량에서 잘 견딜 수 있음을 나타낸다(도 5). 실시간 PCR은 생리 식염수 주사 동물과 비교하여 폐에 대한 miR-29b 모방체의 강력한 투여량 의존적 분포와 유사한 결과를 나타내었다(도 1d). 또한, miR-29 표적의 실시간 PCR 분석은 비장에서 최고 투여량에서 Co13a1을 제외하고 치료된 동물에서 mRNA 수준에서 어떠한 조절도 나타내지 않았다(도 6). 이것은 표적 유전자가 스트레스를 받지 않은 동물에서 정상 상태에 있고 모방체는 표적 유전자가 상승될 때 이를 낮추거나 기능적 전달이 부적절하거나 불충분하다는 것을 암시한다.

[0087] miRNA 모방체의 생체 내 안정성에 대한 더 많은 통찰력을 얻기 위해, 125 mpk의 miR-29b 모방체를 생쥐에 주사하였고, 1, 2, 4 또는 7일 후에 희생시켰다. miR-29b 모방체의 강력한 존재는 조사한 모든 조직에서 주사 1일 후 노던 블롯 및 실시간 PCR 분석에 의해 탐지될 수 있었지만, 조직 제거율은 그 이후 크게 달랐다(도 1e 및 f). 간 및 신장은 1일 후 최소 탐지로 miR-29b 모방체를 신속하게 제거하였다. 폐 및 비장은 miR-29b 모방체의 가장 현저한 탐지를 시간에 따라 입증하였고, 이는 치료 후 적어도 4일 동안 유지되었다(도 1e 및 1f). 이 증가는 실시간 PCR에 의해 측정된 바와 같이 miR-29a 및 miR-29c 수준에 영향을 주지 않으면서 miR-29b에 특이적이었다(도 7). 또한 본 발명에서 miR-29 표적의 실시간 PCR 분석은 스트레스를 받지 않은 동물에서 mRNA 수준의 하향 조절을 나타내지 않았다(도 8).

[0088] 종합하면 이들 데이터는 비 제제화된 miR-29b 모방체는 기준선 조건하에서 유전자 발현에 대한 어떠한 명확한 효과 없이, 조직 의존적 제거 및 전달 효율에 의해 miRNA 수준을 증가시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

실시예 3 : miR-29b 모방체는 블레오마이신 유도 폐 섬유증을 둔화시킨다

[0089] 조직 섬유증의 현재 치료는 주로 염증 반응을 표적으로 하는 것에 의존한다; 그러나 이런 치료는 궁극적으로 질환의 진행을 막는데 효과적이지 않으며, 새로운 기계학적 통찰력과 치료 방법에 대한 필요성을 강조한다(Friedman et al, 2013). 최근의 연구는 폐 섬유증에 miRNA의 관여를 나타낸다(Pandit et al, 2011).

[0090] miR-29b 모방체의 우세한 폐의 분포 때문에, 스트레스 및 표적 유전자 발현의 후속 유도가 miR-29b 모방체 치료에 반응하여 mRNA 표적 유전자 및 하류 치료 효과의 탐지 가능한 변화를 허용하는지의 문제가 연구되었다. 이것을 테스트하기 위해, 폐 섬유증의 블레오마이신 유도 모델을 이전에 기술한 대로 사용하였다(Pandit et al, 2010). 구체적으로, 생쥐를 40% 아이소플루레인 용액으로 적신 페이퍼 타월을 갖는 챔버에 넣음으로써 마취시켰다. 0.0375U의 블레오마이신(Hospira, IL)을 50 μ l의 0.9% 식염수에 기관지 내로 투여하였다. 초기 섬유증에 대한 miR-29b 모방체의 효과를 측정하기 위해, 대조군(생리 식염수-치료) 및 블레오마이신-치료 생쥐에 제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 2 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 1을 함유하는 miR-29b 모방체, 대조군 모방체의 kg 당 100mg 또는 필적할만한 부피의 생리 식염수를 두 시점에서: 블레오마이신 치료 후 3일 및 10일에 주사하였고; 동물을 희생시키고 폐를 14일에 획득하였다. 확립된 섬유증에 대한 miR-29b 모방체의 효과를 측정하기 위해, miR-29b 모방체를 블레오마이신 또는 생리 식염수 투여 후 10, 14 및 17일에 투여하고 생쥐를 21일에 희생시켰다 두 프로토콜 모두에서, 폐를 조직학적 분석, 히드록시프롤린 분석 및 RNA 추출을 위해 획득하였다.

[0092] 예상한 대로, 블레오마이신 치료 14일 후, miR-29 수준이 감소하였고, miR-29b 모방체 치료는, 비록 높은 수준의 변화가 있었지만, 실시간 PCR에 의해 측정된 바와 같이, 대조군 또는 생리 식염수 주사 동물과 비교하여 miR-29b 수준의 증가된 탐지를 초래하였다(도 2a). miR-29 수준에 유사한 감소가 인간에서 관찰되는지를 측정하기 위해, 폐 이식을 받은 특발성 폐 섬유증(IPF) 환자에서 채취한 생검 또는 폐의 수술 잔여물에서 16개 폐 조직 샘플을 얻었다. 샘플은 피츠버그 대학 건강 과학 조직 은행으로부터 얻었다. 정상 대조군과 비교하여 특발성 폐 섬유증(IPF) 환자의 폐 생검에서 miR-29 수준의 필적할만한 감소가 관찰되었다(도 2b).

[0093] 조직학적 검사를 위해, 폐 조직 단편(4 μ m)을 마슨 트라이크롬(Masson Trichrome)(콜라겐/연결 조직), 그룹당 2 마리의 동물, 동물당 2개의 슬라이스로 염색하였다. 면역 염색은 제조업체의 권장 사항(ABC 탐지 시스템 양식 Vector's lab, USA)에 따라 파라핀 제거, 수화 및 블로킹 후에 실행하였다. 절편을 1차 항체 (Igf1, PBS에서

1:100 희석)에 의해 4°C에서 밤새 및 2차 항체(Invitrogen, USA)로 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 단편을 해마특실린으로 대조염색하였다. 1차 항체는 음성 대조군을 위한 비면역 혈청으로 대체하였다. 마지막으로, 단편을 마운팅 매질(DAKO, USA)을 사용하여 슬라이드에 올려놓고 니콘 현미경을 사용하여 분석하였다. 조직학적 분석은 miR-29b 모방체 치료에 의해 둔화된 블레오마이신 치료에 대한 명확하고 확실한 섬유화 및 염증 반응을 나타내었다(도 2c).

[0094] 또한, 제조사의 지시에 따라 바이오비전(Milpitas, CA)의 하이드록시프롤린 비색측정 분석 키트를 사용하여 폐콜라겐 함량을 분석하였다. 간단히 말해, 대조군과 실험용 생쥐의 폐를 일정한 무게까지 건조하고 120°C에서 3시간 동안 12N HCl에서 가수 분해시켰다. 소화액은 클로르아민 T 시약과 반응하여 DMAB 시약으로 시각화된다. 흡광도는 마이크로플레이트 판독기에서 560nm에서 측정하였다. 데이터는 하이드록시프롤린/우측 폐의 μg 로 표시된다.

[0095] 하이드록시프롤린 분석은 식염수 및 대조군 치료 그룹 모두에서 블레오마이신 치료 후 현저한 증가를 나타내었으나, 생리 식염수와 블레오마이신 치료 생쥐 사이에 miR-29 모방체 치료 그룹에서는 통계적으로 차이가 없었으며, 이는 miR-29b 모방체 치료가 블레오마이신 유도 폐 섬유증을 둔화시킨다는 것을 나타낸다(도 2d).

[0096] 선천성 면역 이펙터 신호 전달 경로는 섬유증을 유발함으로써 근섬유아세포 전이분화의 중요한 동인으로 작용한다. 블레오마이신 유도 폐 섬유증의 환경에서 miR-29b 모방체의 치료 효과를 추가로 특성화하기 위해, 기관지폐포 세척(BAL)을 이들 생쥐에서 실행하고 사이토킨 수준을 Bio-Rad로부터의 인간 사이토카인/케모카인 패널을 사용하여 평가하였다. 전체 절차는 제조사의 지시에 따라 실행하였다. 간단히 말하면, BAL을 5배 희석시키고 96-웰 필터 플레이트에서 분석을 실행하였다. 탐지 단계에서, 샘플을 R-피코에리트린과 접합된 스트렙타비딘과 함께 30분 동안 배양하고 Bio-Plex 혼탁 어레이 시스템(Bio-Rad)에서 분석하였다. Bioplex Manager 소프트웨어 6.0(Bio-Rad)을 사용하여 미가공 데이터를 분석하였다. 제조사에 의해 공급된 사이토카인 표준을 사용하여 샘플의 농도를 계산하였다. 탐지 범위 이하인 분석물은 날짜 해석에 포함하지 않았다. 또한, 탐지 범위 이하의 특정 분석물을 갖는 샘플은 중간 값을 계산하는 동안 제외하였다.

[0097] 현저하게 더 높은 농도의 IL-12, IL-4 및 G-CSF가 블레오마이신 치료 생쥐로부터의 BAL 유체에서 탐지될 수 있으며, 이는 miR-29b 모방체에 의해 감소되었다(도 2e 내지 2g). 또한, BAL 유체에서 탐지가 가능한 면역세포의 블레오마이신 유도 상승은 miR-29b 모방체의 존재하에서 현저하게 감소되었고(도 2h), 이는 항섬유화 효과에 대한 2차 효과인 miR-29b에 의한 면역 반응에 대한 억제 효과를 나타낸다. miR-29 모방체가 대식세포에 직접적인 영향을 미치는지를 측정하기 위해, miR-29b 모방체 또는 대조군을 대식세포, RAW 264.7에 형질감염시키고, 세포 상청액을 형질감염 24 및 48시간 후 획득하였다. IFN- γ , IL-1B, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, KC, IL-10, IL-12P70 및 TNF- α 를 분석하였고, miR-29b 모방체와 대조군 사이에 현저한 차이가 관찰되지 않았다(데이터는 나타내지 않음). 실시간 PCR 분석에 의해, Tgfb1, Ctgf, FGF1 또는 PDGF 발현에는 현저한 차이가 없었다; 그러나, Csf3, Igf1, 및 Kc 발현에서 현저한 차이가 관찰되었다(도 9 및 데이터는 나타내지 않음).

[0098] miR-29가 많은 다른 세포외 기질 관련 유전자의 조절을 통해 기능한다는 것이 잘 입증되었으므로(van Rooij & Olson, 2012), 이들 표적 유전자의 서브 세트의 조절이 확인되었다. Col1a1의 현저한 증가 및 Col3a1 발현의 경향 증가가 생리 식염수 및 대조군 치료 그룹 모두에서 블레오마이신 치료로 관찰되었지만, Col1a1 및 Col3a1의 탐지는 블레오마이신 치료 생쥐에서 miR-29b 모방체의 존재하에서 현저하게 둔화되었다(도 3a 및 도 3b). 흥미롭게도, 블레오마이신 치료 후 BAL 유체에서 Igf1 수준의 증가는 생리 식염수 및 대조군 치료 생쥐 모두와 비교하여 miR-29 모방체의 존재하에서 현저하게 둔화되었다(도 3c). 또한, Igf1에 대한 면역조직화학은 생리 식염수 또는 대조군과 비교하여 miR-29b 모방체 치료 그룹에서 블레오마이신 이후 Igf1의 강력한 감소를 나타내었다(도 3d).

[0099] 블레오마이신 유도 섬유증을 예방하기 위해 초기(3 일 및 10 일) miR-29 모방체가 충분하다는 것을 확립한 후, 확립된 섬유증에 영향을 미치는 miR-29 모방체의 능력을 조사하였다. 그 목적을 위해, miR-29b 모방체 투여는 블레오마이신 10일 후에 시작되었고, 투여를 14일 및 17일에 반복한 후, 폐를 21일 획득하였다. 우측 폐의 하이드록시프롤린 평가는 생리 식염수 및 대조군 치료 폐 모두에서 블레오마이신에 의한 현저한 증가를 나타내었다; 그러나 miR-29b 모방체 치료는 이 효과를 둔화시켰다(도 4a). 또한, 블레오마이신 치료는 Col1a1 및 Col3a1 발현에 현저한 증가를 초래하였고, 이는 또한 miR-29b 모방체 치료로 정상화되었다(도 4b 및 4c). 트라이크롬 염색에 의한 조직학적 평가는 이 효과를 확인하였고, 이로써 블레오마이신은 생리 식염수 또는 대조군 치료에 의해 현저한 섬유증을 유도하였고 이는 miR-29b 모방체로 둔화되었다(도 4d).

[0100] 이들 관찰된 효과는 폐 섬유아세포로부터의 콜라겐 생성의 조절을 통해 매개되는 것으로 여겨지지만, 다른 콜라

겐 생성 세포로부터의 효과는 배제될 수 없다. 이 문제를 해결하기 위해, miR-29b 모방체 효과를 IPF 환자의 1차 섬유아세포 및 폐 상피 세포주인 A549 세포를 포함하는 다양한 폐 세포로부터 생체 외에서 평가하였다. 예상한 바와 같이, IPF 환자로부터의 1차 폐 섬유아세포는 TGF- α 에 반응하여 Col1a1 및 Col3a1의 증가를 나타낸다(도 4e 및 4f). 이 효과는 24시간 및 48시간에서 miR-29b 모방체 치료에 의해 용량 의존적으로 둔화되었다(도 4e, 4f 및 데이터는 나타내지 않음). 유사하게, A549 세포는 Col1a1 및 Col3a1 발현의 강한 증가로 TGF- α 에 반응한다(도 4g 및 4h). 또한, miR-29b 모방체 치료는 TGF- α 치료 및 기준선 조건 모두에서 콜라겐 유도를 차단할 수 있다(도 4g 및 4h). 콜라겐 유도에 미치는 영향은 1차 IPF 세포와 비교하여 A549 세포에서 훨씬 더 강력하다. 그러나, 이것은 IPF 환자로부터의 1차 섬유아세포에서 이미 높은 발현으로 인한 것 같다. 또한, 대식 세포주인 Thp-1에서의 miR-29 효과도 조사되었으나, 자극에 관계없이, 세포에서 콜라겐 발현은 관찰되지 않았다(데이터는 나타내지 않음). 이런 데이터는 miR-29b 모방체가 섬유아세포 및 상피 세포에서 콜라겐 유도 발현을 둔화시킬 수 있음을 시사한다. 이런 데이터는 슬리핑 뷰티-트랜스포존(Sleeping Beauty-transposon) 시스템을 사용하는 miR-29의 유전자 전달이 블레오마이신 유도 폐 섬유증을 예방하고 치료할 수 있다는 것을 나타내어 (Xiao et al., 2012), miR-29를 증가시키는 치료 효과를 강조하는 Xiao 등의 논문과 일치한다.

[0101] 본 발명에 기술된 데이터는 손실되거나 하향 조절된 miRNA의 기능을 복원하기 위해 마이크로RNA 모방체를 사용하는 가능성을 보여준다. 그러나, 적절한 miRNA 기능을 위해서는 RISC의 도입이 필요하므로, 합성 올리고뉴클레오티드 모방체의 구조적 특징의 신중한 디자인이 필요하다. 또한, 본 출원의 데이터는 적절한 세포 유형 또는 조직으로의 전달이 효과적인 miRNA 모방체를 제공한다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 폐 섬유증의 경우, 흡입 경로를 통한 직접 전달은 전통적인 투여 경로와 비교하여 우수한 치료 효능을 제공한다.

실시예 4 : miR-29b 모방체는 피부에서 세포외 기질 생산을 둔화시킨다

[0103] 기관 섬유증 외에, 다수의 연구가 비대증 상흔 및 켈로이드, 및 피부 및 다른 형태의 전신 경화증(경피증)과 같은 진피 섬유증에서 miR-29에 대한 역할을 나타내었다. 예를 들어 전신성 경화증 환자로부터 얻은 섬유아세포와 피부 절편은 건강한 대조군과 비교하여 miR-29a 수준에 현저하게 감소를 나타내었다(Maurer et al 2010). 전신 경화증 섬유아세포에서 과발현될 때, miR-29a는 RNA 및 단백질 수준 모두에서 I 형 및 III 형 콜라겐의 발현을 강력하게 감소시킬 수 있었다. 반대로, 정상 섬유아세포에서 miR-29의 억제는 이를 콜라겐의 증가를 초래하였다. 또한, 블레오마이신 치료 피부는 miR-29의 현저한 감소를 나타내었고, miR-29의 하향 조절이 섬유증의 여러 증상에 광범위하게 적용될 수 있음을 시사하였다(Maurer et al 2010). 이런 결과는 건강한 대조군의 피부 섬유아세포에서 miR-29a 형질감염이 콜라겐 발현을 현저하게 하향 조절한 다른 연구에서 추가로 입증되었다. 또한, 피부 섬유아세포에서 miR-29a 과발현은 TIMP-1 분비를 감소시키고 콜라겐 겔 분해를 증가시켰다. 이러한 결과는 전신 경화증 환자의 섬유아세포에서도 입증되었다 (Ciechomska et al 2014). 종합적으로, 이러한 연구는 miR-29 모방체를 피부 섬유증 및 전신 경화증을 포함하는 섬유증의 국소 형태에서 치료 가능성으로 가리킨다.

[0104] 피부에서 miR-29 효현작용 또는 길항작용의 효과를 측정하기 위해, 생쥐 절개창 모델을 사용하였다. 구체적으로, 수컷 C57BL/6 생쥐를 흡입 챔버를 사용하여 2-5% 흡입 아이소플루오레인으로 마취시키고 모든 절차에 대해 노즈 콘(nose cone)상의 1% 아이소플루오레인 하에서 유지시켰다. 부프레노르핀(0.1 mg/kg)을 모든 수술 절차에 대한 진통제로 사용하였다. 동물을 마취시키고, 면도 및 네어 제모 크림의 투여에 의해 제모하고, 베타딘 및 알코올 수술 스크럽에 의해 피부 부위를 절개에 준비하였다. 하나 내지 두 개의 1cm 길이의 피부 절개를 생쥐의 등에 실시하였다. 절개를 2-5개의 단속 봉합으로 봉합하고 테가덤(Tegaderm) 투명한 반 폐쇄 드레싱(3M)으로 덮었다. 절개 피부 상처를 갖거나 갖지 않은 생쥐를 비히클(PBS), 100 nmol miR-29b 모방체(제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 2 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 1을 포함) 또는 100 nmol antimiR-29로 피내 주사로 치료하였고, 절개창 생성 3일 후, 절개 정중선의 양쪽에 위치한 2개의 50 μ L 부피에 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 비히클(PBS)의 피내 주사하거나 인접한 상처입지 않은 피부에 단일 100 μ L 부피의 주사로 치료하였다. antimiR-29는 5'- 1Gs.dAs.dTs.dTs.lTs.lCs.dAs.lAs.dAs.lTs.1Gs.dGs.lTs.dGs.lCs.lTs-3'(SEQ ID NO: 36) 여기서, "l"은 잠금 뉴클레오티드를 나타내고, "d"는 데옥시리보뉴클레오티드를 나타내며 "s"는 포스포로티오에이트 결합을 나타낸다. 올리고뉴클레오티드 화합물의 투여 24시간 후에 생쥐를 희생시키고 치료 부위(들)의 피부를 획득하고 mRNA 발현 분석을 위해 액체 질소에서 급속 동결시켰다.

[0105] 트라이콜(Invitrogen)을 사용하여 피부로부터 총 RNA를 추출하고, GAPDH, B2M, HPRT1 및 PPIB가 피부 샘플의 유전자 분석을 위한 대조군으로 사용되었다는 것을 제외하고는 상기한 바와 같이 실시간 PCR 분석을 실행하였다.

[0106] 마이크로어레이 분석을 위해, 애질런트 어레이(생쥐 GE (V2), 4x44k - 026655) 상의 생쥐 범용 기준 RNA(애질런트)와 비교하여 마이크로어레이 분석을 위해 샘플당 1 μg 총 RNA를 MOgene으로 보냈다. 분석은 어레이스튜디오 (ArrayStudio)를 사용하여 실행하였고 히트맵은 R 소프트웨어 프로그램을 사용하여 생성하였다.

[0107] 마이크로 어레이 분석을 이용하여, 양성 및 음성 조절 유전자를 PBS 대조군에 대해 동정하였다. miR-29b 모방체와 antimiR-29 사이에서 228개의 유전자가 상호간에 조절되었다($p < 0.05$ 또는 배수 변화 > 1.5)(도 10 및 표 5). 이런 miR-29 조절 유전자와 다른 종의 오솔로그(ortholog)는 miR-29 효현체 또는 miR-29 길항체 치료에 대한 반응을 나타내기 위한 번역 바이오마커로 사용될 수 있다.

표 5

	miR-29b 모방체		antimiR-29	
유전자	배수 변화	p 값	배수 변화	p 값
Cyt11	-3.21	0.000	1.53	0.034
Co13a1	-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
Fst11	-2.25	0.015	2.15	0.019
Co15a2	-2.19	0.005	1.95	0.012
4930543N07Rik	-2.13	0.005	3.10	0.000
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
S1c5a2	-1.94	0.018	2.09	0.010
Tnp2	-1.93	0.073	4.05	0.002
O1fr1336	-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
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
O1fr67	-1.69	0.003	1.37	0.034
Bsnd	-1.69	0.107	2.05	0.038
S1c10a5	-1.69	0.038	1.65	0.045
Defa26	-1.68	0.076	2.06	0.022
Serpinh1	-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
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
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
Asc11	-1.60	0.026	1.78	0.010

Tgfb2	-1.60	0.016	1.08	0.618
Cyp2c29	-1.59	0.009	1.42	0.030
Gm5797	-1.59	0.011	1.49	0.021
Co15a3	-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
Gm5485	-1.55	0.064	5.68	0.000
Slamf9	-1.54	0.204	2.08	0.048
Mab2113	-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
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
Ubtd2	-1.49	0.001	1.48	0.001
Ras111b	-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
Sema3b	-1.42	0.045	1.56	0.017
AI118078	-1.42	0.032	1.69	0.005
Npc111	-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
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
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
Ph1db2	-1.31	0.042	1.52	0.006
Pr12c1	-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
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
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
N1gn2	-1.15	0.043	1.22	0.009
Gm9223	-1.15	0.005	1.30	0.000
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
Bet11	-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
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
Nhp211	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
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
Dus11	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
Ddx18	1.11	0.011	-1.11	0.014
Btbd9	1.11	0.002	-1.06	0.037
Ubap21	1.11	0.008	-1.11	0.008
Pnkp	1.12	0.022	-1.11	0.023
Par1	1.12	0.022	-1.25	0.001
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
Uch15	1.13	0.002	-1.28	0.000
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
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

Seh11	1.14	0.034	-1.16	0.021
Mr11	1.14	0.000	-1.13	0.000
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
Act16a	1.15	0.027	-1.15	0.024
Snrpb	1.15	0.012	-1.21	0.002
Ino80	1.15	0.032	-1.14	0.038
1500002020Rik	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
Mrps27	1.16	0.015	-1.22	0.003
Trnau1ap	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
Wdr55	1.17	0.002	-1.15	0.005
Gorasp2	1.17	0.049	-1.20	0.027
Nfe212	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
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
Aplml1	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
Txn11	1.19	0.031	-1.71	0.000
Zfp608	1.19	0.000	-1.30	0.000
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
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
Cb1	1.21	0.035	-1.83	0.000
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
Mtmr10	1.21	0.041	-1.48	0.001

Ttf2	1.21	0.030	-1.42	0.001
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
BB070754	1.24	0.017	-1.28	0.010
Gn13	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
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
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
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
C1cn5	1.41	0.026	-1.49	0.014
Fam65b	1.41	0.049	-1.50	0.026
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
O1fr663	2.06	0.022	-2.08	0.020

[0109] 두 그룹으로 내용이 풍부한 기능적 용어의 DAVID 분석(NCBI)이 도 10b에 제공된다. 놀랍지도 않지만, 세포외 매트릭스, (피부) 기능, 접착/세포 시그널링 및 세포 분화/세포사멸에 대한 유전자 존재론(GO) 용어는 miR-29b 모방체 치료 이후 상위 음으로 조절되는 경로이다. 세포(핵) 구조와 RNA 처리는 miR-29b 모방체 치료 이후에 상위 양으로 조절되는 경로이다.

[0110] 피부에서 miR-29b 모방체 치료의 효과를 추가로 확인하기 위해, 급성 절개창을 가진 생쥐를 PBS, 20, 50 또는 100 nmol의 miR-29b 모방체(제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 2 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 1을 포함)의 피내 주사로 치료하였다. 정량 역전사효소 PCR 분석을 피부에서 miR-29 조절의 직접 또는 간접 표적으로 확인된 24개의 유전자에 대해 실행하였다(miR-29b 모방체에 의해 억제되고 antimiR-29에 의해 상향 조절된 19개, miR-29b 모방체에 의해 상향 조절되고 antimiR-29에 의해 억제된 5개). 세포외 기질 유전자(콜라겐, ELN 등) 및 섬유아 세포 과정에 관여하는 다른 유전자(예를 들어, MMP2, TGFB2)는 피부에서 miR-29b 모방체 치료에 의해 억제되는 것으로 나타났으나(도 11a), 선택된 세포 표면 수용체(ITGA3, LBR, NUMB, SDC4) 및 수용체 세포내이입과 관련된

인자(SNX27)는 피부에서 miR-29b 모방체 치료로 증가하는 것으로 나타났다(도 11b). 이 연구는 miR-29b 모방체는 피부에서 국소적으로 치료될 때 활성화되며, 기관 섬유화에 대한 효과 외에도, miR-29 모방체는 다양한 병인의 피부 섬유증에 효과적인 치료법이 될 수 있음을 암시한다. 이들 연구는 또한 상기 유전자를 발현이 피부에서 miR-29b 유사체의 활성과 관련이 있는 번역 바이오마커로서 동정하였다. 이런 번역 바이오마커는 정상적인 건강한 지원자 및 피부 경피증 환자에서 miR-29b 모방체의 안전성 및 효능을 테스트하는 임상 시험에 활용될 수 있다.

[0111] 실시예 5: miR-29 모방체의 활성 및 뉴클레오티드 변형의 효과

표적 유전자의 발현 조절에 있어서, miR-29a, b 및 c 유사체의 효능을 결정하기 위해, 상이한 miR-29a, b 및 c 모방체를 10nM의 농도로 IMR-90 인간 폐 섬유아세포에 형질감염시켰고, 콜라겐 발현을 정량적 RT-PCR로 측정하였다. 이들 연구는 제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 27 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 5를 포함하는 miR-29b 모방체 및 제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 19 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 1을 포함하는 miR-29b 모방체가 다중 콜라겐 유전자의 발현을 억제하는데 가장 효과적인 반면, 제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 35 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 24를 포함하는 miR-29c 모방체는 덜 효과적이다(도 12). 이런 효과는 세포 유형 또는 표적 유전자 특이 적일 수 있지만, 세포의 기질 유전자 발현을 억제하는 3개 모방체의 능력에 실제로 차이가 있음을 나타낸다.

동일한 실험에서, miR-29b 모방체의 효능에 대한 뉴클레오티드 변형의 효과를 시험하였다. 이들 연구는 제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 19 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 1을 포함하는 miR-29b 모방체가 동일한 제 1 및 제 2 서열 및 패턴을 가지거나 센스(폐신자) 가닥과 콜레스테롤 사이에 상이한 화학적 링커를 갖는 제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 19를 포함하는 miR-29b 모방체와 유사하게 수행한다. 2' O-메틸 변형의 바둑판 패턴은 miR-29 모방체(제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 31 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 28을 포함하는 모방체 및 제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 32 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 29를 포함하는 모방체)를 완전히 비효과적으로 만든다. 안티센스(제 1/가이드) 가닥(제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 33 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 1을 포함하는 모방체) 상의 모든 C 및 U 잔기의 변형은 모방체 활성을 부분적으로 감소시킨다. 유사하게, 안티센스 가닥(제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 24 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 1을 포함하는 모방체) 상의 3' 오버행의 제거는 부분적으로 모방체 활성을 감소시킨다. 도 12를 참조.

이들 연구는 특정 세포주(IMR-90)에서의 생체 외 활성을 기초로 하고 화합물 섭취와 독립적으로, 효과에 대한 판독치로서 특정 표적 유전자(COL1A1, COL3A1, COL4A5)를 사용하여 miR-29 모방체 화합물의 계층화를 허용하고, 화합물 섭취에 독립적이며 생체 외 수동 전달을 통해 또는 생체 내에서 시험하기 위한 화합물을 선택하기 위한 기초로 사용할 수 있다.

[0115] 실시예 6: 링커 변형을 가진 miR-29b 모방체의 생체 내 활성

절개창을 가진 생쥐를 콜레스테롤 잔기와 제 2/센스 가닥 사이의 결합에서만 상이한 20 nmol의 다양한 miR-29b 모방체로 치료하였다. 콜레스테롤과 센스 가닥(제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 19 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 15를 포함하는 모방체) 사이에 6개의 탄소 링커를 함유하는 모방체 화합물 및 콜레스테롤과 센스 가닥 사이에 동일한 6개 탄소 링커를 함유하나 절단가능한 모이어티(dT,dT)(SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 15)를 통해 연결된 화합물은 표적 유전자를 억제하는데 유사한 활성을 나타내었다(도 13). 도 13의 N/S는 제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 19 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 1을 포함하는 miR-29b 모방체 및 제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 19 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 15를 포함하는 모방체의 활성에 현저한 차이가 관찰되지 않았음을 나타낸다. 5' 말단에 9개 탄소 링커(SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 17) 및 한 링커(SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 16)를 함유하는 miR-29b 모방체는 표적 유전자를 억제하는데 효과적이지 않았다(도 13).

[0117] 실시예 7: miR-29b 모방체의 활성에 대한 5' 인산화의 효과

RAB-9 피부 섬유아세포(ATCC CRL-1414)를 안티센스 가닥 상의 5' 인산화를 갖는(제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 2 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 1을 함유하는 모방체) 및 갖지 않는(제 1 가닥으로서 SEQ ID NO: 19 및 제 2 가닥으로서 SEQ ID NO: 1을 함유하는 모방체) 다양한 농도의 miR-29b 모방체로 형질감염시켰다. Colla1, Colla2 또는 Col3a1 발현에 의해 측정된 바와 같은 표적 유전자 억제에서 현저한 차이는 두 개의 모방체의 활성에서 관찰되지 않았다(도 14에서 N/S로 나타냄). 두 miR-29b 모방체는 비히클, 모조 형질감염 또는 대조군 모방체 치료와 비교하여 표적 유전자의 발현을 현저하게 억제하였다(p <0.0001). 도 14 참조.

[0119] 참조문헌

- [0120] Bouchie A (2013) First microRNA mimic enters clinic. *Nature biotechnology* **31**: 577
- [0121] 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
- [0122] Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S (2013) Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Sci Transl Med* **5**: 167sr161
- [0123] He Y, Huang C, Lin X, Li J (2013) MicroRNA-29 family, a crucial therapeutic target for fibrosis diseases. *Biochimie* **95**: 1355-1359
- [0124] 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
- [0125] 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
- [0126] 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
- [0127] 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
- [0128] 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*
- [0129] 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
- [0130] Pandit KV, Milosevic J, Kaminski N (2011) MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res* **157**: 191-199
- [0131] 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
- [0132] 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
- [0133] 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
- [0134] 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
- [0135] van Rooij E, Olson EN (2012) MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nature reviews Drug discovery* **11**: 860-872
- [0136] van Rooij E, Purcell AL, Levin AA (2012) Developing microRNA therapeutics. *Circ Res* **110**: 496-507
- [0137] 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

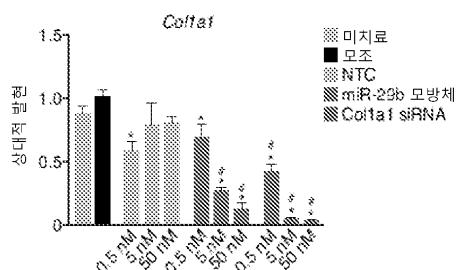
- [0138] Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M, Koh P, Thomas M, Jandeleit-Dahm K, Gregorevic P, Cooper ME, Kantharidis P (2012) Suppression of microRNA-29 expression by TGF- β 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23: 252-265
- [0139] 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
- [0140] 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

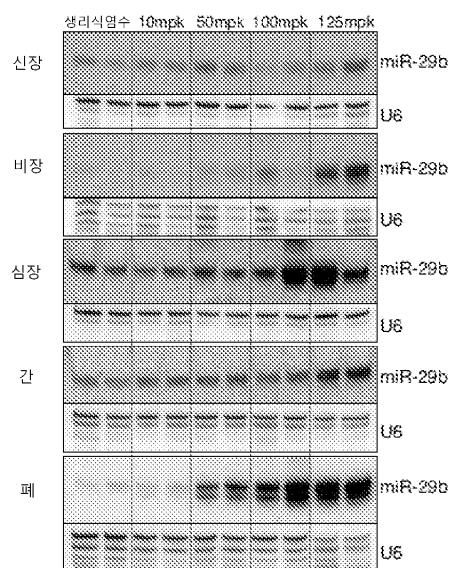
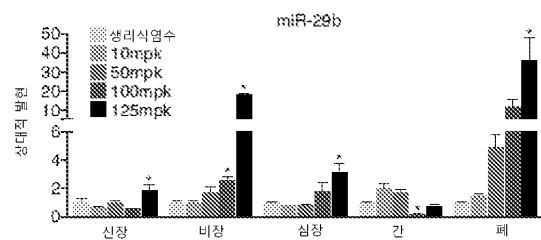
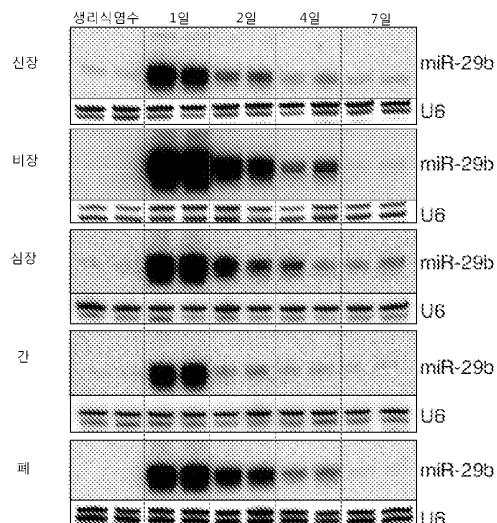
도면

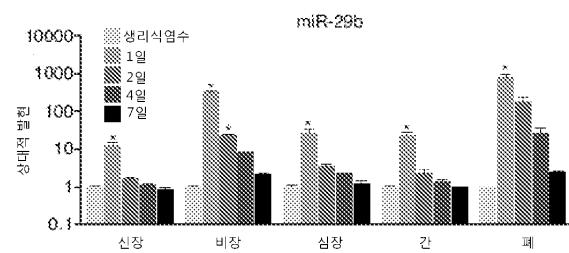
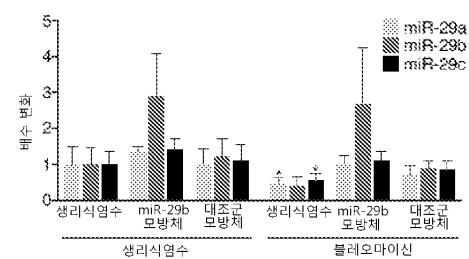
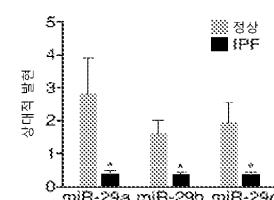
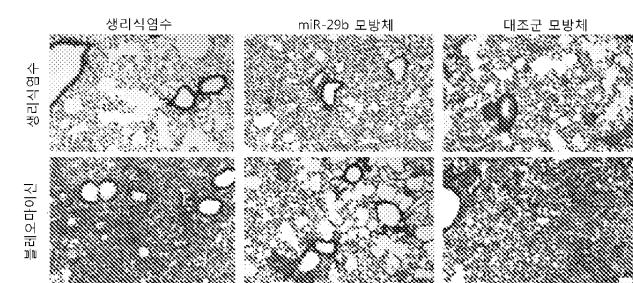
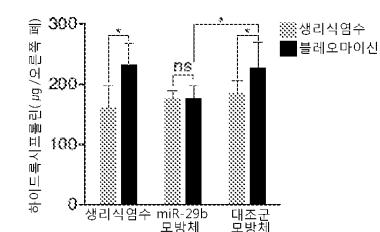
도면 1a



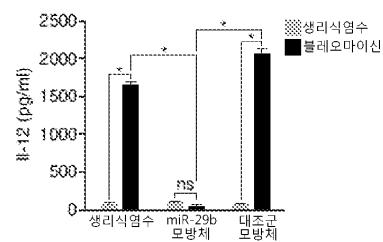
도면 1b



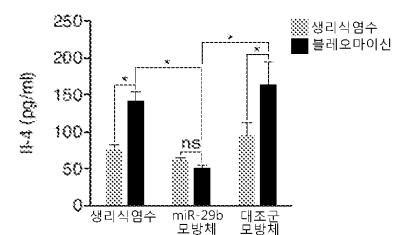
도면1c**도면1d****도면1e**

도면1f**도면2a****도면2b****도면2c****도면2d**

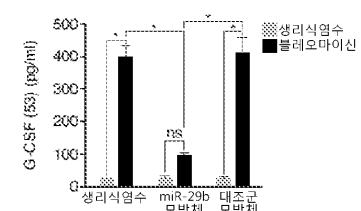
도면2e



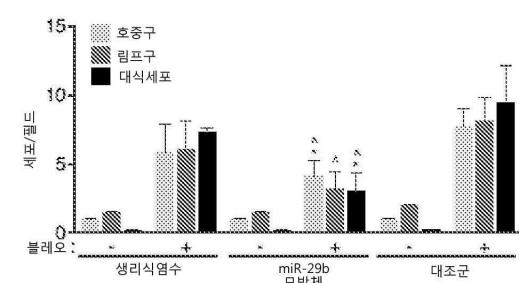
도면2f



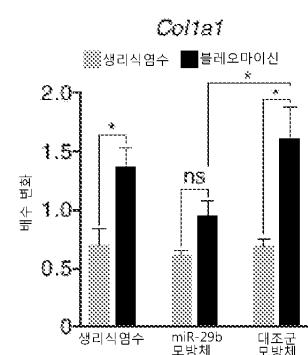
도면2g



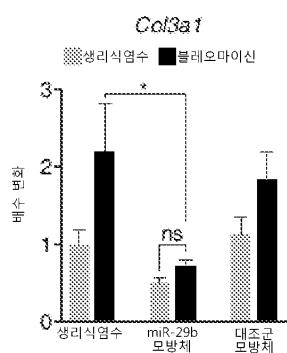
도면2h



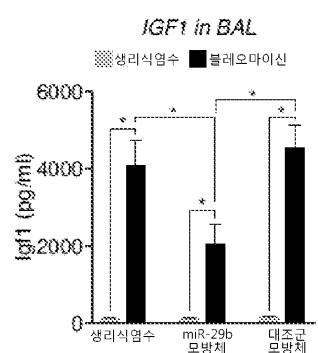
도면3a



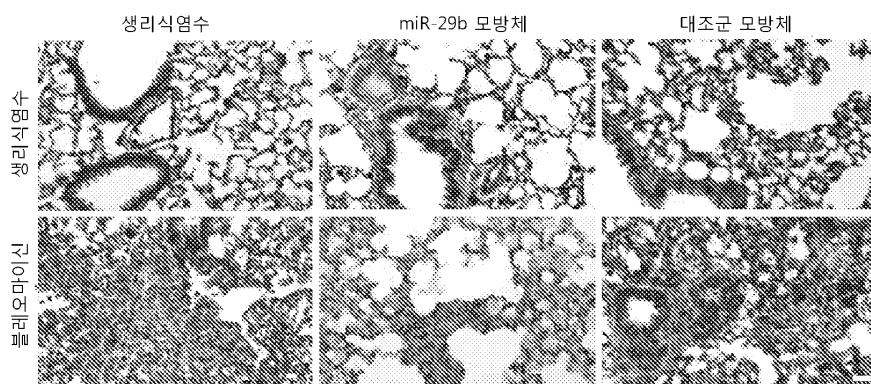
도면3b



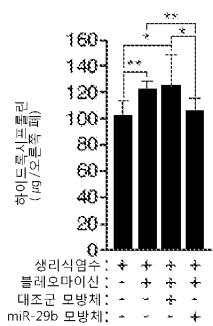
도면3c



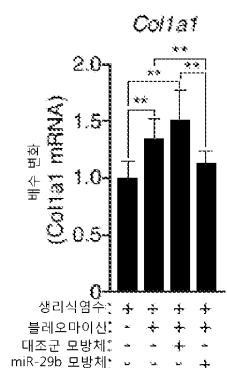
도면3d



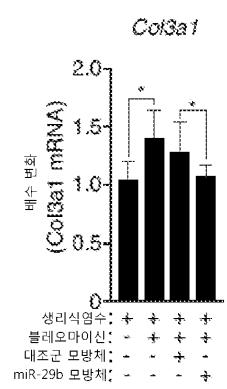
도면4a



도면4b



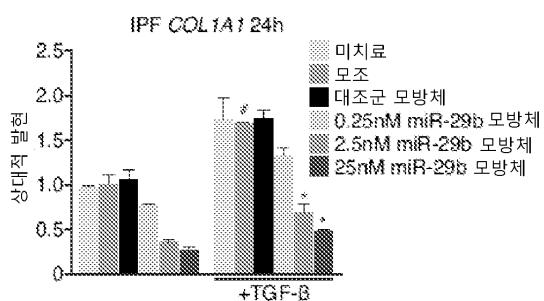
도면4c



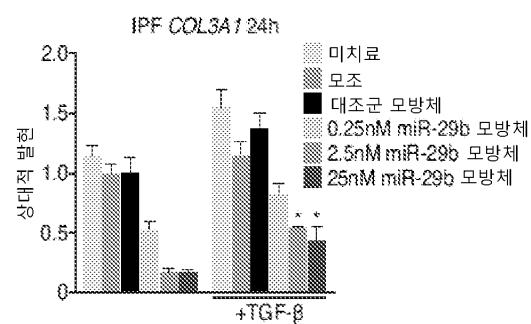
도면4d



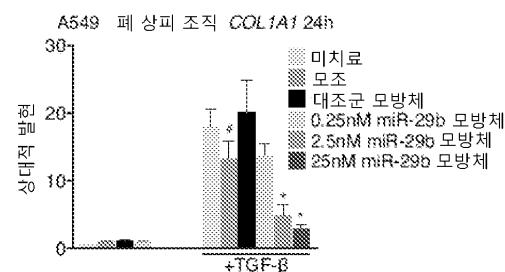
도면4e



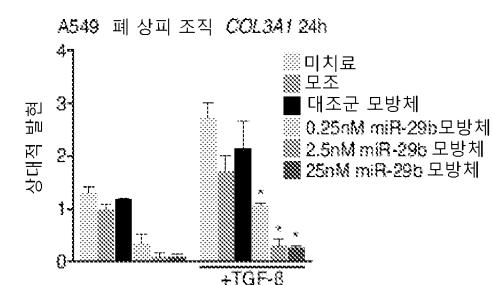
도면4f



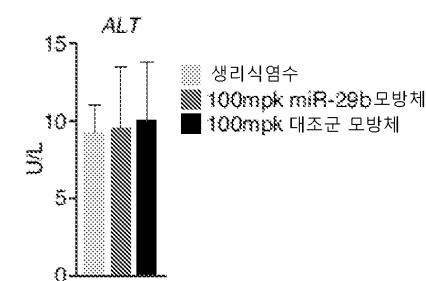
도면4g



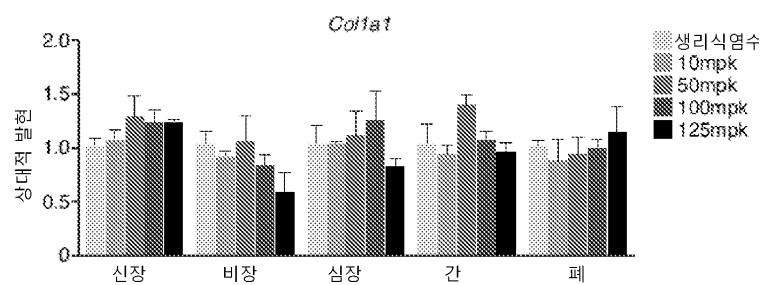
도면4h



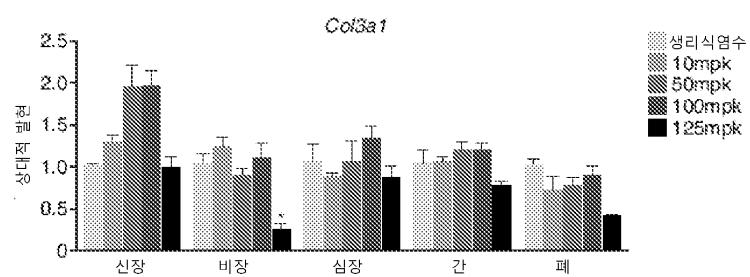
도면5



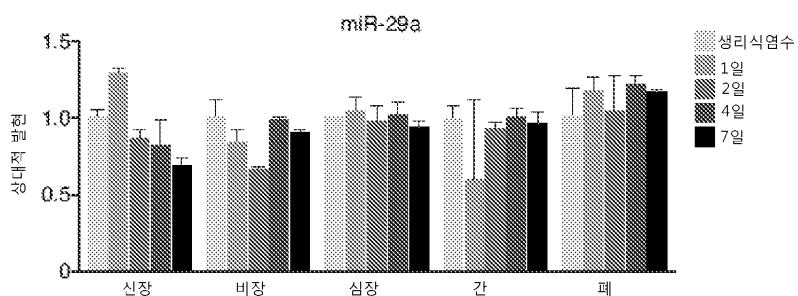
도면6a



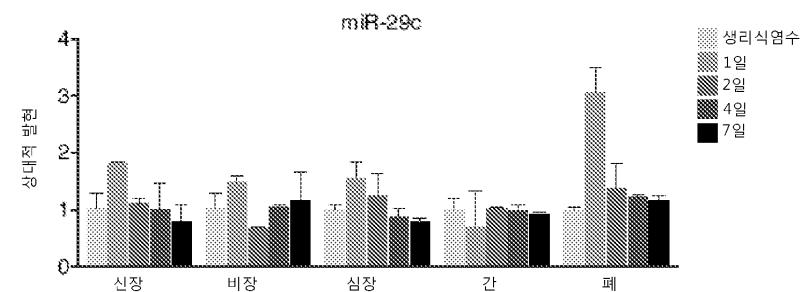
도면6b



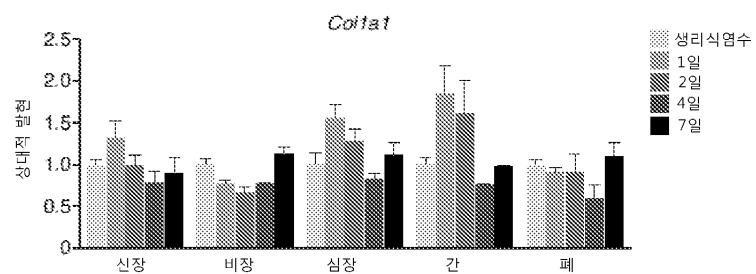
도면7a



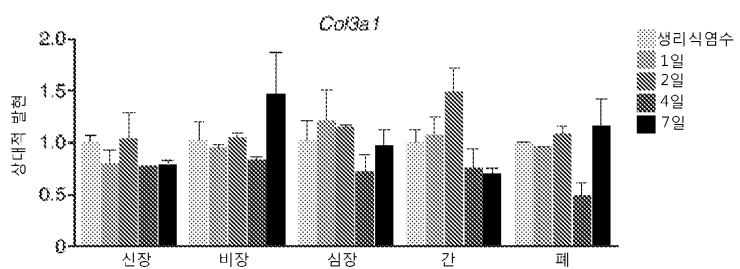
도면7b



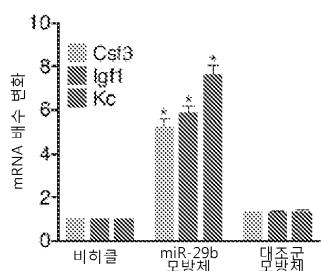
도면8a



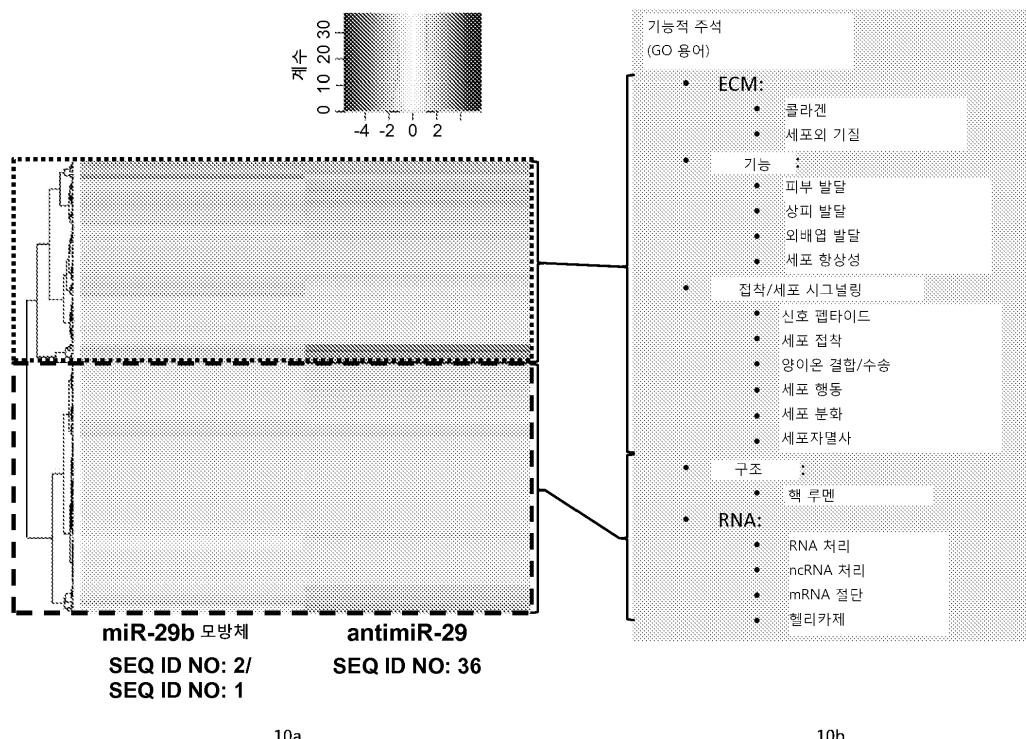
도면8b



도면9



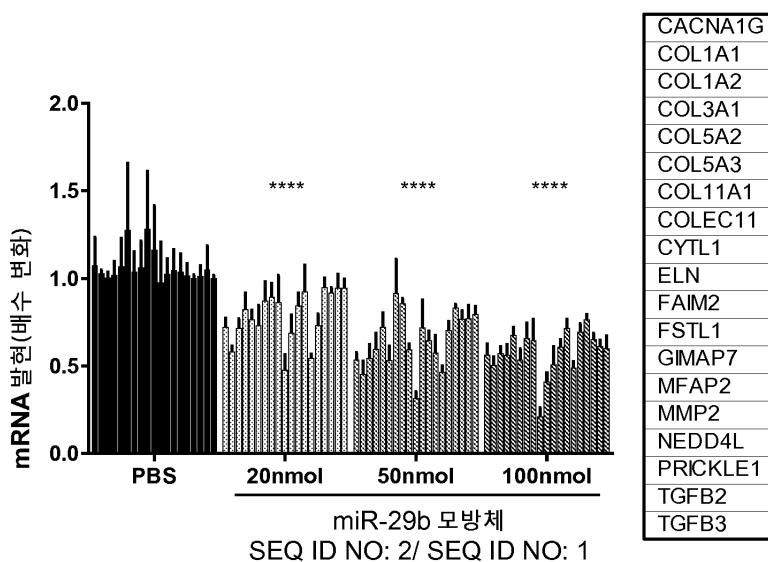
도면10



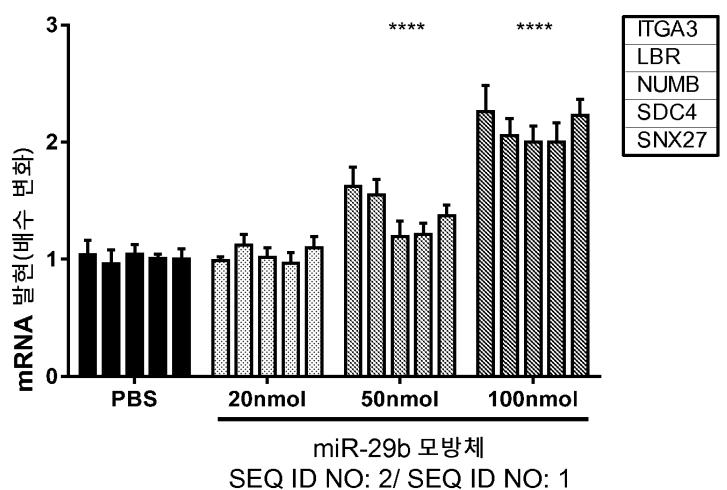
10a

10b

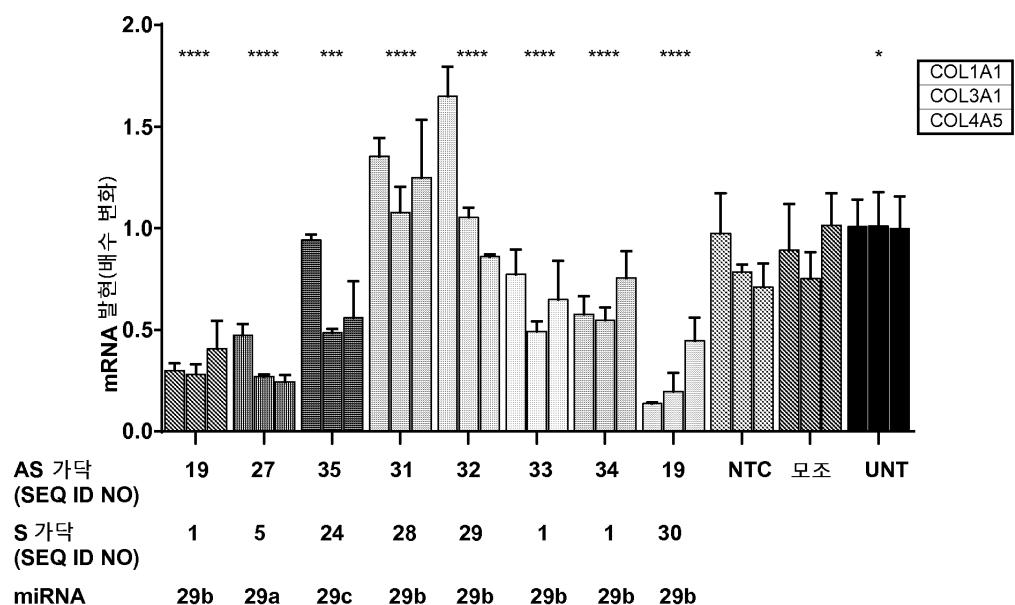
도면11a



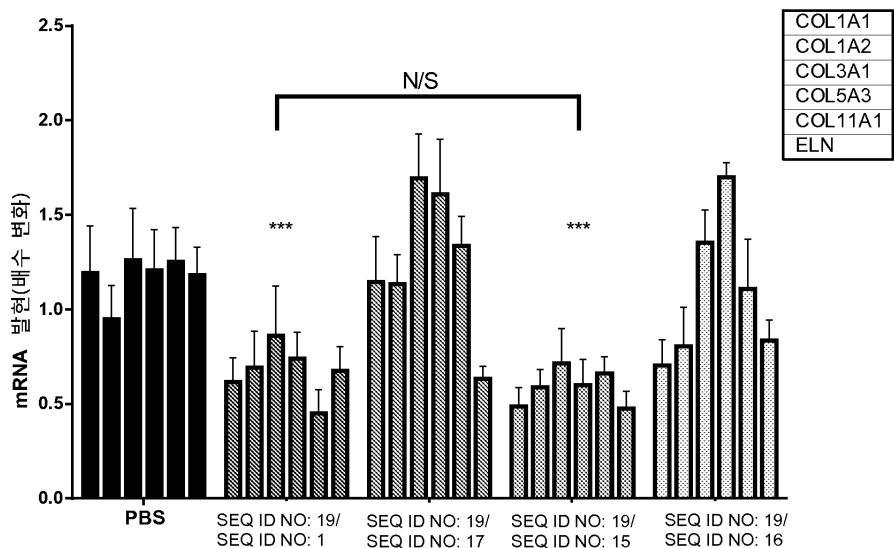
도면11b



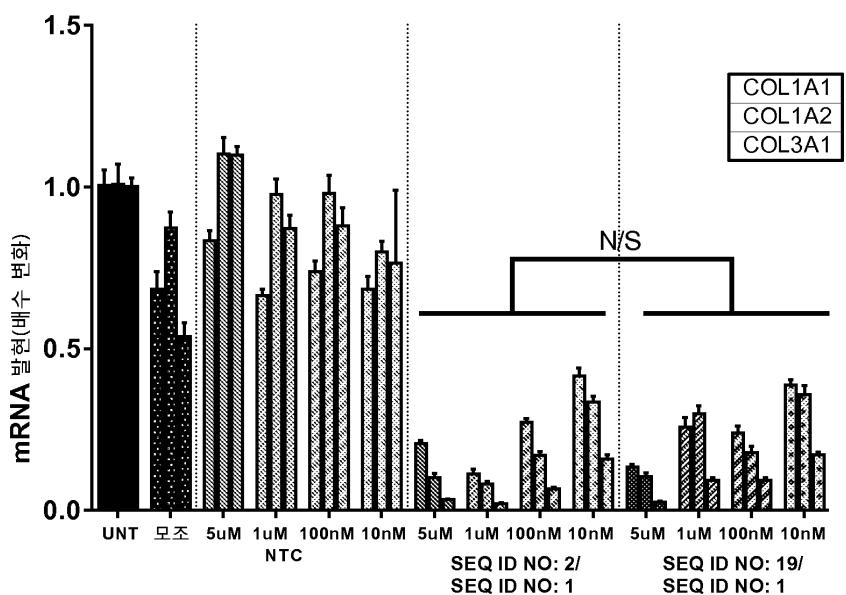
도면12



도면13



도면14



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MiRagen Therapeutics, Inc.

MONTGOMERY, Rusty L.

DALBY, Christina M.

VAN ROOIJ, Eva

GALLANT-BEHM, Corrie

<120> miR-29 Mimics and Uses Thereof
<130> MIRG-047/01WO 308934-2484
<140> PCT/US2015/049018
<141> 2015-09-08
<150> US 62/047,562
<151> 2014-09-08
<160> 42
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220><221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> May be 0-methyl adenosine
<220><221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> May be 0-methyl adenosine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> May be 0-methyl cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> May be 0-methyl cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> May be 0-methyl uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223

> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be O-methyl cytidine

<

220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker

<400> 1

aacacuguuu acaaagguc cua 23

<210> 2

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic first-antisense-guide strand

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> May be modified with a monophosphate moiety

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223>

May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(25)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds

<400> 2

uagcaccaau uggaaucagu guuuu 25

<210> 3

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29a mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<400> 3

uaaccgauuu cagauggugc uauu 24

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29a mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222>

(21)..(21)

<223> May be O-methyl uridine

<400> 4

uaaccguuuua cagaaggucc ua

22

<210> 5

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29a mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be O-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223>

> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES
<222> (21)..(21)
<223> May be O-methyl uridine
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker
<400> 5
uaaccguuuua cagauggucc ua 22
<210> 6
<211> 24
<212>
> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> miR-29a mimic first-antisense-guide strand
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> May be modified with a monophosphate moiety
<400> 6
uagcaccauc uggaaaucgguaauuu 24
<210> 7
<211> 24
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> miR-29a mimic first-antisense-guide strand
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> May be modified with a monophosphate moiety
<220>
<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223

> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> May be fluoro cytidine

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> May be fluoro uridine

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (21)..(21)
 <223> May be fluoro uridine

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(24)
 <223> May be joined through phosphorothioate bonds

<400> 7

uagcaccauc ugaaaucggc uauu 24

<210> 8
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> May be 0-methyl adenosine

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> May be 0-methyl adenosine

<400> 8

aacacugauu ucaaauuggug cuauu 25

<210> 9
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker

<400> 9

aacacugauu ucaaauggug cua

23

<210> 10

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(25)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker

<400> 10

aacacugauu ucaaaggug cuauu

25

<210> 11

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29a mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(24)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker

<400> 11

uaaccgauuu cagauggugc uauu

24

<210> 12

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29c mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(24)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker

<400> 12

uaaccgauuu caaauggugc uauu

24

<210> 13

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be O-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be O-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> May be 0-methyl uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> May be 0-methyl cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> May be 0-methyl uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> May be 0-methyl uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> May be 0-methyl cytidine

<220>
<221> MOD_RES
<222> (21)..(21)
<223> May be 0-methyl cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> May be 0-methyl uridine
<400> 13

aacacuguuu acgggugguc cua	23
<210> 14	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker

<400> 14

aacacuguuu acgggugguc cua

23

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be O-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be O-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223

> May be adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> May be adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> May be adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> May be adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> May be guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> May be guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> May be adenosine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker

<400> 15

aacacuguuu acaaauugguc cuatt

25

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> May be adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> May be adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> May be adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> May be adenosine

<400> 16

ttaacacugu uuacaaaugg uccua 25

<210> 17

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<

<222> (5)..(5)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 9 carbon linker

<400> 17

aacacuguuu acaaauugguc cua

23

<210> 18

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic first-antisense-guide strand

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> May be modified with a monophosphate moiety

<400> 18

uagcaccauu ugaaaucagu guuuu

25

<210> 19

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic first-antisense-guide strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> May be fluoro cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> May be fluoro uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> May be fluoro uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> May be fluoro uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223>
> May be fluoro uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> May be fluoro cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> May be fluoro uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> May be fluoro uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (23)..(23)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(25)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds

<400> 19

uagcaccauu ugaaauacagu guuuu

25

<210> 20

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic first-antisense-guide strand

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> May be modified with a monophosphate moiety

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223>

May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(25)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds

<400> 20

uagcaccacc cgaauacagu guuuu

25

<210> 21

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic first-antisense-guide strand

<400> 21

uagcaccauu ugaaauacagu guuuu

25

<210> 22

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29c mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<400> 22

uaaccgauuu caaauggugc uauu

24

<210> 23

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29c mimic second-sense-passenger strand

<220>

>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> May be 0-methyl uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> May be 0-methyl uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> May be 0-methyl cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> May be 0-methyl cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (21)..(21)
<223> May be 0-methyl uridine

<400> 23
uaaccguuua caaauggucc ua 22
<210> 24
<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> miR-29c mimic second-sense-passenger strand
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> May be 0-methyl uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be O-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker

<400> 24

uaaccguuuua caaauggucc ua

22

<210> 25

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> May be modified with a monophosphate moiety

<400> 25

uagcaccaauu ugaaaucggu uauu

24

<210> 26

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29c mimic first-antisense-guide strand

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> May be modified with a monophosphate moiety

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221>

> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(24)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds

<400> 26

uagcaccauu ugaaaucgg uauu

24

<210> 27

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

miR-29a mimic first-antisense-guide strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> May be fluoro cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> May be fluoro cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> May be fluoro cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> May be fluoro uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> May be fluoro cytidine
<220>
>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> May be fluoro uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> May be fluoro uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> May be fluoro cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)

<223> May be fluoro uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (21)..(21)
<223> May be fluoro uridine
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(24)
<223> May be joined through phosphorothioate bonds
<400> 27

uagcaccauc ugaaaucggu uauu 24

<210> 28
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> May be 0-methyl adenosine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> May be 0-methyl adenosine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> May be 0-methyl uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> May be 0-methyl adenosine
<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> May be 0-methyl guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be 0-methyl guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker

<400> 28

aacacugauu ucaaauuggug cua

23

<210> 29

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> May be 0-methyl guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be 0-methyl guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(25)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a 6 carbon linker

<400> 29

aacacugauu ucaaauggug cuauu

25

<210> 30

<211> 23

<212

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> May be O-methyl adenosine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> May be O-methyl adenosine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> May be O-methyl cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> May be O-methyl cytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> May be O-methyl uridine
<220>
<221>
> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> May be O-methyl uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> May be O-methyl uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> May be O-methyl uridine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223

> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> May be modified with a cholesterol conjugate with a tetraethylene

glycol moiety

<400> 30

aacacuguuu acaaaugguc cua

23

<210> 31

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic first-antisense-guide strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> May be 0-methyl guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be 0-methyl guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be 0-methyl guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> May be 0-methyl uridine

<400> 31

uagcaccauu ugaaaucagu guu

23

<210> 32

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic first-antisense-guide strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> May be 0-methyl guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> May be 0-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> May be 0-methyl guanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be 0-methyl guanosine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(25)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> May be 0-methyl uridine

<400> 32

uagcaccauu ugaaaucagu guuuu 25

<210> 33

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic first-antisense-guide strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be 0-methyl cytidine

<220>

<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)

<223> May be 0-methyl uridine
<220>

<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)

<223> May be 0-methyl uridine
<220>

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

<223> May be 0-methyl uridine
<220>

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

<223> May be 0-methyl uridine
<220>

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

<223> May be 0-methyl cytidine
<220>

<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)

<223> May be 0-methyl uridine
<220>

<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)

<223> May be 0-methyl uridine
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(25)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds
<220>

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

<223> May be O-methyl uridine

<400> 33

uagcaccaau ugaaaucagu guuuu

25

<210> 34

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic first-antisense-guide strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> May be fluoro uridine

<400> 34

uagcaccauu ugaaucagu guu

23

<210> 35

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29c mimic first-antisense-guide strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> May be fluoro cytidine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> May be fluoro uridine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(24)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds

<400> 35

uagcaccauu ugaaaucgg uauu

24

<210> 36

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antimiR-29

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> May be joined through phosphorothioate bonds

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid deoxyguanosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid deoxythymidine

<220>

<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> May be locked nucleic acid deoxycytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> May be locked nucleic acid deoxyadenosine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> May be locked nucleic acid deoxythymidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> May be locked nucleic acid deoxyguanosine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> May be locked nucleic acid deoxythymidine
<220>
<221> MOD_RES
<
222> (15)..(15)
<223> May be locked nucleic acid deoxycytidine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> May be locked nucleic acid deoxythymidine
<400> 36
gatttcaaat ggtgct 16
<210> 37
<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> miR-29a mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be O-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223

> May be O-methyl adenosine

<400> 37

uaaccgauuu cagauggugc ua

22

<210> 38

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29a mimic first-antisense-guide strand

<400> 38

uagcaccauc ugaaaucggc uauu

24

<210> 39

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be O-methyl adenosine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be O-methyl adenosine

<400> 39

aacacugauu ucaaauuggug cua 23

<210> 40

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29b mimic first-antisense-guide strand

<400> 40

uagcaccauu ugaaaucagu guuuu 25

<210> 41

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29c mimic second-sense-passenger strand

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> May be 0-methyl uridine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> May be 0-methyl adenosine

<400> 41

uaaccgauuu caaaauugguc ua 22

<210> 42

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-29c mimic first-antisense-guide strand

<400> 42

uagcaccauu ugaaaucggu uaau 24