



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2017년01월18일  
 (11) 등록번호 10-1697482  
 (24) 등록일자 2017년01월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 31/7105* (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
- (21) 출원번호 10-2010-7021182  
 (22) 출원일자(국제) 2009년02월26일  
 심사청구일자 2014년02월24일
- (85) 번역문제출일자 2010년09월20일  
 (65) 공개번호 10-2010-0126430  
 (43) 공개일자 2010년12월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2009/001590  
 (87) 국제공개번호 WO 2009/106367  
 국제공개일자 2009년09월03일
- (30) 우선권주장  
 08003570.2 2008년02월27일  
 유럽특허청(EPO)(EP)  
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
 AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, PHILADELPHIA,  
 PA, US, 170(6), 1831-1840(2007.06.01.)\*  
 CIRCULATION RESEARCH, GRUNE AND STRATTON,  
 BALTIMORE, US, 100(3), 416-424(2007.02.01.)  
 WO2006053014 A2  
 WO2008043521 A2  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
 율리우스-막시밀리안스 유니버저테트 뷔르츠부르크  
 독일 97070 뷔르츠부르크 잔더링 2
- (72) 발명자  
 텀, 토마스  
 독일 뷔르츠부르크 97082, 루트프레세르웨그 24  
 바우어사취스, 조한  
 독일 뷔르츠부르크 97074, 쾰르스트라세 15  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 최덕규

전체 청구항 수 : 총 35 항

심사관 : 박수진

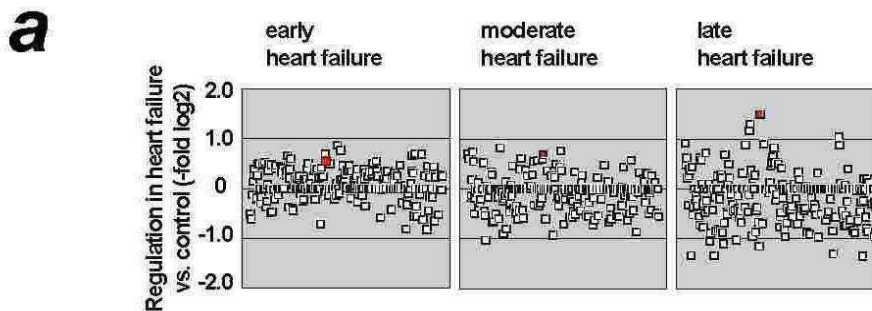
(54) 발명의 명칭 진단 및 치료 목적을 위한 마이크로RNA 및 다운스트림 타겟

**(57) 요약**

본 발명은 마이크로RNA (miRNA)의 프로모터 부위, 마이크로RNA 특히 miR-21의 용도에 관한 것이고, 섬유증 및/또는 섬유증과 관련된 질병의 치료 및/또는 진단을 위한 약물의 제조 및 진단을 위한 요소에 관한 것이다. 추가적으로, 본 발명은 miR-21의 표적에 상보적인 안티센스 올리고 뉴클레오티드에 관한 것이다. miR-21이 결손된

(뒷면에 계속)

**대표도**



세포, miR-21의 프로모터 부위 및 표적과 그것들의 녹-아웃(knock-out)된 기관도 또한 포함된다. 결론적으로, 본 발명은 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병을 진단하기 위한 방법에 관한 것이고, 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병의 치료를 위한 약학적으로 활성화된 화합물을 검사(screening)하기 위한 방법에 관한 것이다.

더 나아가, 본 발명은 섬유증의 치료, 회복, 및/또는 예방에 사용하기 위한 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 조성물은 섬유증의 치료, 회복, 및/또는 예방을 위한 miRNA의 활성을 조절한다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 조성물은 섬유증의 치료, 회복, 및/또는 예방을 위한 miRNA의 활성을 억제한다.

대표도: 도 1a

(72) 발명자

**엔겔하르트, 스테판**

독일 뷔르츠부르크 97082, 윈터레이텐웨그 33

**그로스, 카리나**

독일 뷔르츠부르크 97072, 후텐스트라세 24에이

(30) 우선권주장

61/031,835 2008년02월27일 미국(US)

61/033,340 2008년03월03일 미국(US)

PCT/EP2009/051986 2009년02월19일 세계지적재산권기구(WIPO)(WO)

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

12 내지 30개의 연결 뉴클레오시드(linked nucleoside)로 구성된 변형 올리고뉴클레오티드(modified oligo nucleotide)를 함유하는 화합물을 포함하고, 상기 변형 올리고뉴클레오티드가 miR-21에 대해 상보적인 핵염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물을 섬유증이 있는 개체 또는 섬유증으로 의심되는 개체에 투여하여 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 섬유증은 간 섬유증, 심장 섬유증, 신장 섬유증, 폐 섬유증, 피부 섬유증, 노화관련 섬유증, 또는 비장 섬유증인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 개체는 심장병 또는 그 증상, 간질환 또는 그 증상, 폐질환 또는 그 증상, 및 신장병 또는 그 증상 중에서 선택된 적어도 어느 하나의 질병 또는 증상을 갖는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 하나 이상의 부가적인 의약제제를 더 포함하고, 제1항의 상기 화합물과 상기 부가된 의약제제는 동일한 조성물 내에서 제형되지 않는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 하나 이상의 부가적 의약제제는 이뇨제, 혈관확장제(vasodilator), 안지오텐신(angiotensin) II 전환 효소(ACE) 억제제, 안지오텐신 II 리셉터 블록커(ARB), 칼슘채널 블록커, 히드랄라진 및 베타 블록커 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 섬유증을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 ACE 억제제는 캡토프릴(captopril), 이넬러프릴(enalapril), 리시노프릴(lisinopril), 베나제프릴(benazepril), 퀴나프릴(quinapril), 포시노프릴(fosinopril) 및 라미프릴(ramipril) 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 섬유증을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 8**

제6항에 있어서, 상기 ARB는 칸데사르탄(candesartan), 이르베르사르탄(irbesartan), 올메르사르탄

(olmesartan), 로사르탄(losartan), 발사르탄(valsartan), 텔미사르탄(telmisartan), 및 에프로사르탄(eprosartan) 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 섬유증을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 섬유증을 치료하거나 또는 예방하는 것은,

- a) 섬유증을 개선하는 것;
- b) 섬유증의 추가적인 진행을 늦추는 것;
- c) 섬유증의 추가적인 진행을 중단하는 것;
- d) 섬유증을 감소시키는 것; 또는
- e) 상기 둘 이상의 조합인 것;

을 특징으로 하는 섬유증을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 변형 올리고뉴클레오티드는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 연결 뉴클레오티드로 구성되고, 변형 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO. 12인 핵염기 서열의 연속되는 핵염기가 적어도 15개의 인접한 핵염기를 갖는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 11**

제1항에 있어서, 상기 화합물은 하나의 리간드에 컨쥬게이트된(conjugated) 변형 뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 상기 연결 뉴클레오티드 중 적어도 하나는 변형 뉴클레오티드 결합인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 상기 연결 뉴클레오티드의 각각은 변형된 당(modified sugar)을 포함하는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 변형된 당은 하나의 2'-O-메톡시에틸 당, 하나의 2'-플루오로 당, 하나의 2'-O-메틸 당, 또는 이환성 당 성분(bicyclic sugar moiety)으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 상기 연결 뉴클레오티드의 최소한 하나는 변형 핵염기(modified nucleobase)를 포함하는 것을

특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 변형 핵염기는 5-메틸시토신인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 상기 변형 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO. 1의 핵염기 서열에 대하여 적어도 90%가 상보적인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

제1항에 있어서, 상기 뉴클레오시드 간의 각각의 결합은 변형된 뉴클레오시드간의 결합인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오시드간의 결합은 포스포로시오에이트 뉴클레오시드간 결합인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오시드간의 결합의 각각은 포스포로시오에이트 뉴클레오시드간 결합인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 22**

제1항에 있어서, 각각의 뉴클레오시드는 변형된 당을 포함하는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 변형된 당의 각각은 하나의 2'-O-메톡시에틸 당, 하나의 2'-플루오로 당, 하나의 2'-O-메틸 당, 또는 이환성 당 성분(bicyclic sugar moiety)으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 상기 변형 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO. 1의 핵염기 서열에 대하여 적어도 95%가 상보적인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 25**

제1항에 있어서, 상기 변형 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO. 1의 핵염기 서열에 대하여 적어도 100%가 상보적인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 섬유증은 심장 섬유증인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 27**

제25항에 있어서, 상기 섬유증은 간 섬유증인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 28**

제25항에 있어서, 상기 섬유증은 신장 섬유증인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 29**

제25항에 있어서, 상기 섬유증은 폐 섬유증인 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 30**

섬유증 의심 환자로부터 얻어진 샘플에서 miR-21의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 섬유증의 진단방법으로서, 제어샘플에 비교한 miR-21의 여기 레벨(elevated level)이 섬유증 또는 섬유증 성향임을 나타내는 것을 특징으로 하는 섬유증의 진단방법.

**청구항 31**

- a) miR-21을 함유하는 샘플에 대하여 후보물질을 접촉시키는 단계; 및
  - b) 상기 샘플 상에서 상기 후보물질의 효과를 결정하는 단계;
- 를 포함하고,

miR-21의 레벨 또는 활성 변화가 약학적 활성 화합물임을 나타내는 것을 특징으로 하는 섬유증 또는 섬유증 성향을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 활성 화합물의 생체 외 검사방법.

**청구항 32**

제1항에 있어서, 상기 변형 올리고뉴클레오티드는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 연결 뉴클레오시드로 구성되고, 변형 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO. 12인 핵염기 서열의 연속되는 핵염기가 적어도 16개의 인접한 핵염기를 갖는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 33**

제1항에 있어서, 상기 변형 올리고뉴클레오티드는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 연결 뉴클레오티드로 구성되고, 변형 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO. 12인 핵염기 서열의 연속되는 핵염기가 적어도 17개의 인접한 핵염기를 갖는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 34**

제1항에 있어서, 상기 변형 올리고뉴클레오티드는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 연결 뉴클레오티드로 구성되고, 변형 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO. 12인 핵염기 서열의 연속되는 핵염기가 적어도 18개의 인접한 핵염기를 갖는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 35**

제1항에 있어서, 상기 변형 올리고뉴클레오티드는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 연결 뉴클레오티드로 구성되고, 변형 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO. 12인 핵염기 서열의 연속되는 핵염기가 적어도 19개의 인접한 핵염기를 갖는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 36**

제1항에 있어서, 상기 변형 올리고뉴클레오티드는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 연결 뉴클레오티드로 구성되고, 변형 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO. 12인 핵염기 서열의 연속되는 핵염기가 적어도 20개의 인접한 핵염기를 갖는 것을 특징으로 하는 섬유증(fibrosis)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 37**

제11항에 있어서, 상기 리간드는 콜레스테롤인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제



- 청구항 59
- 삭제
- 청구항 60
- 삭제
- 청구항 61
- 삭제
- 청구항 62
- 삭제
- 청구항 63
- 삭제
- 청구항 64
- 삭제
- 청구항 65
- 삭제
- 청구항 66
- 삭제
- 청구항 67
- 삭제
- 청구항 68
- 삭제
- 청구항 69
- 삭제
- 청구항 70
- 삭제
- 청구항 71
- 삭제
- 청구항 72
- 삭제
- 청구항 73
- 삭제
- 청구항 74
- 삭제

- 청구항 75  
삭제
- 청구항 76  
삭제
- 청구항 77  
삭제
- 청구항 78  
삭제
- 청구항 79  
삭제
- 청구항 80  
삭제
- 청구항 81  
삭제
- 청구항 82  
삭제
- 청구항 83  
삭제
- 청구항 84  
삭제
- 청구항 85  
삭제
- 청구항 86  
삭제
- 청구항 87  
삭제
- 청구항 88  
삭제
- 청구항 89  
삭제
- 청구항 90  
삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 마이크로RNA(miRNA)의 분야에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 섬유증 및 다른 질병들에 대한 진단, 예방 및/또는 치료를 위한 miR-21과 그것의 다운-스트림 표적(down-stream targets)에 관한 것이다. 더 나아가, 본 발명은 섬유증 치료를 위한 조성물, 그 치료방법 및 용도에 관한 것이다. 그러한 방법은 섬유증이 있는 개체 내의 miRNA 활성화를 조절하고 억제하는 것을 포함한다.

**배경 기술**

[0002] 마이크로RNA들은 상보적인 표적 mRNA들의 발현을 조절하는 것에 의한 주된 신호 경로를 포함하는 다양한 생물학적 공정을 조절하는 작은 비-암호화된 RNA들의 넓은 분류이다(Ambros, 2004). 다양한 질병 독립체들 내에서 마이크로RNA들의 조절장애는 계놈에서 변이에 의해 발생되고(Mi et al., 2007), 마이크로RNA 기능이 종양 억제유전자 또는 종양 유전자로 변화하는 어떤 경우에 식별되는 발현 또는 바이러스성 감염에 의해 발생된다. 마이크로RNA는 우수한 유전학 연구의 연속으로 다양한 심장 기능의 조절에 대한 원인 인자임이 최근에 밝혀졌다(Care et al., 2007; Yang et al., 2007). 비록 이러한 연구는 심장 생리, 성장 및 형태 형성 내에서 마이크로RNA의 역할을 상세히 기술하는데 도움을 주었지만, 생체내 질병 경로에서 마이크로RNA를 위한 상세한 분자적 메커니즘은 거의 알려지지 않았다. 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 마이크로RNA의 길항제는 표적 mRNA에 효과를 나타냄과 동시에 생체내 및 실험관 내에서 내생 마이크로RNA(endogenous microRNAs)를 침묵(silence)시키는 것으로 나타났다(Kruetzfeldt et al., 2005; Esau et al., 2006). 이러한 발견은 마이크로RNA 기능의 생체내 확인을 위한 마이크로RNA의 길항제의 적용에 대하여 나타냈고, 아마도 더 중요하게도, 신규한 치료법적인 양상으로서 이에 대하여 나타내었다.

**발명의 내용**

[0003] **발명의 요약**

[0004] 본 발명은 마이크로RNA의 프로모터 부위, 마이크로RNA의 용도, 특히 miR-21, 및 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병들의 치료 및/또는 예방을 위한 약의 제조 및 진단을 위한 요소들에 관한 것이다. 추가적으로, 본 발명은 miR-21의 표적에 상보적인 다양한 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 또한 본 발명은 miR-21이 결손된 세포, 상기 프로모터 부위 및 miR-21의 표적 그리고 그것들의 녹-아웃 기관(knock-out organism)을 포함한다. 결국, 본 발명은 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병을 진단하기 위한 방법 및 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병의 치료를 위한 약학적으로 활성화된 화합물을 검사(screening)하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0005] 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 개체에게 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleoside)로 구성되고 miRNA에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 화합물을 투여하는 섬유증 치료방법을 제공한다.

[0006] 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 개체를 식별해내는 방법; 및 상기 개체에 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성된 화합물을 투여하는 방법을 제공하는데, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 miRNA 또는 그것의 전구체와 상보적이다.

[0007] 본 발명은 섬유증이 발생할 위험이 있는 개체에 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 구성되고 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 화합물을 투여하는 방법을 제공하며, 이로써 섬유증은 예방된다. 본 발명의 하나의 구체예로, 섬유증은 간 섬유증(liver fibrosis)이다. 본 발명의 또 다른 구체예로, 섬유증은 폐 섬유증(lung fibrosis)이다. 본 발명의 또 다른 구체예로, 섬유증은 피부 섬유증(skin fibrosis)이다. 본 발명의 또 다른 구체예로, 섬유증은 노화관련 섬유증(age-related fibrosis)이다. 본 발명의 또 다른 구체예로, 섬유증은 심장 섬유증이다. 본 발명의 또 다른 구체예로,

섬유증은 신장 섬유증(kidney fibrosis)이다. 본 발명의 또 다른 구체예로, 섬유증은 비장 섬유증(spleen fibrosis)이다.

- [0008] 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 개체에게 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleoside)로 구성되고 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 화합물을 투여하는 방법을 제공하는데, 상기 개체는 적어도 하나의 심장 질환(cardiac disease) 또는 그러한 상태를 갖는다.
- [0009] 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 적어도 하나의 심장 질환 또는 그러한 상태를 갖는 개체를 식별해내는 방법; 및 상기 개체에 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성된 화합물을 투여하는 방법을 제공하는데, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 miRNA 또는 그것의 전구체와 상보적이다.
- [0010] 본 발명의 하나의 구체예로, 심장 질환 또는 그러한 상태는 심장 비대증(hypertrophy), 고혈압(hypertensive heart failure), 심장 확장증(diastolic heart failure), 심장 수축증(systolic heart failure), 심장관련 축적증(heart-related storage disease), 심근증(cardiomyopathy), 협착성 심낭염(constrictive pericarditis), 관상동맥 질병(coronary artery disease), 급성 심근경색증(acute myocardial infarction), 만성 심근경색증(chronic myocardial infarction), 심장마비(right heart failure), 심장 부정맥(cardiac arrhythmias), 심근염관련 섬유증(myocarditis-related fibrosis) 및 심장판막증(heart valve disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0011] 본 발명의 하나의 구체예로, 상기 심근증(cardiomyopathy)은 팽창성 심근증(dilatative cardiomyopathy), 폐색증을 갖는 비대성 심근증(hypertrophic cardiomyopathy with obstruction), 폐색증을 갖지 않는 비대성 심근증(hypertrophic cardiomyopathy without obstruction), 수축성 심근증(restrictive cardiomyopathy), 부정맥성 비대 심근증(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy), 당뇨병성 심근증(diabetic cardiomyopathy) 중 어느 하나이다.
- [0012] 본 발명의 하나의 구체예로, 상기 심장판막증(heart valve disease)은 심장 승모판 협착증(mitral valve stenosis), 대동맥판막 협착증(aortic valve stenosis), 삼첨판 협착증(tricuspidal valve stenosis), 폐동맥판 협착증(pulmonary valve stenosis) 중 어느 하나이다.
- [0013] 본 발명의 하나의 구체예로, 상기 심장판막증(heart valve disease)은 심장 승모판 기능 부전(mitral valve insufficiency), 대동맥판막 기능 부전(aortic valve insufficiency), 삼첨판막 기능 부전(tricuspidal valve insufficiency) 및 폐동맥판막 기능 부전(pulmonary valve insufficiency) 중 어느 하나이다.
- [0014] 본 발명의 하나의 구체예로, 본 발명에서 제공하는 상기 방법들은 더 나아가 하나 또는 그 이상의 추가적인 의약제제를 투여하는 것으로 구성된다.
- [0015] 본 발명의 하나의 구체예로, 상기 투여는 심장 무게 증가(heart weight increase), 좌심실 확장(left ventricular dilation) 또는 좌심실단축률의 손상(impairment of fractional shortening)을 개선한다.
- [0016] 본 발명의 하나의 구체예로, 상기 투여는 심장 무게 증가(heart weight increase), 좌심실 확장(left ventricular dilation) 또는 좌심실단축률의 손상(impairment of fractional shortening)을 예방한다.
- [0017] 본 발명의 하나의 구체예로, 상기 투여는 심장 기능(cardiac function)을 향상시킨다.
- [0018] 본 발명의 하나의 구체예로, 상기 투여는 정맥주사(intravenous administration), 피하주사(subcutaneous administration), 동맥주사(intraarterial administration), 심장내 주사(intracardial administration)를 포함한다.
- [0019] 본 발명에서 제공하는 섬유증을 치료하는 방법은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 개체에게 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 구성되고 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 화합물을 투여하는 것으로, 상기 개체는 적어도 하나의 간 질환 또는 그러한 상태를 갖는다.
- [0020] 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 적어도 하나의 심장 질환 또는 그러한 상태를 갖는 개체를 식별해내는 방법을 제공하는데, 상기 개체는 적어도 하나의 간 질환 또는 그러한 상태를 갖고; 상기 개체에게 투여하는 것은 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성된

화합물로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 miRNA 또는 그것의 전구체와 상보적이다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 간 질환 또는 그러한 상태는 만성적 간 질환이다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 간 질환 또는 그러한 상태는 바이러스 감염 간염(hepatitis virus infection)이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 감염 간염은 C형 간염(hepatitis C virus infection)이다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 간 질환 또는 그러한 상태는 비알콜성 지방 간염(non-alcoholic steatohepatitis)이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 투여는 정맥주사(intravenous administration) 또는 피하주사(subcutaneous administration)이다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 간 질환 또는 그러한 상태는 간경변(cirrhosis)이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 투여는 간 기능을 향상시킨다.

[0021] 본 발명에서 제공하는 섬유증을 치료하는 방법은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 개체에게 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 구성되고 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 화합물을 투여하는 것으로, 상기 개체는 적어도 하나의 폐 질환 또는 그러한 상태를 갖는다.

[0022] 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 적어도 하나의 폐 질환 또는 그러한 상태를 갖는 개체를 식별해내는 방법; 및 상기 개체에 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성된 화합물을 투여하는 방법을 제공하는데, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 miRNA 또는 그것의 전구체와 상보적이다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 다른 폐 질환 또는 그러한 상태는 만성 폐색성 폐질환(chronic obstructive lung disease)이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 투여는 폐정맥 주사(pulmonary administration)이다.

[0023] 본 발명에서 제공하는 섬유증을 치료하는 방법은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 개체에게 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 구성되고 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 화합물을 투여하는 것으로, 상기 개체는 적어도 하나의 다른 질병 또는 그러한 상태를 갖는다.

[0024] 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 적어도 하나의 다른 질환 또는 그러한 상태를 갖는 개체를 식별해내는 방법; 및 상기 개체에 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성된 화합물을 투여하는 방법을 제공하는데, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 miRNA 또는 그것의 전구체와 상보적이다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 다른 질병 또는 그러한 상태는 폐고혈압(pulmonary hypertension)이다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 다른 질환 또는 그러한 상태는 혈관 관련 질병(blood-vessel related disease)이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 혈관 관련 질병은 동맥경화(arterial stiffn), 동맥중층경화(mediasclerosis) 및 동맥경화(arteriosclerosis) 중 어느 하나이다. 본 발명의 한 구체예로, 적어도 하나의 다른 질환 또는 그러한 상태는 소화관 경화증(gut sclerosis)이다. 본 발명의 한 구체예로, 적어도 하나의 다른 질환 또는 그러한 상태는 전신 경화증(systemic sclerosis)이다. 본 발명의 한 구체예로, 적어도 하나의 다른 질환 또는 그러한 상태는 복막후 섬유증(retroperitoneal fibrosis), 증식성 섬유증(proliferative fibrosis), 종양성 섬유증(neoplastic fibrosis), 신장 전신 섬유증(nephrogenic systemic fibrosis), 주사 섬유증(injection fibrosis), 종격종 섬유증(mediastinal fibrosis), 골수섬유증(myelofibrosis), 정관 절제 수술 후 통증 증후군(post-vasectomy pain syndrome) 또는 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis) 중 어느 하나이다.

[0025] 본 발명의 일 구체예로, 상기 투여는 섬유증을 개선한다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 투여는 더 나아가 섬유증의 진행을 늦추게 한다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 투여는 더 나아가 섬유증의 진행을 정지시키게 한다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 투여는 섬유증을 감소시킨다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 투여는 콜라겐 함량(collagen content)을 감소시킨다.

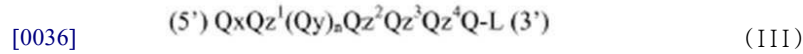
[0026] 본 발명에서 제공하는 섬유증식성 장애(fibroproliferative disorder)를 치료하는 방법은 섬유증식성 장애(fibroproliferative disorder)가 있거나 섬유증식성 장애(fibroproliferative disorder)가 의심되는 개체에게 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성된 화합물을 투여하는 방법으로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 miRNA 또는 그것의 전구체와 상보적이고, 이에 따라 섬유증식성 장애(fibroproliferative disorder)를 치료할 수 있다.

[0027] 본 발명의 한 구체예로, 상기 투여는 정맥주사(intravenous administration), 피하주사(subcutaneous administration), 폐내주사(pulmonary administration), 동맥주사(intraarterial administration), 심장내 주사(intracardiac administration)를 포함한다.

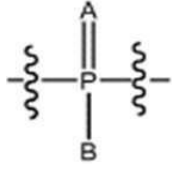


- [0028] 본 발명에서 제공하는 섬유모세포(fibroblast) 증식을 억제하는 방법은 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 구성되고 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 화합물을 섬유모세포(fibroblast)에 접촉시키는 것으로 구성되며, 이에 따라 섬유모세포(fibroblast) 증식을 억제한다.
- [0029] 본 발명에서 제공하는 섬유모세포 세포사멸(fibroblast apoptosis)을 촉진하기 위한 방법은 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 구성되고 miR-21 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 화합물을 섬유모세포에 접촉시키는 것으로 구성되며, 이에 따라 섬유모세포의 세포사멸(fibroblast apoptosis)을 촉진시킨다.
- [0030] 본 발명에서 제공하는 섬유모세포에 있는 스프라우티 1 단백질(Sprouty 1 protein)을 증가시키는 방법은 12 내지 30개가 연결된 뉴클레오시드(nucleosides)로 구성되고 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 화합물을 상기 섬유모세포(fibroblast)에 접촉시키는 것으로 구성되며, 이에 따라 스프라우티 1 단백질의 발현을 촉진시킨다.
- [0031] 본 발명은 마이크로 RNA를 억제하기 위한 조성물을 제공한다. 본 발명의 한 구체예로, 상기 miRNA는 miR-21이다. 본 발명의 한 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 miR-21 또는 그것의 전구체와 적어도 80%가 동일한 핵염기 서열에 상보적인 핵염기 서열을 갖는다. 본 발명의 일 구체예로, miR-21은 SEQ ID NO: 1로 기재되는 핵염기 서열을 갖는다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 miR-21 전구체는 SEQ ID NO: 11로 기재되는 핵염기 서열을 갖는다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 12 내지 30개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 12개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 13개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 14개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 15 내지 24개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 15개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 16개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 17개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 18개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 19개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 20개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 21개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 22개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 23개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 24개 연결된 뉴클레오시드로 구성된다.
- [0033] 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 miR-21 또는 그것의 전구체의 핵염기 서열에 있어서 두 개 이상 잘못 매치된 경우는 없다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 miR-21 또는 그것의 전구체의 핵염기 서열에 있어서 하나 이상의 잘못 매치된 경우는 없다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 miR-21 또는 그것의 전구체의 핵염기 서열에 있어서 어떠한 경우에도 잘못 매치되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 상기 핵염기 서열이 SEQ ID NO: 12인 적어도 15개의 인접한 핵염기들로 구성된다. 본 발명의 일 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 상기 핵염기 서열이 SEQ ID NO: 12인 적어도 16개의 인접한 핵염기들로 구성된다. 본 발명의 일 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 상기 핵염기 서열이 SEQ ID NO: 12인 적어도 17개의 인접한 핵염기들로 구성된다. 본 발명의 일 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 상기 핵염기 서열이 SEQ ID NO: 12인 적어도 18개의 인접한 핵염기들로 구성된다. 본 발명의 일 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 상기 핵염기 서열이 SEQ ID NO: 12인 적어도 19개의 인접한 핵염기들로 구성된다. 본 발명의 일 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 상기 핵염기 서열이 SEQ ID NO: 12인 적어도 20개의 인접한 핵염기들로 구성된다. 본 발명의 일 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 상기 핵염기 서열이 SEQ ID NO: 12인 적어도 21개의 인접한 핵염기들로 구성된다. 본 발명의 일 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 상기 핵염기 서열이 SEQ ID NO: 12인 적어도 22개의 인접한 핵염기들로 구성된다.

[0035] 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 상기 핵염기 서열이 SEQ ID NO: 12로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 화합물은 리간드에 공액결합된 변형된 올리고뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예는 하기 화학식(III)을 나타낸다.

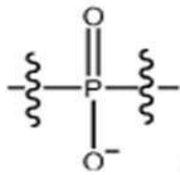


[0037] 상기의 식에서, 각각의 Q는 독립적으로 2'-O-메틸 변형 뉴클레오시드이다;



[0038] x는 이고;

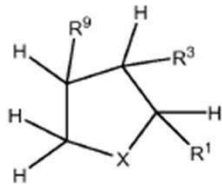
[0039] 상기 식에서, A와 B 중 어느 하나는 S이고, 다른 하나는 O이다;



[0040] y는 이다;

[0041]  $z^1, z^2, z^3$ 의 각각과  $z^4$ 는 독립적으로 x 또는 y이다;

[0042]  $n = 6-17$ 이다;



[0043] L은 이다;

[0044] 상기의 식에서,

[0045] X는  $N(CO)R^7$  또는  $NR^7$ 이고,

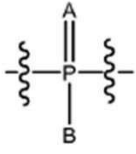
[0046]  $R^1, R^3$  및  $R^9$ 의 각각은 독립적으로 H, OH 또는  $-CH_2OR^b$ 을 나타내고,

[0047]  $R^1, R^3$  및  $R^9$  중 적어도 하나는 OH이고  $R^1, R^3$  및  $R^9$ 의 적어도 하나는  $-CH_2OR^b$ 이며,

[0048]  $R^7$ 은  $R^d$  또는  $(NR^cR^d)$  또는  $NHC(O)R^d$ 로 치환된  $C_1-C_{20}$  알킬)이고,

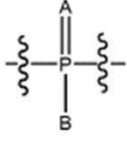
[0049]  $R^c$ 는 H 또는  $C_1-C_6$  알킬이며,

[0050]  $R^d$ 는 탄수화물 라디칼(carbohydrate radical); 또는 스테로이드 라디칼(steroid radical)이고, 상기 각각은 선택적으로 적어도 하나의 탄수화물 라디칼(carbohydrate radical)에 연결되며;



[0051] R<sup>b</sup>는 이고, 상기 A와 B 중 어느 하나는 S이고 다른 하나는 O이다.

[0052] 본 발명의 일 구체예에서, R<sup>d</sup>는 콜레스테롤(cholesterol)이다. 본 발명의 일 구체예에서, z<sup>1</sup>, z<sup>2</sup>, z<sup>3</sup>, 및 z<sup>4</sup>의



각각은 이고, 상기 A와 B 중 어느 하나는 S이고, 다른 하나는 O이다.

[0053] 본 발명의 일 구체예에서, R<sup>1</sup>은 -CH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>이다. 본 발명의 일 구체예에서, R<sup>9</sup>는 OH이다. 본 발명의 일 구체예에서, R<sup>1</sup>와 R<sup>9</sup>는 트랜스(trans) 구조이다. 본 발명의 일 구체예에서, R<sup>1</sup>과 R<sup>3</sup>는 트랜스(trans) 구조이다. 본 발명의 일 구체예에서, R<sup>3</sup>는 -CH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>이다. 본 발명의 일 구체예에서, R<sup>1</sup>는 OH이다. 본 발명의 일 구체예에서, R<sup>1</sup>과 R<sup>3</sup>는 트랜스(trans) 구조이다. 본 발명의 일 구체예에서, R<sup>3</sup>와 R<sup>9</sup>는 트랜스(trans) 구조이다. 본 발명의 일 구체예에서, R<sup>9</sup>는 CH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>이다. 본 발명의 일 구체예에서, X는 NC(O)R<sup>7</sup>이다. 본 발명의 일 구체예에서, R<sup>7</sup>는 -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)R<sup>d</sup>이다.

[0054] 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 뉴클레오타이드간의 연결은 변형된 뉴클레오타이드간의 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 각각의 뉴클레오타이드간 연결은 변형된 뉴클레오타이드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로시오에이트 뉴클레오타이드간 연결(phosphorothioate internucleoside linkage)이다. 본 발명의 일 구체예로, 각각의 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로시오에이트 뉴클레오타이드간 연결(phosphorothioate internucleoside linkage)이다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 변형된 당을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 많은 수의 뉴클레오타이드는 변형된 당을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 각각의 뉴클레오타이드는 변형된 당을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 뉴클레오타이드는 2'-O-메톡시에틸 당(2'-O-methoxyethyl sugar)을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 많은 수의 뉴클레오타이드 각각은 2'-O-메톡시에틸 당(2'-O-methoxyethyl sugar)을 포함하며, 2'-플루오로 당(2'-fluoro sugar)을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 각각의 변형된 당은 독립적으로 2'-O-메톡시에틸 당(2'-O-methoxyethyl sugar), 2'-플루오로 당(2'-fluoro sugar), 2'-O-메틸 당(2'-O-methyl sugar), 또는 이환성 당 일부(bicyclic sugar moiety)이다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 변형된 핵염기로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 핵염기는 5-메틸시토신(5-methylcytosine)이다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 시토신(cytosine)이고, 상기 시토신(cytosine)은 5-메틸시토신(5-methylcytosine)이다. 본 발명의 일 구체예로, 각각의 시토신(cytosine)은 5-메틸시토신(5-methylcytosine)이다.

[0055] 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO: 1인 핵염기 서열에 적어도 90% 정도 상보적이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO: 1인 핵염기 서열에 적어도 95% 정도 상보적이다. 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO: 1인 핵염기 서열에 적어도 100% 정도 상보적이다. 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO: 1인 핵염기 서열에 전체로(full-length) 상보적이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO: 11인 핵염기 서열에 적어도 90% 정도 상보적이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO: 11인 핵염기 서열에 적어도 95% 정도 상보적이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 SEQ ID NO: 11인 핵염기 서열에 적어도 100% 정도 상보적이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 miR-21 핵염기 서열은 SEQ ID NO: 1인 핵염기 서열로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 전구체 핵염기 서열은 SEQ ID NO: 11인 핵염기 서열로 구성된다.

[0056] 본 발명의 한 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오타이드로 구성된 상기 화합물은 의약조성물로 준비된다. 본 발명의 한 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 의약조성물로 준비된다.

[0057] 본 발명의 한 구체예로, 상기 화합물은 변형된 올리고뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 한 구체예로, 상기

변형된 올리고뉴클레오타이드는 단일-가닥의 변형 올리고뉴클레오타이드이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.

- [0058] 본 발명은 섬유증의 치료, 예방, 및/또는 개선을 위해 사용되는 조성물을 제공한다. 더 나아가 본 발명은 miRNA에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드로 구성되는 섬유증의 치료, 예방, 및/또는 개선용 화합물을 제공한다.
- [0059] 본 발명은 섬유증의 치료 및/또는 예방용 약물의 제조를 위한 miR-21에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0060] 본 발명은 섬유증의 치료 및/또는 예방을 위해 사용되는 것으로 miR-21에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0061] 본 발명은 섬유증 치료용으로 miR-21 및/또는 miR-21에 대항하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 용도를 제공한다.
- [0062] 본 발명은 섬유증 진단용으로 miR-21 및/또는 miR-21에 대항하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 용도를 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

**[0063] 도 1: 심장질환에서의 miR-21 탈조절 및 심장 섬유모세포에서의 우세한 발현**

- (a) 마이크로어레이에 의한 마이크로 RNA-발현 분석. RNA는 심부전증의 초기(3개월 연령), 중기(6개월 연령), 그리고 말기(12개월 연령)에 심부전증을 가진 쥐 모델( $\beta$ 1AR-TG 쥐)의 좌심실 심근(ventricular myocardium)에서 분리되었다. 발현은 폴드(fold) 조절 대 와일드 타입(wild type) 제어로 제시된다. miR-21은 붉은 색으로 표시된다. 데이터는 그룹당 3-4개의 독립 혼성화로부터 온다.
- (b)(Left)  $\beta$ 1AR-TG 쥐에서, 심부전증의 서로 다른 단계에서 miR-21 발현에 대한 노던 블롯 분석. Right 상부 패널에서 온 데이터의 정량 분석
- (c)(Left) 심부전이 아닌 그리고 심부전인 인간의 좌심실 심근에서 miR-21 발현의 노던 블롯 분석. (Right) 심부전이 아닌 그리고 심부전인 인간의 좌심실 심근에서 성숙한 형태의 miR-21의 정량 분석.
- (d)(Upper) 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(4',6-diamidino-2-phenylindole) (DAPI)로 염색된 신생아 심근세포 및 스크램블-miR (control-pre-miR, 50 nM, 72 h), 합성(synthetic) miR-21 (pre-miR-21, 50 nM, 72 h) 및 miR-21 억제제 (anti-miR-21, 50 nM, 72 h)로 형질전환 후  $\alpha$ -악티닌( $\alpha$ -actinin)에 대하여 유도된 항체. 심근세포는 조절 조건하(부연 설명된 방법들 참조)에서 배양되거나 또는 48시간 동안 FCS (5%)로 자극하였다. (Lower) 개개의 심근세포 크기(히스토그램 분석)의 정량 분석. n>200 심근세포는 그룹당 분석되었다.
- (e)(Upper)  $\alpha$ -MHC 프로모터 조절 하에서 miR-21를 발현하는 유전자 이식 쥐의 생성. (Middle) 와일드 타입(WT, wild type)에서 성숙한 miR-21의 노던 블롯 및 유전자 이식 (TG) 동물들. (Lower) 발생학적 형태(HE-stain) 및 콜라겐 퇴적(collagen deposition)을 결정하기 위하여 염색된 와일드 타입에서 온 단면 심장 영역 및 miR-21-유전자 이식 쥐(시리우스 적색(Sirius red)).
- (f) 심장 섬유모세포 및 심근세포에서의 miR-21 발현. 노던 블롯 (Upper) 및 정량적 실시간-PCR 분석 (Lower). 모든 에러 막대는 a-f에 대한 SEM. n=3-6을 나타낸다.

**도 2: miR-21를 통한 스프라우티(Sprouty) 1의 억제는 ERK-신호전달(signaling)을 탈억제하고 섬유모세포 생존을 향상시킨다.**

- (a) Spry1 LacZ +/- 쥐에서 온 심장을 X-갈(gal)로 염색하였다. 거시적(upper) 및 미시적(lower) 분석은 심장 섬유모세포에서의 LacZ의 검출을 보여준다. 짧은 검은 막대는 100  $\mu$ m를 나타낸다. 긴 검은 막대는 10  $\mu$ m를 나타낸다.
- (b, c) (Upper) 심부전인 인간의 좌심실에서 SPRY1, ERK1/2 및 인(phosphor)-ERK1/2의 검출 (b) 및 스크램블-마이크로RNA (Pre-miR<sup>T</sup> negative Control #2, 50 nM, 72h), 합성 miR-21 (pre-miR-21, 50 nM, 72 h) 또는 miR-21 저해제(anti-miR-21, 50 nM, 72 h)를 갖는 공동-배양된 심근세포 및 섬유모세포의 형질전환 후. Lower 웨스

턴 블로팅의 정량 분석 결과.

(d)(Upper) SPRY1 (150 nM, 72 h)의 siRNA-중재 녹-다운(knockdown) 또는 공동-배양된 심장 세포의 스크램블 siRNA (150 nM, 72 h) 처리 후 SPRY1, ERK1/2, phospho-ERK1/2의 결정. (Lower) 웨스턴 블로팅의 정량 분석 결과.

(e)(Upper) 스크램블-마이크로RNA (control-pre-miR, 100 nM, 72 h), 합성 miR-21 (pre-miR- 21, 100 nM, 72 h), miR-21 길항제 (anti-miR-21, 100 nM, 72 h) 또는 해당 대조군(100 nM, 72 h) 처리 후 아넥신 V-양성 심장 섬유모세포의 FACS 분석. (Lower) 각 처리 후의 아넥신 V-양성 세포에 대한 정량 분석.

(f)(Upper) 스크램블(scrambled)-마이크로RNA (control pre-miR, 100 nM, 72 h), 합성 miR- 21 (pre-miR-21, 100 nM, 72 h) 또는 miR-21 길항제 (anti-miR-21, 100 nM, 72 h) 처리 후 배양된 심장 섬유모세포의 상청액 (supernatant)에서의 FGF2 농도 또는 (lower) SPRY1 (150 nM, 72 h)의 siRNA-중재 knockdown 또는 스크램블 siRNA (150 nM, 72 h) 처리 후 배양된 심장 섬유모세포의 상청액에서의 FGF2 농도. 모든 예러 막대는 a-f에 대한 SEM. n=3-6을 나타낸다.

**도 3: miR-21의 치료학적 침묵법(therapeutic silencing)은 생체내에서 심장 섬유증 및 심부전을 방지한다.**

(a)(Upper) 경정맥을 통하여 Cy3-표지 수정된 올리고뉴클레오티드의 주입 후에 좌심실 심장 조직 내의 Cy3 및 DAPI 염색에 대한 형광 현미경 검출. 대조군은 PBS 주입을 받았다. (Lower) 횡단 대동맥 협착(TAC, transaortic constriction) 또는 모의(sham) 수술을 받은 쥐는 수술 후 계속하여 3일 동안 대조군 (PBS, 200 μ l) 또는 안타고미르-21 (200 μ l; 80 mg/kg/d)을 24시간 주입되었다.

(b)(Upper) TAC 후 비처리된 (대조군) 쥐 및 안타고미르-21 처리된 쥐에서의 miR-21 발현의 노던 블롯 분석. (Lower) 심장 miR-21 발현에 대한 정량 분석.

(c)(Upper) 모의-수술 후 또는 대조군이나 안타고미르-21 중 어느 하나가 처리된 TAC 후 쥐에서 SPRY1, ERK1/2 및 인(phosphor)-ERK1/2의 웨스턴 블롯(Western blot) 분석. G 베타의 발현은 하우스키핑(housekeeping) 조절로 보였다. (Lower) 웨스턴 블롯의 정량 분석 결과이다.

(d) 대조군- 및 안타고미르-21 처리된 쥐에서 심근 섬유증을 검출하기 위한 시리우스(Sirius) 적색 염색 후의 심장 단면.

(e) 대조군- 및 안타고미르-21 처리된 쥐에서의 심근 섬유증의 정량 분석(left) 및 심장/신체 무게(right).

(f)(Upper) 모의-수술 후 또는 대조군 또는 안타고미르-21 처리된 TAC 후 쥐의 심장 조직에 있는 쥐 게놈의 보편적 전사체(transcriptome) 분석. 적색 (녹색) 상자는 현저하게 (p<0.05) 유도된(억제된) 유전자를 보여준다. (Lower) 안타고미르-21 처리에 의하여 TAC 후 심근 섬유증에 포함된 단백질을 코딩하는 상향조절 유전자의 정상화.

(g) 심초음파 분석. LVD, 좌심실 직경; FS, 좌심실단축률(fractional shortening).

(h) SPRY1의 miR-21-중재 억제을 통한 심장 ERK 신호전달의 탈억제(derepression)를 설명하는 제안된 메커니즘. 모든 예러 막대는 a-g에 대한 SEM, n=3-6을 나타낸다.

**도 4: miR-21의 전사조절**

(a) 인간의 miR-21-프로모터와 비교되는 서로 다른 종의 miR-21-프로모터 영역 내에서 서열 보존. 막대는 보존의 정도를 나타낸다.

(b) 인간의 miR-21-프로모터의 발광효소(luciferase) 활성이 구성된다. 기존(native) 프로모터의 점진적 단축은 miR-21의 발현에 책임이 있는 117 bp 영역을 확인할 수 있도록 한다. n=3이다.

(c) 인간의 miR-21-프로모터의 발광효소 데이터는 개개의 전사인자 결합 장소의 결실(deletion)/변이(mutation) 후에 구성된다. n=3.

**도 5 제브레피쉬에서 편재하여 발현된 miR-21의 녹-다운(Knockdown)은 심장 표현형을 유도한다.**

(a) (Left) 80 hpf에서 MO- 조절 배아 및 miR-21 모르핀트(morphant)의 측면상. A, 심방(atrium); V, 심실(ventricle); 검은색 화살표는 심장 주위의 부종을 강조한다.

(Right Upper) 심장에 주입된 조절-모르폴리노(Control-morpholino) (MO-조절)는 수정후 20시간(hpf)에서의 정

상 심장 형태를 보여준다. 심장은 고리모양을 이루었고, 심장 내막 및 심근층이 잘 성장하였고 심실 (V)과 심방 (A)이 방실계-링(atrio-ventricular(AV)-ring)에 의하여 분리된다. (Lower) miR-21 모르펀트 (MO-1 주입)는 심실 수축성을 잃음으로써 심장 주위의 부종을 성장시키고 단축된 꼬리를 보여주는 반면에, 다른 조직 시스템의 성장은 정상적으로 진행된다.

(b) 2개의 서로 다른 모르폴리노-수정 안티센스(antisense) 올리고뉴클레오티드(MO-1, n=496 and MO-2, n=460)에 의한 miR-21 기능의 억제 는 주입된 배아의 > 90%에서 동일한 표현형을 이끈다. 데이터는 그룹당 3개의 독립 주입으로부터 온다.

(c) 48, 72, 96 및 120 hpf에서 2개의 서로 다른 모르폴리노(MO-1, n=8 and MO-2, n=8)에 의하여 주입된 MO-control (n=6)의 심실 챔버 및 miR-21 모르펀트의 좌심실 단축률(FS, fractional shortening)로 보여지는 심근 기능. miR-21 모르펀트 심실의 심실 FS는 시간에 따라 감소한다.

**도 6: 배양된 심근세포 내의 형질전환효능**

(a) 배양된 신생아 심근세포를 Cy-3로 표지된 miR-21로 세포 감염시켰고 (50 nM, 72 h, Ambion, USA), DAPI로 염색하였다(right). 비교를 위하여 배양된 심근세포를 DAPI만으로 염색하였다(left).

(b) 스크램블(scrambled)-마이크로RNA (control-pre-miR, 50 nM, 72 h), miR-21 억제제 (anti-miR-21, 50 nM, 72 h), 또는 합성 miR-21 (pre-miR-21, 50 nM, 72 h)에 의한 형질전환 후 배양된 심근세포에서 miR-21 발현의 노던 블롯 분석. 모든 에러 막대는 a) 및 b)에 대하여 SEM; n=3-6를 나타낸다.

**도 7: *Spry1* 유전자의 3'UTR 내의 마이크로RNA-결합 장소**

(Upper) *Spry1* 유전자의 3'UTR 내에 결합 장소를 갖는 다양한 마이크로RNA의 발현 변화

(Lower) 마이크로RNA 마이크로어레이에 의하여 분석된 3'UTR 내에 결합 장소를 갖는 마이크로RNA는 회색으로 표시된다. Cds=코드 서열(coding sequence)

**도 8: miR-21 실시간 PCR 발현 데이터**

노던 블로팅에 의한 결정에 더하여, miR-21의 발현은 모의-수술, 모의+안타고미르-21 처리, TAC 및 TAC+안타고미르-21 처리 후의 쥐의 좌심실 조직에서 실시간-PCR에 의하여 분석하였다(left), 그리고 와일드 타입 쥐 및 miR-21 유전자 이식 쥐에서 온 심장에서도 동일한 분석을 하였다 (right). n=그룹당4-6.

**보여주지 않은 데이터:**

이론적 miR-21 표적에 대한 검사(screen)에서 심장 조직 내에서 발견되는 것으로 보이는 22개의 알려진 잠재적 표적 유전자를 보여주었다. 3개의 서로 다른 표적 예측 수단의 조합으로 가장 적합한 후보자로서 *Spry1* (스프라우티1)을 식별하였다.

**miR-21의 전사조절**

인간의 miR-21-프로모터와 비교되는 서로 다른 종의 miR-21-프로모터 영역 내의 서열 보존이 있다. 인간의 miR-21-프로모터의 발광효소 활성(Luciferase activity)은 개개의 전사인자 결합 장소의 결실(deletion)/변이(mutation)를 보여준 후에 이루어진다. 프로모터의 점진적 단축은 miR-21의 발현에 대한 책임이 있는 117 bp 영역을 확인하게 한다. n=3.

**배양된 심근세포에서의 형질전환 효율**

배양된 신생아 심근세포는 Cy-3 표지 miR-21 (50 nM, 72 h, Ambion, USA)로 세포 감염되었고 DAPI로 염색된다. 비교를 위하여 배양된 심근세포는 DAPI만으로 염색되었다. 스크램블-마이크로RNA (control-pre-miR, 50 nM, 72 h), miR-21 저해제 (anti-miR-21, 50 nM, 72 h), 또는 합성 miR-21 (pre-miR-21, 50 nM, 72 h)으로 형질전환 후 배양된 심근세포 내의 miR-21 발현의 노던 블로팅을 분석하였다.

***Spry1* 유전자의 3'UTR 내의 마이크로RNA-결합 장소**

*Spry1* 유전자의 3'UTR 내의 결합 장소를 가진 다양한 마이크로RNA의 발현에서 변화가 있다. 마이크로RNA 마이크로어레이에 의하여 3'UTR 내에 결합 장소가 있는 마이크로RNA를 분석하였다.

**miR-21 실시간PCR 발현 데이터**



노던 블로팅에 의한 결정에 더하여, 와일드타입 쥐 및 miR-21 유전자 이식 쥐에서 온 심장에서와 마찬가지로, 모의-수술, 모의+ miR-21 길항제 처리, TAC 및 TAC+miR-21 길항제 처리 후 쥐의 좌심실 조직에서의 실시간-PCR에 의하여 miR-21의 발현을 분석하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**정의**

- [0064] 정의
- [0065] "섬유증(Fibrosis)"은 기관 또는 조직 내에 과량의 섬유 결합조직이 형성 또는 발전되는 것을 의미한다. 본 발명의 구체예로, 섬유증은 회복 또는 반응의 과정으로 발생한다. 본 발명의 구체예로, 섬유증은 손상 또는 부상에 대한 반응으로 발생한다. 상기 용어 "섬유증"은, 기관 또는 조직의 정상적인 구성요소인 섬유 조직의 형성에 상반되는 것으로, 회복 또는 반응의 과정에서 기관 또는 조직 내에 있는 과량의 섬유 연결 조직이 형성 또는 발전되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0066] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 또 다른 서열에 상보적인 어떤 서열을 갖는, 특히 miR-21에 상보적인 서열인, 올리고뉴클레오티드로 이해되어야 한다. miR-21의 표적은 또한 miR-21의 다운스트림 표적(downstream target)을 포함하는 것으로 이해될 수 있다. miR-21의 억제제, 예를 들어 miR-21에 적어도 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 통하여, Sprouty 등과 같은 miR-21의 표적의 탈억제(derepression) 또는 심지어 초과발현(overexpression)으로 유도될 것은 매우 중요하다.
- [0067] "개체(subject)"는 치료 또는 진료를 위해 선택된 사람 또는 사람이 아닌 동물을 의미한다.
- [0068] "으로 의심되는 개체"는 질환 또는 상태에 관한 하나 또는 그 이상의 임상적 징후들이 나타나는 대상을 의미한다.
- [0069] "섬유증이 발생한 것으로 의심되는 개체"는 섬유증의 하나 또는 그 이상의 임상적 징후들이 나타나는 대상을 의미한다.
- [0070] "예방하는" 또는 "예방"은 주, 월 또는 년 단위를 포함하는 기간 동안 질병의 시작, 발달 또는 진행을 늦추거나 미연에 방지하는 것을 의미한다.
- [0071] "치료" 또는 "치료하다"는 질병의 치료 또는 회복을 위해 사용되는 하나 또는 그 이상의 특정한 절차들의 적용을 의미한다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 특정한 절차는 하나 또는 그 이상의 의약체제를 투여하는 것을 포함한다.
- [0072] "회복(Amelioretion)"은 질병 또는 상태에 관한 적어도 하나의 징후의 심각성을 완화시키는 것을 의미한다. 본 발명의 한 구체예로, 상기 회복은 상태 또는 질병에 관한 하나 또는 그 이상의 징후들의 진행을 연기하거나 늦추는 것을 포함한다. 상기 징후들의 심각성은 본 발명의 기술분야의 당업자에게 잘 알려진 주관적 또는 객관적인 측정에 의해 결정될 수 있다.
- [0073] "상기의 필요가 있는 개체"는 치료 또는 진단의 필요가 있는 것으로 확인된 개체를 의미한다.
- [0074] "투여"는 의약체제 또는 조성물을 개체에 공급하는 것으로, 의료 전문가에 의한 투여 및 자가-투여에 의해 투여될 수 있는데, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] "비경구적 투여(Parenteral administration)"는 주사 또는 정맥주사를 통한 투여를 의미한다. 비경구적 투여(Parenteral administration)는 피하주사(subcutaneous administration), 정맥주사(intravenous administration), 동맥주사(intraarterial administration), 근육내 주사(intramuscular administration), 심장내 주사(intracranial administration)를 포함한다.
- [0076] "피하주사(subcutaneous administration)"는 피부 바로 밑에 투여하는 것이다.
- [0077] "정맥주사(intravenous administration)"는 혈관 내로 투여하는 것을 의미한다.
- [0078] "동맥주사(intraarterial administration)"는 동맥 내로 투여하는 것을 의미한다.
- [0079] "심장내 주사(intracranial administration)"는 심장 내로 투여하는 것을 의미한다. 본 발명의 일 구체예로, 심장내 주사는 카테테르(catheter)의 방법으로 투여한다. 본 발명의 일 구체예로, 심장내 주사는 심장 개복술(open heart surgery)의 방법으로 투여할 수 있다.

- [0080] "폐장맥 주사(pulmonary administration)"는 폐에 투여하는 것을 의미한다.
- [0081] "간 기능을 향상시킨다"는 간 기능이 정상수치로의 변화를 의미한다. 본 발명의 일 구체예로, 간 기능은 개체의 혈액에서 발견된 분자들을 측정하는 것으로 평가된다. 예를 들어, 일 구체예로는, 향상된 간 기능은 혈액 내 간의 아미노기 전이효소 레벨(liver transaminase levels)의 감소에 의해 측정된다.
- [0082] "의약조성물"은 의약제제를 포함하는 것으로, 개별 개체에 투여하기 적절한 물질들의 혼합물을 의미한다. 예를 들어, 의약조성물은 변형된 올리고뉴클레오티드와 살균된 수용액을 포함할 수 있다.
- [0083] "의약제제"는 개체에 투여했을 때 치료상 효과를 제공하는 것을 의미한다.
- [0084] "활성화된 의약성분"은 바람직한 효과를 제공하는 의약조성물 내의 물질을 의미한다.
- [0085] "표적핵산(Target nucleic acid)", "표적 RNA(target RNA)", "표적 RNA 전사물(target RNA transcript)" 및 "핵산 표적(nucleic acid target)"은 모두 안티센스 조성물에 의해 표적될 수 있는 어떤 핵산을 의미한다.
- [0086] "표적화(Targeting)"는 달성하고자 하는 효과를 유도하고 표적 핵산에 부착될 핵염기 서열의 선택 및 설계 과정을 의미한다.
- [0087] "~에 표적된"은 달성하고자 하는 효과를 유도하기 위해 표적 핵산에 부착하는 것을 허용할 핵염기 서열을 갖는 것을 의미한다. 본 발명의 일 구체예로, 달성하고자 하는 효과는 타겟 핵산의 감소이다.
- [0088] "조절(modulation)"은 기능 또는 활성의 섭동을 의미한다. 본 발명의 일 구체예로, 조절은 유전자 발현의 증가를 의미한다. 본 발명의 일 구체예로, 조절은 유전자 발현의 감소를 의미한다.
- [0089] "발현(Expression)"은 유전자의 코드화된 정보가 세포내에 현존하는 구조들로 변환되고 작동하는 것에 의한 어떤 기능과 단계들을 의미한다.
- [0090] "5' 표적장소(5' target site)"는 특별한 올리고뉴클레오티드의 5'-모스트 핵염기(5'-most nucleobase)에 상보적인 표적 핵산의 핵염기를 의미한다.
- [0091] "3' 표적장소(3' target site)"는 특별한 올리고뉴클레오티드의 3'-모스트 핵염기(3'-most nucleobase)에 상보적인 표적 핵산의 핵염기를 의미한다.
- [0092] "부위(region)"는 핵산 내에 연결된 뉴클레오티드의 일부를 의미한다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 표적 핵산의 부위(region)에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 것을 의미한다. 예를 들어, 그러한 구체예들로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA 스템-루프 서열(miRNA stem-loop sequence)의 부위(region)에 상보적이다. 본 발명의 어떤 구체예들로는, 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA 스템-루프 서열(miRNA stem-loop sequence)의 부위(region)에 100% 상보적이다.
- [0093] "부분(Segment)"은 부위(region)에 있어서 그것의 더 작은 부분을 의미한다.
- [0094] "핵염기 서열"은 5'에서 3'의 방향인 연속적인 핵염기의 순서를 의미하는데, 이는 어떤 당, 연결 및/또는 핵염기 변형에 독립적이다.
- [0095] "연속적인 핵염기들"은 핵산 내에서 바로 옆에 각각 인접하는 핵염기를 의미한다.
- [0096] "핵염기 상보성"은 두 개의 핵염기가 서로 쌍을 이루어 수소결합을 수반하는 비공유 결합을 하는 능력을 의미한다.
- [0097] "상보적인"은 첫 번째 핵염기 서열이 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 그 이상의 핵염기들 부위에 걸쳐 두 번째 핵염기 서열의 상보적인 것에 대하여, 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나 100% 동일한 것을 의미하거나, 엄격한 hybridization 조건하에서 두 개 서열이 hybridize되는 것이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA 또는 그것의 전구체에 100% 상보적인 핵염기 서열을 갖는데, 이는 변형된 올리고뉴클레오티드의 전체 길이에 걸쳐서 miRNA 또는 그것의 전구체에 100% 상보적이지 않을 수 있다.
- [0098] "상보성"은 상기 핵염기가 첫 번째 핵산과 두 번째 핵산 사이에 쌍을 이루는 능력이 있는 것을 의미한다.
- [0099] "전체 상보성(Full-length complementarity)"은 첫 번째 핵산의 각각의 핵염기는 두 번째 핵산 내의 대응하는 위치에서 각각의 핵염기와 함께 쌍을 이룰 수 있는 것을 의미한다. 예를 들어, 어떤 한 구체예에으로는, 각 핵염



기가 miRNA 내에 있는 핵염기에 대하여 상보성을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA에 대하여 전체 상보성(full-length complementarity)을 갖는다.

- [0100] "퍼센트 상보적인"은 핵산의 길이로 나눈 핵산 내의 상보적인 핵염기의 수를 의미한다. 어떤 한 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 퍼센트 상보성은 표적 핵산에 상보적인 핵염기의 수를 의미하고, 이것은 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기의 수에 의해 나누어진다. 어떤 한 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 퍼센트 상보성은 miRNA에 상보적인 핵염기의 수를 의미하고, 이는 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기의 수에 의해 나누어진다.
- [0101] "퍼센트 부위 바운드(Percent region bound)"는 올리고뉴클레오티드 부위(region)에 상보적인 부위(region)의 비율(퍼센트)를 의미한다. 퍼센트 부위 바운드(Percent region bound)는 표적 부위의 길이에 의한 올리고 뉴클레오티드에 상보적인 표적 부위의 핵염기 수로 나누어 계산된다. 본 발명의 일 구체예로, 퍼센트 부위 바운드(percent region bound)는 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%이다.
- [0102] "퍼센트 동일성"은 두 번째 핵산내의 대응하는 위치에 있는 핵염기와 동일한 첫 번째 핵산 내의 핵염기들의 수를 첫 번째 핵산 내의 전체 핵염기 수로 나눈 것을 의미한다.
- [0103] 본 명세서에서 사용되는 "본질적으로 동일한"이란, 첫 번째와 두 번째 핵염기 서열이 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 그 이상의 핵염기의 부위(region)에 걸쳐, 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 100% 동일한 것을 의미할 수 있다.
- [0104] "Hybridize"는 핵염기 상보성을 통하여 발생하는 상보적인 핵산의 풀림을 의미한다.
- [0105] "잘못 매치된(mismatch)"은 첫 번째 핵산의 핵염기가 두 번째 핵산의 대응되는 위치에서 핵염기와 함께 쌍을 이룰 수 없는 것을 의미한다.
- [0106] "비-상보적인 핵염기"는 수소 결합을 통해 쌍을 이룰 수 없는 두 개의 핵염기를 의미한다.
- [0107] "동일한(identical)"은 같은 핵염기 서열을 갖는 것을 의미한다.
- [0108] "miRNA" 또는 "miR"길이에 있어서 18 과 25개의 핵염기들 사이의 비-암호화된 RNA(non-coding RNA)이고, 이는 암호화된 RNA(coding RNA)의 발현에 hybridize하고 이를 조절한다. 본 발명의 일 구체예로, miRNA는 enzyme Dicer에 의한 pre-miRNA의 분열(cleavage)의 산물이다. miRNA의 예들은 miRBase로 알려진 miRNA 데이터베이스 내에서 발견된다(<http://microrna.sanger.ac.uk/>).
- [0109] "pre-miRNA" 또는 "pre-miR"은 miRNA를 포함하는 헤어핀 구조를 갖는 비-암호화된 RNA를 의미한다. 본 발명의 일 구체예로, pre-miRNA는 Drosha로 알려진 이중 가닥의 RNA-특정 리보뉴클레아제에 의하여 pri-miR의 분열(cleavage)의 산물이다.
- [0110] "스텝-루프 서열(Stem-loop sequence)"은 헤어핀 구조를 갖고 성숙한 miRNA 서열을 포함하는 RNA를 의미한다. pre-miRNA 서열과 스텝-루프 서열(stem-loop sequences)은 오버랩될 수 있다. 스텝-루프 서열(stem-loop sequences)의 예는 miRBase로 알려진 miRNA 데이터베이스 내에서 발견된다(<http://microrna.sanger.ac.uk/>).
- [0111] "pri-miRNA" 또는 "pri-miR"은 이중 가닥의 RNA-특정 리보뉴클레아제 Drosha를 위한 기질인 헤어핀 구조를 갖는 비-암호화된 RNA(non-coding RNA)이다.
- [0112] "miRNA 전구체"는 게놈의 DNA로부터 비롯된 그리고 하나 또는 그 이상의 miRNA 서열로 구성되는 비-암호화된, 구조적인 RNA로 구성되는 전사물(transcript)을 의미한다. 예를 들어, 일 구체예로, miRNA 전구체는 pre-miRNA이다. 본 발명의 일 구체예로, miRNA 전구체는 pri-miRNA이다.
- [0113] "모노시스트론 전사물(monocistronic transcript)"은 단일 miRNA 서열을 포함하는 miRNA 전구체를 의미한다.
- [0114] "폴리시스트론 전사물(polycistronic transcript)"은 2 또는 그 이상의 miRNA 서열을 포함하는 miRNA 전구체를 의미한다.
- [0115] "seed region"은 성숙한 miRNA 서열의 5' 마지막 부분으로부터 2 내지 6 또는 2 내지 7의 뉴클레오티드를 의미한다.
- [0116] "올리고머 화합물(oligomeric compound)"은 모노머 서브유닛들(monomeric subunits)이 연결된 폴리머로 구성된

화합물을 의미한다.

- [0117] "올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)"는 뉴클레오타이드들이 연결된 폴리머를 의미하는데, 상기 각각은 변형될 수 있거나 변형되지 않을 수 있으며, 이들은 또 다른 하나로부터 영향을 받지 않는다.
- [0118] "자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드간의 연결"은 3'에서 5'까지의 뉴클레오타이드 사이에 인산에스테르 결합을 의미한다.
- [0119] "본연의 당(natural sugar)"은 DNA (2'-H) 또는 RNA (2'-OH)에서 발견되는 당을 의미한다.
- [0120] "본연의 핵염기(natural nucleobase)"는 자연적으로 발생된 형태와 관련하여 변형되지 않은 것을 의미한다.
- [0121] "뉴클레오타이드간의 연결"은 인접한 뉴클레오타이드 사이의 공유 결합을 의미한다.
- [0122] "연결된 뉴클레오타이드"는 공유 결합에 의해 연결된 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0123] "핵염기"는 또 다른 핵염기와 함께 비-공유적으로 쌍을 이룰 수 있는 헤테로고리 일부분(heterocyclic moiety)을 의미한다.
- [0124] "뉴클레오타이드"는 당에 연결된 핵염기를 의미한다.
- [0125] "뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드 내의 당 부분에 공유결합으로 연결된 포스페이트 그룹을 가진 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0126] "miR 길항제"는 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 변형된 뉴클레오타이드를 의미한다. 예를 들어, "miR-X 길항제"는 miR-X에 상보적인 핵염기를 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0127] "변형된 올리고뉴클레오타이드"는 자연적으로 발생된 말단, 당, 핵염기, 및/또는 뉴클레오타이드간의 연결과 관련하여 하나 또는 그 이상 변형이 된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0128] "단일-가닥의 변형된 올리고뉴클레오타이드"는 상보적인 가닥에 hybridize되지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0129] "변형된 뉴클레오타이드간의 연결"은 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드간의 연결에 어떤 변화가 나타난 것을 의미한다.
- [0130] "포스포시오에이트 뉴클레오타이드간의 결합"은 뉴클레오타이드들 사이의 연결을 의미하는 것으로, 상기에서 연결되지 않는 원자(non-bridging atoms) 중 하나는 황 원자이다.
- [0131] "변형된 당"은 자연적인 당에 어떤 변화 및/또는 치환이 있는 것을 의미한다.
- [0132] "변형된 핵염기"는 자연적인 핵염기에 어떤 치환 및/또는 변화가 있는 것을 의미한다.
- [0133] "5-메틸시토신"는 메틸기가 5' 위치에 부착되어 변형된 시토신을 의미한다.
- [0134] "2'-O-메틸 당" 또는 "2'-OMe 당"은 2' 위치에 O-메틸 변형이 있는 당을 의미한다.
- [0135] "2'-O-메톡시에틸 당" 또는 "2'-MOE 당"은 2' 위치에 O-메톡시에틸 변형이 있는 당을 의미한다.
- [0136] "2'-O-플루오로 당" 또는 "2'-F 당"은 2' 위치에 플루오로 변형이 있는 당을 의미한다.
- [0137] "이환성 당의 일부분(bicyclic sugar moiety)"은 2개의 비-제미널 고리 원자들(non-geminal ring atoms)의 연결에 의해 변형된 당을 의미한다.
- [0138] "2'-O-메톡시에틸 뉴클레오타이드"는 2'-O-메톡시에틸 당 변형을 갖는 2'-변형된 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0139] "2'-플루오로 뉴클레오타이드"는 2'-플루오로 당 변형을 갖는 2'-변형된 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0140] "2'-O-메틸" 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 당 변형을 갖는 2'-변형된 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0141] "이환성 뉴클레오타이드"는 이환성 당 일부분(bicyclic sugar moiety)을 갖는 2'-변형된 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0142] "모티프(motif)"는 올리고뉴클레오타이드 내에서 변형 및/또는 변형되지 않은 핵염기, 당 및/또는 뉴클레오타이드간의 연결의 패턴을 의미한다.

- [0143] "완전히 변형된 올리고뉴클레오티드"는 각각의 핵염기, 각각의 당, 및/또는 각각의 변형된 뉴클레오시드간의 연결을 의미한다.
- [0144] "균일하게 변형된 올리고뉴클레오티드"는 각각의 핵염기, 각각의 당, 및/또는 각각의 뉴클레오시드간의 연결이 변형된 올리고뉴클레오티드의 도처에 동일하게 변형된 것을 의미한다.
- [0145] "안정적인 변형"은 뉴클레아제(nucleases)들의 존재하에서, 포스포디에스테르 뉴클레오시드간의 결합에 의해 연결된 2'-디옥시뉴클레오티드의 제공과 관련하여, 변형된 올리고뉴클레오티드가 안정성이 향상되도록 하는 뉴클레오시드에 대한 변형을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 일 구체예로, 안정적인 변형은 안정적인 뉴클레오시드 변형을 의미한다. 본 발명의 일 구체예로, 안정적인 변형은 뉴클레오시드간의 결합의 변형을 의미한다.
- [0146] "안정적인 뉴클레오시드"는 2'-데옥시뉴클레오시드로 제공되는 것과 관련하여, 올리고뉴클레오티드에 향상된 뉴클레아제 안정성을 제공하기 위하여 변형된 뉴클레오시드를 의미한다. 본 발명의 한 구체예로, 안정적인 뉴클레오시드는 2'-변형된 뉴클레오시드이다.
- [0147] "안정적인 뉴클레오시드간의 결합"은 포스포디에스테르 뉴클레오시드간의 결합으로 제공되는 것과 관련하여 올리고뉴클레오티드에 향상된 뉴클레아제 안정성을 제공하는 뉴클레오시드간의 결합을 의미한다. 본 발명의 한 구체예로, 안정적인 뉴클레오시드간의 결합은 포스포티오에이트 뉴클레오시드간의 결합이다.

[0148] **개요**

[0149] 본 출원인은 miR-21에 상보적인 변형된 뉴클레오티드가 miR-21의 억제를 위한 의약제제임을 발견했다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 miR-21의 상향조절(upregulation)에 의해 특징지어지는 질병을 갖는 개체에 투약된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 질병은 암이다. 본 발명의 한 구체예로, 상기 질병은 심장 질환이다. 본 발명의 한 구체예로, 상기 질병은 섬유증이다. 섬유증은 상처나 부상에 있어서 기관 또는 조직내의 섬유 모양의 연결조직의 과도한 발전으로부터 도출된다. 치료되지 않고 남겨지는 경우, 섬유증은 다른 조직들 사이에서, 심장, 폐, 신장, 간 및 피부의 다양한 질환을 이끌어 낸다.

[0150] 본 출원인은 섬유모세포(fibroblast)에서 유도된 miR-21이 섬유증에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 발견했다. miR-21 레벨의 증진은 섬유모세포(fibroblast) 생존을 촉진시켰으며, 반면에 내생의 miR-21(endogenous miR-21)의 억제는 사멸세포의 죽음을 유도하였다. 즉, 본 명세서에서 확인된 것은 miR-21이 섬유모세포(fibroblast) 생존을 조절하는 것에 의한 메커니즘에 관한 것이다. 비정상적인 섬유모세포(fibroblast) 증식과 생존은 섬유증을 이끌 수도 있다. 따라서, miR-21에 상보적인 변형된 올리고뉴클레오티드는 섬유증의 치료를 위한 의약제제가 된다. 본 발명의 일 구체예로, miR-21에 상보적인 변형된 올리고뉴클레오티드는 miR-21에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 의미한다.

[0151] 본 발명자들은 섬유모세포(fibroblast)에서 유도된 miR-21과 SPRY1이 심장내에서 중요한 역할을 하는 것을 증명하였다(도면 3h). 상기 데이터는 ERK-MAPkinase 활동성의 자극-유도적이고 miRNA-중재하는 활성이 심장내 섬유증을 중요하게 조절할 수 있음을 보여준다. 이번 연구는 질병 모델에 있어서 마이크로RNA의 치료법적 응용의 첫 번째 예를 나타낸다. 특별하게도 miR-21에 대항적인 것은 쥐과(科) 동물 내에 구조적이고 기능적인 변질을 예방했다. 이러한 발견들은 심장 질환을 위한 새로운 치료법적 돌파구가 되며, 마이크로RNA 길항제(antagonists)의 광범위한 치료법적 잠재성을 보여준다.

[0152] 본 발명의 어느 한 측면에 있어서, miR-21의 사용과 관련된 것으로, 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병의 치료 및/또는 진단용 약물의 제조를 위하여 miR-21 및/또는 miR-21의 표적에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다.

[0153] 본 발명은 특별하게도 섬유증(=섬유증과 관련된 질병)에 관한 심장의 특별한 질병, 예를 들어, 심장 비대증(cardiac hypertrophy), 고혈압성 심장 질환(hypertensive heart disease), 이완성 및 수축성 심부전(diastolic and systolic heart failure), 심장 관련 저장병(storage-diseases related to heart)에 관한 것으로, 상기 심장 관련 저장병은 M. 페브리, 심근증(M. Fabry, cardiomyopathies)과 같은 것으로, 예를 들어 심장 비대증(dilatative cardiomyopathy), 폐색성을 갖는 및 폐색증을 갖지 않는 비대성 심근증(hypertrophic cardio-myopathy with and without obstruction), 제한성 심근증(restrictive cardiomyopathy), 부정맥성 비대 심근증(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy) 및 심근증의 다른 형태가 있는데, 상기 심근증의 다른 형태로는 예를 들어 당뇨병 심근증(diabetic cardiomyopathy), 협착성 심낭염(constrictive

pericarditis), 관상동맥질환(coronary artery disease), 심근경색증(myocardial infarction), 급성 및 만성 우심부전(acute and chronic right heart failure), 심장부정맥(cardiac arrhythmias) 등이 있고, 상기는 섬유증(fibrosis), 심근경색 관련 섬유증(myocarditis-related fibrosis), 심장관막질환 때문에 발생하며, 상기 심장관막질환은 관막 협착증 또는 기능부전(예, sclerosis) 예를 들어, 심장 승모판 협착증 및/또는 기능부전, 대동맥판 협착증 및/또는 기능부전(aortic valve stenosis and/or insufficiency), 삼첨판 협착증 및/또는 기능부전(tricuspidal valve stenosis and/or insufficiency), 폐동맥판 협착증 및/또는 기능부전(pulmonary valve stenosis and/or insufficiency)을 이끈다.

[0154] 더 나아가, 본 발명의 또 다른 점은 섬유증(=섬유증 관련 질병)을 포함하는 다른 질병에 관한 것으로, 심장 시스템에 관련되지 않는다. 상기의 예는 폐섬유증(lung fibrosis), 만성폐쇄성 폐질환(chronic obstructive lung diseases), 폐고혈압(pulmonary hypertension), 독성의 환경 때문에 발생하는 간섬유증(liver fibrosis), 간염(hepatitis) 및/또는 2차적인 우심부전, 상처 후의 켈로이드(keloids)의 발전과 같은 피부 섬유증(skin fibrosis), 노화 또는 혈압과 관련한 동맥경화(arterial stiffness)과 같은 혈관 관련 질병, 동맥중층경화증(mediasclerosis), 동맥경화증(arteriosclerosis)이 있고, 예를 들어 크론병(Crohn's disease)의 발병 동안의 소화관 경화증(gut sclerosis), 몸 전체의 경화증(systemic sclerosis) 및 CREST 증후군 등과 같은 다른 기관들에 대한 노화 관련 섬유증이 있으며, 신장 섬유증(kidney fibrosis), 종양 섬유증(neoplastic fibrosis) 및/또는 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis)이 있다.

[0155] 더 나아가 잘 알려진 섬유증-관련 질병 및 장애는 심근내막 섬유증(endomyocardial fibrosis) 및 특발성의 심근증(idiopathic cardiomyopathy), 간의 섬유증으로부터 나타날 수 있는 간경변(cirrhosis), 폐의 특발성 폐 섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis), 간질성폐질환(diffuse parenchymal lung disease), 종격동 섬유증(mediastinal fibrosis), 골수섬유증(myelofibrosis), PVPS(post-vasectomy pain syndrome), 복막후의 섬유증(retroperitoneal fibrosis) 및 NSF(nephrogenic systemic fibrosis)등이 있다.

[0156] 본 발명의 모든 측면에서, 특히 본 출원서의 청구항에서 언급된 것은 가능한 예들로 나타난 상기 언급된 질환, 질병, 장애 및 상태의 진단, 치료 및/또는 예방을 위해 사용 가능하다. 상기 리스트는 제한되지 않는다.

[0157] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명은 miR-21을 조절하기 위한 전략과 관련된다. 본 발명의 또 다른 구체예로, 본 발명은 miR-21의 초과발현되는 및/또는 상향조절되는 표적을 조절하는 전략에 관한 것이다. 가능한 조절은 체내 삽입형 장치로, 바이러스성 벡터 및 리보솜의 성분배합물(liposomal formulations), 유전자 전달 시스템, 스폰지(sponges) 등과 같은 것이 있다.

[0158] 본 발명의 Sprouty (SPRY1)는 miR-21의 표적으로 확인되었다. miR-21와 SPRY1의 둘은 다른 셀 타입 사이에 있는, 심장 섬유모세포(fibroblast) 내에서 발현된다. 심장 섬유모세포(fibroblast) 내의 miR-21 발현의 증가는 SPRY1단백질 발현의 강한 억제를 유도했고, 더 나아가 ERK-MAPkinase의 활성을 증가시켰다. 바람직한 구체예로 상기 표적은 Sprouty1 (SPRY1), 특히 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8, Tgfbi, Krit1, Pitx2, Fas1, Nfib, Lnx1 및 Rtn4에서 선택되는 어느 하나이다.

[0159] 본 발명의 어느 한 측면에 있어서, 본 발명은 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병의 진단, 치료 및/또는 예방을 위한 SEQ ID NO: 2 내지 SEQ ID NO: 4, Sprouty1 (SPRY1), (특히 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8), Tgfbi, Krit1, Pitx2, Fas1, Nfib, Lnx1 및/또는 Rtn4에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. SEQ ID NO: 4, Sprouty1 (SPRY1), (특히 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8), Tgfbi, Krit1, Pitx2, Fas1, Nfib, Lnx1 및/또는 Rtn4와 관련된 것이다. 본 발명의 어떤 측면에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 Sprouty1 (SPRY1), 특히 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8, Tgfbi, Krit1, Pitx2, Fas1, Nfib, Lnx1 및/또는 Rtn4으로 구성되는 어느 하나의 표적과 상보적이며, 이는 표적 장소에 결합하고 선택된 표적의 발현을 억제하기 위하여 miR-21와 같은 마이크로RNA의 능력을 방해한다. 본 발명의 어떤 한 측면은, 그러한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 변형으로 구성된다.

[0160] 본 발명의 어느 한 측면은 miR-21, SEQ ID NO: 2 내지 SEQ ID NO: 4, Sprouty1 (SPRY1), 특히 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8, Tgfbi, Krit1, Pitx2, Fas1, Nfib, Lnx1 및/또는 Rtn4이 결손된 세포에 관한 것이다.

[0161] 본 발명의 어느 한 측면은, 섬유증 및/또는 섬유증 관련 병을 위한 질병 모델로서, miR-21, SEQ ID NO: 2 내지 SEQ ID NO: 4, Sprouty1 (SPRY1), 특히 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8, Tgfbi, Krit1, Pitx2, Fas1, Nfib, Lnx1 및/또는 Rtn4이 결손된 인간을 제외한 포유류의 녹-아웃 기관(knock-out organism)에 관한 것이다. 또한 특히 miR-21이 초과 발현된 인간을 제외한 포유류, 즉 유전자 이식 동물을 포함한다.



- [0162] 본 출원인은 섬유모세포(fibroblast)에서 유도된 miR-21이 심부전에 기여한다고 발견하였다. 특발성 확장성 심근병증(idiopathic dilated cardiomyopathy)때문에 나타나는 심부전의 마지막 단계를 겪고 있는 개체로부터 얻어낸 좌심실 심장조직 샘플의 분석은 증가된 miR-21 발현과 억제된 SPRY1 단백질 발현을 나타냈다. 추가적으로, 증가된 phosphor-ERK/ERK비율이 증명된 것처럼, ERK-MAPkinase는 이러한 개체에서 얻어진 샘플 내에서 활성화되었다. 본 출원인은 심부전을 겪는 동물 모델 내로 miR-21에 상보적인 변형된 올리고뉴클레오타이드의 투여는 심장 섬유증의 두드러진 약화를 도출해냄을 발견하였다. 심부전은 다른 파라미터들 사이에서, 심장 섬유증으로 특징지어진다. 따라서, miR-21에 상보적인 변형된 올리고뉴클레오타이드는 심장 섬유증의 치료를 위한 의약제제다.
- [0163] 본 발명은 심부전이 있는 동물 모델에서, 심장 섬유증의 약화는 심장 무게 증가의 감쇠에 의해 동반되는 것으로 밝혀졌다. 더 나아가, 심초음파검사(echocardiography)에 의한 심장 기능의 평가는 miR-21에 상보적인 변형된 올리고뉴클레오타이드의 투여가 좌심실 확장을 예방했고 좌심실단축율(FS, fractional shortening)의 파라미터를 정상화했던 것으로 드러났다. 심부전은 다른 파라미터들 사이에서, 즉 심장 무게가 증가, 좌심실 확장 및 좌심실 단축율의 손상(fractional shortening)에 의해 특징지어질 수 있다. 따라서, miR-21에 상보적인 변형된 올리고뉴클레오타이드는 심장 섬유증과 관련된 심부전의 치료, 개량, 및 예방을 위한 치료적 물질이다.
- [0164] 본 발명의 어느 한 측면은 마이크로RNA(miRNA)의 프로모터 부위에 관한 것으로, 이는 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병의 진단, 예방 및/또는 치료를 위한 칼슘/cAMP 반응 요소 단백질(calcium/cAMP response element protein, CREB)의 변형 및/또는 혈청반응인자(SRF)의 결합자리로 구성된다.
- [0165] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 프로모터 부위(promoter region)에 있어서, miR-21 그 자체의 유전자 및/또는 다양한 메신저 RNAs의 3'UTR는 동질 이상(同質異像, polymorphisms), 돌연변이(mutations), 특히 점돌연변이(point mutations), 결실(deletions), 절단(truncations) 및/또는 역위(inversion)를 포함할 수 있다. 모든 와일드-타입 서열(wild-type sequence)로의 이러한 수정은 miR-21 결합자리의 결손 또는 신규한 miR-21 결합자리의 de novo formation을 이끌어낸다. 본 발명의 또 다른 구체예로, 프로모터 부위(promoter region)의 변형은 점돌연변이(point mutations), 결실(deletions), 절단(truncations) 및/또는 역위(inversion) 중 어느 하나이다. 나아가, 상기 프로모터 부위(promoter region)은 SEQ ID NO: 2 to SEQ ID NO: 4로 구성되는 그룹에서 선택될 수 있다.
- [0166] **진단을 위한 응용**
- [0167] 본 발명의 어느 한 측면은 miR-21의 용도에 관한 것으로, 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병의 진단을 위한 miR-21 및/또는 miR-21의 표적에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특히 miR-21에 상보적인 서열인 또 다른 서열에 상보적인 어떤 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로서 이해된다. miR-21의 표적은 또한 miR-21의 다운스트림 표적(downstream target of miR-21)을 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, miR-21에 적어도 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 통한, miR-21의 억제는 탈억제(derepression) 또는 심지어 Sprouty 등과 같은 miR-21의 표적의 초과발현을 이끌 것이다.
- [0168] 본 발명의 어느 한 측면은 하기의 단계로 구성되는 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병을 진단하기 위한 방법과 관련되어 있다:
- [0169] (a) 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병으로 고통받는 개체의 샘플을 제공하는 단계;
- [0170] (b) miR-21, Sprouty1 (SPRY1), 특히 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fas1, Nfib, Lnx1 및/또는 Rtn4의 발현을 측정하는 단계;
- [0171] 상기에 있어서, 조절 샘플과 비교하여, miR-21의 높은 레벨 및/또는 특히 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fas1, Nfib, Lnx1 및/또는 Rtn4와 같은 Sprouty1(SPRY1)의 감소된 레벨은 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병 또는 그것들의 소인을 나타낸다.
- [0172] 본 발명의 어느 한 측면은 섬유증 및/또는 섬유증 관련 질병 또는 그것들의 소인의 치료 및/또는 예방을 위한 약학적으로 활성화된 화합물을 검사(screening) 하는 방법에 관한 것으로, 이는 하기의 단계로 구성된다:
- [0173] (a) miR-21, Sprouty1 (SPRY1), 특히 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fas1, Nfib, Lnx1 및/또는 Rtn4를 포함하는 샘플을 제공하는 단계;
- [0174] (b) 상기 샘플과 함께 후보 물질을 접촉하는 단계;

- [0175] (c)상기 샘플상에서 상기 후보물질의 효과를 결정하는 단계;
- [0176] 상기에 있어서, miR-21, Sprouty1 (SPRY1), 특히 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fas1, Nfib, Lnx1 및/또는 Rtn4의 변경은 약학적으로 활성화된 화합물을 나타낸다.
- [0177] **어떠한 질병들 및 상태들**
- [0178] 본 발명은 섬유증을 발병되거나 발병된 것으로 의심되는 개체를 치료하기 위한 방법에 관하여 제공한다. 또한 섬유증을 발병되거나 발병된 것으로 의심되는 것으로 확인된 개체를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 어떤 구체예에 의하면, 상기와 같은 방법은 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 개체에 투여하는 것으로 구성된다. 본 발명의 어떤 구체예에 의하면, 상기 miRNA는 miR-21이다.
- [0179] 더 나아가 본 발명은 섬유증이 발생할 위험에 있는 개체 내의 섬유증을 예방하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구체예로 그러한 방법은 섬유증이 발생할 위험이 있는 개체에게 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것으로 구성한다.
- [0180] 본 발명의 일 구체예로, 상기 섬유증은 간 섬유증을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로 상기 섬유증은 폐 섬유증을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 섬유증은 피부 섬유증을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 섬유증은 심장 섬유증을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 섬유증은 신장 섬유증을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 섬유증은 노화관련 섬유증을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 섬유증은 비장 섬유증을 포함한다.
- [0181] 본 발명의 일 구체예로, 상기 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 것으로 의심되는 개체는 적어도 하나의 심장 질환(cardiac disease) 또는 그러한 상태를 갖는다. 본 발명의 일 구체예로, 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 것으로 확인된 개체는 적어도 하나의 심장 질환(cardiac disease) 또는 그러한 상태를 갖는다. 본 발명의 일 구체예로, 상기와 같은 방법은 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 개체에 투여하는 것으로 구성된다. 본 발명의 어떤 한 구체예로, 상기 miRNA는 miR-21이다.
- [0182] 본 발명의 일 구체예로, 심장 질환(cardiac disease) 또는 그러한 상태는 심장 비대증(cardiac hypertrophy)이다. 본 발명의 일 구체예로, 심장 질환(cardiac disease) 또는 그러한 상태는 심근증(cardiomyopathy)이다. 본 발명의 일 구체예로, 심근증(cardiomyopathy)은 팽창성 심근증(dilatative cardiomyopathy), 폐색증을 갖는 비대성 심근증(hypertrophic cardiomyopathy with obstruction), 폐색증을 갖지 않는 비대성 심근증(hypertrophic cardiomyopathy without obstruction), 수축성 심근증(restrictive cardiomyopathy), 부정맥성 비대 심근증(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy), 당뇨병성 심근증(diabetic cardiomyopathy)이다.
- [0183] 본 발명의 일 구체예로, 심장 질환(cardiac disease) 또는 그러한 상태는 관상동맥질환(coronary artery disease)이다. 본 발명의 일 구체예로, 심장 질환(cardiac disease) 또는 그러한 상태는 심장-관련 저장병(heart-related storage disease), 협착성 심낭염(constrictive pericarditis), 급성 심근경색(acute myocardial infarction), 만성 심근경색(chronic myocardial infarction), 심장부정맥(cardiac arrhythmias) 또는 심근염관련 섬유증(myocarditis-related fibrosis)이다.
- [0184] 본 발명의 일 구체예로, 심장 질환(cardiac disease) 또는 그러한 상태는 심부전(heart failure)이다. 본 발명의 일 구체예로, 심부전(heart failure) 고혈압(hypertensive heart failure), 심장 확장증(diastolic heart failure), 심장 수축증(systolic heart failure), 또는 심장마비(right heart failure)이다.
- [0185] 본 발명의 일 구체예로, 심장 질환(cardiac disease) 또는 그러한 상태는 심장판막증(heart valve disease)이다. 본 발명의 일 구체예로, 심장판막증(heart valve disease)은 심장 승모판 협착증(mitral valve stenosis), 대동맥판 협착증(aortic valve stenosis), 삼첨판 협착증(tricuspidal valve stenosis), 폐동맥판 협착증(pulmonary valve stenosis) 중 어느 하나이다. 본 발명의 일 구체예로, 심장판막증(heart valve disease)은 심장 승모판 기능 부전(mitral valve insufficiency), 대동맥판막 기능 부전(aortic valve insufficiency), 삼첨판막 기능 부전(tricuspidal valve insufficiency) 또는 폐동맥판 기능 부전(pulmonary valve insufficiency)이다.
- [0186] 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 개체를 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 개체는 간 질환 또는

그러한 상태를 갖는다. 본 발명의 일 구체예로, 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 것으로 확인된 개체는 적어도 하나의 간 질환 또는 그러한 상태를 갖는다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 방법은 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 개체에 투여하는 것으로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 miRNA는 miR-21이다. 본 발명의 일 구체예로, 간 질환 또는 그러한 상태는 만성적인 간 부상(chronic liver injury)이다. 본 발명의 일 구체예로, 간 질환 또는 그러한 상태는 간염 바이러스의 감염(hepatitis virus infection)이다. 본 발명의 일 구체예로, 간염 감염은 C형 간염 바이러스의 감염(hepatitis C virus infection)이다. 본 발명의 일 구체예로, 간 질환 또는 그러한 상태는 비알콜성지방간(non-alcoholic steatohepatitis)이다. 본 발명의 일 구체예로, 간 질환 또는 그러한 상태는 간경변(cirrhosis)이다.

[0187] 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 개체의 치료를 위한 방법을 제공하는데, 상기 개체는 적어도 하나의 폐 질환 또는 그러한 상태를 갖는다. 또한 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 것으로 확인된 개체의 치료를 위한 방법을 제공하는데, 상기 개체는 적어도 하나의 폐 질환 또는 그러한 상태를 갖는다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 방법은 개체에 miRNA 또는 그것의 전구체와 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것으로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 miRNA는 miR-21이다. 본 발명의 일 구체예로, 폐 질환 또는 그러한 상태는 만성폐색성 폐질환(chronic obstructive lung disease)이다.

[0188] 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 개체를 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 개체는 적어도 하나의 다른 질병 또는 그러한 상태를 갖는다. 또한 본 발명은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 것으로 확인된 개체의 치료를 위한 방법을 제공하는데, 상기 개체는 적어도 하나의 다른 질병 또는 그러한 상태를 갖는다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 방법은 개체에 miRNA 또는 그것의 전구체와 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것으로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 miRNA는 miR-21이다. 본 발명의 일 구체예로, 하나의 다른 질병 또는 그러한 상태는 폐고혈압(pulmonary hypertension)이다. 본 발명의 일 구체예로, 하나의 다른 질병 또는 그러한 상태는 혈관 관련 질병(blood vessel-related disease)이다. 본 발명의 일 구체예로, 혈관 관련 질병은 동맥경화(arterial stiffness), 동맥중층경화증(mediasclerosis) 또는 동맥경화증(arteriosclerosis)이 있다. 본 발명의 일 구체예로, 하나의 다른 질병 또는 그러한 상태는 소화관 경화(gut sclerosis)이다. 본 발명의 일 구체예로, 하나의 다른 질병 또는 그러한 상태는 전신 경화증(systemic sclerosis)이다. 본 발명의 일 구체예로, 하나의 다른 질병 또는 그러한 상태는 복막후 섬유증(retroperitoneal fibrosis), 증식성 섬유증(proliferative fibrosis), 종양성 섬유증(neoplastic fibrosis), 신장 전신 섬유증(nephrogenic systemic fibrosis), 주사 섬유증(injection fibrosis), 종격종 섬유증(mediastinal fibrosis), 골수섬유증(myelofibrosis), 정관 절제 수술 후 통증 증후군(post-vasectomy pain syndrome) 또는 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis)등이 있다.

[0189] 본 발명은 섬유증식성 장애(fibroproliferative disorder)를 갖는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 방법은 섬유증식성 장애(fibroproliferative disorder)가 있거나 의심되는 개체에 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것으로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 miRNA는 miR-21이다.

[0190] 본 발명은 추가적으로 암세포 내에서 SPRY-1-mediated ERK 신호의 조절에 의해 특정 암을 표적화하는 것과 관련된 암치료에 기반을 둔 mRNA-21과 관련된 것이다. miR-21은, 몇몇의 예를 든다면, 식도암(esophageal cancer), 대장선암(colon adenocarcinoma), 유방암(breast cancer), 신경교종(gliomas), 신경교아세포종(glioblastomas), 난소암(ovarian cancer), 간암(hepatocellular cancer), 두경부암(head and neck cancer), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia), 췌장암(pancreatic cancer)을 포함하는 많은 다른 암 종류 내에서 초과 발현되는 것으로 알려져 있다.

[0191] 그러므로, 본 발명은 또한 상기 언급한 암 종류에 관한 진단, 예방 및/또는 치료에 관한 것이다. 본 청구항에서 언급한 모든 특징들은 이러한 암 종류에서 드러난 사실과 결합할 수 있다.

[0192] **투여에 관한 특정 경로들**

[0193] 본 발명의 일 구체예로, 개체에 투여하는 것은 비경구적투여(parenteral administration)로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 개체에 투여하는 것은 정맥주사(intravenous administration)이다. 본 발명의 일 구체예로, 개체에 투여하는 것은 피하주사(subcutaneous administration)이다.

[0194] 본 발명의 일 구체예로, 개체에 투여하는 것은 동맥주사(intraarterial administration)이다. 본 발명의 일 구

체어로, 개체에 투여하는 것은 심장내 주사(intracardial administration)이다. 심장내 주사(intracardial administration)의 적절한 수단은 카테테르(catheter)의 방법 또는 심장 개복술(open heart surgery)의 방법으로 투여할 수 있다.

[0195] 본 발명의 일 구체예로, 투여는 폐정맥주사(pulmonary administration)를 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 폐정맥주사(pulmonary administration)는 흡입에 의해 개체의 폐내로 에어로졸화된 올리고뉴클레오티드를 전달하는 것으로 구성된다. 개체가 에어로졸화된 올리고뉴클레오티드를 흡입함에 따라, 올리고뉴클레오티드는 폐포대식세포(alveolar macrophages), 호산구(eosinophils), 상피조직(epithelium), 혈관내피(blood vessel endothelium), 및 폐포상피(bronchiolar epithelium)를 포함하는 정상 및 염증이 생긴 폐조직의 세포에 분배된다. 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 의약조성물의 전달을 위한 적절한 장치는 표준 분무기(standard nebulizer device)이며 이에 제한되는 것은 아니다. 호흡관(respiratory tract)과 폐의 특정한 부분을 표적화하기 위하여, 분무기(nebulizer devices)를 사용하여 작은 물방울 사이즈로 조절하는 공식 및 방법은 본 발명의 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 널리 알려져 있다. 추가적으로 적절한 장치는 DPIs(dry powder inhalers) 또는 MDIs(metered dose inhalers)을 포함한다.

[0196] 본 발명의 일 구체예로, 의약조성물은 전신 노출보다 국부적 노출을 달성하기 위하여 투여된다. 예를 들어, 폐정맥주사(pulmonary administration)는 적어도 전신노출과 동시에 의약조성물을 폐로 전달한다. 추가적으로 적절한 투여는 구강(oral), 직장(rectal), 점막관통(transmucosal), 창자(intestinal), 장(enteral), 국부(topical), 좌제(suppository), 척추강내(intrathecal), 심실내(intraventricular), 복강내(intraperitoneal), 비(鼻)내(intranasal), 안구내(intraocular), 근육내(intramuscular), 골수내(intramedullary), 및 종양내(intratumoral)를 통할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0197] **어떠한 임상적인 결과들**

[0198] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명이 제공하는 방법은 섬유증이 있거나 섬유증이 의심되는 개체에게 임상적으로 바람직한 결과를 제공하는 것이다.

[0199] 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 심장 무게 증가(heart weight increase)의 개선이다. 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 좌심실 확장(left ventricular dilation)의 개선이다. 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 좌심실단축률의 손상(impairment of fractional shortening)을 개선하는 것이다. 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 심장 무게 증가(heart weight increase)의 예방이다. 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 좌심실 확장(left ventricular dilation)의 예방이다. 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 좌심실단축률의 손상(impairment of fractional shortening)의 예방이다.

[0200] 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 심장기능을 향상시키는 것이다.

[0201] 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 섬유증의 개선이다. 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 더 나아가 섬유증의 진행을 늦추는 것이다. 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 더 나아가 섬유증의 진행을 정지시키는 것이다. 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 섬유증의 감소이다. 본 발명의 일 구체예로, 임상적으로 바람직한 결과는 콜라겐 함량의 감소이다.

[0202] 본 발명의 일 구체예로, 약학적으로 바람직한 결과는 간 기능을 향상시키는 것이다. 간 기능은 혈액 내 간의 아미노기 전이효소 레벨(liver transaminase levels)과 같은 것들 사이에서 측정되는 간 기능 검사(liver function test)에 의해 평가될 수 있다. 본 발명의 일 구체예로, 비정상적인 간 기능을 가진 개체는 혈액 내 간의 아미노기 전이효소 레벨(liver transaminase levels)이 올라간다. 혈액 내 간의 아미노기 전이효소(Blood liver transaminase)는 알라닌아미노전이효소(alanine aminotransferase, ALT) 및 아스파르트산아미노기전달효소(aspartate aminotransferase, AST)을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 비정상적인 간 기능을 가진 개체는 혈액 내 빌리루빈(bilirubin) 수치가 높다. 본 발명의 일 구체예로, 개체는 혈액내 비정상적인 알부민(albumin) 수치를 갖는다. 본 발명의 일 구체예로, 본 발명에서 제공하는 방법은 혈액내 ALT, AST, 빌리루빈(bilirubin) 및/또는 알부민(albumin) 수치를 변경하여 이러한 수치들 중 하나 또는 그 이상은 정상수치에 가깝게 된다.

[0203] 본 발명의 일 구체예로, 개체의 간 기능은 Child-Pugh 분류 시스템에 의해 평가되며, Child-Pugh 분류 시스템은 간 기능을 3가지로 분류하여 정의한다. 이러한 분류 시스템에서, 포인트들은 5개의 카테고리 중 어느 하나에 있는 치수에 할당된다: 빌리루빈 수치(bilirubin levels), 알부민 수치(albumin levels), 프로트롬빈 시간(PT,



prothrombin time), 복수(ascites), 및 뇌증(encephalopathy). 1 포인트는 하기에 따라오는 특징들이 제시하는 것의 각각에 할당된다: 2.0 mg/dl미만의 혈액 내 빌리루빈(blood bilirubin); 3.5 mg/dl 이상의 혈액 내 알부민(blood albumin); 1.7 국제적으로 표준화된 비율 (international normalized ratio, INR)의 미만인 프로트롬빈 시간(PT, prothrombin time); 복수(ascites)의 부재; 또는 뇌증(encephalopathy)의 부재. 2 포인트는 하기에 따라오는 특징들이 제시하는 것의 각각에 할당된다: 2-3 mg/dl의 혈액 내 빌리루빈(blood bilirubin); 3.5 to 2.8 mg/dl의 혈액 내 빌리루빈(blood bilirubin); 1.7-2.3 IN의 프로트롬빈 시간(PT, prothrombin time); 복수(ascites)는 완화시켜서 마일드하다; 또는 뇌증(encephalopathy)은 마일드하다. 3 포인트는 하기에 따라오는 특징들이 제시하는 것의 각각에 할당된다: 3.0 mg/dl 이상의 혈액 내 빌리루빈(blood bilirubin); 2.8 mg/dl 미만의 혈액 내 빌리루빈(blood bilirubin); 2.3 INR 이상의 프로트롬빈 시간(PT, prothrombin time); 복수(ascites)는 반응하지 않아 심각하다; 또는 뇌증(encephalopathy)은 심각하다. 상기 점수들은 더해지고 분류A는 5-6 포인트 점수에 할당되고, 분류 B는 7-9 포인트 점수에 할당되며, 분류C는 10-15 포인트 점수에 할당된다. 본 발명의 일 구체예로, 본 발명에서 제공하는 방법은 Child-Pugh 분류 시스템에 의해 측정된 간 기능 향상을 도출해낸다.

[0204] 어떤 세포의 표현형(Cellular Phenotypes)

[0205] 본 발명은 섬유모세포 증식(fibroblast cell proliferation)을 억제하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 섬유모세포 내에 세포사멸을 자극하기 위한 방법을 제공한다. 더 나아가, 본 발명은 섬유모세포 내의 스프라우티 1 단백질을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구체예로, 그러한 방법은 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖으며 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성되는 화합물을 섬유모세포에 접촉시키는 것으로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 miRNA는 miR-21이다.

[0206] 본 발명의 일 구체예로, 상기 섬유모세포는 시험관에서의 실험(in vitro)이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 접촉하는 것은 시험관에서 실행(in vitro)된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 접촉하는 것은 생체 내(in vivo)에서 실행된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 접촉하는 것은 생체 밖(ex vivo)에서 실행된다.

[0207] 어떤 추가적인 치료들

[0208] 섬유증의 치료는 하나 이상의 치료로 구성될 수 있다. 그러한 경우, 일 구체예로, 본 발명은 섬유증이 발병하거나 발병된 것으로 의심되는 개체를 치료하기 위한 방법을 제공하는데, 상기 방법은 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것에 더하여, 적어도 하나 이상의 치료를 하는 것으로 구성된다.

[0209] 본 발명의 일 구체예로, 상기 방법은 하나 또는 그 이상의 추가적인 의약제제를 투여하는 것으로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 추가적인 의약조성물은 이뇨제(diuretics)(예를 들어, spironolactone, eplerenone, furosemide), 수축촉진제(inotropes)(예를 들어, dobutamine, milrinone), 심장근육수축제(digoxin), 혈관확장제(vasodilators), ACE(angiotensin II converting enzyme)억제제 (예를 들어, captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril, 및 ramipril), ARB(angiotensin II receptor blockers)(예를 들어, candesartan, irbesartan, olmesartan, losartan, valsartan, telmisartan, eprosartan), 칼슘통로 차단제(calcium channel blockers), 이소소르비드질산염(isosorbide dinitrate), 혈관 확장제(hydralazine), 질산염(nitrates) (예를 들어, isosorbide mononitrate, isosorbide dinitrate), 혈관 확장제(hydralazine), 베타-차단제(beta-blockers)(예를들어, carvedilol, metoprolol), 및 나트륨이뇨펩타이드(natriuretic peptides) (예를 들어, nesiritide)를 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0210] 본 발명의 일 구체예로, 추가적인 치료는 신체의 면역 시스템을 향상시키는 저용량시클로포스파미드(low-dose cyclophosphamide), TP-1(thymostimulin), 비타민 및 영양제(nutritional supplements) (예를 들어, 비타민 A, C, E, 베타-카로틴, 아연(zinc), 셀레늄(selenium), 글루타시온(glutathione), 코엔자Q-10(coenzyme Q-10) 및 에키네이서(Echinacea)를 포함하는 항산화제(antioxidants)), 및 항원(antigen)과 보조제(adjuvant)가 다중결합의 방식으로 결합하는 백신 제제로 구성되는 것과 같은 백신(vaccines)을 포함하는 의약제제일 수 있다.

[0211] 본 발명의 어떤 그러한 구체예로, 상기 추가적인 치료는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 의약조성물의 부작용을 개선하거나 치료하기 위한 것에서 선택된다. 그러한 부작용은 주입 자리의 반응성(injection site reactions), 간 기능 검사의 이상(liver function test abnormalities) 신장 기능의 이상(renal function abnormalities),

간 독성(liver toxicity), 신장 독성(renal toxicity), 중추신경체계의 이상(central nervous system abnormalities) 및 근병증성(myopathies)을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 혈청 내의 아미노 전이효소(aminotransferase)의 수치의 증가는 간 독성(liver toxicity)이나 간 기능의 이상(liver function abnormality)을 나타낼 수 있다.

[0212] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 의약조성물과 하나 또는 그 이상의 다른 의약제제는 동시에 투여된다. 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 의약조성물과 하나 또는 그 이상의 다른 의약제제는 서로 다른 시점에서 투여된다. 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 의약조성물과 하나 또는 그 이상의 다른 의약제제는 동일 성분배합물(single formulation) 내에서 함께 준비된다. 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 의약조성물과 하나 또는 그 이상의 다른 의약제제는 서로 분리되어 준비된다.

[0213] 어떤 약학적인 조성물

[0214] 본 발명의 일 구체예로, 본 명세서에서 설명된 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성되는 화합물은 섬유증 치료를 위한 의약조성물로서 준비된다. 본 발명의 일 구체예로, miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 뉴클레오티드로 구성되는 화합물은 섬유증의 예방을 위한 의약조성물로서 준비된다.

[0215] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 약의 복용량 단위(dosage unit, 예를 들어, tablet, capsule, bolus, 등)의 형태로 투여된다. 본 발명의 일 구체예로, 그러한 의약조성물은 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg, 100 mg, 105 mg, 110 mg, 115 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 135 mg, 140 mg, 145 mg, 150 mg, 155 mg, 160 mg, 165 mg, 170 mg, 175 mg, 180 mg, 185 mg, 190 mg, 195 mg, 200 mg, 205 mg, 210 mg, 215 mg, 220 mg, 225 mg, 230 mg, 235 mg, 240 mg, 245 mg, 250 mg, 255 mg, 260 mg, 265 mg, 270 mg, 270 mg, 280 mg, 285 mg, 290 mg, 295 mg, 300 mg, 305 mg, 310 mg, 315 mg, 320 mg, 325 mg, 330 mg, 335 mg, 340 mg, 345 mg, 350 mg, 355 mg, 360 mg, 365 mg, 370 mg, 375 mg, 380 mg, 385 mg, 390 mg, 395 mg, 400 mg, 405 mg, 410 mg, 415 mg, 420 mg, 425 mg, 430 mg, 435 mg, 440 mg, 445 mg, 450 mg, 455 mg, 460 mg, 465 mg, 470 mg, 475 mg, 480 mg, 485 mg, 490 mg, 495 mg, 500 mg, 505 mg, 510 mg, 515 mg, 520 mg, 525 mg, 530 mg, 535 mg, 540 mg, 545 mg, 550 mg, 555 mg, 560 mg, 565 mg, 570 mg, 575 mg, 580 mg, 585 mg, 590 mg, 595 mg, 600 mg, 605 mg, 610 mg, 615 mg, 620 mg, 625 mg, 630 mg, 635 mg, 640 mg, 645 mg, 650 mg, 655 mg, 660 mg, 665 mg, 670 mg, 675 mg, 680 mg, 685 mg, 690 mg, 695 mg, 700 mg, 705 mg, 710 mg, 715 mg, 720 mg, 725 mg, 730 mg, 735 mg, 740 mg, 745 mg, 750 mg, 755 mg, 760 mg, 765 mg, 770 mg, 775 mg, 780 mg, 785 mg, 790 mg, 795 mg, 및 800 mg에서 선택된 투약량(dose)인 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 및 800mg에서 선택된 변형된 올리고뉴클레오티드의 투약량(dose)으로 된다.

[0216] 본 발명의 일 구체예로, 의약제제는 감압 하에서 동결 건조되고 살균한 변형된 올리고뉴클레오티드(lyophilized 변형된 올리고뉴클레오티드)이고, 이는 예를 들어, 주입용 살균물 또는 주입용 살균염분과 같은 적절한 희석액(diluent)으로 재구성된 것이다. 상기 재구성된 생산물은 희석액에 염분을 넣은 후에 피하주사 또는 정맥내 주입으로 투여한다. 상기 감압 하에서 동결 건조된 약제는 이를 준비하는 동안에 주입용 물 또는 주입용 염분 내에서 산과 염으로 pH를 7.0-9.0으로 조절하여 제조된 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성되며, 그 후에 상기 감압 하에서 동결 건조된다. 상기 감압 하에서 동결 건조되어 변형된 올리고뉴클레오티드는 변형된 올리고뉴클레오티드의 25-800 mg일 수 있다. 이것은 감압 하에서 동결 건조되어 변형된 올리고뉴클레오티드의 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 및 800 mg을 포함하는 것으로 이해된다. 상기 감압 하에서 동결 건조된 약제는 2 mL Type I인 깨끗한 유리 바이알(clear glass vial, 암모늄 설페이트로 처리됨)에 포장될 수 있으며, 브로모부틸 고무마개로 막아놓았고, 알루미늄 FLIP-OFF®overseal로 밀봉되었다.

[0217] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 상기 조성물은 그 기술 분야에서 정립한 사용 수치로 의약조성물 내에서 관습적으로 발견되어온 다른 부속물인 화합물을 추가적으로 포함할 수 있다. 즉, 예를 들어, 상기 조성물은 항소양제(antipruritics), 수렴제(astringents), 국소마취약(local anesthetics) 또는 항소염제(anti-inflammatory agents)와 같은 부가적인, 양립가능한, 약학적으로 활성화된 물질을 포함할 수 있거나 본 발명의 조성물에 물리

적으로 제조된 다양한 복용량(dosage)의 형태인 유용한 부가적인 물질, 예를 들어 염색제(dyes), 착향료(flavoring agents), 보존료(preservatives), 항산화제(antioxidants), 오페서파이어(opacifiers), 농유제(thickening agents) 및 안정화제(stabilizers) 등을 포함할 수 있다. 그렇지만, 그러한 물질을 첨가하였을 때, 본 발명의 조성물의 생물학적 활성을 지나치게 방해하지 않아야만 한다. 상기 성분배합물(formulations)은 살균될 수 있고, 바람직하게도, 보조제(auxiliary agents), 예를 들어, 윤활제(lubricants), 보존료(preservatives), 안정화제(stabilizers), 습윤제(wetting agents), 유화제(emulsifiers), 삼투압에 영향주기 위한 염(salts), 완충제(buffers), 염색제(colorings), 착향료(flavorings 및/또는 aromatic substances) 및 상기 성분배합물(formulation)의 올리고뉴클레오티드와 해롭게 상호작용하지 않는 것 등과 혼합될 수 있다.

- [0218] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 하나 또는 그 이상의 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하며, 하나 또는 그 이상의 부형제(excipients)를 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 부형제(excipients)는 물, 염용액, 알코올, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycols), 젤라틴(gelatin), 락토오스(lactose), 아밀라제(α-amylase), 스테아린산마그네슘(magnesium stearate), 탈크(talc), 규산(silicic acid), 점성있는 파라핀(viscous paraffin), 하이드록시메틸셀룰로오스(hydroxymethylcellulose) 및 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone) 중 어느 하나이다.
- [0219] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 이미 알려진 기술을 사용하여 제조될 수 있고, 이는 혼합하기(mixing), 용해하기(dissolving), 입화(granulating), 드라제-만들기(dragee-making), 가루로 만들기(levigating), 유화하기(emulsifying), 캡슐만들기(encapsulating), 인트랩핑(entraping) 또는 성형(tabletting) 공정들을 포함하고, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0220] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 액체(예를 들어, 현탁액(suspension), 영약(elixir) 및/또는 용액)이다. 본 발명의 일 구체예로, 액체 의약조성물은 기술분야에서 잘 알려진 요소를 사용하여 제조되며, 물, 글리콜(glycols), 오일, 알코올, 착향제(flavoring agents), 보존제(preservatives) 및 염색제(coloring agents)를 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0221] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 고체(예를 들어, 가루(powder), 정제(tablet), 및/또는 캡슐(capsule))이다. 본 발명의 일 구체예로, 하나 또는 그 이상의 올리고뉴클레오티드로 구성되는 고체 의약조성물은 그 기술분야에서 잘 알려진 요소를 사용하여 제조되며, 탄수화물(starches), 당(sugars), 희석액(diluents), 과립의 물질(granulating agents), 윤활유(lubricants), 결합제(binders), 및 분산제(disintegrating agents)를 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0222] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 depot preparation으로써 제조된다. 어떠한 상기 depot preparations는 전형적으로 non-depot preparations보다 더 오랫동안 활성적이다. 본 발명의 일 구체예로, 그러한 preparations는 착상(implantation) (예를 들어, 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사(intramuscular injection)에 의해 투여한다. 본 발명의 일 구체예로, depot preparations는 적절한 중합의(polymeric) 또는 소수성의(hydrophobic) 물질(예를 들어, 수용 가능한 오일 내의 유화(emulsion)) 또는 이온 교환수지(ion exchange resins), 또는 드물게 용해되는 유도체로서, 예를 들어, 드물게 용해되는 염을 사용하여 제조된다.
- [0223] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 전달 시스템을 구성한다. 전달 시스템의 예로는 리포솜(liposomes) 및 유화액(emulsions)을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다. 어떤 전달 시스템은 소수성 화합물(hydrophobic compounds)로 구성되는 것들을 포함하는 어떠한 의약조성물을 제조하기 위해 유용하다. 본 발명의 일 구체예로, 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)와 같은 어떤 유기 용액이 사용된다.
- [0224] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 특정 조직 또는 세포 타입에 하나 또는 그 이상의 본 발명의 의약제제를 전달하기 위해 설계된 하나 또는 그 이상의 특정-조직 전달 분자를 포함한다. 예를 들어, 일 구체예로, 의약조성물은 특정-조직의 항체(tissue-specific antibody)로 표면 처리된 리포솜(liposomes)을 포함한다.
- [0225] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 co-solvent 시스템으로 구성된다. 상기 co-solvent 시스템은 예를 들어, 벤질 알코올(benzyl alcohol), 비극성 계면활성제(nonpolar surfactant), 물에 혼합될 수 있는 유기 중합체(water-miscible organic polymer), 및 수용액상(aqueous phase)을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 그러한 co-solvent 시스템은 소수성 화합물을 위해 사용된다. 상기 co-solvent 시스템의 제한되지 않는 예들은 VPD co-solvent 시스템이고, 이것은 3% w/v의 벤질 알코올, 8% w/v의 비극성 계면 활성제 Polysorbate 80™ 및 65% w/v의 폴리에틸렌 글리콜 300으로 구성되는 순수한 에탄올 용액으로 구성된다. 용해성 및 독성적 특

징이 증대한 변경이 없는 채로, 상기 co-solvent 시스템의 비율은 상당히 다양할 수 있다. 더 나아가, co-solvent 화합물의 확인은 다양할 수 있다: 예를 들어, 다른 계면 활성제는 Polysorbate 80<sup>TM</sup> 대신에 사용될 수 있다; 폴리에틸렌 글리콜의 분획크기(fraction size)도 다양할 수 있다; 다른 생체에 적합한 중합체들은 폴리에틸렌 글리콜, 예를 들어, 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone); 및 다른 당(sugars) 또는 폴리사카린(polysaccharides)은 텍스트로오스(dextrose)를 대체할 수 있다.

[0226] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 지속적-방출 시스템(sustained-release system)을 포함한다. 그러한 지속적-방출 시스템의 예는 고체 소수성 중합체의 반투성 기질(semi-permeable matrix)이고, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구체예로, 지속적-방출 시스템(sustained-release systems)은, 그것들의 화학적 성질에 의존하며, 시(hours), 주(weeks) 또는 달(months)의 기간에 걸쳐 의약제제를 방출한다.

[0227] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 구강투여로 준비된다. 본 발명의 일 구체예로, 의약조성물은 하나 또는 그 이상의 약학적으로 수용가능한 운반체를 가진 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성되는 하나 또는 그 이상의 화합물이 결합하는 것에 의해 형성된다. 그러한 운반체들은 개체의 구강 섭취를 위하여, 의약조성물이 제형(tablets), 알약(pills), 드라제(dragees), 캡슐(capsules), 액체(liquids), 젤(gels), 시럽(syrups), 슬러리(slurries), 현탁액(suspensions) 등과 같은 형태로 제조되도록 하고, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구체예로, 구강 사용을 위한 의약조성물은 올리고뉴클레오티드와 하나 또는 그 이상의 고체 첨가제를 섞어서 얻는다. 적절한 첨가제는 락토오스(lactose), 수크로오스(sucrose), 마니톨(mannitol), 또는 소르비톨(sorbitol)을 포함하는 당(sugars)과 같은 충전제(fillers)를 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다; 예를 들어, 옥수수전분(maize starch), 밀전분(wheat starch), 쌀전분(rice starch), 감자전분(potato starch), 젤라틴(gelatin), 트래거캔스 고무(gum tragacanth), 메틸셀룰로오스(methyl cellulose), 히드록시프로필메틸-셀룰로오스(hydroxypropylmethyl-cellulose), 나트륨 카르복시 메틸 셀룰로오스(sodium carboxymethylcellulose), 및/또는 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP)과 같은 셀룰로오스 준비. 본 발명의 일 구체예로, 그러한 혼합물은 선택적으로 갈아놓고, 보조제(auxiliaries)를 선택적으로 첨가할 수 있다. 본 발명의 일 구체예로, 의약조성물은 제형(tablets) 또는 드라제 코어(dragee core)를 얻을 수 있도록 형성된다. 본 발명의 구체예로, 분해물질(disintegrating agents) (예를 들어, 교차 연결된 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 한천(agar), 또는 알긴산(alginic acid) 또는 알긴산 나트륨(sodium alginate)과 같은 그것들의 염)을 첨가한다.

[0228] 본 발명의 일 구체예로, 드라제 코어(dragee cores)는 코팅된 것으로 제공된다. 본 발명의 일 구체예로, 농축된 당 용액은 사용될 수 있고, 그것은 선택적으로 아라비아 고무(gum Arabic), 탈크(talc), 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 카보폴 겔(carbopol gel), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 및/또는 티타늄 디옥사이드(titanium dioxide), 라커용액(lacquer solutions), 및 적절한 유기 용액 또는 혼합용액을 포함할 수 있다. 염료(Dyestuffs) 또는 색소(pigments)는 제형(tablets) 또는 드라제 코팅(dragee coatings)에 첨가될 수 있다.

[0229] 본 발명의 일 구체예로, 구강 투여를 위한 의약조성물은 젤라틴으로 만들어진 밀어맞추어진 캡슐(push-fit capsules)이다. 그러한 밀어맞추어진 캡슐(push-fit capsules)은 본 발명의 하나 또는 그 이상의 의약제제와 하나 또는 그 이상의 충전제(filler)를 약간 혼합하는 것으로 구성될 수 있고, 상기 충전제(filler)는 예를 들어, 락토오스(lactose), 결합제(binders) 및/또는 예를 들어 탈크(talc) 또는 스테아린마그네슘(magnesium stearate)과 같은 윤활유(lubricants) 및 선택적으로 안정제(stabilizers)가 있다. 본 발명의 일 구체예로, 구강투여를 위한 의약조성물은 글리세롤(glycerol) 또는 소르비톨(sorbitol)과 같은 젤라틴과 가소제로 만들어진 부드럽고(soft), 밀봉된 캡슐이다. 어떠한 부드러운 캡슐인, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 의약제제는 적절한 액체, 예를 들어, 지방유(fatty oils), 액체파라핀(liquid paraffin), 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜(liquid polyethylene glycols)에 용해되거나 현탁되어 있다. 추가로, 안정화제(stabilizers)도 첨가될 수 있다.

[0230] 본 발명의 일 구체예로, 의약조성물은 구강투여를 위해 준비될 수 있다. 그러한 의약조성물은 본 기술분야에서 잘 알려진 방법으로 만들어진 제형(tablets) 또는 로젠지(lozenges)로 준비된다. 본 발명의 일 구체예로, 의약조성물은 예를 들어, 정맥내(intravenous), 피하내(subcutaneous), 근육내(intramuscular) 등의 주사와 같은 방법으로 투여하기 위해 제조된다. 본 발명의 일 구체예로, 의약조성물은 운반체를 포함하고 예를 들어 물 또는 Hanks의 용액, Ringer의 용액 또는 생리식염수(physiological saline buffer)처럼 생리적으로 안정된 버퍼와 같은 수용액 내에서 제조된다. 본 발명의 일 구체예로, 예를 들어, 용해성을 돕는 요소 또는 보존성을 수행하는 요소와 같은 다른 요소들도 포함된다. 본 발명의 일 구체예로, 주입가능한 현탁액은 현탁물질(suspending



agents) 등과 같은 적절한 액체 운반체를 사용하여 준비된다. 주입가능한 어떤 의약조성물은 예를 들어, 앰플(ampoules) 또는 다회 투여 용량 컨테이너(multi-dose containers)와 같은 복용량(dosage) 단위의 형태로 나타낸다. 주입가능한 어떤 의약조성물은 오일 또는 수용액 용제내의 현탁액, 용액 또는 유화액이고, 현탁된, 안정화된 및/또는 분산 물질과 같은 혼합제를 포함할 수 있다. 주입용의 의약조성물에 사용하기 적합한 어떤 용액은 친유성 용액(lipophilic solvents) 및 지방유(fatty oils)를 포함하고, 상기 지방유는 참기름(sesame oil), 예를 들어, 에틸 올레산염(ethyl oleate) 또는 트리글리세라이드(triglycerides)와 같은 합성된 지방산 에스테르(synthetic fatty acid esters) 및 리포솜(liposomes)이 있고, 이에 제한되는 것은 아니다. 수용액 주입 현탁액은, 예를 들어 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스(sodium carboxymethyl cellulose), 소르비톨(sorbitol), 또는 덱스트란(dextran)과 같은, 상기 현탁액의 점성을 증가시키는 물질을 포함한다. 선택적으로, 그러한 현탁액은 또한 적절한 안정화제 또는 고도로 농축된 용액의 준비를 가능하게 하기 위하여 의약제제의 용해성을 증가시키는 물질을 포함할 수 있다.

[0231] 본 발명의 어느 한 구체예로, 의약조성물은 경점막 투여(transmucosal administration)를 위해 준비된다. 본 발명의 일 구체예로, 침투가능한 장벽(barrier)에 적절한 침투물(penetrants)은 제제에 사용된다. 그러한 침투물(penetrants)은 일반적으로 본 발명의 기술분야에서 잘 알려져 있다.

[0232] 본 발명의 일 구체예로, 의약조성물은 흡입에 의한 투여로 준비된다. 상기 흡입용 의약조성물의 일 예는 가압된 팩 또는 분무기 내에 에어로졸 스프레이의 형태로 준비된다. 상기 의약조성물의 일 예는 분사제(propellant)이고, 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄(dichlorodifluoromethane), 트리클로로플루오로메탄(trichlorofluoromethane), 디클로로테트라플루오로에탄(dichlorotetrafluoroethane), 이산화탄소 또는 다른 적절한 가스 등이 있다. 가압된 에어로졸을 사용하는 일 구체예로, 복용량 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브(valve)로 결정될 수 있다. 본 발명의 일 구체예로, 흡입기(inhaler) 또는 취입기(insufflators)에 사용되는 캡슐과 카트리지는 제조될 수 있다. 상기 성분배합물(formulation)의 일 예는 락토오스 또는 전분과 같은 적절한 분말베이스와 본 발명의 의약제제의 분말 혼합물로 구성된다.

[0233] 본 발명의 일 구체예로, 의약조성물은 좌약(suppositories) 또는 정체 관장(retention enema)과 같은 직장 투여를 위해 준비된다. 상기 의약조성물의 일 예는 코코아 버터 및/또는 다른 글리세리드와 같은 잘 알려진 요소로 구성된다.

[0234] 본 발명의 일 구체예로, 의약조성물은 국부 투여(topical administration)를 위해 준비된다. 상기 의약조성물의 일 예는 연고(ointments) 또는 크림(creams)과 같은 무자극의 습윤 베이스(bland moisturizing bases)로 구성된다. 일 예로 적절한 연고 베이스는 바셀린(petrolatum), 바셀린(petrolatum)에 휘발성의 실리콘(volatile silicones)을 첨가한 것, 및 오일 에멀전에 있는 라놀린(lanolin) 및 물(water)을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 예로 적절한 크림은, 콜드 크림(cold cream) 및 소수성 연고(hydrophilic ointment)가 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0235] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 의약조성물은 치료법적으로 효과적인 함량 내에 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 치료법적으로 효과적인 함량은 병의 증상을 예방하고, 경감시키거나 개선하며, 치료되는 개체의 생존을 연장시킨다. 치료법적으로 효과적인 함량은 본 발명의 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자의 능력 범위 내에서 잘 결정될 수 있다.

[0236] 본 발명의 일 구체예로, 하나 또는 그 이상의 변형된 올리고뉴클레오티드는 전구약물(prodrug)로서 제조된다. 본 발명의 일 구체예로, 생체내 투여와 동시에, 전구약물(prodrug)은 변형된 올리고뉴클레오티드의 생물학적으로, 약학적으로 또는 치료법적으로 더 많은 활성화된 형태로 화학적으로 변환된다. 본 발명의 일 구체예로, 전구약물(prodrugs)은 상기 대응하는 활성화된 형태보다 투약하기 더 쉽기 때문에 전구약물(prodrugs)은 유용하다. 어느 일 예로, 전구약물은 상기 대응하는 활성화된 형태보다 더 생물학적으로 이용가능(예, 경구투여 방식)할 수 있다. 발명의 일 예로, 전구약물은 상기 대응하는 활성화된 형태와 비교하였을 때 향상된 용해성을 가질 수 있다. 본 발명의 일 구체예로, 전구약물은 상기 대응하는 활성화된 형태보다 물에 덜 용해된다. 본 발명의 일 구체예로, 그러한 전구약물은 물의 용해도가 이동성에 해로운, 세포막을 가로질러 잘 전달되는 특징을 갖는다. 본 발명의 일 예로, 전구약물은 에스테르이다. 본 발명의 일 예로, 상기 에스테르는 투여와 동시에 카르복실산에 대사적으로 가수분해된다. 본 발명의 일 예로, 화합물을 포함하는 상기 카르복실산은 상기 대응하는 활성화된 형태이다. 본 발명의 일 예로, 전구약물은 산 그룹에 결합된 짧은 펩티드(폴리아미노산)로 구성된다. 본 발명의 일 예로, 상기 펩티드는 상기 대응되는 활성화된 형태를 형성하기 위해 투여와 동시에 쪼개진다.

[0237] 본 발명의 일 예로, 전구약물은 약학적으로 활성화된 화합물을 변형하는 것에 의해 생산되어, 상기 활성화된 화

합물이 생체내 투여와 동시에 다시 재생될 수 있게 한다. 상기 전구약물은 대사적 안정성을 변경하거나, 약물의 수송특징을 변경하기 위해, 부작용 또는 독성을 막고, 약물의 향을 향상시키거나, 약물의 특징들 또는 그 밖에 다른 성질을 변경하기 위해 설계된다. 약역학 공정 및 생체내 약물 대사작용의 지식의 이점은, 약학적으로 활성화된 화합물을 잘 알고 있는 본 발명의 기술분야의 당업자가 상기 화합물의 전구약물을 설계할 수 있다는 것이다(예, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388-392).

[0238]

[0239] 어떤 화합물

[0240] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명에서 제공하는 방법은 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물의 투여로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 화합물은 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성된다.

[0241] 본 발명의 일 구체예로, 화합물은 상보적 가닥에 hybridized된 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성되는데, 그 예로, 화합물은 이중가닥의 올리고체 단백질 화합물로 구성된다. 본 발명의 일 예로, 상보적인 가닥에 변형된 올리고뉴클레오티드가 hybridization된 것은 적어도 하나의 두가닥 말단을 형성한다. 본 발명의 일 예로, 상보적인 가닥에 변형된 올리고뉴클레오티드가 hybridization된 것은 이중가닥의 올리고체 단백질 화합물의 각 말단에 있는 두 가닥 말단을 형성한다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 말단은 상보적인 가닥에 연결된 뉴클레오시드의 수와 관련하여 하나 또는 그 이상의 부가적인 연결 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 예로, 하나 또는 그 이상의 부가적인 연결 뉴클레오시드는 변형된 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 있다. 본 발명의 일 예로, 하나 또는 그 이상의 부가적인 뉴클레오시드는 변형된 뉴클레오티드의 3' 말단에 있다. 본 발명의 일 예로, 하나 또는 그 이상의 뉴클레오시드가 추가된 뉴클레오시드의 적어도 하나의 핵염기는 표적RNA에 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 하나 또는 그 이상의 부가적인 뉴클레오시드 각각의 핵염기는 표적RNA에 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 상보적인 가닥의 말단은 변형된 올리고뉴클레오티드의 연결된 뉴클레오시드의 수와 관련하여 하나 또는 그 이상의 부가적인 연결 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일 예로, 하나 또는 그 이상의 부가적인 연결 뉴클레오시드는 상보적 가닥의 3' 말단에 있다. 본 발명의 일 예로, 하나 또는 그 이상의 부가적인 연결 뉴클레오시드는 상보적 가닥의 5' 말단에 있다. 본 발명의 일 예로, 두 개의 부가적인 연결 뉴클레오시드는 말단에 연결되어 있다. 본 발명의 일 예로, 하나의 부가적인 뉴클레오시드는 말단에 연결되어 있다.

[0242] 본 발명의 일 예로, 화합물은 활성화, 세포 분배 또는 그렇게 만들어진 안티센스 올리고뉴클레오티드의 세포적 흡수를 향상시키는 하나 또는 그 이상의 일부분에 컨주게이트된 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성된다. 본 발명의 일 예로, 상기 일부분은 콜레스테롤 일부 또는 지질 일부이다. 합성을 위한 부가적인 일부분은 탄수화물, 인지질(phospholipids), 비오틴(biotin), 페나진(phenazine), 엽산(folate), 펜안트라딘(phenanthridine), 안트라퀴논(anthraquinone), 아크리딘(acridine), 플루오레세인(fluoresceins), 로다민(rhodamines), 쿠머린(coumarins), 염색제(dyes)를 포함한다. 본 발명의 일 예로, 합성된 기는 변형된 올리고뉴클레오티드에 직접적으로 부착된다. 본 발명의 일 예로, 합성된 기는 아미노, 하이드록실, 카르복실산, 티올, 불포화물(예, 이중 또는 삼중 결합), ADO(8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid), SMCC(succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate), AHX 또는 AHA(6-aminohexanoic acid), 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬, 치환된 또는 치환되지 않은 C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알케닐, 및 치환된 또는 치환되지 않은 C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알킬닐에서 선택된 연결된 일부분에 의해 변형된 올리고뉴클레오티드에 직접적으로 부착된다. 본 발명의 일 예로, 치환기는 수산기, 아미노, 알콕시, 카르복시, 벤질, 페닐, 니트로, 티올, 티오알콕시, 할로젠, 알킬, 아릴, 알케닐, 및 알킬닐에서 선택된다.

[0243] 본 발명의 일 예로, 상기 화합물은 하나 또는 그 이상의 안정화기를 갖는 변형된 뉴클레오티드로 구성되는데, 상기 안정화기는 뉴클레아제 안정성과 같은 특성을 향상시키기 위하여 변형된 올리고뉴클레오티드의 하나 또는 양 말단에 부착된 것이다. 안정화기는 캡 구조를 포함한다. 이러한 말단 변형은 엑소뉴클리아제 저하(exonuclease degradation)로부터 변형된 올리고뉴클레오티드를 보호하고, 세포 내로 전달 및/또는 위치시키는 것을 도울 수 있다. 상기 캡은 5' -말단(5' -캡), 또는 3' -말단(3' -캡)에 존재할 수 있거나 양 말단에 존재할 수 있다. 캡 구조는 예를 들어, 뒤집어진 디옥시 염기결여된 캡(inverted deoxy abasic caps)과 같은 것을 포함한다.

[0244] 적절한 캡구조는 4', 5'-메틸렌 뉴클레오티드, 1-(베타-D-에리트로푸라노실) 뉴클레오티드, 4'-티오 뉴클레오티드, 카르보시클릭 뉴클레오티드, 1,5-엔하이드록시톨 뉴클레오티드, L-뉴클레오티드, 알파-뉴클레오티드, 변형된 염기 뉴클레오티드, 포스포로디티오에이트 연결, 트레오-펜토푸라노실 뉴클레오티드(threo-pentofuranosyl

뉴클레오티드), 비고리형 3',4'-세코 뉴클레오티드, 비고리형 3,4-디하이드록실부틸 뉴클레오티드, 비고리형 3,5-디하이드록시펜틸 뉴클레오티드, 3'-3'-뒤집어진 뉴클레오티드 일부분, 3'-3'-뒤집어진 염기결여된 일부분(3'-3'-inverted abasic moiety), 3'-2'-뒤집어진 뉴클레오티드 일부분, 3'-2'-뒤집어진 염기결여된 일부분(3'-2'-inverted abasic moiety), 1,4-부탄디올 포스페이트, 3'-포스포르아미데이트(3'-phosphoramidate), 헥실포스페이트(hexylphosphate), 아미노헥실 포스페이트, 3'-포스페이트, 3'-포스포로티오에이트(3'-phosphorothioate), 포스포로디티오에이트(phosphorodithioate), 다리연결 메틸포스포네이트 일부분(bridging methylphosphonate moiety), 및 비-다리연결 메틸포스포네이트 일부분 5'-아미노-알킬 포스페이트, 1,3-디아미노-2-프로필 포스페이트, 3-아미노프로필 포스페이트, 6-아미노헥실 포스페이트, 1,2-아미노도데실 포스페이트, 히드록시프로필 포스페이트, 5'-5'-뒤집어진 뉴클레오티드 일부분, 5'-5'-뒤집어진 염기결여된 일부분, 5'-포스포르아미데이트, 5'-포스포로티오에이트, 5'-아미노, 다리연결 및/또는 비-다리연결 5'-포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 및 5'-머캡토 일부분으로 구성된다.

[0245] 어떤 핵염기 서열

[0246] 본 발명은 섬유증의 치료 또는 예방을 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 일 예로, 상기 방법은 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 의약조성물의 투여로 구성된다. 본 발명의 일 예로, 상기 방법은 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물의 투여로 구성된다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 서열을 갖는다. 본 발명의 일 예로, 상기 miRNA는 miR-21이다.

[0247] 본 명세서에서 설명하고 있는 성숙한 miRNA의 핵염기 서열과 그것들의 대응하는 스템-루프 서열은 miRBase 내에서 발견된 서열이고, miRNA 서열과 그 주석에 관해 온라인에서 조사가능한 데이터베이스는 <http://microrna.sanger.ac.uk/>에서 찾을 수 있다. miRBase 서열 데이터베이스에 있어서, 성숙한 miRNA 서열의 위치 및 서열에 대한 정보의 참작은 예견가능하게도 miRNA 전사(상기 스템-루프)의 헤어핀 부분을 나타낸다. 상기 데이터베이스 내의 miRNA 스템-루프 서열은 엄격하게는 전구체 miRNAs (pre-miRNAs)이 아니고, pre-miRNA 및 추정된 1차 전사물로부터의 어떤 flanking 서열을 포함하는 어떤 예들일 수 있다. 본 명세서에 설명된 상기 miRNA 핵염기 서열은 miRBase 서열 데이터베이스의 Release 10.0에 기술된 서열 및 miRBase 서열 데이터베이스의 10.0 Release의 어떠한 이전 Release에 기술된 서열들을 포함하며, miRNA의 어떠한 버전도 포함한다. 서열 데이터베이스 release는 어떤 miRNA의 이름을 다시 짓는 것을 도출할 수 있다. 서열 데이터베이스 release는 다양한 성숙한 miRNA 서열을 도출할 수 있다. 본 발명의 화합물은 본 명세서에 기술된 miRNA의 어떤 핵염기 서열 버전과 상보적인 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0248] 본 명세서에 기재된 어떠한 핵염기 서열은 당 일부분, 뉴클레오시드간 연결, 또는 핵염기에 대한 어떤 변이에 독립적인 것으로 이해된다. 더 나아가, 'U' 들을 포함하는 핵염기 서열은 또한 상기 동일한 핵염기 서열을 포함하고, 상기 'U' 는 'U' 를 갖는 하나 또는 그 이상의 위치에 'T' 로 교체되는 것으로 이해된다. 반대로, 'T' 를 포함하는 핵염기 서열은 또한 동일한 핵염기 서열을 포함하며, 상기 'T' 는 'T' 를 갖는 하나 또는 그 이상의 위치에 'U' 로 교체되는 것으로 이해된다.

[0249] 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA 또는 그것의 전구체에 상보적인 핵염기 서열을 갖는데, 그것의 의미는 변형된 올리고뉴클레오티드의 상기 핵염기 서열이 miRNA 또는 그것의 전구체의 상보적인 것의 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 더 많은 핵염기 부위에 걸쳐서, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다는 것이거나, 2개 서열이 엄격한 hybridization 조건 하에서 hybridize된다는 것이다. 따라서, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열의 일 예는 그것의 표적 miRNA 또는 표적 miRNA 전구체 서열에 관하여 하나 또는 그 이상의 잘못 매치된 염기쌍을 갖는 것이고, 그것의 표적 서열에 hybridizing 될 수 있는 것이다.

[0250] 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA 또는 그것의 전구체에 100% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 것이다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 miRNA에 전체로 상보적이다.

[0251] 본 발명의 일 예로, miR-21은 핵염기 서열 5' -UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3' (SEQ ID NO: 1)을 갖는다. 본 발명의 일 예로, miR-21 스템-루프 서열은 핵염기 서열 5' -UGUCGGGAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCUGUCUGACA-3' (SEQ ID NO: 11)을 갖는다.

- [0252] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 1로 기재된 miR-21의 핵염기 서열에 상보적인 서열을 갖는다.
- [0253] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 11로 기재된 miRNA 스템-루프 서열의 핵염기 서열에 상보적인 서열을 갖는다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 11의 핵염기 8 내지 29의 부위에 상보적인 핵염기 서열을 갖는다. 본 발명의 일 예로, 변형된 뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 11의 핵염기 46 내지 66의 부위에 상보적인 서열을 갖는다.
- [0254] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 핵염기 서열 5' -UCAACAUCAGUCUGAUAAAGCUA-3' (SEQ ID NO: 12)로 구성되는 핵염기 서열을 갖는다.
- [0255] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고 뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 12라고 기재된 핵염기 서열로 구성된 핵염기 서열을 갖는다.
- [0256] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 miR-21로 구성되는 pri-miR의 핵염기 서열과 상보적인 핵염기 서열을 갖는다.
- [0257] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 1로 기재된 핵염기 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 핵염기 서열에 상보적인 핵염기 서열을 갖는다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 1로 기재된 핵염기 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 98% 동일성을 갖는 핵염기 서열과 상보적인 핵염기 서열을 갖는다.
- [0258] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 11로 기재된 miR-21 스템-루프 서열의 핵염기 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 핵염기 서열과 상보적인 핵염기 서열을 갖는다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 11로 기재된 miR-21 스템-루프 서열의 핵염기 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 또는 적어도 98% 동일성을 갖는 핵염기 서열과 상보적인 핵염기 서열을 갖는다.
- [0259] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 본 명세서에 나열된 miRNA 핵염기 서열 또는 그것의 전구체에 전체로(full-length) 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 본 명세서에 나열된 miRNA 핵염기 서열 또는 그것의 전구체와 전체적(full-length) 상보성을 갖는다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miRNA 또는 그것의 전구체의 핵염기 서열과 관련하여 하나의 잘못 매치된 핵염기 서열을 갖는다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오는 상기 miRNA 또는 그것의 전구체의 핵염기 서열과 관련하여 두 개의 잘못 매치된 핵염기 서열을 갖는다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오는 상기 성숙한 miRNA 또는 그것의 전구체의 핵염기 서열과 관련하여 두 개 이하의 잘못 매치된 핵염기 서열을 갖는다. 본 발명의 일 예로, 잘못 매치된 핵염기는 연속적이다. 본 발명의 일 예로, 잘못 매치된 핵염기는 연속적이지 않다.
- [0260] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miRNA에 상보적이며, 상기 성숙한 miRNA의 길이와 상응하는 많은 연결 뉴클레오시드로 구성된다.
- [0261] 본 발명의 일 예로, 변형 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miRNA에 상보적이며, 상기 변형 올리고뉴클레오티드의 연결 뉴클레오시드의 수는 상기 성숙한 miRNA의 길이보다 작다. 본 발명의 일 예로, 변형 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miRNA에 상보적이며, 상기 변형 올리고뉴클레오티드의 연결 뉴클레오시드의 수는 상기 성숙한 miRNA의 길이보다 한 개 적다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 한 개 더 적은 뉴클레오시드를 는다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 3' 말단에 한 개 더 적은 뉴클레오시드를 갖는다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 두 개 더 적은 뉴클레오시드를 갖는다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 3' 말단에 두 개 더 적은 뉴클레오시드를 갖는다. miRNA의 길이보다 작은 많은 연결 뉴클레오시드를 가진 변형된 올리고뉴클레오티드는, 상기에서 변형된 올리고뉴클레오티드의 각각의 핵염기는 miRNA 내의 대응하는 위치에서 각각의 핵염기에 상보적이며, miRNA서열의 일부분에 100% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드로 간주된다.
- [0262] 본 발명의 일 구체예로, 변형 올리고뉴클레오티드는 miRNA에 상보적이며, 상기 변형 올리고뉴클레오티드의 연결 뉴클레오시드의 수는 상기 miRNA의 길이보다 크다. 본 발명의 일 예로, 부가적인 뉴클레오시드의 핵염기는 miRNA 스템-루프 서열의 핵염기에 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA에 상보적이며, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 연결 뉴클레오시드의 수는 상기 miRNA의 길이보다 1개 더 많다. 본



발명의 일 예로, 상기 부가적인 뉴클레오시드는 변형된 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 있다. 본 발명의 일 예로, 상기 부가적인 뉴클레오시드는 변형된 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 있다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA에 상보적이며, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드의 연결 뉴클레오시드의 수는 상기 miRNA의 길이보다 2개 더 많다. 본 발명의 일 예로, 상기 두 개의 부가적인 뉴클레오시드는 변형된 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 있다. 본 발명의 일 예로, 상기 두 개의 부가적인 뉴클레오시드는 변형된 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 있다. 본 발명의 일 예로, 하나의 부가적인 뉴클레오시드는 5' 말단에 위치하고, 하나의 부가적인 뉴클레오시드는 변형된 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 위치한다.

[0263] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열의 일부분은 miRNA의 핵염기 서열에 100% 상보적이지만, 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 그것의 전체 길이에 걸쳐서 100% 상보적이지 않다. 본 발명의 일 예로, 100% 상보적인 부분을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오시드의 수는 miRNA의 길이보다 크다. 예를 들어, 뉴클레오시드 1내지 23까지의 핵염기들은 길이상으로 23개 핵염기가 있는 miRNA의 상응하는 위치에 각각 상보적인 변형된 올리고뉴클레오티드에 있어서, 24개의 연결 뉴클레오시드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA의 핵염기 서열에 100% 상보적이고, miRNA의 핵염기 서열에 전체적으로 대략 96% 상보적인 23번째 뉴클레오시드 부분을 갖는다.

[0264] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 miRNA의 핵염기 서열의 부분에 100% 상보적이다. 예를 들어, 뉴클레오시드 1내지 22까지의 핵염기들은 길이상으로 23개 핵염기가 있는 miRNA의 상응하는 위치에 각각 상보적인 변형된 올리고뉴클레오티드에 있어서, 22개 연결된 뉴클레오시드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA의 핵염기 서열의 22번째 핵염기 부분에 100% 상보적이다. 그러한 변형된 올리고뉴클레오티드는 전체 miRNA의 핵염기 서열에 전체적으로 대략 96% 상보성을 갖으며, miRNA의 22번째 핵염기 부분에 100% 상보성을 갖는다.

[0265] 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열의 일부는 miRNA 또는 그것의 전구체의 핵염기 서열의 부분에 대하여 100% 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 15개의 연속적인 핵염기는 miRNA 또는 그것의 전구체의 15개 연속적인 핵염기와 각각 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 16개의 연속적인 핵염기는 miRNA 또는 그것의 전구체의 16개 연속적인 핵염기와 각각 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 17개의 연속적인 핵염기는 miRNA 또는 그것의 전구체의 17개 연속적인 핵염기와 각각 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 18개의 연속적인 핵염기는 miRNA 또는 그것의 전구체의 18개 연속적인 핵염기와 각각 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 19개의 연속적인 핵염기는 miRNA 또는 그것의 전구체의 19개 연속적인 핵염기와 각각 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 20개의 연속적인 핵염기는 miRNA 또는 그것의 전구체의 20개 연속적인 핵염기와 각각 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 21개의 연속적인 핵염기는 miRNA 또는 그것의 전구체의 21개 연속적인 핵염기와 각각 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 22개의 연속적인 핵염기는 miRNA 또는 그것의 전구체의 22개 연속적인 핵염기와 각각 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 23개의 연속적인 핵염기는 miRNA 또는 그것의 전구체의 23개 연속적인 핵염기와 각각 상보적이다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 24개의 연속적인 핵염기는 miRNA 또는 그것의 전구체의 24개 연속적인 핵염기와 각각 상보적이다.

[0266] 어떤 변형된 올리고뉴클레오티드

[0267] 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 12 내지 30개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 15 내지 25개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 19 내지 24개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 21 내지 24개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다.

[0268] 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 12개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 13개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 14개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 15개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 16개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 17개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 18개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 19개로 연결된 뉴클레오시드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 20

개로 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 21개로 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 22개로 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 23개로 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 24개로 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 25개로 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 26개로 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 27개로 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 28개로 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 29개로 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 30개로 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일례로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 12의 연속적인 핵염기에서 선택된 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0269] **어떠한 변이**

[0270] 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오타이드는 핵염기, 당, 및/또는 뉴클레오타이드 연결에 대한 하나 또는 그 이상의 변이로 구성한다. 변형된 핵염기, 당, 및/또는 뉴클레오타이드간 연결은 예를 들어, 향상된 세포 흡수, 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산 표적과의 향상된 친화도, 뉴클레아제 존재하의 증가된 안정성과 같은 바람직한 특징들 때문에 변형되지 않은 형태에 걸쳐서 선택될 수 있다.

[0271] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하나 또는 그 이상의 변형된 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 뉴클레오타이드는 안정화된 뉴클레오타이드이다. 안정화된 뉴클레오타이드의 예는 당-변형 뉴클레오타이드이다.

[0272] 본 발명의 일 구체예로, 변형된 뉴클레오타이드는 당-변형 뉴클레오타이드이다. 본 발명의 일 구체예로, 더 나아가, 상기 당-변형 뉴클레오타이드는 본연의 또는 변형된 헤테로고리 염기 일부분 및/또는 본연의 또는 변형된 뉴클레오타이드간 연결로 구성될 수 있고 더 나아가 당 변이로부터 독립적인 변이를 포함할 수 있다. 본 발명의 일례로, 당 변형 뉴클레오타이드는 2' -변형된 뉴클레오타이드이고, 상기 당 고리는 본연의 리보오스 또는 2' -디옥시-리보오스에서 2' 탄소는 변형된 것이다.

[0273] 본 발명의 일례로, 2' -변형된 뉴클레오타이드는 이환성 당 일부분을 갖는다. 본 발명의 일례로, 이환성 당 일부분은 알파 배열에서 D 당이다. 본 발명의 일례로, 이환성 당 일부분은 베타 배열에서 D 당이다. 본 발명의 일례로, 상기 이환성 당 일부분은 알파 배열에서 L 당이다. 본 발명의 일례로, 이환성 당 일부분은 베타 배열에서 L 당이다.

[0274] 본 발명의 일례로, 상기 이환성 당 일부분(bicyclic sugar moiety)은 2' 와 4' -탄소원자 사이의 다리그룹(bridge group)으로 구성된다. 본 발명의 일례로, 상기 다리그룹(bridge group)은 1 내지 8개가 연결된 이가 라디칼 그룹(biradical group)들로 구성된다. 본 발명의 일례로, 이환성 당 일부분(bicyclic sugar moiety)은 1 내지 4개로 연결된 이가 라디칼 그룹(biradical groups)으로 구성된다. 본 발명의 일례로, 상기 이환성 당 일부분(bicyclic sugar moiety)은 2 또는 3개로 연결된 이가 라디칼 그룹(biradical groups)으로 구성된다. 본 발명의 일례로, 상기 이환성 당 일부분 (bicyclic sugar moiety)은 2개로 연결된 이가 라디칼 그룹(biradical groups)으로 구성된다. 본 발명의 일례로, 연결된 이가 라디칼 그룹(biradical group)은 -O-, S-, -N(R<sub>1</sub>)-, C(R<sub>1</sub>)(R<sub>2</sub>)-, C(R<sub>1</sub>)=C(R<sub>1</sub>)-, -C(R<sub>1</sub>)=N-, C(=NR<sub>1</sub>)-, Si(R<sub>1</sub>)(R<sub>2</sub>)-, -S(=O)<sub>2</sub>-, -S(=O)-, -C(=O)- 및 -C(=S)-으로 구성되고; 상기 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub> 각각은, 독립적으로, H, 수산기, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> 아릴, 치환된 C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> 아릴, 헤테로고리 라디칼, 치환된 헤테로고리 라디칼, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> 지방족고리 라디칼, 치환된 C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> 지방족고리 라디칼, 할로젠, 치환된 옥시 (-O-), 아미노, 치환된 아미노, 아지도(azido), 카르복실, 치환된 카르복실, 아실(acyl), 치환된 아실, CN, 티올, 치환된 티올, 설폰일 (S(=O)<sub>2</sub>-H), 치환된 설폰일, 설폰일 (S(=O)-H) 또는 치환된 설폰일이고; 및 각각 치환된 그룹은 독립적으로, 할로젠, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, 아미노, 치환된 아미노, 아실, 치환된 아실, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 아미노알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 아미노알콕시, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 아미노알킬, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 아미노알콕시 또는 보호기이다.

[0275] 본 발명의 일 구체예로, 이환성 당 일부분(bicyclic sugar moiety)은 2' 과 4' 탄소원자 사이에 -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-,

-O-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -O-CH(알킬)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-, -N(알킬)-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-, -O-CH(알킬)-, -(CH(알킬))-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-, -NH-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-, -N(알킬)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-, 또는 -O-N(알킬)-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-, (상기 p 는 1, 2, 3, 4 또는 5이고, 더 나아가 각각의 알킬기는 치환될 수 있으며, p는 1, 2 또는 3이다)에서 선택된 이가라디칼 그룹(biradical group)으로 다리가 놓여 있다.

[0276] 본 발명의 일 예로, 2' -변형된 뉴클레오시드는 할로(halo), 아릴, 아미노, 아지도(azido), SH, CN, OCN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, O-, S-, 또는 N(Rm)-알킬; O, S-, 또는 N(Rm)-알케닐; O-, S- 또는 N(Rm)-알키닐; O-알키레닐-O-알킬, 알키닐, 알카릴, 아랄킬, O-알카릴, O-아랄킬, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(Rm)(Rn) 또는 O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(Rm)(Rn), (상기에서 Rm 및 Rn 각각은 독립적으로 H, 아미노 보호기 또는 치환된 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬이다)에서 선택된 2' -치환기로 구성된다. 더 나아가, 이러한 2'-치환기는 독립적으로 수산기, 아미노, 알콕시, 카르복시, 벤질, 페닐, 니트로(NO<sub>2</sub>), 티올, 티오알콕시(S 알킬), 할로젠, 알킬, 아릴, 알케닐 및 알키닐에서 선택된 하나 또는 그 이상의 치환기로 치환될 수 있다.

[0277] 본 발명의 일 구체예로, 2' -변형된 뉴클레오시드는 F, NH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O N(Rm)(Rn), -O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 및 N-치환 아세트아미드(O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(Rm)(Rn), (상기 식에서 Rm 및 Rn 각각은, 독립적으로 H, 아미노 보호기 또는 치환 또는 비치환 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬이다)에서 선택된 2' -치환기로 구성된다.

[0278] 본 발명의 일 예로, 2' -변형된 뉴클레오시드는 F, OCF<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 및 O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)CH<sub>3</sub> 에서 선택된 2' -치환기로 구성된다.

[0279] 본 발명의 일 예로, 2' -변형된 뉴클레오시드는 F, O-CH<sub>3</sub>, 및 OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>에서 선택된 2' -치환기로 구성된다.

[0280] 본 발명의 일 예로, 당-변형 뉴클레오시드는 4' 티오 변형 뉴클레오시드이다. 본 발명의 일 예로, 당-변형 뉴클레오시드는 4' -티오-2' -변형 뉴클레오시드이다. 4'-티오 변형 뉴클레오시드는 β-D-리보뉴클레오시드의 4'-O가 4'-S로 교체된 것이다. 4'-티오-2'-변형 뉴클레오시드는 2'-OH가 2'-치환기로 교체된 4'-티오-2'-변형 뉴클레오시드이다. 적절한 2' -치환기는 2'-OCH<sub>3</sub>, 2'-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>, 및 2'-F를 포함한다.

[0281] 본 발명의 일 예로, 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오티드는 하나 또는 그 이상의 내부뉴클레오시드 변이를 포함한다. 본 발명의 일 예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 각 뉴클레오시드간 연결은 변형된 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 본 발명의 일 구체예로, 변형된 뉴클레오시드간 연결은 인원자로 구성된다.

[0282] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오티드 적어도 하나의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 각각의 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다.

[0283] 본 발명의 일 구체예로, 변형된 뉴클레오시드간 연결 인원자로 구성되지 않는다. 본 발명의 일 구체예로, 뉴클레오시드간 연결은 짧은 사슬 알킬의 뉴클레오시드간 연결로 형성된다. 본 발명의 일 구체예로, 뉴클레오시드간 연결은 고리알킬의 뉴클레오시드간 연결로 형성된다. 본 발명의 일 구체예로, 뉴클레오시드간 연결은 헤테로원자와 알킬의 혼합인 뉴클레오시드간 연결로 형성된다. 본 발명의 일 구체예로, 뉴클레오시드간 연결은 헤테로원자와 고리알킬의 혼합인 뉴클레오시드간 연결로 형성된다. 본 발명의 일 구체예로, 뉴클레오시드간 연결은 하나 또는 그 이상의 짧은 사슬 헤테로원자의 뉴클레오시드간 연결로 형성된다. 본 발명의 일 구체예로, 뉴클레오시드간 연결은 하나 또는 그 이상의 헤테로고리의 뉴클레오시드간 연결로 형성된다. 본 발명의 일 구체예로, 뉴클레오시드간 연결은 아미드 골격을 갖는다. 본 발명의 일 구체예로, 뉴클레오시드간 연결은 N, O, S 및 CH<sub>2</sub> 구성요소 부분의 혼합이다.

[0284] 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드 하나 또는 그 이상의 변형된 핵염기이다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 하나 또는 그 이상의 5-메틸시토신이다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 각각의 시토신은 5-메틸시토신으로 구성된다.

[0285] 본 발명의 일 구체예로, 변형된 핵염기는 5-히드록시메틸 시토신, 7-디아자구아닌 및 7-디아자아데닌에서 선택된다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 핵염기 7-디아자-아데닌, 7-디아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈

에서 선택된다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 핵염기는 5-치환 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환 퓨린, (2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함한다)에서 선택된다.

[0286] 본 발명의 일 구체예로, 변형된 핵염기는 다환의 헤테로고리를 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 핵염기 3환의 헤테로고리를 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 핵염기 페녹사진(phenoxazine) 유도체를 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 더 나아가, 상기 페녹사진은 본 발명의 기술분야에서 지-클램프(G-clamp)로 잘 알려진 핵염기를 형성하기 위해 변형될 수 있다.

[0287] **어떠한 올리고 뉴클레오티드의 모티프**

[0288] 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오티드를 위한 적절한 모티프는, 완전히 변형된, 균일하게 변형된, 위치적으로 변형된, 및 갭머(gapmer) 등이 있고 이에 제한되는 것은 아니다. 균일하게 변형된 모티프를 포함하여 완전히 변형된 모티프를 가진 변형된 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miRNA를 표적화하기 위해 설계될 수 있다. 대안적으로, 균일하게 변형된 모티프를 포함하여 완전히 변형된 모티프를 가진 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA 전구체가 성숙한 miRNA로 과정을 막기 위해 pri-miRNA 또는 pre-miRNA들의 어떤 위치를 표적화하기 위해 설계될 수 있다. 균일하게 변형된 모티프 또는 완전히 변형된 모티프를 가진 변형된 올리고뉴클레오티드는 miRNA활성의 효과적인 억제제이다.

[0289] 본 발명의 일 구체예로, 완전히 변형된 올리고뉴클레오티드는 각 뉴클레오시드에 당 변이가 있는 것으로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 많은 뉴클레오시드들은 2' -O-메톡시에틸 뉴클레오시드이고 상기 남겨진 뉴클레오시드들은 2' -플루오로 뉴클레오시드이다. 본 발명의 일 구체예로, 많은 뉴클레오시드들의 각각은 2' -O-메톡시에틸 뉴클레오시드이고 많은 뉴클레오시드들의 각각은 이환성 뉴클레오시드이다. 본 발명의 일 구체예로, 더 나아가 완전히 변형된 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드간 연결로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 완전히 당-변형된 올리고뉴클레오티드의 각각의 뉴클레오시드간 연결은 변형된 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 더 나아가 완전히 당-변형된 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 완전히 당-변형된 올리고뉴클레오티드의 각각의 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다.

[0290] 본 발명의 일 구체예로, 완전히 변형된 올리고뉴클레오티드는 각각의 뉴클레오시드간 연결에서 변형된다. 본 발명의 일 구체예로, 완전히 변형된 올리고뉴클레오티드의 각각의 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다.

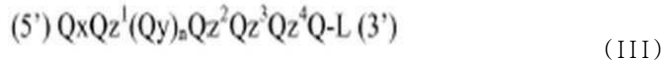
[0291] 본 발명의 일 구체예로, 균일하게 변형된 올리고뉴클레오티드는 각각의 뉴클레오시드에서 상기 동일한 당 변이를 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 각각의 뉴클레오시드는 2' -O-메톡시에틸 당 변이를 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 각 뉴클레오시드는 2' -O-메틸 당 변이를 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드의 각 뉴클레오시드는 2' -플루오로 당 변이를 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 더 나아가 균일하게 변형된 올리고뉴클레오티드 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 균일하게 당-변형된 올리고뉴클레오티드의 각 뉴클레오시드간 연결은 변형된 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 더 나아가 균일하게 당-변형된 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 균일하게 당-변형된 올리고뉴클레오티드의 각 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다.

[0292] 본 발명의 일 구체예로, 균일하게 변형된 올리고뉴클레오티드는 도처에 동일한 뉴클레오시드간 연결 변이를 포함한다. 본 발명의 일 구체예로, 균일하게 변형된 올리고뉴클레오티드의 각 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다.

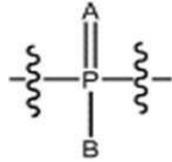
[0293] 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 각 뉴클레오시드에 상기 동일한 당변이를 구성하며, 더 나아가, 하나 또는 그 이상의 뉴클레오시드간 연결 변이를 구성한다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 변형된 뉴클레오시드간 연결이고, 3' 말단에 변형된 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 2개 변형된 뉴클레오시드간 연결이고, 3' 말단에 2개 변형된 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 2개 변형된 뉴클레오시드간 연결이고, 3' 말단에 3개 변형된 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 2개 변형된 뉴클레오시드간 연결이고, 3' 말단에 4개 변형된 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결

이다.

[0294] 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식(III)으로 나타낸다:

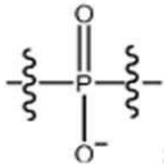


[0295] 본 발명의 일 구체예로, 화합물은 화학식(III)으로 나타낸다. 본 발명의 일 구체예로, Q는 2' -O-메틸 변형된 뉴클레오시드이다. 본 발명의 일 구체예로, x는 포스포로티오에이트이다. 본 발명의 일 구체예로, y는 포스포디에스테르이다. 본 발명의 일 구체예로, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, Z<sup>3</sup> 및 Z<sup>4</sup> 각각은, 독립적으로 포스포로티오에이트 또는 포스포디에스테르이다. 본 발명의 일 구체예로, n는 6 내지 17이다. 본 발명의 일 구체예로, L은 콜레스테롤이다. 본 발명의 일 구체예로, n은 12 내지 17이다.



[0297] 본 발명의 일 구체예로, x는 이고;

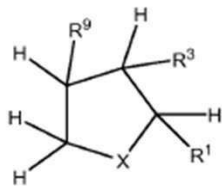
[0298] A 및 B 중 어느 하나는 S이고, 반면 다른 하나는 O이다;



[0299] y는 이고;

[0300] Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, Z<sup>3</sup>의 각각, 및 Z<sup>4</sup>는 독립적으로 x 또는 y이다;

[0301] n = 6-17



[0302] L은 이다:

[0303] 상기의 식에서:

[0304] X는 N(CO)R<sup>7</sup>, 또는 NR<sup>7</sup>이다;

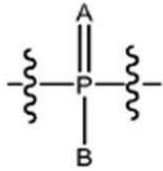
[0305] R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> 및 R<sup>9</sup>의 각각은 독립적으로, H, OH, 또는 -CH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>, 상기 R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> 및 R<sup>9</sup> 중 어느 하나는 OH이고 R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> 및 R<sup>9</sup> 중 적어도 하나는 -CH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>이다;

[0306] R<sup>7</sup>은 R<sup>d</sup> 또는 NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup> 또는 NHC(O)R<sup>d</sup>로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 알킬이다;

[0307] R<sup>c</sup>는 H 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이다;

[0308] R<sup>d</sup>는 탄수화물 라디칼; 또는 선택적으로 적어도 하나의 탄수화물 라디칼에 구속된 스테로이드 라디칼; 및

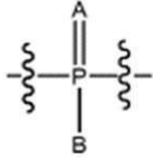




[0309] R<sup>b</sup>은 이고,

[0310] 상기 A 와 B 중 어느 하나는 S이고 반면 다른 하나는 O이다.

[0311] 본 발명의 일 구체예로, R<sup>d</sup>은 콜레스테롤이다. 본 발명의 일 예는 Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, Z<sup>3</sup> 및 Z<sup>4</sup>의 각각은



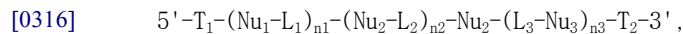
이고,

[0312] 상기 A 및 B 중 어느 하나는 S이고 반면 다른 하나는 O이다.

[0313] 본 발명의 일 구체예로, R<sup>1</sup>은 -CH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>9</sup>은 OH이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>1</sup> 및 R<sup>9</sup> 트랜스이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>9</sup>은 OH이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>1</sup> 및 R<sup>3</sup>는 트랜스이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>3</sup>는 -CH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sub>1</sub>은 OH이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>1</sup> 및 R<sup>3</sup>는 트랜스이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>9</sup>은 OH이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>3</sup> 및 R<sup>9</sup>는 트랜스이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>9</sup>는 CH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>1</sup>은 OH이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>1</sup> 및 R<sup>9</sup>은 트랜스이다. 본 발명의 일 구체예로, X는 NC(O)R<sup>7</sup>이다. 본 발명의 일 구체예로, R<sup>7</sup>은 -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)R<sup>d</sup>이다.

[0314] 본 발명의 일 구체예로, 위치적으로 변형된 올리고뉴클레오티드는 연결된 뉴클레오시드의 부위를 포함하며, 상기 각 부위의 각 뉴클레오시드는 동일 당 일부이며, 각 부위의 각 뉴클레오시드는 인접한 부위의 당 일부와 구별되는 당 일부분으로 구성된다.

[0315] 본 발명의 일 구체예로, 위치적으로 변형된 올리고뉴클레오티드는 적어도 10개의 2'-플루오로 변형된 뉴클레오시드로 구성된다. 그러한 위치적으로 변형된 올리고뉴클레오티드는 하기 화학식 I로 나타낼 수 있다:



[0317] 상기의 식에서:

[0318] 각 Nu<sub>1</sub> 및 Nu<sub>3</sub>는, 독립적으로, 안정한 뉴클레오시드이고;

[0319] 적어도 10개의 Nu<sub>2</sub>는 2'-플루오로 뉴클레오시드이며;

[0320] 각 L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> 및 L<sub>3</sub>는, 독립적으로, 뉴클레오시드간 연결이고;

[0321] 각 T<sub>1</sub> 및 T<sub>2</sub>는, 독립적으로, H, 수산기 보호기, 선택적으로 컨쥬게이트 기(conjugate group) 또는 캡핑기(capping group)이고;

[0322] n<sub>1</sub>은 0 내지 3;

[0323] n<sub>2</sub>은 14 내지 22;

[0324] n<sub>3</sub>은 0 내지 3; 및

[0325] n<sub>1</sub>이 0이면, T<sub>1</sub>는 H 또는 수산기 보호기가 아니고, n<sub>3</sub>이 0이면, T<sub>2</sub>은 H 또는 수산기 보호기가 아니다.

[0326] 본 발명의 일 구체예로, n<sub>1</sub> 및 n<sub>3</sub>는 각각, 독립적으로, 1 내지 3이다. 본 발명의 일 구체예로, n<sub>1</sub> 및 n<sub>3</sub>는 각각,

독립적으로, 2 내지 3이다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_1$ 은 1 또는 2이고,  $n_3$ 은 2 또는 3이다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_1$  및  $n_3$ 는 각각 2이다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_1$  및  $n_3$ 의 적어도 하나는 0보다 크다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_1$  및  $n_3$  각각은 0보다 크다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_1$  및  $n_3$ 의 하나는 0보다 크다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_1$  및  $n_3$ 의 하나는 어느 하나보다 크다.

[0327] 본 발명의 일 구체예로,  $n_2$ 은 16 내지 20이다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_2$ 은 17 내지 19이다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_2$ 은 18이다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_2$ 는 19이다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_2$ 는 20이다.

[0328] 본 발명의 일 구체예로,  $Nu_2$  뉴클레오시드들의 2 내지 8개는 안정화 뉴클레오시드이다. 본 발명의 일 구체예로,  $Nu_2$  뉴클레오시드들의 2 내지 6개는 안정화 뉴클레오시드. 본 발명의 일 구체예로,  $Nu_2$  뉴클레오시드들의 3 내지 4개는 안정화 뉴클레오시드이다. 본 발명의 일 구체예로,  $Nu_2$  뉴클레오시드들의 3개는 안정화 뉴클레오시드이다.

[0329] 본 발명의 일 구체예로,  $Nu_2$  안정화 뉴클레오시드의 각각은 2 내지 8개의 2'플루오로 뉴클레오시드들에 의한  $Nu_3$  안정한 뉴클레오시드와 분리된다. 각각의  $Nu_2$  안정한 뉴클레오시드들의 일 예는 3 내지 8개의 2'플루오로 뉴클레오시드들에 의한  $Nu_3$  안정한 뉴클레오시드와 분리된다. 본 발명의 일 구체예로,  $Nu_2$  안정화 뉴클레오시드의 각각은 5 내지 8개의 2'플루오로 뉴클레오시드들에 의한  $Nu_3$  안정한 뉴클레오시드와 분리된다.

[0330] 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 2 내지 6개의  $Nu_2$  안정한 뉴클레오시드들로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드는 3개의  $Nu_2$  안정한 뉴클레오시드들로 구성된다.

[0331] 발명의 일 구체예로, 각  $Nu_2$  안정한 뉴클레오시드는 어느 인접 서열에 함께 연결된다. 본 발명의 일 구체예로, 적어도 2개의  $Nu_2$  안정한 뉴클레오시드는 2'플루오로 뉴클레오시드들 중 적어도 한 개에 의해 분리된다. 본 발명의 일 구체예로, 각  $Nu_2$  안정한 뉴클레오시드는 2'플루오로 뉴클레오시드들 중 적어도 하나에 의해 분리된다.

[0332] 본 발명의 일 구체예로,  $Nu_2$  2'-플루오로 뉴클레오시드들의 적어도 2개의 인접한 서열은 안정한 뉴클레오시드들 중 적어도 하나에 의해 분리된다. 상기 인접 서열의 각각은 동일한 수의 2'-플루오로 뉴클레오시드를 갖는다.

[0333] 본 발명의 일 구체예로,  $T_1$  및  $T_2$ 는 각각, 독립적으로, H 또는 수산기 보호기이다. 본 발명의 일 구체예로,  $T_1$  및  $T_2$ 의 적어도 하나는 4,4'-디메톡시트리틸이다. 본 발명의 일 구체예로,  $T_1$  및  $T_2$ 의 적어도 하나는 선택적으로 연결된 컨주게이트기이다. 본 발명의 일 구체예로,  $T_1$  및  $T_2$ 의 적어도 하나는 캡핑기이다. 본 발명의 일 구체예로, 상기 캡핑기는 뒤집어진 디옥시 염기결여된 그룹(inverted deoxy abasic group)이다.

[0334] 본 발명의 일 구체예로, 위치적으로 변형된 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드간 연결로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 위치적으로 변형된 올리고 뉴클레오시드의 각 뉴클레오시드간 연결은 변형된 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 위치적으로 변형된 올리고뉴클레오티드의 적어도 하나의 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 위치적으로 변형된 올리고뉴클레오티드의 각 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다.

[0335] 본 발명의 일 구체예로, 위치적으로 변형된 모티프는 하기의 화학식 II로 나타내며, 이는 연결 뉴클레오시드로 구성된 변형된 올리고뉴클레오티드를 나타낸다:

[0336]  $T_1-(Nu_1)_{n_1}-(Nu_2)_{n_2}-(Nu_3)_{n_3}-(Nu_4)_{n_4}-(Nu_5)_{n_5}-T_2$ , 상기의 식에서:

[0337]  $Nu_1$  및  $Nu_5$ 는, 독립적으로, 2' 안정한 뉴클레오시드이고;

[0338]  $Nu_2$  및  $Nu_4$ 은 2' 플루오로 뉴클레오시드이고;

[0339]  $Nu_3$ 은 2' 변형된 뉴클레오시드이며;

[0340]  $n_1$  및  $n_5$  각각은, 독립적으로, 0 내지 3이고;

- [0341]  $n_2$ 과  $n_4$ 의 합은 10 과 25 사이이며;
- [0342]  $n_3$ 은 0 내지 5; 및
- [0343] 각각의  $T_1$  및  $T_2$ 는, 독립적으로, H, 수산기 보호기, 선택적으로 연결된 컨쥬게이트기(conjugate group) 또는 캡핑기이다.
- [0344] 본 발명의 일 구체예로,  $n_2$  및  $n_4$ 의 합은 16이다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_2$  및  $n_4$ 의 합은 17이다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_2$  및  $n_4$ 의 합은 18이다. 본 발명의 일 구체예로,  $n_1$ 은 2이고;  $n_3$  은 2 또는 3이며; 및  $n_5$ 은 2이다.
- [0345] 본 발명의 일 구체예로,  $Nu_1$  및  $Nu_5$ 는 독립적으로, 2'변형된 뉴클레오시드이다.
- [0346] 본 발명의 일 구체예로,  $Nu_1$ 는  $O-(CH_2)_2-OCH_3$ 이고,  $Nu_3$ 는  $O-(CH_2)_2-OCH_3$ ,  $Nu_5$   $O-(CH_2)_2-OCH_3$ 이며,  $T_1$ 는 H이고,  $T_2$ 는 H이다.
- [0347] 본 발명의 일 구체예로, miRNA에 상보적이고 22개 연결 뉴클레오시드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오티드는 표 A에서 선택되는 화학식 II를 갖으며, 상기 각 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다. 본 발명의 일 구체예로, 표 A에서 선택되는 화학식 II를 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드 SEQ ID NO: 12의 핵염기 서열을 갖는다.

표 A									
$n_1$	$n_2$	$n_3$	$n_4$	$n_5$	$Nu_1$	$Nu_3$	$Nu_5$	$T_1$	$T_2$
2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

- [0348]
- [0349] 갭머(gapmer) 모티프를 가진 변형된 올리고뉴클레오티드는 연결된 2'-디옥시 뉴클레오티드들로 구성된 내부 부위와 연결된 2'-변형된 뉴클레오시드들로 구성된 외부 부위를 가질 수 있다. 그러한 갭머(gapmer)는 miRNA 전구체의 RNase H 분해를 도출할 수 있도록 설계될 수 있다. 내부의 2'-디옥시 뉴클레오시드 부위는 RNase H를 위한 기질로 수행되며, 이는 변형된 올리고뉴클레오티드를 표적하는 miRNA 전구체의 분해를 허용되도록 한다. 본 발명의 일 구체예로, 각 외부 부위의 각 뉴클레오시드 상기 동일한 2'-변형된 뉴클레오시드이다. 본 발명의 일 구체예로, 하나의 외부 부위는 첫 번째 2'-변형된 뉴클레오시드로 균일하게 구성되고, 다른 외부 부위는 두 번째 2'-변형된 뉴클레오시드로 구성된다.
- [0350] 갭머(gapmer) 모티프를 가진 변형된 올리고뉴클레오티드는 각 뉴클레오시드에 당 변이를 가질 수 있다. 본 발명



의 일 구체예로, 내부 부위는 첫 번째 2'-변형된 뉴클레오타이드로 균일하게 구성되고, 윙(wing)들의 각각은 두 번째 2'-변형된 뉴클레오타이드로 균일하게 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 2'-플루오로 뉴클레오타이드로 균일하게 구성되고 각 외부 부위는 2'-0-메톡시에틸 뉴클레오타이드로 균일하게 구성된다.

[0351] 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 각 외부 부위는 연결된 2'-0-메톡시에틸 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 각 외부 부위는 연결된 2'-0-메틸 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 각 외부 부위는 2'-플루오로 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 각 외부 부위는 연결된 이환성 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0352] 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 어느 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 2'-0-메톡시에틸 뉴클레오타이드이고 다른 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 다른 2'-변이다. 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 어느 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 2'-0-메톡시에틸 뉴클레오타이드이고 다른 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 2'-0-메틸 뉴클레오타이드이다. 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 어느 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 2'-0-메톡시에틸 뉴클레오타이드이고 다른 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 뉴클레오타이드이다. 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 어느 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 2'-0-메틸 뉴클레오타이드이고 다른 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 뉴클레오타이드이다. 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 어느 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 2'-0-메톡시에틸 뉴클레오타이드이고 다른 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 이환성 뉴클레오타이드이다. 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 어느 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 2'-0-메틸 뉴클레오타이드이고 다른 외부 부위의 각 뉴클레오타이드는 이환성 뉴클레오타이드이다.

[0353] 본 발명의 일 구체예로, 하나의 외부 부위 중 하나인 뉴클레오타이드는 두 개 또는 그 이상의 당 변이로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 각 외부 부위의 뉴클레오타이드는 두 개 또는 그 이상의 당 변이로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위의 적어도 하나인 뉴클레오타이드는 2'-0-메톡시에틸 당이고 동일 외부 부위의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 당이다. 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 2'-0-메톡시에틸 당이고 동일 외부 부위의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 이환성 당 일부로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위의 적어도 하나인 뉴클레오타이드는 2'-0-메틸 당이고 동일 외부 부위의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 이환성 당 일부로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 2'-0-메틸 당이고 동일 외부 부위의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 당이다. 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 당이고 동일 외부 부위의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 이환성 당 일부로 구성된다.

[0354] 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 각 외부 부위는 상기 동일수로 연결된 뉴클레오타이드이다. 본 발명의 일 구체예로, 갭머(gapmer)의 어느 외부 부위는 다른 외부 부위의 연결 뉴클레오타이드와 다른 많은 연결 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0355] 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위(external region)는 독립적으로 1 내지 6개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위는 1개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위는 2개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위는 3개의 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0356] 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위는 4개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위는 5개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 외부 부위는 6개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 17 내지 28개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 17 내지 21개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 17개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 18개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 19개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 20개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 21개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 22개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 23개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 24개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 25개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 26개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 27개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다. 본 발명의 일 구체예로, 내부 부위는 28개의 연결 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0357] 어떤 정량분석

- [0358] 변형된 올리고뉴클레오티드의 투여에 따르는 miRNA의 안티센스 억제 효과는 본 발명의 기술분야에서 잘 알려진 다양한 방법으로 평가될 수 있다. 본 발명의 일 구체예로, 이러한 방법은 생체내 또는 실험관 내의 세포 또는 조직 내에서 miRNA 수치의 정량을 평가하는데 사용된다. 본 발명의 일 구체예로, miRNA 수치상의 변화는 마이크로어레이(microarray) 분석으로 측정된다. 본 발명의 일 구체예로, miRNA 수치상의 변화는 TaqMan® MicroRNA Assay(생체시스템에 적용된)와 같은 상업적으로 이용가능한 여러 PCR 분석들 중 어느 하나로 측정될 수 있다. 본 발명의 일 구체예로, miRNA의 안티센스 억제제는 miRNA의 표적의 mRNA 및/또는 단백질 수치를 측정하는 것으로 평가된다. miRNA의 안티센스 억제제는 일반적으로 miRNA의 표적의 mRNA 및/또는 단백질 수치의 증가를 산출해낸다.
- [0359]
- [0360] **어떤 실험적 모델**
- [0361] 본 발명의 일 구체예로, 본 발명에서 제공하는 방법은 실험적 모델로 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오티드를 사용 및/또는 테스트하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구체예로, 실험적 모델은 섬유증 치료를 위한 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오티드의 효과를 평가하는데 이용된다. 본 발명의 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자는 본 발명의 의약제제를 평가하기 위하여 그러한 실험적 모델을 위한 프로토콜을 선택하고 변형할 수 있다.
- [0362] 변형된 올리고뉴클레오티드는 배양된 세포 내에서 첫 번째로 테스트된다. 적절한 세포타입은 생체 내에서 바람직한 변형된 올리고뉴클레오티드의 전달을 위한 세포타입과 관련된 것들을 포함한다. 예를 들어, 섬유증 치료를 위한 변형된 올리고뉴클레오티드의 연구에 사용되는 적절한 세포타입은 섬유모세포, 심근세포, 성상세포를 포함한다.
- [0363] 본 발명의 일 구체예로, 변형된 올리고뉴클레오티드가 miRNA 활성을 억제하는 정도는 배양된 세포 내에서 평가된다. 본 발명의 일 구체예로, miRNA의 활성 억제는 miRNA의 수치를 측정하는 것으로 평가될 수 있다. 대안적으로, 예견되거나 입증된 miRNA 표적의 수치는 측정될 수 있다. 활성의 억제는 miRNA 표적의 단백질 및/또는 mRNA 내에서 증가한다. 더 나아가, 본 발명의 일 구체예로, 어떤 표현형 결과는 측정될 있다. 예를 들어, 적절한 표현형 결과는 세포증식의 억제, 세포사멸의 유도 및/또는 세포자살의 유도를 포함한다.
- [0364] 활성을 효과적으로 억제하는 변형된 올리고뉴클레오티드의 실험관내 확인이 있는 후, 더 나아가 변형된 올리고뉴클레오티드는 생체내 실험 모델로 테스트된다.
- [0365] miR-122에 상보적인 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성되는 의약제제를 포함하는, 섬유증 치료를 위한 의약제제의 테스트를 위한 적절한 실험적 모델은 하기에서 설명하는 과부하압-유도 비대 모델(pressure overload-induced hypertrophy model)을 포함한다.
- [0366] 섬유증 치료용인 의약제제의 테스트를 위한 부가적인 실험적 모델은 MCD(methionine choline deficient) 먹이 모델(see, for example, Yamaguchi et al., Hepatology, 2008, 47, 625-635)이 있고, 이에 제한되는 것은 아니다. db/db 쥐는 자발적으로 비만, 당뇨, 및 지방간이 생겼다. 그러한 쥐에 MCD 먹이를 먹이는 것은 비알콜성 지방간(NASH) 및 간 섬유증을 4 내지 8 주 내에 발병하도록 유도시킨다. miRNA에 상보적인 핵염기를 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드는 간 섬유증에 효과를 주기 위하여 상기 모델에 테스트한다.
- [0367] 하기의 실시예들은 본 발명의 어떤 구체예들을 좀 더 충분히 설명하기 위하여 제시된다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명의 넓은 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.
- [0368] **실시예**
- [0369] **실시예 1: 심장 질환에서 miR-21에 대한 역할**
- [0370] 심부전의 유전자 이식 쥐 모델에서 마이크로어레이 분석( $\beta$ 1-아드레날린 작용 수용체(adrenergic receptor)의 심장에 제한된(heart-restricted) 과다 발현 (Engelhardt et al., 1999))은 질병의 심각성이 증가하는 심장 마이크로RNA 발현 특성의 점진적 역-조절(de-regulation)을 보여준다(도 1a). miR-21 발현이 정상 심근에서 약하게 이루어진 반면, 이 마이크로RNA는 부전성 심장에서 가장 강하게 조절된 마이크로RNA 중에 있었다. 사실, 말기 심부전이 있는 쥐에서, miR-21은 단일의 가장 강한 상향조절 마이크로RNA였다(도 1a). 정량적 노던 블롯 분석은 쥐에서 miR-21의 상향 조절을 확인하였고 또한 인간의 심부전에서 주목할 상향 조절을 보여주었다(도 1b, c). 노던 블로팅으로 평가된 바와 같이 miR-21 전구체의 증가된 발현은 전사 메커니즘을 암시하였다. 따라서 인

간의 miR-21 프로모터를 더 상세하게 연구하였다. miR-21 프로모터 영역을 확인하였고 몇몇 종들에서 보존된다 (도 4 a).

[0371] 인간의 miR-21 발현에 관한 연구들 (도 4 a-c)은 전사조절 2 개의 전사인자, 칼슘/cAMP 반응 요소 단백질(CREB, Calcium/cAMP response element protein) 및 혈청 반응 인자(SRF, serum response factor)에 의하여 그 전사조절을 확인하였는데, 이는 전형적으로 심장 스트레스 반응 중에 활성화된다. miR-21 프로모터에서 CREB의 제거 및 SRF 결합 장소의 변이(mutation)는 혈청 자극에 대응한 두드러진 감소된 miR-21 발현을 초래하였는데, miR-21 조절에서 이들 두 개의 전사인자를 위한 주요한 역할을 나타낸다(도 4c). 심장 형태학 및 기능에서 miR-21의 본질적 역할은 편향 스크린에서 모르폴리노(morpholino)-기반의 접근 방법에 의하여 제브라피쉬(zebrafish)에서 몇몇의 편재하여 발현된 마이크로RNA를 억제(knock down)한다는 것을 발견하였다. miR-21의 녹-다운(knock down)은 심장 구조 및 기능의 획기적 장애를 초래하였다(도 5). 95% 이상의 주입 동물들은 많은 양의 심낭 삼출(심장 주위의 유출)을 보여주었고(도 5a, inset 및 b) 비디오 현미경에 의하여 결정될 바와 같이 심실 기능의 손상을 보여주었다(도 5c).

[0372] 포유류 심장에서 miR-21의 이러한 본질적 기능들을 더 상세하게 연구하기 위하여, 본 발명자들은 고립된 심근세포 내의 miR-21 발현을 모듈레이션(modulation)하였다. 본 발명자들은 안티센스(antisense) miR-21-저해제뿐만 아니라 합성 miR-21-전구체를 세포 감염시켰는데, 통상적으로 > 95% 형질전환 효율의 올리고뉴클레오티드 전달(delivery)을 달성한다(도 6a). miR-21의 과다 발현은 성숙한 miR-21의 강건한 증강으로 이끄는 반면에, miR-21의 저해는 노던 블롯 분석에 의하여 결정된 바와 같이 내생의 miR-21 발현을 완전히 억제하였다(도 6b). 그러나, 심근세포에서 miR-21 레벨의 증강/억제 모두 휴지 조건(resting condition) 또는 심근세포 비대 조건하에서 1차 쥐의 심근세포의 형태, 크기 또는 수에 중대한 영향을 주지 않았다(도 1d). 심근세포에 특유한 miR-21 유전자 이식 쥐는 와일드 타입의 한배 새끼에 관하여 25배 과다 발현된 경우에 좌심실 심근의 손상되지 않은 어떠한 현시적 심장 표현형 및 간질 섬유증의 부재도 보여주지 않았다(도 1e, 아래). 부전성 심장에서 현저하게 증가된 miR-21 발현과 대조적으로, 이들 데이터는 고립된 심근세포 및 심근세포에 특유한 miR-21 유전자 이식 쥐 모델에서 miR-21 발현 레벨을 조절하는 것이 제브라피쉬에서 관찰된 효과에 의하여 나타난 바와 같이, 심장 내에서 miR-21의 중요한 기능 및 부전성 심장에서 현저하게 증가한 miR-21 발현을 보장하지 못한다는 것을 보여준다. 따라서 본 발명자들은 다음에 비-심근세포 형, 예를 들면, 심장 섬유모세포에서 miR-21의 잠재적 역할을 탐구하였다. 원위치(in situ) 혼성화를 이용하여, 정상 심근에서 약한 miR-21 신호를 검출한 반면에, 심부전의 심근에서는 혼성화 신호가 매우 증강되었다. 고배율 확대에서, 혼성화 신호는 주로 작은 간질 세포, 가정하건데, 심장 섬유모세포에 한정되었다 예비-플레이팅(pre-plating) 과정을 이용하여, 본 발명자들은 신생아 쥐의 심장을 심근세포 및 섬유모세포 조각으로 분류하였다. 실제로, 본 발명자들은 주로 심장 섬유모세포에서 내생의 miR-21 발현을 검출하였다(도 1f).

[0373] 실시예 2: miR-21은 심장 섬유모세포 ERK-신호를 활성화한다

[0374] miR-21 발현은 다양한 인간의 암에서 선택적으로 증가하고(Lu et al., 2005; Iorio et al., 2005) 다양한 세포에서 다양한 메커니즘에 의하여 종양 성장 및 확산에 기여한다는 것을 볼 수 있다. miR-21은 세포 형에 특유한 방식으로 특별한 mRNA를 표적으로 삼는 것으로 보이기 때문에, 본 발명자들은 잠재적으로 심장에 특유한 miR-21 표적을 조사하기로 결정하였다. 바이오인포매틱(bioinformatic) 접근 방식을 사용하여, 본 발명자들은 3' UTR-포함 시드 서열을 갖는 잠재적 miR-21 표적을 찾기 위하여 몇 개의 마이크로RNA를 검사하였고 측면 뉴클레오티드(flanking nucleotide)를 매칭하고 이러한 분석을 보고된 심장 발현을 가진 후보자들에 집중 적용하였다. 아래 표 1에 요약되어 있다.

표 1

[0375]

유전자	유전자 이름	심장 발현	보존 종의 수	예상 표적	예상 표적	miR-21에 대한 시드 매치
심벌		(ID Reference)				
			(miRBase)	(miRBase)	(PicTar)	(Target Scan)
<i>Spry1</i>	스프라우티 homolog 1	15306693	7	예	예	8mer

<i>Tgfb1</i>	transforming growth factor, beta induced	10913330	7	예	예	8mer
<i>Krit1</i>	KRIT1, ankyrin repeat containing	16455310	7	예	예	7mer
<i>Pitx2</i>	paired-like homeodomain 전사 인자 2	16836994	7	예	예	7mer
<i>Fas1</i>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	16698421	7	예	예	7mer
<i>Nfib</i>	nuclear factor I/B	9056636	7	예	아니오	7mer
<i>LnX1</i>	ligand of numb-protein X1	17118964	7	예	아니오	7mer
<i>Rtn4</i>	reticulon 4	16202479	8	예	아니오	7mer

[0376] 이론적 miR-21 표적을 찾는 검사에 의하여 22개의 알려진 잠재적 표적 유전자가 드러나는데, 이 중 8개는 심장 조직 내에서 발현된 것으로 앞에서 보여 주었다. 3개의 서로 다른 표적 예측 수단들의 조합으로 Spry1(스프라우티1)이 매우 적합한 후보자로 확인되었다. 스프라우티1(SPRY1), Ras/MEK/ERK-경로의 알려진 저해제 (Hanafusa et al., 2002, Casci et al., 1999)가 심장에서 높은 점수 및 매우 큰 발현 때문에 잠재적 표적으로 나타났다 (표 1). Spry1 mRNA의 3'UTR은 몇 개의 예상되는 마이크로RNA 결합 장소(결합 장소)를 포함하는데, 이 중 단지 하나만이 심장 질환 동안 매우 조절되지 않는(unregulated) 마이크로RNA에 해당한다(miR-21, 도 7 참조). Spry1 이 발현되는 세포 형을 결정하기 위하여, 발명자들은 Spry1의 대립유전자를 채택하였고, 여기에서 lacZ 유전자는 Spry1 코딩 서열의 일부를 대체한다. lacZ 발현 분석은 성장한 쥐 심장에서 우세한 염색(staining)을 보여주었다(도 2a). 더 확대하여 간질 섬유모세포에서 기원하는 Spry1 발현의 얼룩 패턴(spotted pattern)을 확인하였다(Fig 2 a, lower panel). 따라서 miR-21 및 이의 추정 표적, Spry1은 심장 섬유모세포에서 공동-발현되고, 심근세포 조각에서는 그렇지 않다.

[0377] 이러한 관찰에 따르면, 심근세포에 특유한 방법으로 miR-21 과다 발현 유전자 이식 쥐에서는 SPRY1 발현에 대한 어떠한 검출 가능한 하향조절도 발견되지 않았다. 더욱이, 심장 CREB, miR-21 발현의 전사 활성화자(transcriptional activator) (도 4)가 섬유모세포에 배타적으로 고립된다. 본 발명자들은 다음에 이러한 발견과 인간의 질병과의 연관성을 검사하였다. 실제로, 특발성 확장성 심근증(idiopathic dilated cardiomyopathy)에 기인하는 말기 심부전을 가진 개체에서 추출한 좌심실 심장 조직 분석은 증가된 miR-21 발현(도 1c) 및 SPRY1 단백질 발현의 중대한 억제 (도 2 b)를 보여주었다. 이러한 발견들은 증가된 인(phospho)- ERK/ERK 비율에 의하여 입증된 것으로, ERK-MAP키나제의 활성을 동반하였다(도 2b).

[0378] 다음에 온전한 심장 조직 성분을 흉내내기 위하여 miR-21 기능들을 간질 섬유모세포 및 심근세포의 공동-배양에서 특징지었다. 본 발명자들은 합성 miR-21 전구체 분자 또는 저해제의 형질전환에 의하여 miR-21 기능을 평가하였다. 증가한 miR-21은 SPRY1 단백질 발현의 강한 억제를 초래하였고 ERK-MAP키나제 활성을 증가시켰다(도 2c). 같은 방식으로 siRNA-중재 Spry1 사일런싱(silencing)도 ERK-MAP키나제 활성을 초래하였다(도 2d). 본 발명자들은 다음에 섬유모세포 ERK-MAP키나제 신호의 miR-21-중재 발현 활성화(derepression)가 섬유모세포 생존에 충분한 영향을 주는지를 평가하였다. 심근 섬유증에서 ERK-MAP키나제 신호의 잠재적 역할에 대한 동의하에서, miR-21 레벨의 증가는 심장 섬유모세포 생존을 촉진하였고, 반면에 내생의 miR-21의 억제는 세포자멸사(apoptotic cell death)를 초래하였다(도 2e). 본 발명자들은 또한 SPRY1 발현의 siRNA-중재 사일런싱뿐만 아니라 miR-21의 과다 발현 또한 섬유모세포 성장 인자 2(FGF2)의 상청액으로의 분비를 매우 증가시키면서, 심장 섬유모세포의 분비 기능에 치명적인 SPRY1 발현의 miR-21-기반 조절을 발견하였다(도 2f). 따라서 이러한 연구는 심부전에서 신규한 신호전달 패러다임을 기술하였는데, 여기에서 심장 질환 중 miR-21의 재-발현이 SPRY1의 저해를 통하여 ERK-MAP키나제를 증가시킨다. 포유류 심장에서, 이러한 메커니즘은 섬유모세포 생존을 조절하고 따라서 간질 섬유증 및 심장 리모델링(remodeling)의 양을 결정적으로 지배한다.



[0379] 실시예 3: 생체내 miR-21의료학적 침묵법

[0380] 생체 내에서 정상 세팅 및 심부전에서 miR-21의 기능을 평가하기 위하여, miR-21 활성은 miR-21에 상보적인 수정된 올리고뉴클레오티드(miR-21 antagonist)를 이용하여 억제되었다. 과부하압-유도 비대증 쥐 모델(pressure overload-induced hypertrophy mouse model)을 간의 심부전에 대한 모델로 사용하였다. 이 모델에서 횡대동맥 협착(TAC, transverse aortic constriction)을 통하여 재현성 심장 부하 응답을 얻었다. 이 모델은 보편적 발현 프로파일(Thum et al. 2007)에서 마이크로RNA와 mRNA 변화의 매칭 패턴에 기인하는 인간의 심부전과 매우 유사하다.

[0381] 심장 내 안타고미르-21의 위치를 결정하기 위하여, 경정맥 카테터를 통하여 Cy-3-표지 안타고미르-21을 정맥 주사하였다. 좌심실근을 통한 짙은 염색을 관찰하였는데(도 3a), 이는 miR-21에 상보적인 수정된 올리고뉴클레오티드가 심장 조직으로 분산된다는 것을 나타낸다. 각 뉴클레오시드에서 miR-21 길항제(antagonist)는 2' -O-메틸 슈거(sugar)를 포함하는데, 올리고뉴클레오티드의 5' -말단에서 두 개의 포스포로치오에이트 뉴클레오시드(phosphorothioate internucleoside)간 결합, 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에서 3개의 포스포로치오에이트 뉴클레오시드간 결합, 하이드록시프롤리놀 링커(linker)를 통하여 결합한 콜레스테롤이다. miR-21 길항제는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 12의 핵염기 서열을 가진다. 비투여(untreated) (모의) 또는 TAC-수술 받은(operated) 쥐를 3일 연속으로 80 mg/kg 의 양의 안타고미르-21 또는 조절 올리고뉴클레오티드로 처리하였다. 안타고미르-21 처리는 노던 블롯(도 3b) 및 실시간 PCR 분석(도 8)에서 결정된 바와 같이 3주까지 심장 miR-21 발현을 강하게 억제하였다. 이러한 처리는 모의-수술 받은(sham-operated) 쥐에서 관찰된 레벨로의 과부하압 동안에 SPRY1 및 ERK-MAP키나제 활성의 TAC-유도 하향조절을 완전히 역전시켰다(도 3c). 비처리 쥐에서 간질 섬유증(interstitial fibrosis) 및 심장 무게는 TAC 후 3주 동안 매우 증가하였지만, 안타고미르-21 처리에 의하여 매우 약화되었다 (도 3d 및 e). 실제로, 심근의 콜라겐 양은 안타고미르-21 처리에 의하여 근본적으로 정상화되었다. 더욱이, 심장 무게가 TAC 후 3주 동안에 2배로 된 경우에, 안타고미르-21 처리는 비대증을 방지했다. 모의-수술 쥐에서, 안타고미르-21 처리는 심장 무게 또는 간질 섬유증에서 중대한 변화를 초래하지 않았고, 이는 정상 심장에서의 miR-21길항작용에 대한 어떠한 식별할 수 있는 효과도 나타나지 않았고 안타고미르-21 처리에 따른 현시적 심근독성(overt cardiotoxicity)도 나타나지 않았다. TAC 수술 및 안타고미르-21 처리 후, 보편적 전사체 분석은 다양한 탈조절 유전자의 정상화를 보여주었다(도 3f). 특히, 콜라겐 1 $\alpha$ 1, 콜라겐 3  $\alpha$  1, 비글리칸, 파이브로모듈린(fibromodulin) 또는 연결(connective) 조직 성장 인자 등의 심장 섬유증 동안에 매우 상향조절된 유전자들은 각각 42%, 39%, 44%, 38% 및 37%에 의한 miR-21의 특이적 억제 후에 감소되었다(도 3f lower panel). 더 나아가 연구에서, 심장초음파 기술에 의하여 심장 기능을 조사하였다. 좌심실 말기 확장기 직경(ventricular end-diastolic diameter)은 인간의 심부전에서 자주 목격되는 바와 같이, TAC 후 3주 동안에 매우 증가했고 좌심실단축률(fractional shortening)을 손상시켰다(도 3g). 대조군과 비교하였을 때, 안타고미르-21 처리는 좌심실 팽창을 방지하였고 본질적으로 모의-수술 동물에서 관찰된 레벨로 좌심실단축률의 파라미터(parameters of fractional shortening)를 정상화하였다(도 3g). 이소프로테레놀-유발 심장 질환 모델에서 안타고미르-21 처리로 유사한 결과를 얻었다. 부가적 실험을 수행하였는데, 여기에서 쥐를 안타고미르-21 처리하기 전 3주 동안 좌심실의 과부하압을 받도록 하였다. 이 기간 동안에 동물들은 심각한 좌심실 비대증, 섬유증 및 손상된 심장 기능을 보여주었다. 이 3주 기간이 지난 후, 쥐들을 안타고미르-21로 처리하였고 또 다른 3주 동안 관찰하였다. 대조군으로 처리된 동물들이 간질 섬유증 및 심장 비대증뿐만 아니라 좌심실 기능의 점진적 손상을 보여준 반면에, 안카고미르-21 처리된 동물들은 심장 비대증 및 섬유증의 퇴행뿐만 아니라 심장 기능의 손상의 의미있는 경감을 보여주었다.

[0382] 이들 데이터는 심장에서 섬유모세포-유래 miR-21 및 SPRY1에 대한 결정적인 역할을 보여준다. 심장 섬유모세포에서 miR-21의 비정상 발현은 SPRY1단백질 발현을 저해하고, ERK-MAP 키나제 활성의 증가를 초래한다. 결국, 이는 심장 섬유모세포 생존을 강화시키고 따라서 심부전의 특징인 간질 섬유증 및 심장 리모델링을 강화시킨다. 이 모델(도 3h에 요약됨)에 따르면 심근 질환에서 심장 섬유모세포 활성이 중요한 역할을 맡는다. 심장 질환의 쥐 모델에서 miR-21를 상쇄(antagonizing)하는 것은 구조적 및 기능 저하를 방지하였다. 따라서, 본 발명은 miR-21에 상보적인 수정된 올리고뉴클레오티드를 투여하는 단계를 포함하는 섬유증 치료를 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 miR-21에 상보적인 수정된 올리고뉴클레오티드를 투여하는 단계를 포함하는 심장 질환과 관련된 섬유증 치료를 위한 방법을 더 제공한다.

[0383]

[0384] **실시예 4: 세포밖신호-조절 키나제 MAPK 경로의 miR-21 조절**

[0385] 정상 세포의 암 세포로의 악성 변형은 제어되지 않는 세포 분열, 예정 세포사(apoptosis), 침투 및 혈관신생(angiogenesis)과 같은 몇 가지의 종양원성(oncogenic) 특성의 획득을 필요로 한다. 유전자 돌연변이는 종종 c-RAF-1, MEK-1, ERK 1/2, p38 및 JNK 등을 포함하는 미토겐 활성화 단백질(MAP, mitogen activated protein) 키나제 캐스캐이드와 같은 일반적인 하향신호 변환 경로의 항시적 활성화(constitutive activation)을 초래한다. 미토겐-활성화 단백질 키나제(MAPK, mitogen-activated protein kinase) 캐스캐이드는 정상 세포 분열, 생존 및 분화의 조절에 포함된 주요한 신호 경로이다. MAPK캐스캐이드의 비정상 조절(aberrant 조절)은 암 및 기타 인간의 질병을 초래한다. 특히, 세포 밖 신호-조절 키나제(ERK, signal-regulated kinase) MAPK 경로는 암의 처치를 위한 약리학적 저해제의 개발을 이끄는 강력한 연구 주제였다. 정상 세포에서는, 키나제 ERK 1/2의 활성화는 Ras의 활성을 통하여 EGF-수용체 및 혈소판-유기 성장 인자 수용체(PDGFR, platelet-derived growth factor receptor)등의 수용체 티로신 키나제에 의하여 조절되고, 따라서 RAF-1/MEK-1/ERK 1/2 캐스캐이드를 활성화시킨다는 것이 확립되어 있다. 이러한 신호 전달 경로가 많은 인간의 암에서 과활성(hyperactivated)되기 때문에, 수용체 티로신 키나제, Ras, c-RAF-1 및 MEK-1의 저해제를 모두 개발되어 왔고 개발의 다양한 단계에 있다. 따라서 암의 처치는 RAF-1/MEK-1/P-ERK 1/2 경로의 저해제의 효과적인 양을 조절함으로써 가능할 것이다.

[0386] 스프라우티(Sprouty)(SPRY)는 Ras/MAP 키나제 경로와 같은 수용기 티로신 키나제 경로의 내생 조절자(endogenous regulator)인 세포 내 단백질의 한 종류에 속한다. 포유류 종은 스프라우티의 4개의 이소폼(isoform)을 발현하는데, 성장 인자-유기 세포 분화, 이동, 및 증식의 저해제로 작용한다. 발명자들은 스프라우티-1이 종양 형성의 조절(modulation)을 초래할 수 있는 ERK 인산화(ERK phosphorylation)를 저해한다는 것을 확인하였다. 발명자들은 다양한 인간의 암에서 miR-21의 상향조절(upregulation)이 스프라우티-1을 억제하여 ERK를 활성화시켜 향상된 종양 형성 및 진행을 초래한다는 것을 제시한다. 따라서miR-21의 길항작용(antagonism)(예를 들면, 안타고미르-21에 의한 것)은 종양 형성 및/또는 진행을 방지하고/거나 약화시킬 수 있다.

[0387]  
[0388] **실시예 5: 실험적 절차**

[0389] 발현 분석 (마이크로RNA 어레이, 아피메트릭스(Affymetrix) 유전자칩 분석, 노던 블로팅, 실시간 PCR)

[0390] 쥐의 좌심실근에서 추출한 RNA준비물로부터 마이크로RNA(Castoldi et al., 2007)와 전체적 mRNA 발현 프로파일을 생성하였다. 탈조절 마이크로RNA(deregulated microRNA)를 노던 블로팅 및 스템-루프 특이(stem-loop specific) 실시간 PCR에 의하여 확인하였다. 올리고뉴클레오티드 어레이 및 표지된 마이크로RNA 모두에 대하여, 이전에 (Thum et al., 2007)에 기술된 바와 같이 바이로컨덕터(Bioconductor) 프로젝트(www.bioconductor.org)에서 온 R 패키지를 사용하여 데이터 분석을 수행하였다.

[0391] **miR-21 프로모터 분석**

[0392] 분리 후 24시간이 지난 후, 세포를 확립된 리포좀 세포 감염 방법(Lipofectamine, Invitrogen, USA)을 이용하여 1 ug의 리포터 플라스미드로 세포 감염시켰다. 12시간 후 배지(medium)를 무-FCS 배지로 변경하였다. 24시간 후 한 그룹을 FCS없이 배양한 반면에 다른 그룹에서는 세포를 8시간 동안 5% FCS로 처리하였다. 제작자의 추천에 따라 이중 발광효소 키트(Dual Luciferase Kit) (Promega, 독일)를 사용하여 세포 용해물에서 발광효소(luciferase)활성을 측정하였다.

[0393] **심근세포 분리,배양 및 형질전환 실험**

[0394] 이전에 (Merkle et al., 2007)에 기술된 바와 같이 신생아 심근세포(신생아 심근세포)를 분리하였다. 악시오 비전 엘이(AxioVision LE) 4.1 소프트웨어 패키지(Carl Zeiss Vision GmbH, Jena, 독일)를 사용하여 디지털 방식으로 기록된 영상으로부터 심근세포의 크기를 결정하였다. 심근세포 배양을 miR-21 의 전구체 및 억제제(Ambion, USA) 또는 스프라우티1에 대한siRNA(Promega, 독일)로 세포 감염시켰다. 적절한 배양 조건을 이용하여 발명자들은 또한 심장 섬유모세포 및 섬유모세포/심근세포 공동-배양을 가지고 실험을 수행하였다.

[0395]

- [0396] **제브라피쉬 유지, 모르폴리노 안티센스 올리고뉴클레오티드의 미세주입(microinjection) 및 심장 기능 결정**
- [0397] 표준 모르폴리노(morpholino)-변형 올리고뉴클레오티드(올리고뉴클레오티드)를 성숙한 dre-miR-21(MO-1 = 5'-GCCAACACCAGTCTGATAAGCTA-3')로 보내졌고 또한 miR-21처리 및 기능(MO-2 = 5'-TGTAACGCCAACACCAGTCTGATAAGCTAT -3')에서의 다중 단계들을 저해하기 위하여 다중-블로킹 모르폴리노-조작 올리고뉴클레오티드를 사용하였다. 음성 대조군으로 동일한 농도에서 표준 조절 올리고뉴클레오티드(MO-control) (GENETOOLS, LLC)를 주입하였다. 발달과정에서 단일-세포 단계 와일드-타입 제브라피쉬 배아(one-cell stage wild-type zebrafish embryo) 및 전반적 형태 및 특히 심장 기능을 수개의 시점에서 평가하였다. 사진 및 동영상 기록하였고 (Rottbauer et al., 2005)에 기술된 바와 같이 48, 72, 80, 96 및 120 수정 후 시간(hpf, hours post fertilization)에 좌심실단축률(ventricular fractional shortening)을 측정하였다.
- [0398] **심장 비대 및 부전에 대한 쥐 모델**
- [0399] 일반적인 방법으로 경대동맥 협착(transaortic constriction)을 수행하였다. 이전에 베타1-아드레날린 수용체 유전자 이식 쥐(line TG4)에 대하여 상세하게 기술하였다(Engelhardt et al., 1999).
- [0400] **인간의 심장 샘플**
- [0401] 본 발명자들은 확장성 심근질환에 기인하는 말기 심부전을 이유로 심장 이식을 받은 개체에서 유래한 심장 조직 및 비교를 위한 건강한 성인의 심장 샘플을 검사하였다. 이식하자마자, 좌심실에서 조직 조각들을 제거하였고, 절개된 조직을 액체 질소에서 급속 냉각(shockfroze)시켰고 분석 때까지 -80 ° C에 저장하였다.
- [0402] **마이크로RNA표적 예측 방법**
- [0403] 잠재적 마이크로RNA표적을 식별하기 위하여 마이크로 RNA 데이터베이스 및 예측 도구 miRBase (<http://마이크로RNA.sanger.ac.uk/>), PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu/>) 및 타깃스캔(TargetScan) (<http://www.targetscan.org/index.html>)을 사용하였다.
- [0404] **웨스턴 블로팅 및 심장 섬유증 분석**
- [0405] (Buitrago et al., 2005)에 기술된 바와 같이 외식 심장(explanted heart) 또는 공동-배양에서 온 단백질 용해액(protein lysate)을 준비했고 여기에 설명된 바와 같이 Spry1, ERK1/2, phosphoERK1/2 및 G베타의 발현을 검출하였다. 형태학적 분석을 위하여, 섬유증 심장을 4% 포르말린에 고정하였고 파라핀에 박아 넣었다. LV에서 온 조직 부(5 um)를 헤마탁실린 및 에오신 또는 피크로시리우스를 가지고 적색으로 염색하였다. 원형 편파 조사를 제공하기 위하여 필터를 구비한 니콘 ECLIPSE 50i 현미경을 사용하여 피크로시리우스 적색 부분을 조사하였다. 20X 대물 렌즈를 가지고 조직 영상을 획득하였고, 고급 디지털 카메라(DS-5Mc, Nikon) 상에 기록하였고, 시그마스캔(SigmaScan) Pro 5.0 이미지 분석 소프트웨어 (SPSS Inc., 미국)를 사용하여 분석하였다. 각 영상의 면적 퍼센트(픽셀로 표현됨.)로 콜라겐 함량을 계산하였다.
- [0406]
- [0407]  **$\alpha$ MHC-miR-21 유전자 이식 쥐**
- [0408] 쥐의  $\alpha$ -마이오신 중쇄( $\alpha$ MHC) 프로모터의 제어하에서 선천성 전구체 시퀀스의 154 bp 업스트림 및 136 bp다운 스트림을 곁에 둔, 성숙한 miR-21시퀀스를 포함하는 형질전환 구조가 있는 FVB/N 쥐에서 온 수정 난모세포의 전 핵 주입에 의하여 유전자 이식 쥐의 이상발현 miR-21을 생성하였다.
- [0409] **Spry-1acZ 쥐에서 추출한 심근의 X-갈(gal)염색**
- [0410] Spry1-lacZ +/- 쥐로부터 심장을 수집하고2%의 포름알데히드와 0.05%의 글루타알데히드를 포함하는 PBS에 2시간 동안 고정시켰다. 그 후, PBS내 0.01% 데속시콜리산 나트륨(Na-desoxycholate), 0.02% 노니데트(Nonidet) P-40, 2mM MgCl2 및 2mM EGTA에서 30분 동안에 4회 세척하였다.  $\beta$ -갈락토시다제의 활성을 검출하기 위하여 37 ° C

에서 0.5 mg/ml X-갈(gal), 10 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 및 10 mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>을 포함하는 세정액에서 심장을 배양하였다. 호울 마운트 분석(whole mount analysis)을 위하여, 30%의 글리세롤로 심장을 이동시키고 니콘 디지털 카메라(Nikon Digital Camera) DXM1200F 및 ACT-1 소프트웨어를 사용하여 디지털 영상을 찍었다. 조직학적 분석을 위하여 심장을 이소프로판올에서 탈수시키고, 크실렌에서 세척하고 파라핀으로 이동시켰다. 표준 프로토콜을 사용하여 10 um 파라핀 절편을 생성하여 기록하였다.

[0411] **변형 올리고뉴클레오티드의 주입 및 검출**

[0412] TAC 과정 이전에 수컷 C57/B16 쥐(10-12 주 연령) 내부로 경정맥 카테터(jugular vein catheter)를 영구 삽입하였다. 24시간의 수정된 올리고뉴클레오티드의 포스트-TAC 80mg/kg/d을 경정맥 카테터를 통하여 3일 동안 매일 주입하였다. 효과적 전달을 위한 양성 대조군으로 (Cy3-표지 수정된 올리고뉴클레오티드)를 카테터 내부로 한번 80 mg/kg 주입하여 3시간 후에 심장을 제거하여 고정하였고, 형광 현미경에 의하여 Cy3 염색을 관찰하였다.

[0413]

[0414] **섬유모세포 세포사멸 및 FGF2생산**

[0415] miR-21 전구체, 저해제 또는 개별 대조군으로 처리한 후, 아넥신 V-양성 섬유모세포를 FACS 분석(Annexin-V-FLUOS kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 독일)에 의하여 측정하였다. miR-21 조절(modulated) 심장 섬유모세포의 상등액에서 FGF2를 정량화하기 위하여 효소-결합면역흡착제 분석(ELISA)을 수행하였다. 제작자의 명세서에 따라 퀀티카인(Quantikine) FGF 베이직 면역분석 키트(R&D Systems, Minneapolis, USA)를 사용하여 FGF2 분석을 수행하였다.

[0416] **통계적 분석**

[0417] 평균 데이터는 평균 + SEM으로 제시되었다. 프리즘(Prism) 소프트웨어(GraphPad, San Diego, CA) 또는 스탯뷰(StatView)(SAS Institute Inc., Cary, USA) 패키지를 사용하여 통계적 분석을 수행하였다. 바람직하게 ANOVA 다음에 본페로니(Bonferroni)의 시험(test) 및 학생들의 t-test 를 차례로 사용하였다. P<0.05이고 별표로 나타낼 때 차이가 매우 중대한 것으로 고려하였다. \* 는 p < 0.05, \*\* 는 p < 0.01, \*\*\* 는 p < 0.005임을 각각 나타낸다.

[0418] **RNA 분리, 실시간 RT-PCR 및 노던 블로팅**

[0419] 냉동 조직이나 세포 배양에서 전체 RNA를 추출하기 위하여, 제작자의 지시에 따라 알엔이지 미니 키트(RNeasy Mini Kit)(Qiagen, Hilden, 독일)을 사용하였다. MiRNA는 TRIZOL(Invitrogen, Karlsruhe, 독일) 또는 miRNA 분리 키트(mirVana™, Ambion, USA)을 이용하여 분리하였다. 분리된 RNA의 온전성은(Thum 및 Borlak, 2004)에 기술된 것처럼 변성 아가로제 겔 전기영동 또는 모세혈관 전기영동(Bioanalyzer 2100; Agilent)으로 입증하였다. 실시간 PCR을 위하여 본 발명자들은 iCycler iQ™ 실시간 PCR 검출 시스템(BioRad, 독일)을 채택하였다.

[0420] 본 발명자들은 표적-특유의 줄기 루프 구조 및 역전사 프라이머를 사용하였고, 역전사 후에는 miR-21 발현을 정량화하기 위하여 특정의 TaqMan 혼성화 프로브를 사용하였다(TaqMan miR-21 마이크로RNA Assay, Applied Biosystems, Foster City, USA). 대조군으로 작은 RNA 분자 U6B 작은 핵(RNU6B)을 증폭하였다(TaqMan 마이크로RNA Assay Controls, Applied Biosystems, Foster City, USA). 모든miRNA 샘플 들은 동일한 전체RNA 농도를 포함하는 분리된 물질에서 유도하였다. 노던 블롯 분석을 위하여, 3 µg의 전체 RNA를 적당한 DNA 표지를 붙이고15% 아크릴라마이드(acrylamide), 6 M 우레아, 및 TBE 겔 상으로 적재하였다. 아래의 전기영동에서, 반건조 이동을 이용하여 나일론 막(Qiabrane Nylon, Qiagen)으로 RNA를 이동하였다. 다음에 혼성화 버퍼(ULTRAhyb-Oligo 혼성화 버퍼, Ambion, USA)에서 65° C에서 1시간 동안 예비-혼성화시켰다. 이전에T4 키나제(Exiqon) 및 32P-ATP로 표지된LNA 올리고뉴클레오티드(miRCURY LNA 어레이 검출 프로브; Exiqon)을 버퍼에 추가하였고 하룻 밤 동안 42° C에서 막을 혼성화하였다. 결과적으로, 블롯은 (0.2× SSC에서) 실내 온도에서 3분 동안 세 번 세척되었고, 다음 한 번은 42° C 에서 15동안 세척되었다. 다음에 막은 형광 이미징 장치(phosphoimager)에 노출시켰다.



[0421] **마이크로RNA 발현 analyses**

[0422] 마이크로어레이 마이크로RNA 발현 분석을 위하여 발명자들은 플래시페이지 분별 시스템(flashPAGE Fractionator system) (Ambion, USA)을 사용하여 마이크로RNA를 개별적으로 정제하였다. 8 µg의 총 RNA에서 획득한 마이크로RNA는 미르바나(mirVana) 마이크로RNA 표지(Labeling) 키트(Ambion, USA)를 사용하여 제작자의 추천에 따라 dye Cy3 (Molecular Probes, Carlsbad, Calif)을 가지고 표지하였다.

[0423] 각 샘플을 개별적 어레이로 혼성화하였다. 암비온 미르바나(Ambion mirVana) 매뉴얼 (www.ambion.com/techlib/prot/) 또는 2에서 설명한 바에 따라, 마이크로RNA 마이크로어레이 혼성화, 마이크로RNA 정제 및 인리치먼트(enrichment), 표지 및 마이크로어레이 혼성화 절차를 수행하였다. 스캐널라이즈 (Scanalyze) 소프트웨어 (Eisen-Lab, Lawrence Berkeley National Lab (LBNL), Berkeley, USA)를 사용하여 데이터를 획득하였다. 대체적으로, Cy3-복합(conjugated) RNA 링커(linker) (Dharmacon, USA)로 5 µg의 총 RNA를 표지하였고 miRNA의 게놈-와이드(genome-wide) 프로파일[miChip; 어레이 상에 고정된 포착 프로브는 miRbase version 6.1에 저장되어 있는 바와 같이 (211 인간, 51 쥐) 유일한 인간의 miRNA에 해당한다]을 위한 마이크로어레이 플랫폼으로 혼성화하였다. 동일한 광전자증배관 설정을 한 액손(Axon) 스캐너(4000B, Molecular Dynamics)를 사용하여 혼성화 신호 강도를 획득하였다. 유전자 픽스(pix) 6 (Molecular Dynamics) 및 엑셀 (Excel) 소프트웨어를 사용하여 그 이상의 분석을 수행하였다. 특정의 TaqMan RT-PCR 분석과 노던 블롯 분석에 의하여 MiR-21 발현을 입증하였다.

[0424] **보편적 전사체(transcriptome) 분석**

[0425] 전사체 분석을 위하여, 2 µg의 총 RNA에서 시작하여 아피메트릭스(Affymetrix) 프로토콜 (One-Cycle cDNA synthesis Kit, Affymetrix, USA)에 따라 (모의-수술 후 n=4 대조군(control) 심장, TAC 및 플라시보 처치 후 n=4 좌심실; TAC 및 miR-21 길항제 처치 후 n=4 좌심실), 역전사, 제2 가닥 합성, 및 이중 가닥 cDNA의 클린업 (cleanup)을 수행하였다. 바이오틴-표지된 cRNA 합성은 IVT Labeling Kit (Affymetrix, USA)를 사용하여 수행하였다. 겔 전기영동법에 의하여 cRNA 농도를 결정하였고 cRNA 단편 크기의 분포를 확인하였다. 쥐 게놈 430 2.0 유전자Chip (Affymetrix, USA) 상에서의 혼성화를 위하여 15 µg의 단편 cRNA를 사용하였다. 바이오컨덕터 (Bioconductor) 프로젝트 (www.bioconductor.org)의 온 어레이 스터디 R 패키지의 데이터 분석을 사용하였다. 결과의 신호 강도는 분산안정화에 의하여 정규화하였다. 모든 데이터 집합의 품질을 검사하였고 서로 달리 발현된 유전자를 선택하기 위하여 리마(limma, 마이크로어레이 분석을 위한 선형 모델) 패키지를 사용한 통계적 분석을 수행하였다.

[0426] **심장 공동-배양 실험 및 마이크로RNA / siRNA 형질전환 절차**

[0427] 신생아 쥐에서 추출한 심근세포는 상술한 바와 같이 (Merckle et al., 2007)를 이용하여 분리되어 배양했다. 심근세포 크기에서 miR-21 조절 분석을 위하여, 주요 비-심근세포 (예를 들면, 섬유모세포) 오염을 제거하기 위한 예비-플레이트링(pre-plating) 단계를 부가함으로써 순 심근세포 배양을 사용하였다. 배양된 심근세포의 95% 이상이 악티닌에 대하여 양성으로 염색되었는데, 높은 순도의 세포 배양을 나타낸다. 스크램블(scrambled)-miR (예 비음성대조군 #2, Ambion; 50 nmol/L, 72 시간), miR-21 전구체 분자 (예비- MiR, Ambion; 50 nmol/L, 72 시간) 또는 miR-21 길항제 (항-miR, Ambion; 50 nmol/L, 72 시간) 리포솜 기반의 방법 (Lipofectamine, Invitrogen, USA; 상세하게는 6 참조)로 세포 감염시켰다. 심근세포는 심근세포 비데 현상을 줄이기 위하여 낮은 FCS (0.1 %, 조절 조건)로 또는 높은 FCS (5.0 %)로 48시간 배양하였다. 세포 크기의 결정을 위하여, 신생아 심근세포의 표면적 (세포감염 후72 시간)은 악시오비전(AxioVison) Rel 4.4 패키지(Carl Zeiss GmbH, Jena, 독일)를 사용하여 96-웰(well) 플레이트(plate) 포맷(시드 밀도(seeding density) 40.000 세포s/well)으로 계산하였다. 데이터는 평균 ±SEM으로 표현된다.

[0428] 심장 생체 내(생체내) 조건을 모방하기 위하여 본 발명자들은 상술한 프리 플레이트링(preplating) 단계를 무시하고 심근세포와 심장 섬유모세포의 공동-배양 시스템을 사용하였다. 여기에서, 본 발명자들은 스크램블-miR (50 nmol/L, 72 시간), miR-21 전구체 분자 (50 nmol/L, 72 시간) 또는 miR-21 길항제 (50 nmol/L, 72 시간)의 세포 감염 후의 Spry-1 및 Erk 활성의 발현을 상세하게 연구하였다. 개별적 실험에서 스크램블 siRNA 또는 Spry1 (3개의 서로 다른 마이크로RNA, 각각16.7 nmol/L)에 대한 특정의 siRNA 카테일을 공동-배양으로 세포 감염시켰다. 세포 감염 효과는 실시간-PCR 측정 (TaqMan 마이크로RNA Assays, Applied Biosystems) 및 노던 블로팅으로

모니터링 하였다.

[0429]

[0430] **마이크로RNA표적 예측 수단**

[0431]

인간 및 쥐의 게놈의 3' UTR 시퀀스 내의 잠재적 miR-21 결합 자리에 대한 스캔을 위하여 미란다(miRanda) 알고리즘(Griffiths-Jones et al., 2006)을 사용하였다. 결과적으로, Karlin-Altschul 정규화를 수행하였다 (miRBase Targets version 4.0; <http://마이크로RNA.sanger.ac.uk/targets/v4/>). 상세하게는, 본 발명자들은 miR염기 데이터베이스(Version 4, Sanger Institute; USA)를 사용하였고 “많은 수의 보존 중;>6”, “낮은 p-value; <0.001” 및 높은 miR염기 스코어;>15 알고리즘을 사용하여 잠재적 miR-21 표적을 정렬했다. 이 절차는 22개의 알려진 유전자들이 잠재적 miR-21 표적임을 드러내 주었다. 여기에서 8개는 GEO-발현 프로파일 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (표 1 참조)에 기반하는 심장 조직 내에서 발견되는 것으로 나타났다. 5개의 유전자는 PicTar miRNA 데이터베이스 9를 사용한 miR-21 표적으로 부가적으로 예측되었다(Krek et al., 2005) (<http://pictar.bio.nyu.edu/>). 타깃스캔(TargetScan) miRNA 표적 예측 소프트웨어 (Whitehead Institute for Biomedical Research, USA, Release 4.0; July 2007; <http://www.targetscan.org/>)를 사용하여, 본 발명자들은 2개의 표적에 대하여만 miR-21에 대한 8-mer 시드 매칭(seed match)과 보존적 자리가 있는 표적을 식별하였다. 다음에 Spry1을 더 상세하게 연구하였다.

[0432] **웨스턴 블로팅**

[0433]

의식 심장 또는 배양 섬유모세포/심근세포에서 유래한 단백질 효소분해물을 설명된 바와 같이 준비하였다 (Bitrago et al., 2005). 추출물(레인 당20-50 µg 단백질)을 샘플 로딩 버퍼와 혼합하고 감소 조건에서 10% SDS-폴리크리라마이드 겔 상에서 분리하였다. 단백질은 PVDF 막 상으로 전기전달 되었다(Immun-Blot®, Bio-Rad). 밴드는 화학발광기법(chemiluminescence assay)을 사용하여 검출하였다(ECL Plus, Amersham). 본 발명자들은 적합한 2차적 항체(Anti-mouse-HRP (세포 신호, #7076, 희석 1:10000; Anti-rabbit-HRP (세포 신호, #7074, 희석 1:10000))뿐만 아니라, 스프라우티-1(Santa Cruz, sc- 30048, 희석 1:250-1:500), Erk1/2 (세포 신호, #9102, 희석 1:1000); phospho-Erk1/2 (세포 신호, #9101, 희석 1:1000) 및 G-β (Santa Cruz Biotechnology, sc-378, 희석 1:1000) 에 대한 주요 항체를 사용하였다.

[0434] **생체내 TAC 모델 및 변형 올리고뉴클레오티드 투여**

[0435]

본 발명자들은 Charles River 실험실 (Sulzfeld, 독일)에서 온 수컷 C57BL/6 쥐 (10-12 주 연령, 25g)를 사용하였다. 횡단 대동맥 협착(TAC, transaortic constriction)은 대동맥 주위로 2회 감은7-0 봉합과 27-게이지 지침을 이용하여 생성되었다. 다음에 지침은 부드럽게 후퇴되고, 80%의 대동맥 협착을 생성하였다. 동일한 수술 중에, 경정맥 카테터(jugular vein catheter)를 표준적 외과 수술에 의하여 삽입하였다. 그 시퀀스는 안타고미르-21(안타고미르-21), 5' - oUsoCsoAoAoCoAoUoCoAoGoUoCoUoGoUoAoAoGsoCsoUsoAs-Chol-3' 이었다. 합성에 사용된 모든 뉴클레오티드는 2' -OMe- 변형 (첨자 'o')이다. 첨자 's' 는 포스포로치오에이트(Phosphorothioate) 연쇄를 나타내고; “Cy3” 은 올리고의 5' 말단에서의 Cy3 염색 레벨을 나타내고; “Chol” 은 하이드록시프롤리놀 연쇄를 통하여 연결된 콜레스테롤을 나타낸다. 치료는 TAC 이후 24시간 경과하여 시작되었고 동물들은 주입된 경정맥 카테터를 통하여 PBS 또는 miR-21 길항제 주사를 맞았다. (연속된 3일, 주사당 0.2ml내에서 신체 무게(kg) 당 80mg의 양으로PBS 또는 miR-21 길항제의 경정맥 주입. 효과적인 심장 운반 Cy-3-라벨 수정된 올리고뉴클레오티드(안타고미르-181a)에 대한 양성 대조군이 경정맥 카테터로 주입되었고 후에 심장이 제거되어, 고정되고 Cy3 얼룩이 형광 현미경에 의하여 관찰되었다.

[0436] **심장 기능적 분석**

[0437]

3주의 TAC 후에, 쥐들은 아이소플루란(isoflurane)으로 마취되었고 심장 치수와 기능이 15-MHz 펄스-파 도플러 심초음파검사(echocardiography)에 의하여 분석되었다. 다음에 심장이 제거되고, 심방 제거 후에 무게를 달고 이후의 분석에 제공되었다. 심초음파검사적 연구는 아이소플루란을 사용하여 자발적 호흡이 있는 가벼운 마취 상태에서 수행되었다. 쥐 영상을 경험하고 실험 그룹에는 차단된 두 개의 독립한 초음파 검사 장치 (ultrasonographer)로 15MHz변환기를 구비한 도시바 파워 비전 6000을 동작시켜 심초음파검사를 수행하였다. 유

두근(papillary muscles)의 레벨에서 2D 좌측-흉골주위의 단축 모습이 기록되었다. 올바른 프로브 배치는 각도 조절 및 상하방향촬영 변환기 이동 후, 좌 심실(LV, 좌심실) 공동의 등근 외형에 의하여 판단되었다. LV 말단-확장기 영역은 니스(Nice) 소프트웨어 패키지를 가지고, 면적측정이 다음에 이어지는 심장 내부 경계의 수동 추적에 의하여 계산되었다(Toshiba Medical Systems). 동시적 횡단 M-모드 추적은 LV 공동의 중간에 배치된 커서를 가지고 기록되었다. (Collins et al., 2001)에 설명된 것처럼 좌심실단축률(fractional shortening)을 계산하였다.

[0438] **심장 섬유증의 검출**

[0439] 쥐의 심장은 4% 완충 포르말린에 고정되어 파라핀 내에 포매(embed)되었다. 5 μm 피크로시리우스 레드 섹션(picrosirius red section)은 원형편파 조사를 제공하기 위한 필터를 장착한 니콘 ECLIPSE 50i 현미경을 사용하여 검사하였다(Whittaker et al., 1994). 하부 필터는 현미경의 필드 조리개 링 위에 두고, 상부 필터는 전송축이 파장판의 fast 축에 대하여 45° 로 되도록 선형 편광기 아래에 두어진 4분의 1 파장판의 조합으로 구성되었다. 이들 두 필터는 겹쳐지고, 즉 시야에 있는 배경이 가능한 한 어둡도록 정렬되었다. 조직 영상은 20X 대물렌즈로 얻어지고, 냉각 디지털 카메라(DS-5Mc, Nikon) 상에 기록되고, SigmaScan Pro 5.0 영상 분석 소프트웨어(SPSS Inc, USA)를 사용하여 분석되었다. 정확하게는, 원래의 (원형 편파된) 영상은 (영상 분석으로 제공된 자동 기능 CYMK를 사용하여) 각각 청색(cyan), 황색(yellow), 적색(magenta) 및 검은색(black) 성분으로 분해되었다.

[0440] 검은색 성분은 편파 영상에서 추출되었다. 추출 전에, 검은색 성분은 (조사로 확인된) 가장 가는 콜라겐 섬유가 아닌, 틈새공간 및 비-콜라겐 요소의 제거를 보장하기 위하여 조절된 적합한 밝기였다. 다음에 추출된 영상은 영상 소프트웨어에 의하여 제공된 자동 기능 HSV를 사용하여 색도(hue), 채도(saturation), 명도(value) (HSV) 성분으로의 최종 색 분리 과정을 따랐다. 색도 주파수의 히스토그램은 256 색상을 포함하는 8-비트 해상도의 색도 영상에서 얻어졌다. 다음의 색도 정의가 사용되었다: 적색 2-9 및 230-256, 오렌지색 10-38, 노랑색 39-51, 녹색 52-128. 색도 범위 129-229는 틈새공간과 비-복굴절성 섬유 요소로 구성된다. 색도 적색, 오렌지색, 노랑색 및 녹색 범위 내의 픽셀의 수가 결정되어 콜라겐 픽셀의 총 개수의 퍼센트로 표현되고, 따라서 영상에서의 픽셀의 총 개수의 퍼센트로 표현되었다.

[0441] **섬유모세포 세포사멸 및 FGF-2생산**

[0442] 심근세포 분리 중 프리플레이팅 단계로 획득한 심장 섬유모세포는 서브-칸플루언스(sub-confluence) 때까지 배양되었다. 세포 순도는 섬유모세포 표지 안티-렛 프로필-4-하이드록실라제 (아크리스 안티바디, AF5110-1, 테이 터는 표시되지 않음)로 착색하는 것을 토대로 >95%였다. miR-21 전구체, 저해제(저해제) 또는 각각의 제어(전술함)로 처리된 후에, 아넥신 V-양성 섬유모세포는 FACS 분석 (아넥신-VFLUOS 키트, 로체 진단 GmbH, 맨하임, 독일)에 의하여 측정되었다. 효소결합면역흡착검사(ELISA, anzyme-linked immunocorbent assay)는 miR-21 변형 심장 섬유모세포의 상등액에서 FGF-2 농축을 수량화하도록 수행되었다. FGF-2-결정은 제조사의 설명서에 따라 판티카인 FGF 베이직 면역정량법 키트(Quantikine FGF Basic Immunoassay kit) (R&D 시스템, Minneapolis, USA) 을 사용하여 수행되었다.

[0443] **참고문헌**

[0444] Ambros,V. The functions of animal microRNAs. Nature 431, 350-355 (2004).

[0445] Buitrago,M. et al. The transcriptional repressor Nabl is a specific regulator of

[0446] pathological cardiac hypertrophy. Nat Med 11, 837-844 (2005).

[0447] Care,A. et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. Nat Med 13, 613-618 (2007).

[0448] Casci,T., Vinos,J. & Freeman,M. Sprouty, an Intracellular Inhibitor of Ras Signaling. Cell 96, 655-665 (1999).

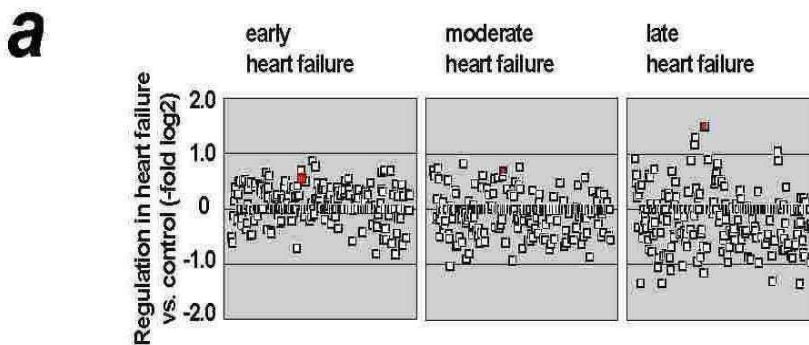
[0449] Castoldi,M. et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked

nucleic acids (LNA). RNA 12, 913-920 (2006).

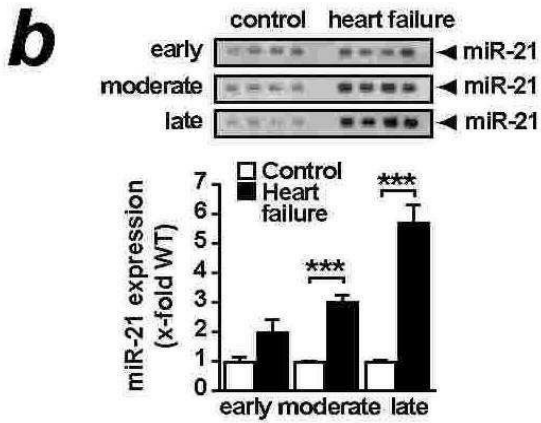
- [0450] Collins,K.A. et al. Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 280, H1954-H1962 (2001).
- [0451] Engelhardt,S., Hein,L., Wiesmann,F. & Lohse,M.J. Progressive hypertrophy and heart failure in beta 1-adrenergic receptor transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 96, 7059-7064 (1999).
- [0452] Griffiths-Jones,S., Grocock,R.J., van Dongen,S., Bateman,A. & Enright,A.J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Research 34, D140-D144 (2006).
- [0453] Hanafusa,H., Torii,S., Yasunaga,T. & Nishida,E. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. Nat Cell Biol 4, 850-858 (2002).
- [0454] Iorio,M.V. et al. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. Cancer Res 65, 7065-7070 (2005).
- [0455] Krutzfeldt J, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. Nature 438, 685-689 (2005).
- [0456] Lu,J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 435, 834-838 (2005).
- [0457] Merkle,S. et al. A Role for Caspase-1 in Heart Failure. Circ Res 100, 645-653 (2007).
- [0458] Mi,S. et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 19971-19976 (2007).
- [0459] Rottbauer,W. et al. VEGF-PLC{gamma}1 pathway controls cardiac contractility in the embryonic heart. Genes Dev. 19, 1624-1634 (2005).
- [0460] Thum,T. & Borlak,J. Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein-induced vascular injury: therapy through LOX-1 receptor antagonism? Circ Res 94, e1-13 (2004).
- [0461] Thum,T. et al. MicroRNAs in the Human Heart: A Clue to Fetal Gene Reprogramming in Heart Failure. Circulation 116, 258-267 (2007).
- [0462] Yang,B. et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. Nat Med 13, 486-491 (2007).
- [0463]

도면

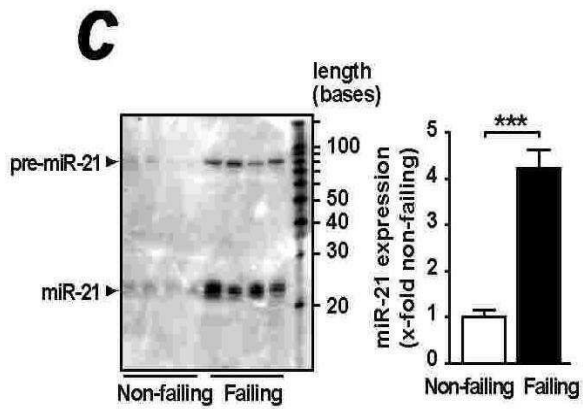
도면1a



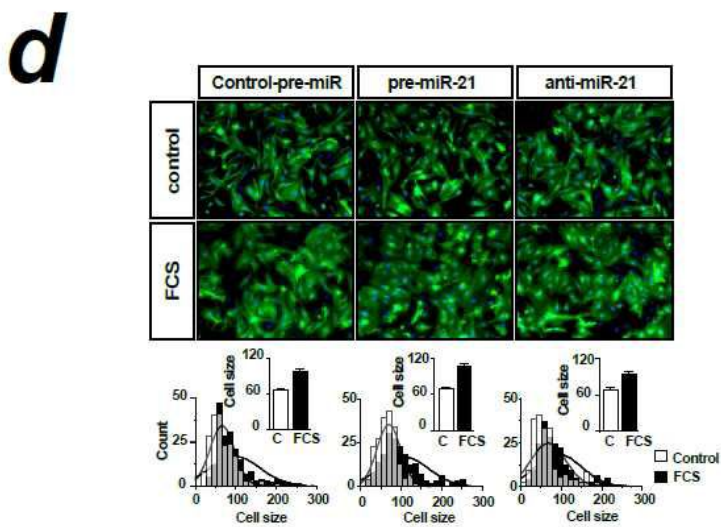
도면1b



도면1c

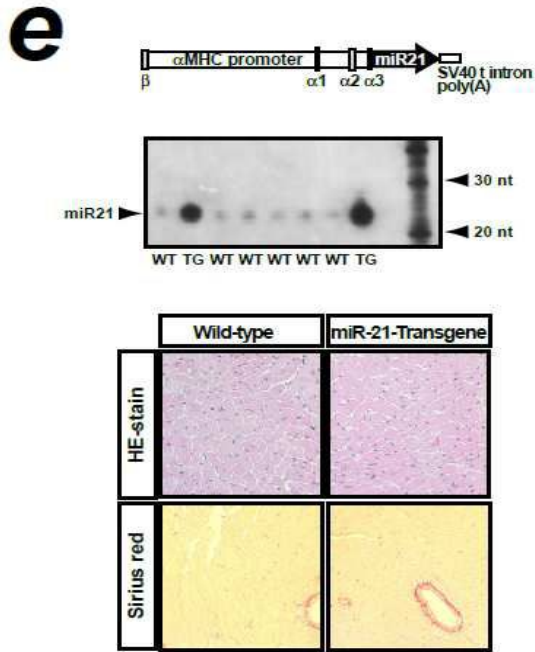


도면1d

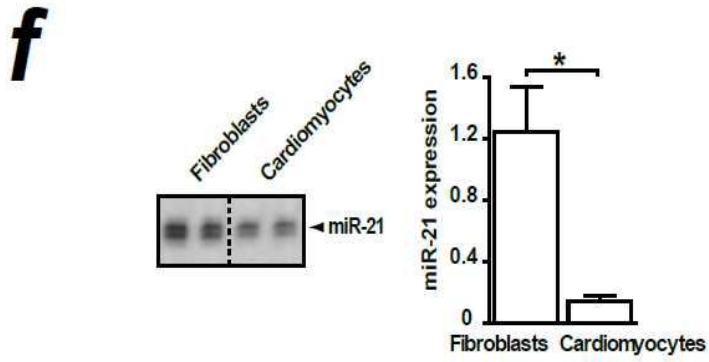




도면1e



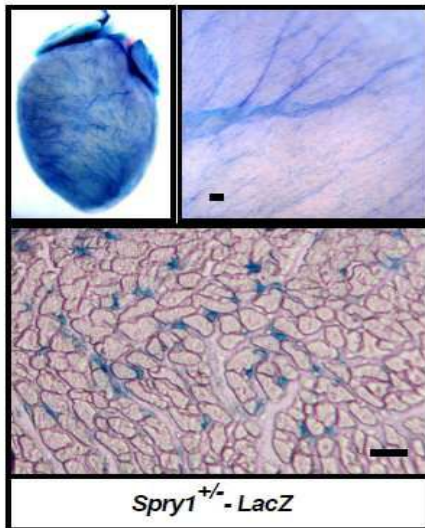
도면1f





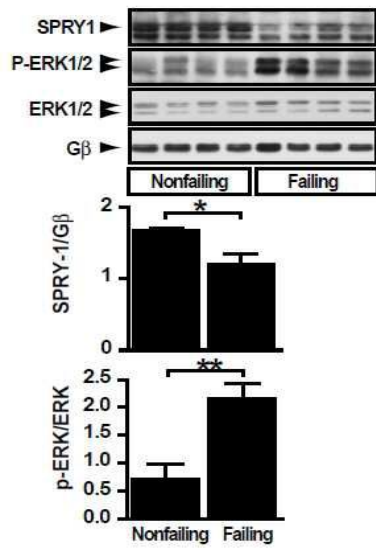
도면2a

**a**

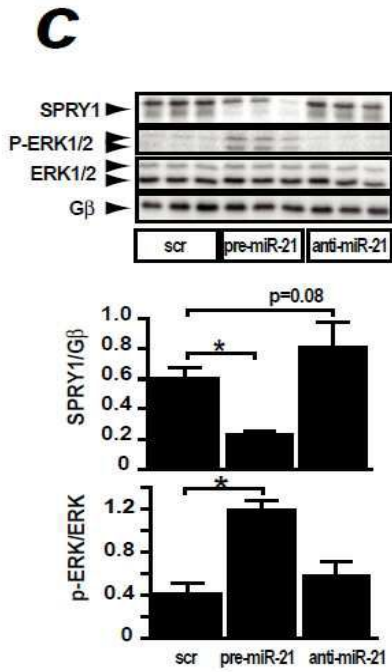


도면2b

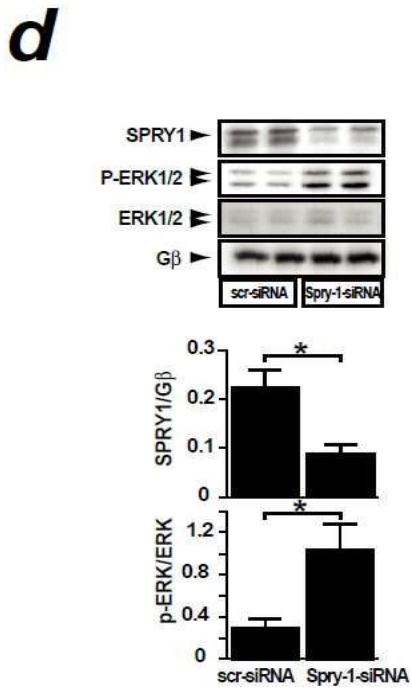
**b**



도면2c

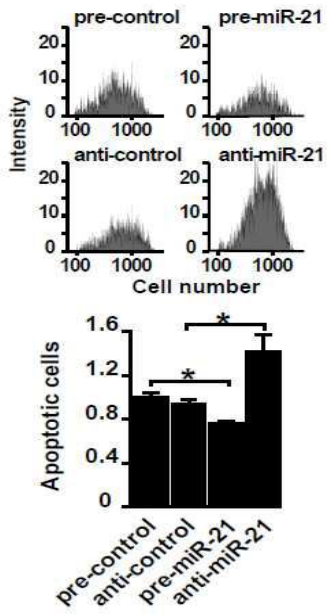


도면2d



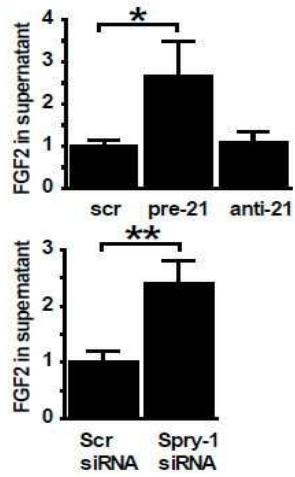
도면2e

**e**



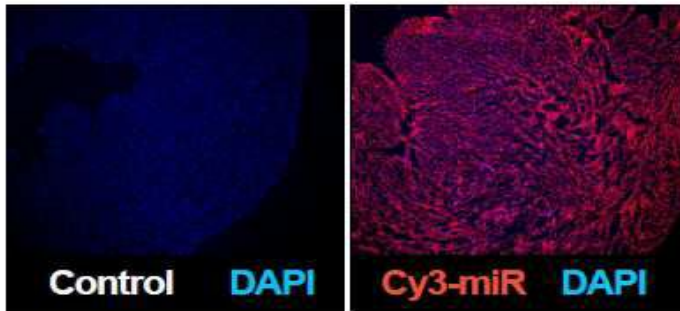
도면2f

**f**



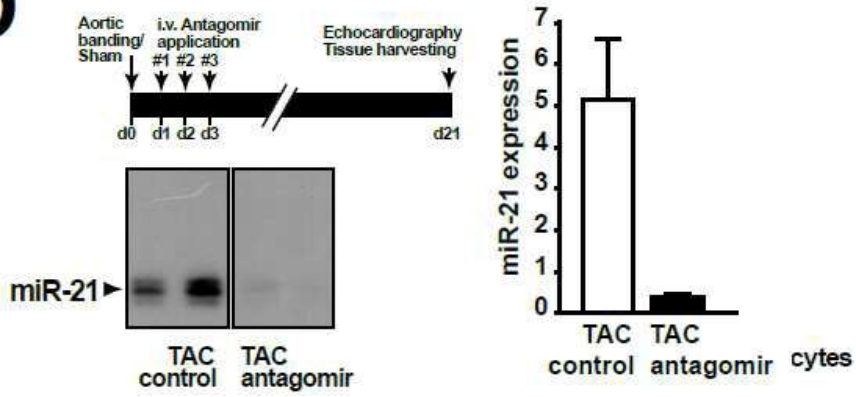
도면3a

**a**



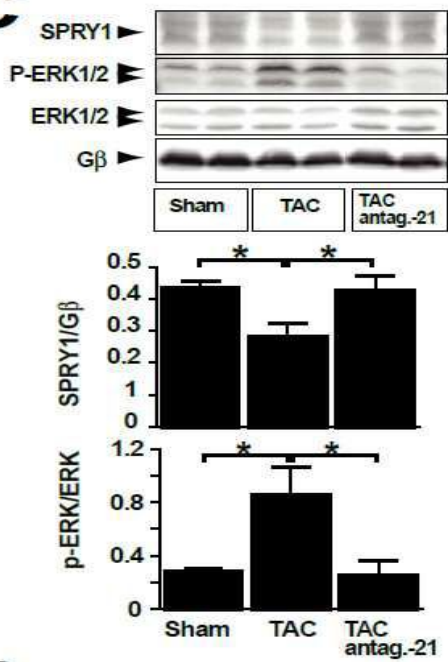
도면3b

**b**

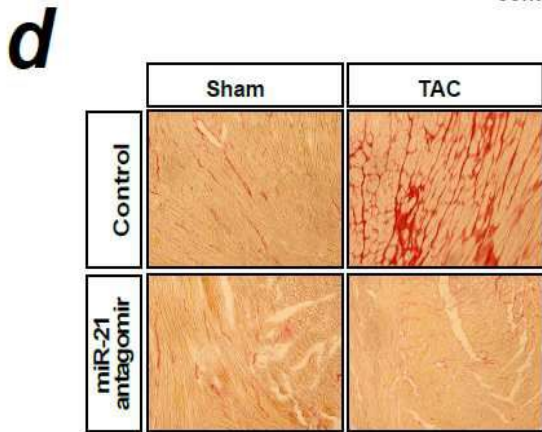


도면3c

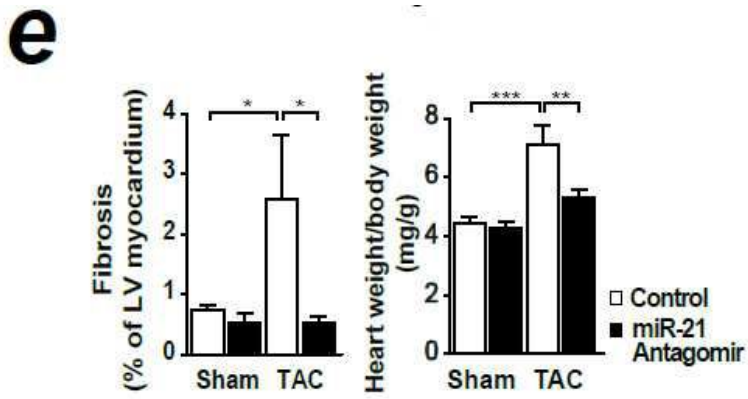
**c**



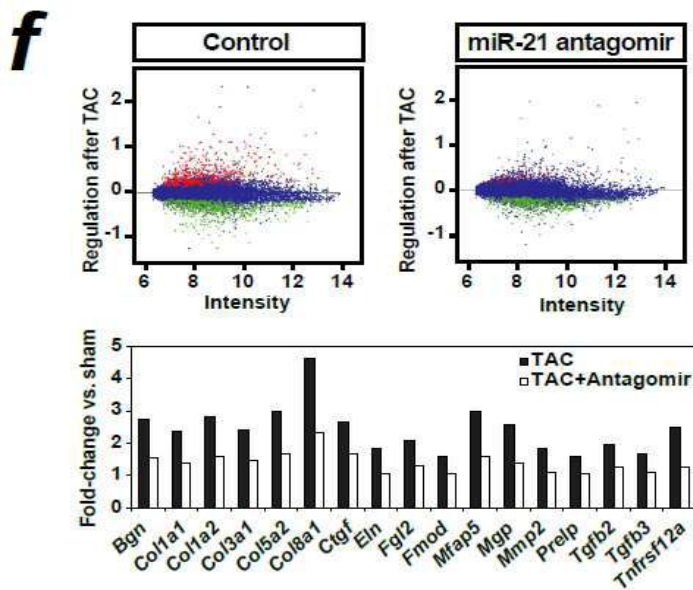
도면3d



도면3e

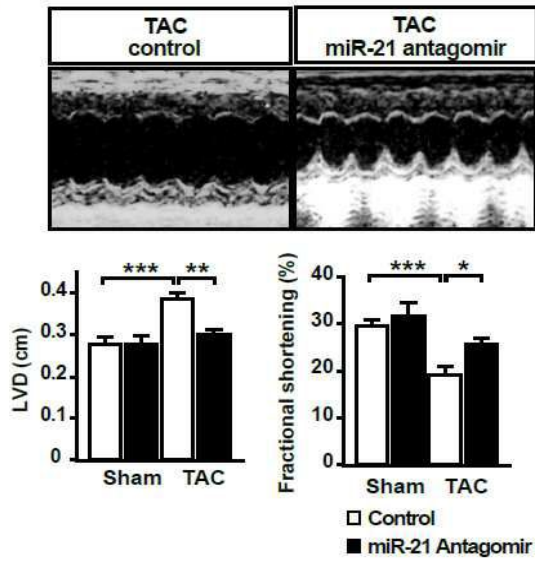


도면3f



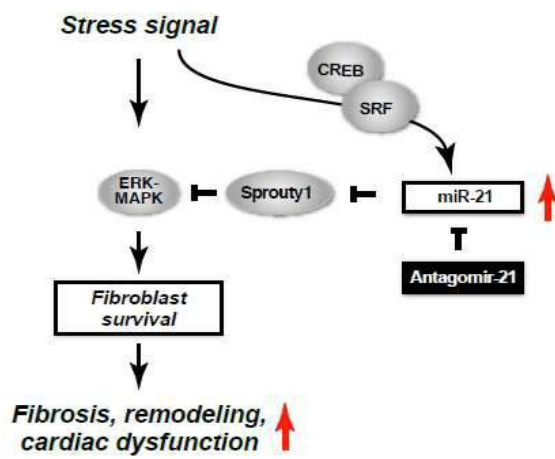
도면3g

**g**



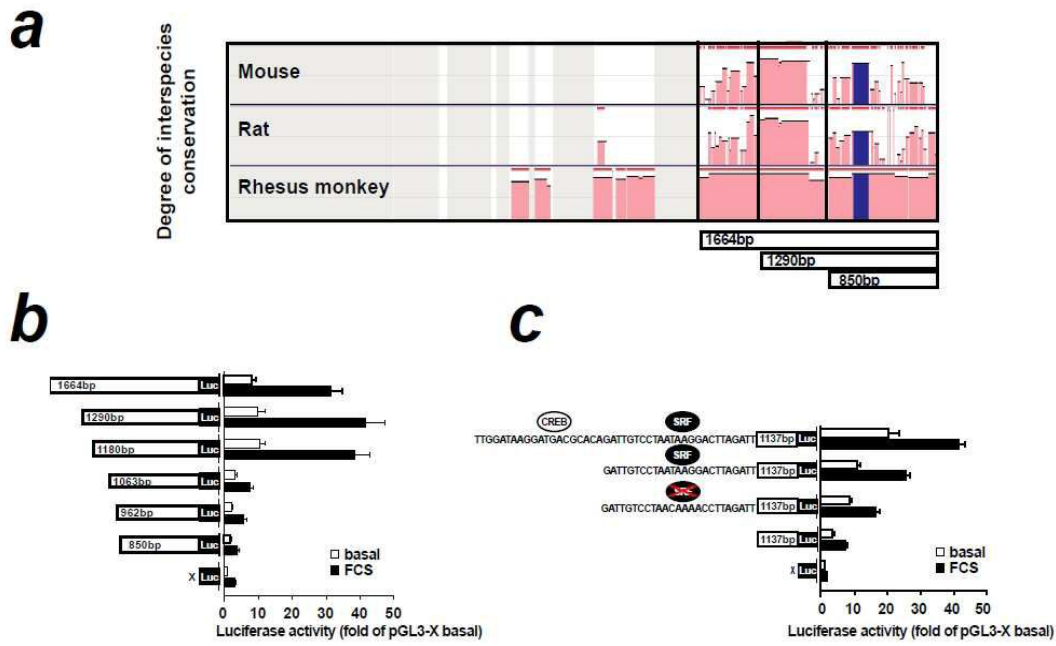
도면3h

**h**

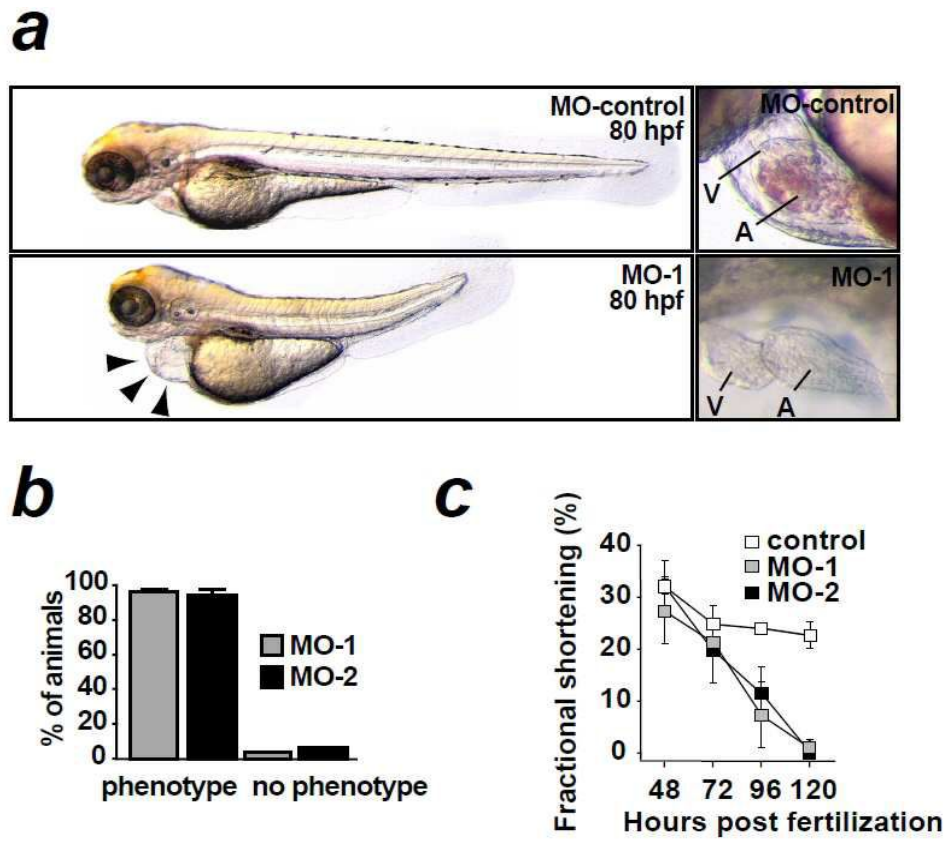




도면4

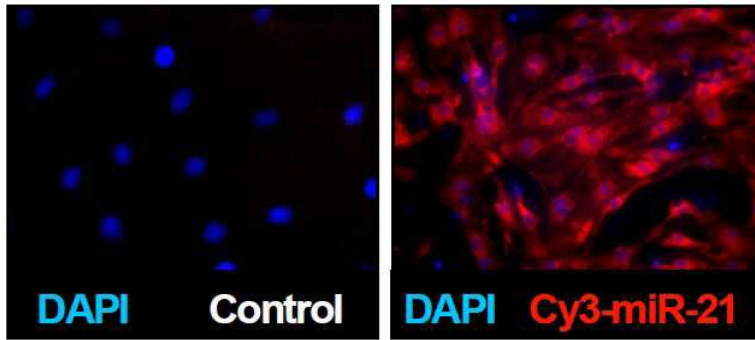


도면5

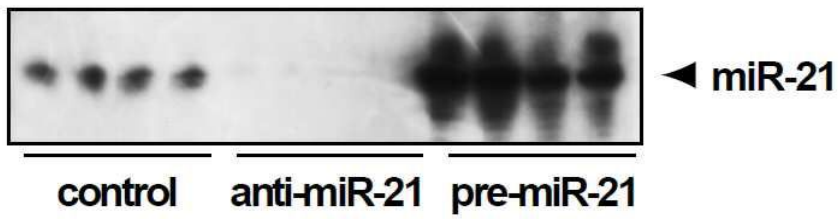


도면6

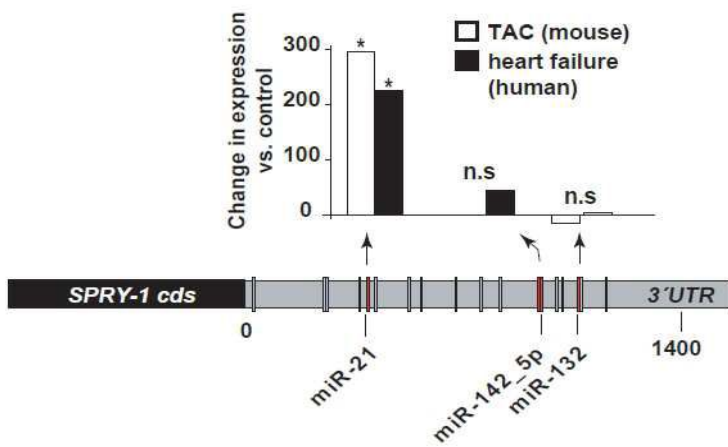
**a**



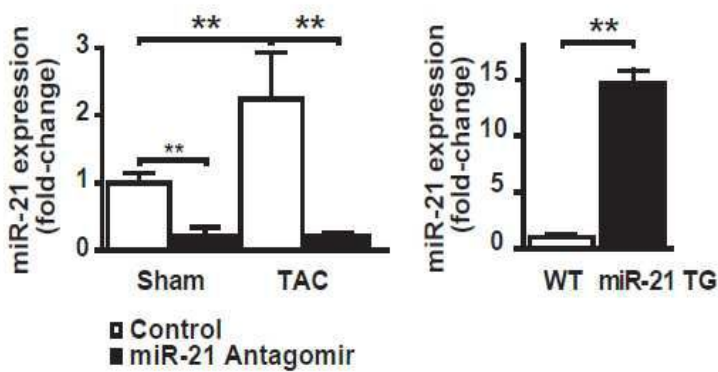
**b**



도면7



도면8



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Julius-Maximilians-Universität Würzburg

<120> MicroRNA (miRNA) and down-stream targets

<130> U30038

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> microRNA-21

<400> 1

uagcuuauca gacugauguu ga 22

<210> 2

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> promoter region of miR-21

<400> 2

ttggataagg atgacgcaca gattgtccta ataaggactt agatt 45

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> promoter region miR-21 deletion CREB binding site

<400> 3

gattgtccta ataaggactt agatt 25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> promoter region miR-21 deletion of CREB binding site and point

mutation of the SRF binding site

<400> 4  
gattgtccta aacaaaactt agatt 25

<210> 5  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220><223> morpholino antisense oligo against mature dre-mirR-21

<400> 5  
gccaacacca gtctgataag cta 23

<210> 6  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220><223> multiblocking morpholino antisense oligo to interfere with  
mirR-21

<400> 6  
tgtaacagcc aacaccagtc tgataagcta t 31

<210> 7  
<211> 960  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
atggatcccc aaaatcaaca tggcagtggc agttcgttag ttgtgatcca gcagccttct 60

ttggatagcc gtcagagatt agactatgag agagagattc agcctactgc tattttgtcc 120

ttagaccaga tcaaggccat aagaggcagc aatgaataca cagaagggcc ttcggtggtg 180

aaaagacctg ctctcggac agcaccaaga caagaaaagc atgaaaggac tcatgaaatc 240

ataccaatta atgtgaataa taactacgag cacagacaca caagccacct gggacatgca 300

gtactcccaa gtaatgccag gggccccatt ttgagcagat caaccagcac tggaaagtgca 360

gccagctctg ggagcaacag cagtgcctct tctgaacagg gactgttagg aaggtcacca 420

ccaaccagac cagtccctgg tcataggtct gaaagggcaa tccggacca geccaagcaa 480

ctgattgtgg atgacttgaa gggttccttg aaagaggacc tgacacagca caagttcatt 540

tgtgaacagt gtgggaagtg caagtgtgga gaatgcactg ctcccaggac cctaccatcc 600  
 tgtttggcct gtaaccggca gtgcctttgc tctgctgaga gcatgggtgga atatggaacc 660  
 tgcattgtct tagtcaaggg catctttctac cactgctcca atgacgacga aggggattcc 720  
 tattcagata atccttgctc ctgttcacaa tcacactgct gctctagata cctgtgtatg 780  
 ggagccatgt ctttattttt accttgctta cctgtttatc ctctgctaa aggatgcctg 840  
 aagctgtgca ggaggtgtta tgactggatc catcgcccag ggtgcagatg taagaactcc 900

aacactgtct attgtaagct ggagagctgc cctcccggg gtcagggtaa accatcatga 960

<210> 8

<211> 319

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Asp Pro Gln Asn Gln His Gly Ser Gly Ser Ser Leu Val Val Ile

1                    5                                    10                                    15

Gln Gln Pro Ser Leu Asp Ser Arg Gln Arg Leu Asp Tyr Glu Arg Glu

                  20                                    25                                    30

Ile Gln Pro Thr Ala Ile Leu Ser Leu Asp Gln Ile Lys Ala Ile Arg

                  35                                    40                                    45

Gly Ser Asn Glu Tyr Thr Glu Gly Pro Ser Val Val Lys Arg Pro Ala

                  50                                    55                                    60

Pro Arg Thr Ala Pro Arg Gln Glu Lys His Glu Arg Thr His Glu Ile

65                                    70                                    75                                    80

Ile Pro Ile Asn Val Asn Asn Asn Tyr Glu His Arg His Thr Ser His

                  85                                    90                                    95

Leu Gly His Ala Val Leu Pro Ser Asn Ala Arg Gly Pro Ile Leu Ser

                  100                                    105                                    110

Arg Ser Thr Ser Thr Gly Ser Ala Ala Ser Ser Gly Ser Asn Ser Ser

                  115                                    120                                    125

Ala Ser Ser Glu Gln Gly Leu Leu Gly Arg Ser Pro Pro Thr Arg Pro

                  130                                    135                                    140

Val Pro Gly His Arg Ser Glu Arg Ala Ile Arg Thr Gln Pro Lys Gln

145                                    150                                    155                                    160

Leu Ile Val Asp Asp Leu Lys Gly Ser Leu Lys Glu Asp Leu Thr Gln  
 165 170 175

His Lys Phe Ile Cys Glu Gln Cys Gly Lys Cys Lys Cys Gly Glu Cys  
 180 185 190

Thr Ala Pro Arg Thr Leu Pro Ser Cys Leu Ala Cys Asn Arg Gln Cys  
 195 200 205

Leu Cys Ser Ala Glu Ser Met Val Glu Tyr Gly Thr Cys Met Cys Leu  
 210 215 220

Val Lys Gly Ile Phe Tyr His Cys Ser Asn Asp Asp Glu Gly Asp Ser  
 225 230 235 240

Tyr Ser Asp Asn Pro Cys Ser Cys Ser Gln Ser His Cys Cys Ser Arg  
 245 250 255

Tyr Leu Cys Met Gly Ala Met Ser Leu Phe Leu Pro Cys Leu Leu Cys  
 260 265 270

Tyr Pro Pro Ala Lys Gly Cys Leu Lys Leu Cys Arg Arg Cys Tyr Asp  
 275 280 285

Trp Ile His Arg Pro Gly Cys Arg Cys Lys Asn Ser Asn Thr Val Tyr  
 290 295 300

Cys Lys Leu Glu Ser Cys Pro Ser Arg Gly Gln Gly Lys Pro Ser  
 305 310 315

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> antisense oligonucleotide against miR-21

<400> 9

ucaacaucag ucuguaagcu a

21

<210> 10

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> antisense oligonucleotide against miR-181a



<400> 10  
 acucaccgac agguugaaug uu 22

<210> 11  
 <211> 72  
 <212> RNA  
 <213> H. sapiens  
 <220><223> microRNA-21 stem-loop sequence

<400> 11  
 ugucggguag cuuauacagac ugauguugac uguugaaau cuuggcaaca ccagucgaug 60  
 ggcugucuga ca 72

<210> 12  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> antisense oligonucleotide against miR-21

<400> 12  
 ucaacaucag ucugauaagc ua 22