(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0127008
(43) 공개일자 2020년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7027733
(22) 출원일자(국제) 2019년02월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년09월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/018184
(87) 국제공개번호 WO 2019/168686
국제공개일자 2019년09월06일
(30) 우선권주장
62/637,973 2018년03월02일 미국(US)

(71) 출원인
다이서나 파마수이티컬, 인크.
미국 02421 메사추세츠주 렉싱턴 헤이든 애비뉴 33
(72) 발명자
퍼셀, 나탈리
미국 02421 매사추세츠주 렉싱턴 헤이든 애비뉴 33
라이, 쳉
미국 02421 매사추세츠주 렉싱턴 헤이든 애비뉴 33
(74) 대리인
양영준, 이상남

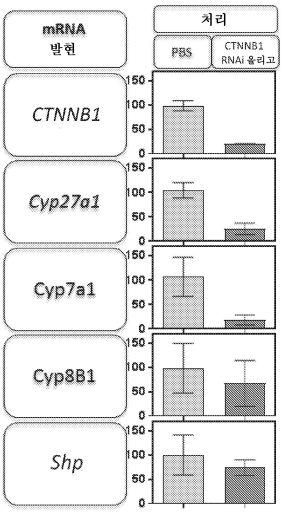
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 **담관 부족-연관된 상태의 치료를 위한 방법 및 조성물**

(57) 요 약

본 개시내용은 담관 부족-연관된 상태의 치료를 위해 특히 간세포에서 CTNNB1 발현을 감소시키는데 유용한 올리고뉴클레오티드, 조성물 및 방법에 관한 것이다. CTNNB1 발현의 감소를 위한 개시된 올리고뉴클레오티드는 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있고, 보다 강한 뉴클레아제 내성 및 보다 낮은 면역원성과 같은 개선된 특징을 위해 변형될 수 있다. CTNNB1 발현의 감소를 위한 개시된 올리고뉴클레오티드는 또한 특정한 세포 또는 기관, 예컨대 간의 간세포를 표적화하는 표적화 리간드를 포함할 수 있다.

대 표 도 - 도7c



(52) CPC특허분류
A61P 1/16 (2018.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

담관 형성의 촉진을 필요로 하는 대상체에게 CTNNB1 발현을 감소시키는 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 담관 형성을 촉진시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 투여가 대상체에서 기능성 담관의 개수 및/또는 크기를 증가시키는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 투여가 대상체에서 담관의 표면적을 증가시키는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드를 투여하기 전에, 대상체가 담관 부족 (BDP)-연관된 상태를 가진 것으로 확인되는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, BDP-연관된 상태가 알라질 증후군인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, BDP-연관된 상태가 담도 폐쇄증인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, BDP-연관된 상태가 유형 I 담도 폐쇄증, 유형 II 담도 폐쇄증, 또는 유형 III 담도 폐쇄증인 방법.

청구항 8

제2항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 담관이 간내 담관인 방법.

청구항 9

제2항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 담관이 간외 담관인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 청소년 인간 대상체인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥이 CTNNB1 mRNA의 표적 서열에 대해 상보성인 영역을 갖고, 상보성 영역이 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상보성 영역이 CTNNB1 mRNA의 표적 서열에 대해 완전히 상보성인 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 안티센스 가닥이 19 내지 27개 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 안티센스 가닥이 21 내지 27개 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 15 내지 40개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 추가로 포함하고, 센스 가닥이 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 센스 가닥이 19 내지 40개 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 듀플렉스 영역이 적어도 19개 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 듀플렉스 영역이 적어도 21개 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 19

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CTNNB1 mRNA에 대해 상보성인 영역이 적어도 19개의 연속 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 20

제11항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, CTNNB1 mRNA에 대해 상보성인 영역이 적어도 21개의 연속 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 21

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥이 그의 3'-말단에 S1-L-S2로 제시된 스템-루프를 포함하고, S1이 S2에 대해 상보성이고, L이 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, L이 테트라루프인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, L이 4개 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, L이 GAAA로 제시된 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥이 27개 뉴클레오티드 길이이고, 센스 가닥이 25개 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥이 25개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 영역을 형성하는 것인 방법.

청구항 27

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥 상의 3'-오버행 서열을

추가로 포함하는 방법.

청구항 28

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 각각 21 내지 23개 범위의 뉴클레오티드 길이인 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 19 내지 21개 범위의 뉴클레오티드 길이인 듀플렉스 구조를 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 1개 이상의 뉴클레오티드 길이의 3'-오버행 서열을 포함하고, 3'-오버행 서열이 안티센스 가닥, 센스 가닥, 또는 안티센스 가닥 및 센스 가닥 상에 존재하는 것인 방법.

청구항 31

제28항 또는 제29항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 2개 뉴클레오티드 길이의 3'-오버행 서열을 포함하고, 3'-오버행 서열이 안티센스 가닥 상에 존재하고, 센스 가닥이 21개 뉴클레오티드 길이이고, 안티센스 가닥이 23개 뉴클레오티드 길이이며, 이에 따라 센스 가닥 및 안티센스 가닥이 21개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스를 형성하는 것인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 2'-변형을 포함하는 것인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 2'-변형이 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산으로부터 선택된 변형인 방법.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드가 변형되는 것인 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결이 포스포로티오에이트 연결인 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오티드의 당의 4'-탄소가 포스페이트 유사체를 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 포스페이트 유사체가 옥시메틸포스포네이트, 비닐포스포네이트, 또는 말로닐포스포네이트인 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 1개의 뉴클레오티드가 1개 이상의 표적화 리간드에 접합되는 것인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 각각의 표적화 리간드가 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티를 포함하는 것인 방법.

청구항 42

제42항에 있어서, GalNAc 모이어티가 1가 GalNAc 모이어티, 2가 GalNAc 모이어티, 3가 GalNAc 모이어티, 또는 4가 GalNAc 모이어티인 방법.

청구항 43

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 스템-루프의 L의 4개 이하의 뉴클레오티드 각각이 1가 GalNAc 모이어티에 접합되는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)하에 "담관 부족-연관된 상태의 치료를 위한 방법 및 조성물"을 발명의 명칭으로 하는, 2018년 3월 2일에 출원한 미국 가출원 번호 62/637973을 우선권 주장하며, 그의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 출원은 올리고뉴클레오티드 및 그의 용도, 특히 담관 부족과 관련된 상태의 치료와 관련된 용도에 관한 것이다.

[0005] **서열 목록에 대한 참고**

[0006] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 제출된다. 서열 목록은 5.45 KB 크기로 2019년 2월 15일에 생성된 D0800.70013WO00 - SEQ.txt 명칭의 파일로 제공된다. 서열 목록의 전자 형식 내의 정보는 그의 전체가 본원에 참고로 포함된다.

배 경 기 술

[0007] 담즙산 생성, 분비 및/또는 흡수에 영향을 미치는 장애는 유의한 생리학적 영향을 가질 수 있다. 예를 들어, 담즙정체는 특히 신생아에서 흔한 간 질환이며, 이는 담즙 유동 및 배설을 감소시키고, 결합된 고빌리루빈혈증을 연장시킨다. 유사하게, 간내 담관의 부족은 만성 담즙정체, 심장 이상, 근골격 이상, 안구 이상 및 얼굴 이형증을 수반하는 알라질 증후군 (Alagille syndrome, AGS)으로 지칭되는 가족성 증후군을 비롯하여 다양한 장애 및 이상과 연관이 있다. 여러 개체, 특히 AGS를 앓고 있는 개체에서, 담관의 부족은 급속 진행성 간 질환과 연관이 있다. 담도 폐쇄증 (Biliary Atresia, BA)은 유아에서 간내 및 간외 담관의 또 다른 진행성 섬유-폐색 장애이다. 담관 부족을 개선시키는 방법을 비롯하여 이러한 환자를 치료하는 적합한 방법이 부족하다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용의 측면은 대상체에서 담관 부족 및 관련된 상태를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 CTNNB1 발현의 선택적인 억제가 대상체의 담관 용량을 증가시키는데 (예를 들어, 새로운 담관 형성을 자극하는데) 유용하다는 발견에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 대상체에서 β-카테닌 활성을 감소시켜, 대상체의 담관 용량을 증가시키기 위해 (예를 들어, 담관의 재생을 촉진시키기 위해) RNAi 올리고뉴클레오티드를 사용한다. 본원에 제공된 방법에 의해 생성된 담관 용량 증가의 결과는 담즙 유동에서의 개선 (예를 들어, 증가된 담즙산 흡수) 및 순환 담즙산에서의 상응하는 감소이다 (예를 들어, CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드의 투여가 담관 손상의 동물 모델에서 담즙산 수준을 감소시켰음을 보여

주는 실시예 4 참고). 일부 실시양태에서, β-카테닌 활성의 감소는 간세포에서 담즙산 합성을 감소시키고, 이는 대상체에서 담관 부족으로 인한 담즙산-유도된 급성 독성을 예방할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 새로운 담관의 재생 및 담즙산 합성의 감소를 통해 담관 부족-연관된 상태, 예컨대 알라질 증후군 및 담도 폐쇄증을 치료하는데 유용하다.

[0009] 본 개시내용의 한 측면은 CTNNB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21 또는 적어도 22개의 연속 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 CTNNB1의 표적 서열에 대해 완전히 상보성이다. 일부 실시양태에서, CTNNB1에 대한 상보성 영역은 적어도 19개의 연속 뉴클레오티드 길이이다.

[0010] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 19 내지 27개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 21 내지 27개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 15 내지 40개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 추가로 포함하고, 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 19 내지 40개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 27개 뉴클레오티드 길이이고, 센스 가닥은 25개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스 영역은 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20 또는 적어도 21개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 25개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 영역을 형성한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥 상에 2개 뉴클레오티드 길이의 3'-오버행 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 각각 21 내지 23개 범위의 뉴클레오티드 길이인 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 19 내지 21개 범위의 뉴클레오티드 길이인 듀플렉스 구조를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 1개 이상의 뉴클레오티드 길이의 3'-오버행 서열을 포함하고, 3'-오버행 서열은 안티센스 가닥, 센스 가닥, 또는 안티센스 가닥 및 센스 가닥 상에 존재한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 2개 뉴클레오티드 길이의 3'-오버행 서열을 포함하고, 3'-오버행 서열은 안티센스 가닥 상에 존재하고, 센스 가닥은 21개 뉴클레오티드 길이이고, 안티센스 가닥은 23개 뉴클레오티드 길이이며, 이에 따라 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 21개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스를 형성한다.

[0012] 일부 실시양태에서, CTNNB1에 대한 상보성 영역은 적어도 19개의 연속 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 그의 3'-말단에 S1-L-S2로 제시된 스템-루프를 포함하고, S1은 S2에 대해 상보성이고, L은 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성한다.

[0013] 본 개시내용의 또 다른 측면은 CTNNB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 21 내지 27개 뉴클레오티드 길이이고, CTNNB1에 대해 상보성인 영역을 갖고, 센스 가닥은 그의 3'-말단에 S1-L-S2로 제시된 스템-루프를 포함하고, S1은 S2에 대해 상보성이고, L은 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 적어도 19개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 구조를 형성하지만, 공유 연결되지 않는다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 CTNNB1 mRNA의 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20 또는 적어도 21개의 연속 뉴클레오티드에 대해 완전히 상보성이다. 일부 실시양태에서, L은 테트라루프이다. 일부 실시양태에서, L은 4개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, L은 GAAA로 제시된 서열을 포함한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 2'-변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2'-변형은 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산으로부터 선택된 변형이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드는 변형된다.

[0015] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오티드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸포스포네이트, 비닐포스포네이트, 또는 말로닐포스포네이트이다.

[0016] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 1개의 뉴클레오티드는 1개 이상의 표적화 리간드에 접합된다. 일부 실시양태에서, 각각의 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드 또는 지질을 포함한

다. 일부 실시양태에서, 각각의 표적화 리간드는 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, GalNac 모이어티는 1가 GalNAc 모이어티, 2가 GalNAc 모이어티, 3가 GalNAc 모이어티, 또는 4가 GalNAc 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 스템-루프의 L의 4개 이하의 뉴클레오티드 각각은 1가 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 압타머를 포함한다.

[0017] 본 개시내용의 또 다른 측면은 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드 및 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 개시내용의 또 다른 측면은 본 개시내용의 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에서 담관 부족을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에서 담관 형성을 증가시켜, 담관 용량을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 치료하고자 하는 대상체는 알라질 증후군을 앓고 있다. 일부 실시양태에서, 치료하고자 하는 대상체는 담도 폐쇄증을 앓고 있다.

[0018] 본 개시내용의 또 다른 측면은 CTNNB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 15 내지 40개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥 및 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하고, 안티센스 가닥은 상보성 서열을 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 첨부 A에 제시된 표의 열로부터 선택된 센스 및 안티센스 가닥의 쌍을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0020] 본 명세서의 일부로 포함되고 그를 구성하는 첨부된 도면은 특정 실시양태를 설명하고, 서면 명세서와 함께 본원에 개시된 조성물 및 방법의 특정 측면의 비제한적인 예를 제공하는 역할을 한다.

도 1은 0.1% 3,5-디에톡시카르보닐-1,4-디히드로콜리딘 (DDC)을 공급하고 PBS로 처리한 마우스로부터의 (처음 3개의 패널) 및 0.1% DDC를 공급하고 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리한 마우스로부터의 (마지막 3개의 패널) 간 절편에서 CK19에 대한 면역조직화학 염색을 도시하는 일련의 사진이다. CK19는 담관 상피 마커이다. 서열식별번호(SEQ ID NO): 1에 제시된 서열을 갖는 센스 가닥 및 서열식별번호: 2에 제시된 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함하는 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드가 제공된다.

도 2는 10 일, 24 일 또는 38 일 동안 매주 0.1% DDC를 공급하고 PBS 또는 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리한 마우스로부터의 간 절편에서 CK19에 대한 면역조직화학 염색을 도시하는 일련의 사진이다. 사진의 위쪽 열은 PBS 처리에 의한 결과를 도시하고, 사진의 아래쪽 열은 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드에 의한 결과를 도시한다. 처리일은 각각의 날에 대해 2개의 면역조직화학 염색과 함께 아래쪽에 도시된다. 정상 식사를 한 마우스 (0.1% DDC를 공급하지 않은 마우스)에 대한 결과는 맨 오른쪽에 도시된다.

도 3은 PBS로 처리한 $Mdr2^{+/-}$ 마우스로부터의 (왼쪽에서 첫 번째 패널), PBS로 처리한 $Mdr^{-/-}$ 마우스로부터의 (왼쪽에서 두 번째 및 세 번째 패널), 및 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리한 $Mdr^{-/-}$ 마우스로부터의 (오른쪽에 도시된 마지막 3개의 패널) 간 절편에서 CK19에 대한 면역조직화학 염색을 도시하는 일련의 사진이다. 각각의 마우스의 성별은 관련 패널 아래에 표시된다.

도 4는 PBS (왼쪽에서 시작하는 처음 3개의 패널), 5 mg/kg CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 (왼쪽에서 네 번째 패널) 및 100 mg/kg CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드, Q1W x 6 (오른쪽에 도시된 마지막 3개의 패널)으로 처리한 각각의 개별 야생형 동물로부터의 간 절편에서 CK19에 대한 면역조직화학 염색을 도시하는 일련의 사진이다. 화살표는 실질 구획의 비-문맥주위 영역에서 CK19 양성 세포를 갖는 영역을 표시한다. 척도 막대는 100 μm를 나타낸다.

도 5는 PBS (위쪽 2개의 패널) 또는 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 (아래쪽 2개의 패널)로 처리한 2 마리의 DDC-공급 동물 (동물 1 및 동물 2)에서 수지 캐스팅을 이용하여 세관 아키텍처를 도시하는 일련의 사진이다. 동물 1에 대한 영상은 2X 배율을 가지며 척도 막대가 500 μm를 나타내고, 동물 2에 대한 영상은 4X 배율을 가지며 척도 막대가 100 μm를 나타낸다.

도 6은 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리한 단일 DDC-공급 동물에서 잉크 주사에 의한 세관 아키텍처를 도시하는 사진이다. 영상은 10X 배율을 가지며 척도 막대가 50 μm를 나타낸다.

도 7a는 PBS로 처리한 대조군 식사를 한 마우스로부터, 0.1% DDC를 공급하고 PBS로 처리한 마우스로부터, 및 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드의 4 주 용량으로 처리하는 동안 0.1% DDC를 공급한 마우스로부터 중력식 유동에 의해 수집된 담즙 샘플로부터 총 담즙산 농도를 비교하는 그래프이다. 스위스 웹스터(Swiss Webster) 암컷

마우스를 사용하였다.

도 7b는 PBS로 처리한 대조군 식사를 한 마우스에 대해, PBS로 처리한 0.1% DDC를 공급한 마우스에 대해 및 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 QW x 4로 처리한 0.1% DDC를 공급한 마우스에 대해 담즙 유속을 비교하는 그래프이다. 스위스 웹스터 암컷 마우스를 사용하였다.

도 7c는 PBS로 처리한 DDC-공급 마우스에서 (밝은 회색 막대) 및 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 QW x 4로 처리한 마우스에서 (어두운 회색 막대) CTNNB1, Cyp27a1, Cyp7a1, Cyp8B1 및 Shp의 발현을 비교하는 일련의 그래프이다. 스위스 웹스터 암컷 마우스를 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 일부 측면에 따라, 본 개시내용은 담관 부족을 치료하기 위해 세포, 특히 간 세포 (예를 들어, 간세포)에서 CTNNB1 발현을 감소시키는데 효과적인 CTNNB1 mRNA를 표적화하는 올리고뉴클레오티드를 사용하는 방법을 제공한다. 따라서, 관련 측면에서, 본 개시내용은 간에서 CTNNB1 유전자 발현의 선택적인 감소를 수반하는, 담관 부족을 치료하는 방법을 제공하였다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 CTNNB1 표적화 올리고뉴클레오티드는 대상체에서 담관 부족을 치료하기 위해 표적 조직의 선택된 세포 (예를 들어, 간의 간세포)에게 전달하기 위해 설계된다.

[0022] 정의된 용어의 기재를 비롯하여 본 개시내용의 추가의 측면이 하기에 제공된다.

[0023] **I. 정의**

[0024] **투여하는**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "투여하는" 또는 "투여"는 (예를 들어, 대상체에서 상태를 치료하기 위해) 약리학적으로 유용한 방식으로 대상체에게 물질 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드)을 제공하는 것을 의미한다.

[0025] **대략적으로**: 본원에서 사용된 바와 같이, 1개 이상의 관심 값에 적용되는 용어 "대략적으로" 또는 "약"은 명시된 기준 값과 유사한 값을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 용어 "대략적으로" 또는 "약"은 달리 명시되지 않거나 또는 문맥으로부터 명백하지 않다면 명시된 기준 값의 어느 한 방향으로 (초과 또는 미만) 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만 내에 속하는 값의 범위를 지칭한다 (이러한 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 제외함).

[0026] **알라질 증후군**: 본원에서 사용된 바와 같이, "알라질 증후군"은 간에서 담관의 좁아짐, 기형 및/또는 부족을 특징으로 하는 장애를 지칭한다. 알라질 증후군에서, 간내 담관의 손상된 분화는 담관의 좁아짐, 기형 및 부족을 야기할 수 있다. 이러한 담관 이상은 담즙 유동을 감소시켜서 (간내 담즙정체), 간에서 담즙의 축적을 초래한다. 예를 들어, [Turnpenny *et al.* Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. Eur J Hum Genet. 2012 Mar;20(3):251-7]을 참고하며, 이는 모든 목적을 위해 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0027] **아시알로당단백질 수용체 (ASGPR)**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "아시알로당단백질 수용체" 또는 "ASGPR"은 큰 48 kDa (ASGPR-1) 및 작은 40 kDa 서브유닛 (ASGPR-2)에 의해 형성된, 이분된 C-유형 렉틴을 지칭한다. ASGPR은 간세포의 동모양 표면 상에서 주로 발현되고, 말단 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기 (아시알로당단백질)를 함유하는 순환 당단백질의 결합, 내재화 및 후속적인 제거에서 주요 역할을 한다.

[0028] **CTNNB1**: 본원에서 사용된 바와 같이, CTNNB1은 β-카테닌 단백질을 코딩하는 유전자이다. 인간에서, CTNNB1은 적어도 4가지 전사체, 즉, NM_001904.3 (변이체 1), NM_001098209.1 (변이체 2), NM_001098210.1 (변이체 3), 및 NM_001330729.1 (변이체 4)을 코딩한다. 변이체 1, 2 및 3은 동일한 이소형 (NP_001091680.1, 이소형 1)을 코딩한다. 변이체 4는 이소형 2 (NP_001317658.1)를 코딩하고, 이는 이소형 1에 비해 더 짧은 N-말단을 갖는다. 마우스에서, CTNNB1은 적어도 2가지 전사체, 즉, NM_007614.3 (변이체 1) 및 NM_001165902.1 (변이체 2)을 코딩한다. 두 전사체 모두 동일한 단백질 (예를 들어, NP_001159374.1 및 NP_031640.1에 제공된 서열)을 코딩한다.

[0029] **담관 부족**: 본원에서 사용된 바와 같이, "담관 부족"은 대상체에서 담관의 부재, 담관의 개수 및/또는 크기에서의 감소, 또는 담관의 차단으로 인해 감소된 담관 기능을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 담관 부족은 간내 관의 부재 또는 감소된 개수와 연관이 있다. 일부 실시양태에서, 담관 부족은 간외 관의 부재 또는 감소된 개수와 연관이 있다. 일부 실시양태에서, 담관 부족은 간내 또는 간외 관의 차단과 연관이 있다. 비제한적인 예로서, 소엽간 담관의 부족은 문맥 구역의 총 개수와 비교하여 담관이 부족한 문맥 구역의 비를 결정함으로써 계산

될 수 있다 (예를 들어, [Hadchouel Paucity of interlobular bile ducts. Semin Diagn Pathol. 1992 Feb;9(1):24-30]을 참고하며, 이는 모든 목적을 위해 그의 전문이 본원에 참고로 포함됨).

[0030] **담관 부족-연관된 상태**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "담관 부족-연관된 상태" 또는 "BDP-연관된 상태"는 상기 상태를 갖지 않는 정상의 대조군 대상체와 비교하여 대상체에서 기능성 담관의 개수 또는 크기에서의 감소를 초래하거나 또는 이와 연관이 있는 대상체에서의 상태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, BDP-연관된 상태를 가진 대상체는 기능성 담관의 개수 및/또는 크기에서의 감소를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체에서 결함이 있는 담도계는 간내 담관에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 손상된 기능을 갖는 간내 관은 문맥주위 담관 (헤링(Hering)의 관) 및 소엽내 담관 (세담관)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 대상체에서 손상된 기능을 갖는 담관은 간외 담관이다. 일부 실시양태에서, 손상된 기능을 갖는 간외 관은 좌간관, 우간관, 및 총간관으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, BDP-연관된 상태는 알라질 증후군이다. 일부 실시양태에서, BDP-연관된 상태는 담도 폐쇄증이다.

[0031] **담도 폐쇄증**: 본원에서 사용된 바와 같이, "담도 폐쇄증 (BA)"은 특히 유아에서 담관의 파괴 또는 폐색이 담즙 유동을 방해하는 질환을 지칭한다. 예를 들어, [Kelly *et al.* Current management of Biliary Atresia. Arch Dis Child. 2007 Dec;92(12):1132-5]을 참고하며, 이는 모든 목적을 위해 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0032] **상보성**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성"은 뉴클레오티드가 서로 염기 쌍을 형성하는 것을 허용하는, 뉴클레오티드 (예를 들어, 대향 핵산 상에 있는 또는 단일 핵산 가닥의 대향 영역 상에 있는 2개의 뉴클레오티드) 사이의 구조적 관계를 지칭한다. 예를 들어, 대향 핵산의 피리미딘 뉴클레오티드에 대해 상보성인 한 핵산의 퓨린 뉴클레오티드는 서로 수소 결합을 형성함으로써 함께 염기 쌍을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상보성 뉴클레오티드는 왓슨-크릭(Watson-Crick) 방식으로 또는 적합한 듀플렉스의 형성을 허용하는 임의의 다른 방식으로 염기 쌍을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 2개의 핵산은 상보성 영역을 형성하도록 서로 상보성인 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

[0033] **데옥시리보뉴클레오티드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "데옥시리보뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드와 비교하여 그의 펜토스 당의 2' 위치에서 수소를 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 변형된 데옥시리보뉴클레오티드는 당, 포스페이트 기 또는 염기 내의 또는 그의 변형 또는 치환을 비롯하여, 2' 위치 이외에 있는 원자의 1개 이상의 변형 또는 치환을 갖는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

[0034] **이중-가닥 올리고뉴클레오티드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이중-가닥 올리고뉴클레오티드"는 실질적으로 듀플렉스 형태인 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 듀플렉스 영역(들)의 상보성 염기-쌍 형성은 공유적으로 분리된 핵산 가닥의 뉴클레오티드의 역평행 서열 사이에 형성된다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 듀플렉스 영역(들)의 상보성 염기-쌍 형성은 공유적으로 연결된 핵산 가닥의 뉴클레오티드의 역평행 서열 사이에 형성된다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 듀플렉스 영역(들)의 상보성 염기-쌍 형성은 함께 염기 쌍을 형성하는 뉴클레오티드의 상보성 역평행 서열을 제공하기 위해 (예를 들어, 헤어핀을 통해) 폴딩된 단일 핵산 가닥으로부터 형성된다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 서로 완전히 듀플렉스화된 2개의 공유적으로 분리된 핵산 가닥을 포함한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 한쪽 또는 양쪽 말단에 오버행을 갖는 부분적으로 듀플렉스화된 2개의 공유적으로 분리된 핵산 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 부분적으로 상보성인 뉴클레오티드의 역평행 서열을 포함하고, 따라서 1개 이상의 미스매치를 가질 수 있으며, 여기에는 내부 미스매치 또는 말단 미스매치가 포함될 수 있다.

[0035] **듀플렉스**: 본원에서 사용된 바와 같이, 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드)과 관련하여 용어 "듀플렉스"는 뉴클레오티드의 2개의 역평행 서열의 상보성 염기-쌍 형성을 통해 형성된 구조를 지칭한다.

[0036] **부형제**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "부형제"는 예를 들어 원하는 점조도 또는 안정화 효과를 제공하거나 또는 부여하기 위해 조성물에 포함될 수 있는 비치료적인 작용제를 지칭한다.

[0037] **간세포**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "간세포" 또는 "간세포들"은 간의 실질 조직의 세포를 지칭한다. 이들 세포는 간 질량의 대략 70-85%를 구성하고, 혈청 알부민, 피브리노겐, 및 응고 인자의 프로트롬빈 그룹 (인자 3 및 4는 제외)을 제조한다. 간세포 계통 세포에 대한 마커에는 트랜스티레틴 (Ttr), 글루타민 신테타제 (Glul), 간세포 핵 인자 1a (Hnf1a), 및 간세포 핵 인자 4a (Hnf4a)가 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 성숙한 간세포에 대한 마커에는 시토크롬 P450 (Cyp3a11), 푸마릴아세토아세테이트 히드롤라제 (Fah), 글루코스

6-포스페이트 (G6p), 알부민 (Alb), 및 OC2-2F8이 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, [Huch *et al.*, (2013), Nature, 494(7436): 247-250]을 참고하며, 간세포 마커와 관련된 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0038] **루프**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "루프"는 서로 충분히 상보성인 핵산의 2개의 역평행 영역에 의해 플랭킹된 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드)의 쌍을 형성하지 않은 영역을 지칭하며, 이에 의해 적절한 혼성화 조건하에 (예를 들어, 포스페이트 완충제에서, 세포에서) 쌍을 형성하지 않은 영역을 플랭킹하는 2개의 역평행 영역이 혼성화하여 듀플렉스 ("스템"으로 지칭됨)를 형성한다.

[0039] **변형된 뉴클레오티드간 연결**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 뉴클레오티드간 연결"은 포스포디에스테르 결합을 포함하는 기준 뉴클레오티드간 연결과 비교하여 1개 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오티드간 연결을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 비-천연 발생 연결이다. 전형적으로, 변형된 뉴클레오티드간 연결은 변형된 뉴클레오티드간 연결이 존재하는 핵산에 하나 이상의 바람직한 성질을 부여한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드는 열 안정성, 분해에 대한 내성, 뉴클레아제 내성, 가용성, 생체이용률, 생활성, 감소된 면역원성 등을 개선시킬 수 있다.

[0040] **변형된 뉴클레오티드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 뉴클레오티드"는 아데닌 리보뉴클레오티드, 구아닌 리보뉴클레오티드, 시토신 리보뉴클레오티드, 우라실 리보뉴클레오티드, 아데닌 데옥시리보뉴클레오티드, 구아닌 데옥시리보뉴클레오티드, 시토신 데옥시리보뉴클레오티드 및 티미딘 데옥시리보뉴클레오티드로부터 선택된 상응하는 기준 뉴클레오티드와 비교하여 1개 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 비-천연 발생 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 그의 당, 핵염기 및/또는 포스페이트 기에서 1개 이상의 화학적 변형을 갖는다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 상응하는 기준 뉴클레오티드에 접합된 1개 이상의 화학적 모이어티를 갖는다. 전형적으로, 변형된 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드가 존재하는 핵산에 하나 이상의 바람직한 성질을 부여한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드는 열 안정성, 분해에 대한 내성, 뉴클레아제 내성, 가용성, 생체이용률, 생활성, 감소된 면역원성 등을 개선시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 리보스 고리의 2' 위치에서 2'-O-메틸 또는 2'-F 치환을 포함한다.

[0041] **닉킹된 테트라루프 구조**: "닉킹된 테트라루프 구조"는 별개의 센스 (패신저) 및 안티센스 (가이드) 가닥의 존재를 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드의 구조이며, 센스 가닥은 안티센스 가닥에 대해 상보성인 영역을 가져서 두 가닥이 듀플렉스를 형성하고, 가닥들 중 적어도 하나, 일반적으로 센스 가닥은 듀플렉스로부터 연장되고, 연장부는 테트라루프, 및 테트라루프에 인접합 스템 영역을 형성하는 2개의 자체-상보성 서열을 함유하고, 테트라루프는 적어도 1개의 가닥의 자체-상보성 서열에 의해 형성된 인접한 스템 영역을 안정화시키도록 형성된다.

[0042] **올리고뉴클레오티드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "올리고뉴클레오티드"는 예를 들어 100개 미만의 뉴클레오티드 길이인 짧은 핵산을 지칭한다. 올리고뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 및/또는 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어 변형된 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 듀플렉스 영역을 가질 수 있거나 또는 갖지 않을 수 있다. 비제한적인 예의 세트로서, 올리고뉴클레오티드는 소형 간섭 RNA (siRNA), 마이크로RNA (miRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 다이서 기질 간섭 RNA (dsiRNA), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 짧은 siRNA, 또는 단일-가닥 siRNA일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 RNAi 올리고뉴클레오티드이다.

[0043] **오버행**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "오버행"은 1개의 가닥 또는 영역이 함께 듀플렉스를 형성하는 상보성 가닥의 말단 너머로 연장된 1개의 가닥 또는 영역으로부터 생성된 말단의 염기 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드(들)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 오버행은 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 5' 말단 또는 3' 말단에서 듀플렉스 영역으로부터 연장된 쌍을 형성하지 않은 1개 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 오버행은 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 또는 센스 가닥 상의 3' 또는 5' 오버행이다.

[0044] **포스페이트 유사체**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "포스페이트 유사체"는 포스페이트 기의 정전기적 및/또는 입체적 성질을 모방하는 화학적 모이어티를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 종종 효소적 제거에 민감한 5'-포스페이트 대신에 올리고뉴클레오티드의 5' 말단 뉴클레오티드에 위치한다. 일부 실시양태에서, 5' 포스페이트 유사체는 포스파타제-내성 연결을 함유한다. 포스페이트 유사체의 예에는 5' 포스포네이트, 예컨대 5' 메틸렌포스포네이트 (5'-MP) 및 5'-(E)-비닐포스포네이트 (5'-VP)가 포함된다. 일부 실시양태

에서, 올리고뉴클레오티드는 5'-말단 뉴클레오티드에서 당의 4'-탄소 위치에 포스페이트 유사체 ("4'-포스페이트 유사체"로 지칭됨)를 갖는다. 4'-포스페이트 유사체의 예는 옥시메틸 기의 산소 원자가 당 모이어티 (예를 들어, 그의 4'-탄소에서) 또는 그의 유사체에 결합된 옥시메틸포스포네이트이다. 예를 들어, 2017년 9월 1일에 출원한 국제 특허 출원 PCT/US2017/049909, 2016년 9월 2일에 출원한 미국 가출원 번호 62/383,207, 및 2016년 9월 12일에 출원한 62/393,401을 참고하며, 포스페이트 유사체와 관련된 각각의 내용은 본원에 참고로 포함된다. 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 대해 다른 변형이 개발되었다 (예를 들어, WO 2011/133871; 미국 특허 번호 8,927,513; 및 Prakash *et al*. (2015), Nucleic Acids Res., 43(6):2993-3011, 포스페이트 유사체와 관련된 각각의 내용은 본원에 참고로 포함됨).

[0045] **감소된 발현**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 유전자의 "감소된 발현"은 적절한 기준 세포 또는 대상체와 비교하여 유전자에 의해 코딩된 RNA 전사체 또는 단백질의 양에서의 감소 및/또는 세포 또는 대상체에서 유전자 활성의 양에서의 감소를 지칭한다. 예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, CTNNB1 mRNA 서열에 대해 상보성인 안티센스 가닥을 갖는 것)로 세포를 처리하는 작용은 이중-가닥 올리고뉴클레오티드로 처리하지 않은 세포와 비교하여 (예를 들어, CTNNB1 유전자에 의해 코딩된) RNA 전사체, 단백질 및/또는 효소 활성의 양에서의 감소를 일으킬 수 있다. 유사하게, 본원에서 사용된 바와 같이 "발현을 감소시키는"은 유전자 (예를 들어, CTNNB1)의 감소된 발현을 일으키는 작용을 지칭한다.

[0046] **상보성 영역**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성 영역"은 적절한 혼성화 조건하에, 예를 들어 포스페이트 완충제에서, 세포 등에서 뉴클레오티드의 두 서열 사이에 혼성화를 허용하기 위해 뉴클레오티드의 역평행 서열 (예를 들어, mRNA 내의 표적 뉴클레오티드 서열)에 대해 충분히 상보성인 핵산의 뉴클레오티드의 서열 (예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드)을 지칭한다. 상보성 영역은 뉴클레오티드 서열 (예를 들어, mRNA 내에 존재하는 표적 뉴클레오티드 서열 또는 그의 일부분)에 대해 완전히 상보성일 수 있다. 예를 들어, mRNA에 존재하는 뉴클레오티드 서열에 대해 완전히 상보성인 상보성 영역은 임의의 미스매치 또는 갭이 없이 mRNA에서 상응하는 서열에 대해 상보성인 뉴클레오티드의 연속적인 서열을 갖는다. 대안적으로, 상보성 영역은 뉴클레오티드 서열 (예를 들어, mRNA에 존재하는 뉴클레오티드 서열 또는 그의 일부분)에 대해 부분적으로 상보성일 수 있다. 예를 들어, mRNA에 존재하는 뉴클레오티드 서열에 대해 부분적으로 상보성인 상보성 영역은 mRNA에서 상응하는 서열에 대해 상보성이지만, mRNA에서 상응하는 서열과 비교하여 1개 이상의 미스매치 또는 갭 (예를 들어, 1, 2, 3개 또는 그 초과의 미스매치 또는 갭)을 함유하는 뉴클레오티드의 연속적인 서열을 가지며, 단, 상보성 영역은 적절한 혼성화 조건하에 mRNA와 혼성화할 수 있도록 유지된다.

[0047] **리보뉴클레오티드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "리보뉴클레오티드"는 그의 2' 위치에 히드록실 기를 함유하며 그의 펜토스 당으로서 리보스를 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 변형된 리보뉴클레오티드는, 리보스, 포스페이트 기 또는 염기 내의 또는 그의 변형 또는 치환을 비롯하여, 2' 위치 이외에 있는 원자의 1개 이상의 변형 또는 치환을 갖는 리보뉴클레오티드이다.

[0048] **RNAi 올리고뉴클레오티드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "RNAi 올리고뉴클레오티드"는 (a) 표적 mRNA의 절단에서 안티센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 일부가 아르고너트(Argonaute) 2 (Ago2) 엔도뉴클레아제에 의해 사용되는 것인, 센스 가닥 (패신저) 및 안티센스 가닥 (가이드)을 갖는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드, 또는 (b) 표적 mRNA의 절단에서 안티센스 가닥 (또는 해당 안티센스 가닥의 일부)이 Ago2 엔도뉴클레아제에 의해 사용되는 것인, 단일 안티센스 가닥을 갖는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 지칭한다.

[0049] **가닥**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "가닥"은 뉴클레오티드간 연결 (예를 들어, 포스포디에스테르 연결, 포스포로티오에이트 연결)을 통해 함께 연결된 뉴클레오티드의 단일 연속 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 가닥은 2개의 유리 말단, 예를 들어 5'-말단 및 3'-말단을 갖는다.

[0050] **대상체**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 마우스, 토끼 및 인간을 비롯한 임의의 포유류를 의미한다. 한 실시양태에서, 대상체는 인간 또는 비-인간 영장류이다. 용어 "개체" 또는 "환자"는 "대상체"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 청소년 인간 대상체 (예를 들어, 18세 미만, 12세 미만, 6세 미만, 3세 미만)이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 대상체는 성인 인간 대상체 (예를 들어, 18세 이상)이다.

[0051] **합성**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "합성"은 (예를 들어, 기계 (예를 들어, 고체 상태 핵산 합성기)를 사용하여) 인공적으로 합성되거나, 또는 분자를 정상적으로 생성하는 천연 공급원 (예를 들어, 세포 또는 유기체)으로부터 달리 유래되지 않는 핵산 또는 다른 분자에 대해 지칭한다.

[0052] **표적화 리간드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "표적화 리간드"는 관심 조직 또는 세포의 관련 분자 (예를 들어, 수용체)에 선택적으로 결합하고, 다른 물질을 관심 조직 또는 세포에 표적화시키기 위한 목적으로 또 다른 물질에 접합될 수 있는 분자 (예를 들어, 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드 또는 지질)를 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오티드를 특이적인 관심 조직 또는 세포에 표적화시키기 위한 목적으로 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 세포 표면 수용체에 선택적으로 결합한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오티드에 접합될 때, 세포의 표면 상에서 발현된 수용체와의 선택적 결합을 통해 및 올리고뉴클레오티드, 표적화 리간드 및 수용체를 포함하는 복합체의 세포에 의한 엔도좀 내재화를 통해, 특정한 세포에게로 올리고뉴클레오티드의 전달을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오티드가 세포에서 표적화 리간드로부터 방출되도록 세포성 내재화 이후에 또는 동안에 절단되는 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 접합된다.

[0053] **테트라루프**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "테트라루프"는 뉴클레오티드의 플랭킹 서열의 혼성화에 의해 형성된 인접한 듀플렉스의 안정성을 증가시키는 루프를 지칭한다. 안정성에서의 증가는, 무작위로 선택된 뉴클레오티드 서열로 이루어진 비등한 길이를 갖는 루프의 세트로부터 평균적으로 예상되는 인접한 스템 듀플렉스의 T_m보다 높은, 인접한 스템 듀플렉스의 융점 (T_m)에서의 증가로서 검출가능하다. 예를 들어, 테트라루프는 적어도 2개 염기 쌍 길이의 듀플렉스를 포함하는 헤어핀에 10 mM $NaHPO_4$ 중에서 적어도 50℃, 적어도 55℃, 적어도 56℃, 적어도 58℃, 적어도 60℃, 적어도 65℃ 또는 적어도 75℃의 융점을 부여한다. 일부 실시양태에서, 테트라루프는 적층 상호작용에 의해 인접한 스템 듀플렉스에서 염기 쌍을 안정화시킬 수 있다. 또한, 테트라루프에서 뉴클레오티드 사이의 상호작용에는 비-왓슨-크릭 염기 쌍 형성, 적층 상호작용, 수소 결합, 및 접촉 상호작용이 포함되나 이에 제한되지 않는다 (Cheong *et al.*, Nature 1990 Aug. 16; 346(6285):680-2; Heus and Pardi, Science 1991 Jul. 12; 253(5016):191-4). 일부 실시양태에서, 테트라루프는 3 내지 6개 뉴클레오티드를 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 전형적으로 4 내지 5개 뉴클레오티드이다. 특정 실시양태에서, 테트라루프는 변형될 수 있거나 또는 변형되지 않을 수 있는 (예를 들어, 표적화 모이어티에 접합될 수 있거나 또는 접합되지 않을 수 있는) 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오티드를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 한 실시양태에서, 테트라루프는 4개의 뉴클레오티드로 이루어진다. 임의의 뉴클레오티드가 테트라루프에서 사용될 수 있고, 이러한 뉴클레오티드에 대한 표준 IUPAC-IUB 기호는 [Cornish-Bowden (1985) Nucl. Acids Res. 13: 3021-3030]에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다. 예를 들어, 문자 "N"은 임의의 염기가 해당 위치에 있을 수 있음을 의미하기 위해 사용될 수 있고, 문자 "R"은 A (아데닌) 또는 G (구아닌)이 해당 위치에 있을 수 있음을 나타내기 위해 사용될 수 있고, "B"는 C (시토신), G (구아닌), 또는 T (티민)이 해당 위치에 있을 수 있음을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 테트라루프의 예에는 테트라루프의 UNCG 패밀리 (예를 들어, UUCG), 테트라루프의 GNRA 패밀리 (예를 들어, GAAA), 및 CUUG 테트라루프가 포함된다. (Woese *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1990 November; 87(21):8467-71; Antao *et al.*, Nucleic Acids Res. 1991 Nov. 11; 19(21):5901-5). DNA 테트라루프의 예에는 테트라루프의 d(GNNA) 패밀리 (예를 들어, d(GTTA)), 테트라루프의 d(GNRA) 패밀리, 테트라루프의 d(GNAB) 패밀리, 테트라루프의 d(CNNG) 패밀리, 및 테트라루프의 d(TNCG) 패밀리 (예를 들어, d(TTCG))가 포함된다. 예를 들어 [Nakano *et al*. Biochemistry, 41 (48), 14281-14292, 2002. SHINJI *et al*. Nippon Kagakkai Koen Yokoshu VOL. 78th; NO. 2; PAGE. 731 (2000)]을 참고하며, 그들의 관련 개시내용에 대해서는 본원에 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, 테트라루프는 닉킹된 테트라루프 구조 내에 함유된다.

[0054] **치료하다**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다"는 기존 상태 (예를 들어, 질환, 장애)와 관련하여 대상체의 건강 및/또는 복지를 개선시키기 위해 또는 상태의 발병 가능성을 예방하거나 감소시키기 위해, 예를 들어 대상체에게 치료제 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드)의 투여를 통해, 치료를 필요로 하는 대상체에게 치유를 제공하는 작용을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료는 대상체가 경험한 상태 (예를 들어, 질환, 장애)의 적어도 하나의 징후, 증상 또는 기여 인자의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 수반한다.

[0055] **II. 올리고뉴클레오티드-기반 억제제**

[0056] **i. CTNNB1 표적화 올리고뉴클레오티드**

[0057] CTNNB1 표적화 올리고뉴클레오티드를 사용하여, β-카테닌 활성을 감소시킴으로써, 결과적으로 담관 형성을 증가시키고 담즙산 합성을 억제함으로써 담관 부족을 가진 대상체에 대해 치료적 이익을 달성할 수 있다. 임의의 적합한 CTNNB1 표적화 올리고뉴클레오티드가 사용될 수 있다. 예를 들어, CTNNB1 표적화 올리고뉴클레오티드는 국제 특허 출원 PCT/US2011/042820 (2011년 7월 1일 출원); 국제 특허 공개 번호 WO 2012/018754 (2012년 2월 9일 공개); 및 국제 특허 공개 번호 WO 2013/105022 (2013년 7월 18일 공개)에서 확인될 수 있으며, CTNNB1 표

적화 올리고뉴클레오티드에 적용되는 각각의 내용은 모든 목적을 위해 그들의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0058] 표적화 서열은 본원에 기재된 바와 같이 여러 상이한 올리고뉴클레오티드 구조 (또는 포맷)로 표현될 수 있다.

[0059] 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 세포에서 mRNA를 표적화하고 그의 발현을 억제하기 위한 목적으로 CTNNB1 mRNA에 대해 상보성인 영역을 갖도록 설계된다. 상보성 영역은 일반적으로 그의 발현을 억제하기 위한 목적으로 올리고뉴클레오티드 (또는 그의 가닥)를 CTNNB1 mRNA에 어닐링하기에 적합한 길이 및 염기 함량을 갖는다.

[0060] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 3에 제시된 서열에 대해 그의 길이를 따라 적어도 부분적으로 상보성인 (예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 상에) 상보성 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 3에 제시된 서열에 대해 그의 길이를 따라 완전히 상보성인 (예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 상에) 상보성 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 3에 제시된 서열의 연속 뉴클레오티드에 대해 상보성인 올리고뉴클레오티드의 상보성 영역은 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐 이어진다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 3 중 어느 하나에 제시된 서열의 연속 뉴클레오티드에 대해 상보성인 올리고뉴클레오티드의 상보성 영역은 안티센스 가닥의 전체 길이의 일부분에 걸쳐 이어진다 (예를 들어, 안티센스 가닥의 3' 말단에 있는 2개의 뉴클레오티드를 제외한 모두).

[0061] 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 12 내지 30개 (예를 들어, 12 내지 30, 12 내지 22, 15 내지 25, 17 내지 21, 18 내지 27, 19 내지 27, 또는 15 내지 30개) 범위의 뉴클레오티드 길이인 CTNNB1에 대해 상보성인 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오티드 길이인 CTNNB1에 대해 상보성인 영역을 갖는다.

[0062] 일부 실시양태에서, CTNNB1에 대해 상보성인 영역은 CTNNB1 mRNA의 상응하는 서열과 비교하여 1개 이상의 미스매치를 가질 수 있다. 적절한 혼성화 조건하에 CTNNB1 mRNA와 상보성 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 올리고뉴클레오티드 상의 상보성 영역은 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하 등의 미스매치를 가질 수 있다. 대안적으로, 적절한 혼성화 조건하에 CTNNB1 mRNA와 상보성 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 올리고뉴클레오티드 상의 상보성 영역은 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하 또는 5개 이하의 미스매치를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역에 1개 초과의 미스매치가 있는 경우, 올리고뉴클레오티드가 적절한 혼성화 조건하에 CTNNB1 mRNA와 상보성 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 이들은 상보성 영역에 걸쳐 연속하여 (예를 들어, 연이어 2, 3, 4개 또는 그 초과) 또는 산재하여 위치할 수 있다.

[0063] **ii. 올리고뉴클레오티드 구조**

[0064] 본 개시내용의 방법에서 CTNNB1 mRNA를 표적화하는데 유용한 올리고뉴클레오티드의 다양한 구조, 예컨대 RNAi, 안티센스, miRNA 등이 있다. 본원에 또는 다른 곳에 기재된 임의의 구조가 CTNNB1 mRNA를 표적화하기 위한 프레임워크로서 사용될 수 있다. (예를 들어, RNAi 경로를 통해) CTNNB1 발현을 표적화하기 위한 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 서로 듀플렉스를 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥은 공유적으로 연결되지 않는다. 그러나, 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥은 공유적으로 연결된다.

[0065] 일부 실시양태에서, CTNNB1 발현의 발현을 감소시키기 위한 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 RNA 간섭 (RNAi)과 결속된다. 예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드는 1 내지 5개 뉴클레오티드의 적어도 1개의 3' 오버행과 함께 19-25개 뉴클레오티드의 크기를 갖는 각각의 가닥으로 개발되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,372,968 참고). 활성 RNAi 생성물을 생성하도록 다이서에 의해 가공된 더 긴 올리고뉴클레오티드 또한 개발되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,883,996 참고). 추가의 작업은, 가닥들 중 하나가 열역학적-안정화 테트라루프 구조를 포함하는 것인 구조를 비롯하여, 적어도 1개의 가닥의 적어도 1개의 말단이 듀플렉스 표적화 영역을 넘어서 연장된 것인, 연장된 이중-가닥 올리고뉴클레오티드를 생성하였다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,513,207 및 8,927,705, 뿐만 아니라 WO2010033225 참고, 이들 올리고뉴클레오티드의 개시내용에 대해서는 본원에 참고로 포함됨). 이러한 구조는 단일-가닥 연장부 (분자의 한쪽 또는 양쪽 상에) 뿐만 아니라 이중-가닥 연장부를 포함할 수 있다.

[0066] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 서열은 둘 다 17 내지 36개 뉴클레오티드 길이인 센스 및 안티센스 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오티드에 포함될 수 있거나 또는 그를 사용하여 표적화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 그들의 센스 가닥의 3' 연장부 내에 테트라루프 구조, 및 그의 안티센스 가닥의 3' 말단에 2개의 말단 오버행 뉴클레오티드를 갖는, 이러한 서열이 도입된 올리고뉴클레오티드가 제공된다. 일부 실시양태에서, 2개의 말단 오버행 뉴클레오티드는 GG이다. 전형적으로, 안티센스 가닥의 2개의 말단 GG 뉴클레오티드 중 하나 또는 둘 다는 표적에 대해 상보성이거나 또는 상보성이 아니다.

[0067] 일부 실시양태에서, 둘 다 21 내지 23개 범위의 뉴클레오티드 길이인 센스 및 안티센스 가닥을 갖는, 이러한 서열이 도입된 올리고뉴클레오티드가 제공된다. 일부 실시양태에서, 3' 오버행은 1 또는 2개 뉴클레오티드 길이인 센스, 안티센스, 또는 센스 및 안티센스 가닥 둘 다에 제공된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 23개 뉴클레오티드의 가이드 가닥 및 21개 뉴클레오티드의 패신저 가닥을 갖고, 패신저 가닥의 3'-말단 및 가이드 가닥의 5'-말단은 평활 말단을 형성하고, 가이드 가닥은 2개 뉴클레오티드 3' 오버행을 갖는다.

[0068] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 21 내지 23개 범위의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 올리고뉴클레오티드는 센스 및/또는 안티센스 가닥의 3' 말단에 오버행 (예를 들어, 1, 2 또는 3개 뉴클레오티드 길이)을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, siRNA)는 표적 RNA에 대해 안티센스인 21개 뉴클레오티드 가이드 가닥, 및 상보성 패신저 가닥을 포함할 수 있고, 두 가닥 모두 어닐링되어 19-bp 듀플렉스 및 하나의 또는 둘 다의 3' 말단에 2개 뉴클레오티드 오버행을 형성한다. 예를 들어, US9012138, US9012621 및 US9193753을 참고하며, 이들 각각의 내용은 관련 개시내용에 대해 본원에 포함된다.

[0069] 일부 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 안티센스-센스 듀플렉스를 넘어서 연장되는 영역을 포함하는 36개 뉴클레오티드 센스 가닥을 가지며, 연장 영역은 스템-테트라루프 구조를 갖고, 스템은 6개 염기 쌍 듀플렉스이고, 테트라루프는 4개의 뉴클레오티드를 갖는다. 이들 특정한 실시양태에서, 테트라루프 뉴클레오티드 중 3개 또는 4개 각각은 1가 GalNac 리간드에 접합된다.

[0070] 일부 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 다이서 효소에 의해 작동될 때 성숙 RISC에 도입된 안티센스 가닥을 생성하는 25개 뉴클레오티드 센스 가닥 및 27개 뉴클레오티드 안티센스 가닥을 포함한다. [[이 구조에 관한 참고문헌 삽입 - 출원을 보류하지 않음]]

[0071] 본원에 개시된 조성물 및 방법에서 사용하기 위한 다른 올리고뉴클레오티드 설계에는 다음이 포함된다: 16량체 siRNA (예를 들어, Nucleic Acids in Chemistry and Biology. Blackburn (ed.), Royal Society of Chemistry, 2006 참고), shRNA (예를 들어, 19 bp 또는 그보다 짧은 스템을 가짐; 예를 들어, Moore *et al*. Methods Mol. Biol. 2010; 629:141-158 참고), 평활 siRNA (예를 들어, 19 bp 길이; 예를 들어, Kraynack and Baker, RNA Vol. 12, p163-176 (2006) 참고), 비대칭 siRNA (aiRNA; 예를 들어, Sun *et al*., Nat. Biotechnol. 26, 1379-1382 (2008) 참고), 비대칭의 더 짧은-듀플렉스 siRNA (예를 들어, Chang *et al*., Mol Ther. 2009 Apr; 17(4): 725-32 참고), 포크 siRNA (예를 들어, Hohjoh, FEBS Letters, Vol 557, issues 1-3; Jan 2004, p 193-198 참고), 단일-가닥 siRNA (Elsner; Nature Biotechnology 30, 1063 (2012)), 덤벨-형태의 원형 siRNA (예를 들어, Abe *et al*. J Am Chem Soc 129: 15108-15109 (2007) 참고), 및 소형의 내부 세그먼트화된 간섭 RNA (sisiRNA; 예를 들어, Bramsen *et al*., Nucleic Acids Res. 2007 Sep; 35(17): 5886-5897 참고). 상기 각각의 참고문헌은 관련된 개시내용에 대해 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다. CTNNB1의 발현을 감소시키거나 또는 억제하기 위해 일부 실시양태에서 사용될 수 있는 올리고뉴클레오티드 구조의 추가의 비제한적인 예는 마이크로RNA (miRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 및 짧은 siRNA (예를 들어, Hamilton *et al*., Embo J., 2002, 21(17): 4671-4679 참고; 또한 미국 출원 번호 20090099115 참고)이다.

[0072] **a. 안티센스 가닥**

[0073] 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 40개 이하의 뉴클레오티드 길이 (예를 들어, 40개 이하, 35개 이하, 30개 이하, 27개 이하, 25개 이하, 21개 이하, 19개 이하, 17개 이하, 또는 12개 이하의 뉴클레오티드 길이)의 안티센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 12개 뉴클레오티드 길이 (예를 들어, 적어도 12, 적어도 15, 적어도 19, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 25, 적어도 27, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 38개 뉴클레오티드 길이)의 안티센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 12 내지 40개 (예를 들어, 12 내지 40, 12 내지 36, 12 내지 32, 12 내지 28, 15 내지 40, 15 내지 36, 15 내지 32, 15 내지 28, 17 내지 21, 17 내지 25, 19 내지 27, 19 내지 30, 20 내지 40, 22 내지 40, 25 내지 40, 또는 32 내지 40개 범위의) 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 가질 수 있다. 일부

실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 가질 수 있다.

[0074] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥은 "가이드 가닥"으로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 가닥이 RNA-유도된 침묵 복합체 (RISC)와 결속될 수 있고 아르고너트 단백질에 결합할 수 있거나, 또는 1개 이상의 유사한 인자와 결속하거나 또는 그와 결합할 수 있고, 표적 유전자의 침묵을 지시할 수 있다면, 이는 가이드 가닥으로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥에 대해 상보성인 센스 가닥은 "패신저 가닥"으로 지칭될 수 있다.

[0075] **b. 센스 가닥**

[0076] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 40개 이하의 뉴클레오티드 길이 (예를 들어, 40개 이하, 36개 이하, 30개 이하, 27개 이하, 25개 이하, 21개 이하, 19개 이하, 17개 이하, 또는 12개 이하의 뉴클레오티드 길이)의 센스 가닥 (또는 패신저 가닥)을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 12개 뉴클레오티드 길이 (예를 들어, 적어도 12, 적어도 15, 적어도 19, 적어도 21, 적어도 25, 적어도 27, 적어도 30, 적어도 36, 또는 적어도 38개 뉴클레오티드 길이)의 센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 12 내지 40개 (예를 들어, 12 내지 40, 12 내지 36, 12 내지 32, 12 내지 28, 15 내지 40, 15 내지 36, 15 내지 32, 15 내지 28, 17 내지 21, 17 내지 25, 19 내지 27, 19 내지 30, 20 내지 40, 22 내지 40, 25 내지 40, 또는 32 내지 40개) 범위의 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 가질 수 있다.

[0077] 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 그의 3'-말단에 스템-루프 구조를 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 그의 5'-말단에서 스템-루프 구조를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스템은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개 염기 쌍 길이의 듀플렉스이다. 일부 실시양태에서, 스템-루프는 분자에게 분해 (예를 들어, 효소적 분해)에 대한 보다 양호한 보호를 제공하고, 표적 세포로의 전달을 위한 표적화 특징을 용이하게 한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 루프는 올리고뉴클레오티드의 유전자 발현 억제 활성에 실질적으로 영향을 미치지 않고 변형이 이루어질 수 있는 부가된 뉴클레오티드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 센스 가닥은 (예를 들어, 그의 3'-말단에서) S_1-L-S_2로 제시된 스템-루프를 포함하고, S_1은 S_2에 대해 상보성이고, L은 S_1과 S_2 사이에 10개 이하의 뉴클레오티드 길이 (예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 뉴클레오티드 길이)의 루프를 형성하는 것인 올리고뉴클레오티드가 본원에 제공된다.

[0078] 일부 실시양태에서, 스템-루프의 루프 (L)는 (예를 들어, 닉킹된 테트라루프 구조 내의) 테트라루프이다. 테트라루프는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드, 및 이들의 조합물을 함유할 수 있다. 전형적으로, 테트라루프는 4 내지 5개의 뉴클레오티드를 갖는다.

[0079] **c. 듀플렉스 길이**

[0080] 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 적어도 12개 (예를 들어, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20 또는 적어도 21개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 12-30개 범위의 뉴클레오티드 길이 (예를 들어, 12 내지 30, 12 내지 27, 12 내지 22, 15 내지 25, 18 내지 30, 18 내지 22, 18 내지 25, 18 내지 27, 18 내지 30, 19 내지 30 또는 21 내지 30개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐 이어지지 않는다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이의 듀플렉스는 센스 또는 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐 이어진다. 특정 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이의 듀플렉스는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 다의 전체 길이에 걸쳐 이어진다.

[0081] **d. 올리고뉴클레오티드 말단**

[0082] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 또는 안티센스 가닥, 또는 센스 및 안티센스 가닥 둘 다에 3'-오버행이 있도록 센스 및 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 다른 5' 말단과 비교하여 열역학적으로 덜 안정한 1개의 5' 말단을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 3' 말단에서 평활 말단 및 안티센스 가닥의 3' 말단에서 오버행을 포함하는 비대칭 올리고뉴클레오티드가 제공된다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥 상의 3' 오버행은 1-8개 뉴클레오티드 길이 (예

를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 뉴클레오티드 길이)이다.

[0083] 전형적으로, RNAi에 대한 올리고뉴클레오티드는 안티센스 (가이드) 가닥의 3' 말단 상에 2개의 뉴클레오티드 오버행을 갖는다. 그러나, 다른 오버행이 가능하다. 일부 실시양태에서, 오버행은 1 내지 6개 뉴클레오티드, 임의적으로 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 6개 뉴클레오티드, 또는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오티드 길이를 포함하는 3' 오버행이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 오버행은 1 내지 6개 뉴클레오티드, 임의적으로 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 6개 뉴클레오티드, 또는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오티드 길이를 포함하는 5' 오버행이다.

[0084] 일부 실시양태에서, 센스 및/또는 안티센스 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단의 1개 이상의 (예를 들어, 2, 3, 4개) 말단 뉴클레오티드가 변형된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단의 1 또는 2개의 말단 뉴클레오티드가 변형된다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단에서 마지막 뉴클레오티드가 변형되고, 예를 들어 2'-변형, 예를 들어 2'-O-메톡시에틸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단에서 마지막 1 또는 2개의 말단 뉴클레오티드는 표적에 대해 상보성이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단에서 마지막 1 또는 2개의 뉴클레오티드는 표적에 대해 상보성이 아니다. 일부 실시양태에서, 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 말단 및/또는 3' 말단은 역전된 캡 뉴클레오티드를 갖는다.

[0085] **e. 미스매치**

[0086] 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 1개 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개) 미스매치가 있다. 센스 및 안티센스 가닥 사이에 1개 초과의 미스매치가 있다면, 이들은 상보성 영역에 걸쳐 연속하여 (예를 들어, 연이어 2, 3개 이상) 또는 산재하여 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 3'- 말단은 1개 이상의 미스매치를 함유한다. 한 실시양태에서, 2개의 미스매치가 센스 가닥의 3' 말단에 포함된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥의 3'-말단에서 염기 미스매치 또는 세그먼트 탈안정화는 가능하게는 다이서에 의한 가공을 촉진시킴으로써 RNAi에서 합성 듀플렉스의 효능을 개선시켰다.

[0087] **iii. 단일-가닥 올리고뉴클레오티드**

[0088] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 CTNNB1 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥이다. 이러한 구조에는 단일-가닥 RNAi 올리고뉴클레오티드가 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 최근의 노력은 단일-가닥 RNAi 올리고뉴클레오티드의 활성을 입증하였다 (예를 들어, Matsui *et al.* (May 2016), Molecular Therapy, Vol. 24(5), 946-955 참고). 그러나, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5'에서 3' 방향으로 쓰여질 때 특정한 핵산의 표적화된 세그먼트의 역 상보체를 포함하는 핵염기 서열을 갖는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드이며, (예를 들어, 갭머로서) 세포에서 그의 표적 RNA의 RNaseH 매개된 절단을 유도하기 위해 또는 (예를 들어, 믹스머로서) 세포에서 표적 mRNA의 번역을 억제하기 위해 적합하게 변형된다. 본 개시내용에서 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방식으로, 예를 들어 미국 특허 번호 9,567,587에 기재된 바와 같이 변형될 수 있으며, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 변형 (예를 들어, 길이, 핵염기 (피리미딘, 퓨린)의 당 모이어티, 및 핵염기의 헤테로시클릭 부분의 변경)과 관련된 그의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다. 추가로, 안티센스 분자는 특이적 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위해 수십년 동안 사용되어 왔다 (예를 들어, Bennett *et al.*; Pharmacology of Antisense Drugs, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Vol. 57: 81-105 참고).

[0089] **iv. 올리고뉴클레오티드 변형**

[0090] 올리고뉴클레오티드는 특이성, 안정성, 전달, 생체이용률, 뉴클레아제 분해로부터의 내성, 면역원성, 염기-쌍 형성 성질, RNA 분포 및 세포 흡수, 및 치료 또는 연구 사용과 관련된 다른 특징을 개선시키거나 또는 조절하기 위해 다양한 방식으로 변형될 수 있다. 예를 들어, [Bramsen *et al.*, Nucleic Acids Res., 2009, 37, 2867-2881; Bramsen and Kjems (Frontiers in Genetics, 3 (2012): 1-22)]를 참고한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 적합한 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 그의 염기 (또는 핵염기), 당 (예를 들어, 리보스, 데옥시리보스), 또는 포스페이트 기에서 변형을 갖는다.

[0091] 올리고뉴클레오티드 상에서 변형의 개수 및 이들 뉴클레오티드 변형의 위치는 올리고뉴클레오티드의 성질에 영

향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 그들을 지질 나노입자 (LNP) 또는 유사한 담체에 접합시키거나 또는 포괄시킴으로써 생체내로 전달될 수 있다. 그러나, 올리고뉴클레오티드가 LNP 또는 유사한 담체에 의해 보호되지 않을 경우에는 (예를 들어, "네이키드 전달"), 그의 뉴클레오티드의 적어도 일부가 변형되는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 임의의 올리고뉴클레오티드의 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 모든 또는 실질적으로 모든 뉴클레오티드가 변형된다. 특정 실시양태에서, 절반이 넘는 뉴클레오티드가 변형된다. 특정 실시양태에서, 절반 미만의 뉴클레오티드가 변형된다. 전형적으로, 네이키드 전달에 의해, 모든 뉴클레오티드가 해당 뉴클레오티드의 당 기의 2'-위치에서 변형된다. 이들 변형은 가역적일 수 있거나 또는 비가역적일 수 있다. 전형적으로, 2'-위치 변형은 2'-플루오로, 2'-O-메틸 등이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 원하는 특징 (예를 들어, 효소적 분해로부터의 보호, 생체내 투여 후에 원하는 세포를 표적화하는 능력, 및/또는 열역학적 안정성)을 유발하기에 충분한 개수 및 유형의 변형된 뉴클레오티드를 갖는다.

[0092] **a. 당 변형**

[0093] 일부 실시양태에서, 변형된 당 (본원에서 당 유사체로도 지칭됨)은 예를 들어 1개 이상의 변형이 당의 2', 3', 4' 및/또는 5' 탄소 위치에서 발생하는 것인 변형된 데옥시리보스 또는 리보스 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 당은 또한 비천연의 대안적인 탄소 구조체, 예컨대 록킹된 핵산 ("LNA") (예를 들어, Koshkin *et al*. (1998), Tetrahedron 54, 3607-3630 참고), 록킹되지 않은 핵산 ("UNA") (예를 들어, Snead *et al*. (2013), Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2, e103 참고), 및 브릿지된 핵산 ("BNA") (예를 들어, Imanishi and Obika (2002), The Royal Society of Chemistry, Chem. Commun., 1653-1659 참고)에 존재하는 것들을 포함할 수 있다. [Koshkin *et al*., Snead *et al*., 및 Imanishi and Obika]는 당 변형에 관한 그들의 개시내용에 대해 본원에 참고로 포함된다.

[0094] 일부 실시양태에서, 당에서의 뉴클레오티드 변형은 2'-변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 2'-변형은 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 또는 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산일 수 있다. 전형적으로, 변형은 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 또는 2'-O-메톡시에틸이다. 그러나, 올리고뉴클레오티드에서 사용하기 위해 개발되었던 매우 다양한 2' 위치 변형이 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드에서 이용될 수 있다. 예를 들어, [Bramsen et al., Nucleic Acids Res., 2009, 37, 2867-2881]을 참고한다. 일부 실시양태에서, 당에서의 변형은 당 고리의 변형을 포함하고, 이는 당 고리의 1개 이상의 탄소의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오티드의 당의 변형은 당의 2'-탄소와 1'-탄소 또는 4'-탄소 사이의 연결을 포함할 수 있다. 예를 들어, 연결은 에틸렌 또는 메틸렌 브릿지를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 2'-탄소와 3'-탄소의 결합이 결여된 아시클릭 당을 갖는다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 예를 들어 당의 4' 위치에서 티올 기를 갖는다.

[0095] 일부 실시양태에서, 말단의 3'-말단 기 (예를 들어, 3'-히드록실)는 포스페이트 기 또는 다른 기이고, 예를 들어 링커, 어댑터 또는 표지를 부착시키기 위해 또는 올리고뉴클레오티드를 또 다른 핵산에 직접적으로 라이게이션시키기 위해 사용될 수 있다.

[0096] **b. 5' 말단 포스페이트**

[0097] 올리고뉴클레오티드의 5'-말단 포스페이트 기는 아르고너트 2와의 상호작용을 증강시킬 수 있거나, 또는 일부 실시양태에서 증강시킨다. 그러나, 5'-포스페이트 기를 포함하는 올리고뉴클레오티드는 포스파타제 또는 다른 효소를 통해 분해되기 쉬울 수 있고, 이는 생체 내에서 그들의 생체이용률을 제한할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 이러한 분해에 대해 내성인 5' 포스페이트의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸포스포네이트, 비닐포스포네이트, 또는 말로닐포스포네이트일 수 있다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단은 천연 5'-포스페이트 기의 정전기적 및 입체적 성질을 모방하는 화학적 모이어티 ("포스페이트 모방체")에 부착된다 (예를 들어, Prakash *et al*. (2015), Nucleic Acids Res., Nucleic Acids Res. 2015 Mar 31; 43(6): 2993-3011 참고, 포스페이트 유사체에 관한 내용은 본원에 참고로 포함됨). 5' 말단에 부착될 수 있는 여러 포스페이트 모방체가 개발되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,927,513 참고, 포스페이트 유사체에 관한 내용은 본원에 참고로 포함됨). 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 대한 다른 변형이 개발되었다 (예를 들어, WO 2011/133871 참고, 포스페이트 유사체에 관한 내용은 본원에 참고로 포함됨). 특정 실시양태에서, 히드록실 기는 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 부착된다.

[0098] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 당의 4'-탄소 위치에서 포스페이트 유사체 ("4'-포스페이트 유사체"로 지칭됨)를 갖는다. 예를 들어, 2017년 9월 1일에 출원한 국제 특허 출원 PCT/US2017/049909, 2016년 9월 2

일에 출원한, "4'-포스페이트 유사체 및 그를 포함하는 올리고뉴클레오티드"의 명칭을 갖는 미국 가출원 번호 62/383,207, 및 2016년 9월 12일에 출원한, "4'-포스페이트 유사체 및 그를 포함하는 올리고뉴클레오티드"의 명칭을 갖는 62/393,401을 참고하며, 포스페이트 유사체에 관한 이들 각각의 내용은 본원에 포함된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 5'-말단 뉴클레오티드에 4'-포스페이트 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸 기의 산소 원자가 (예를 들어, 그의 4'-탄소에서) 당 모이어티에 결합되어 있는 옥시메틸포스포네이트 또는 그의 유사체이다. 다른 실시양태에서, 4'-포스페이트 유사체는 티오메틸 기의 황 원자 또는 아미노메틸 기의 질소 원자가 당 모이어티의 4'-탄소에 결합되어 있는 티오메틸포스포네이트 또는 아미노메틸포스포네이트, 또는 그의 유사체이다. 특정 실시양태에서, 4'-포스페이트 유사체는 옥시메틸포스포네이트이다. 일부 실시양태에서, 옥시메틸포스포네이트는 화학식 $-O-CH_2-PO(OH)_2$ 또는 $-O-CH_2-PO(OR)_2$로 표현되며, 여기서 R은 H, CH_3, 알킬 기, CH_2CH_2CN, $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCH_2CH_2Si(CH_3)_3$, 또는 보호기로부터 독립적으로 선택된다. 특정 실시양태에서, 알킬 기는 CH_2CH_3이다. 더욱 전형적으로, R은 H, CH_3 또는 CH_2CH_3으로부터 독립적으로 선택된다.

[0099] **c. 변형된 뉴클레오시드간 연결**

[0100] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오시드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 변형 또는 치환은 적어도 1개의 (예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3 또는 적어도 5개) 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나는 1 내지 10개의 (예를 들어, 1 내지 10, 2 내지 8, 4 내지 6, 3 내지 10, 5 내지 10, 1 내지 5, 1 내지 3 또는 1 내지 2개) 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함한다.

[0101] 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로디티오에이트 연결, 포스포로티오에이트 연결, 포스포트리에스테르 연결, 티오노알킬포스포네이트 연결, 티오노알킬포스포트리에스테르 연결, 포스포르아미다이트 연결, 포스포네이트 연결 또는 보라노포스페이트 연결일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이다.

[0102] **d. 염기 변형**

[0103] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 1개 이상의 변형된 핵염기를 갖는다. 일부 실시양태에서, 변형된 핵염기 (본원에서 염기 유사체로도 지칭됨)는 뉴클레오티드 당 모이어티의 1' 위치에서 연결된다. 특정 실시양태에서, 변형된 핵염기는 질소성 염기이다. 특정 실시양태에서, 변형된 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, 미국 공개 특허 출원 번호 20080274462를 참고한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 보편적 염기를 포함한다. 그러나, 특정 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 핵염기를 함유하지 않는다 (무염기).

[0104] 일부 실시양태에서, 보편적 염기는 변형된 뉴클레오티드에서 뉴클레오티드 당 모이어티의 1' 위치에 또는 뉴클레오티드 당 모이어티 치환에서 동등한 위치에 위치하는 헤테로시클릭 모이어티이며, 이는 듀플렉스로 존재할 때 듀플렉스의 구조를 실질적으로 변경시키지 않고 1가지 유형 초과의 염기에 대향하여 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산에 대해 완전히 상보성인 기준 단일-가닥 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드)과 비교하여, 보편적 염기를 함유하는 단일-가닥 핵산은 상보성 핵산과 함께 형성된 듀플렉스보다 낮은 Tm을 갖는, 표적 핵산과의 듀플렉스를 형성한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 보편적 염기가 단일 미스매치를 생성하도록 하는 염기로 대체된 기준 단일-가닥 핵산과 비교하여, 보편적 염기를 함유하는 단일-가닥 핵산은 미스매치된 염기를 포함하는 핵산과 함께 형성된 듀플렉스보다 높은 T_m을 갖는, 표적 핵산과의 듀플렉스를 형성한다.

[0105] 보편적-결합 뉴클레오티드의 비제한적인 예에는 이노신, 1-β-D-리보푸라노실-5-니트로인돌, 및/또는 1-β-D-리보푸라노실-3-니트로피롤이 포함된다 (Quay 등의 미국 특허 출원 공개 번호 20070254362; Van Aerschot *et al.*, An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside. Nucleic Acids Res. 1995 Nov 11;23(21):4363-70; Loakes *et al.*, 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR. Nucleic Acids Res. 1995 Jul 11;23(13):2361-6; Loakes and Brown, 5-Nitroindole as an universal base analogue. Nucleic Acids Res. 1994 Oct 11;22(20):4039-43. 이들 각각은 염기 변형에 관한 그들의 개시내용에 대해 본원에 참고로 포함됨).

[0106] **e. 가역적인 변형**

[0107] 표적 세포에 도달하기 전에 생체내 환경으로부터 올리고뉴클레오티드를 보호하기 위한 특정한 변형이 이루어질 수 있지만, 이는 올리고뉴클레오티드가 표적 세포의 시토졸에 도달하였을 때 그의 효능 또는 활성을 감소시킬 수 있다. 분자가 세포 밖에서 바람직한 성질을 보유하도록 하는 가역적인 변형이 이루어질 수 있고, 이는 세포의 시토졸 환경에 들어갈 때 제거된다. 가역적인 변형은 예를 들어 세포내 효소의 작용에 의해 또는 세포 내의 화학적 조건에 의해 (예를 들어, 세포내 글루타티온에 의한 감소를 통해) 제거될 수 있다.

[0108] 일부 실시양태에서, 가역적으로 변형된 뉴클레오티드는 글루타티온-민감성 모이어티를 포함한다. 전형적으로, 뉴클레오티드간 디포스페이트 연결에 의해 생성된 음의 전하를 차폐시키고, 세포 흡수 및 뉴클레아제 내성을 개선시키기 위해, 핵산 분자를 시클릭 디술피드 모이어티에 의해 화학적으로 변형시켰다. 트라베르사 테라퓨틱스, 인크.(Traversa Therapeutics, Inc.) ("Traversa")에게 원래 양도된 미국 공개 출원 번호 2011/0294869, 솔스티스 바이올로직스, 리미티드(Solstice Biologics, Ltd.) ("Solstice")에게 양도된 PCT 공개 번호 WO 2015/188197, [Meade *et al.*, *Nature Biotechnology*, 2014,32:1256-1263] ("Meade"), 머크 샤프 앤 돔 코퍼레이션(Merck Sharp & Dohme Corp)에게 양도된 PCT 공개 번호 WO 2014/088920을 참고하며, 이들 각각은 이러한 변형에 관한 그들의 개시내용에 대해 참고로 포함된다. 뉴클레오티드간 디포스페이트 연결의 이러한 가역적인 변형은 시토졸의 환원 환경 (예를 들어 글루타티온)에 의해 세포 내에서 절단되도록 설계된다. 초기의 예에는 세포 내에서 절단가능한 것으로 보고된 포스포트리에스테르 변형을 중화시키는 것이 포함된다 (Dellinger *et al. J. Am. Chem. Soc.* 2003,125:940-950).

[0109] 일부 실시양태에서, 이러한 가역적인 변형은 올리고뉴클레오티드가 뉴클레아제 및 다른 혹독한 환경 조건 (예를 들어, pH)에 노출되는 생체내 투여 (예를 들어, 혈액 및/또는 세포의 리소좀/엔도좀 구획을 통한 이동) 동안에 보호를 가능하게 한다. 글루타티온 수준이 세포외 공간에 비해 높은 세포의 시토졸로 방출될 때, 변형이 역전되고, 결과는 절단된 올리고뉴클레오티드이다. 가역적인 글루타티온 민감성 모이어티를 사용하면, 비가역적인 화학적 변형을 사용하여 이용가능한 옵션과 비교하여 입체적으로 더 큰 화학적 기를 관심 올리고뉴클레오티드에 도입시키는 것이 가능하다. 이는 이들 더 큰 화학적 기가 시토졸에서 제거될 것이고, 따라서 세포의 시토졸 내에서 올리고뉴클레오티드의 생물학적 활성을 방해하지 않아야 하기 때문이다. 결과적으로, 이들 더 큰 화학적 기는 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드에 대해 다양한 이점, 예컨대 뉴클레아제 내성, 친유성, 전하, 열안정성, 특이성, 및 감소된 면역원성을 부여하도록 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티의 구조는 그의 방출 동역학을 변경시키도록 조작될 수 있다.

[0110] 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 뉴클레오티드의 당에 부착된다. 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 변형된 뉴클레오티드의 당의 2'-탄소에 부착된다. 일부 실시양태에서, 특히 변형된 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드의 5'-말단 뉴클레오티드일 때, 글루타티온-민감성 모이어티는 당의 5'-탄소에 위치한다. 일부 실시양태에서, 특히 변형된 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드의 3'-말단 뉴클레오티드일 때, 글루타티온-민감성 모이어티는 당의 3'-탄소에 위치한다. 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 술포닐 기를 포함한다. 예를 들어, 2018년 3월 1일에 공개된 국제 특허 출원 공보 WO2018/039364, 및 2016년 8월 23일에 출원한 "가역적으로 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물 및 그의 용도"의 명칭을 갖는 미국 가출원 번호 62/378,635를 참고하며, 그의 관련 개시내용에 대한 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0111] **v. 표적화 리간드**

[0112] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드를 하나 이상의 세포 또는 하나 이상의 기관에 대해 표적화하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 전략은 다른 기관에서 바람직하지 않은 효과를 피하는데 도움이 될 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오티드로부터 이익을 얻지 않는 세포, 조직 또는 기관으로의 올리고뉴클레오티드의 과도한 손실을 피할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 특정한 조직, 세포 또는 기관의 표적화를 용이하게 하도록, 예를 들어 간으로 올리고뉴클레오티드의 전달을 용이하게 하도록 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 간의 간세포로 올리고뉴클레오티드의 전달을 용이하게 하도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 1개 이상의 표적화 리간드에 접합된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0113] 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 단백질의 일부 (예를 들어, 항체 또는 항체 단편) 또는 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 압타머이다. 예를 들어, 표적화 리간드는 종양 맥관구조 또는 신경교종 세포를 표적화하기 위해 사용되는 RGD 펩티드, 종양 맥관구조 또는 스토마를 표적화하기 위해 사용되는 CREKA 펩티드, CNS 맥관구조 상에서 발현된 트랜스페린 수용체

를 표적화하기 위해 사용되는 트랜스페린, 락토페린 또는 압타머, 또는 신경교종 세포 상의 EGFR을 표적화하기 위해 사용되는 항-EGFR 항체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적화 리간드는 1개 이상의 GalNAc 모이어티이다.

[0114] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 1개 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개) 뉴클레오티드 각각은 별도의 표적화 리간드에 접합된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 2 내지 4개 뉴클레오티드 각각은 별도의 표적화 리간드에 접합된다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드가 칫솔의 강모와 유사하고, 올리고뉴클레오티드가 칫솔과 유사하도록, 표적화 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 말단에서 2 내지 4개 뉴클레오티드에 접합된다 (예를 들어, 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 또는 3' 말단 상의 2 내지 4개 뉴클레오티드 오버행 또는 연장부에 접합됨). 예를 들어 2016년 6월 23일에 공개된 국제 특허 출원 공보 WO 2016/100401 (관련 내용은 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같이, 예를 들어 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥의 5' 또는 3' 말단에서 스템-루프를 포함할 수 있고, 스템의 루프의 1, 2, 3 또는 4개 뉴클레오티드는 표적화 리간드에 개별적으로 접합될 수 있다.

[0115] 일부 실시양태에서, CTNNB1의 발현을 감소시키는 올리고뉴클레오티드를 대상체의 간의 간세포에 대해 표적화시키는 것이 바람직하다. 임의의 적합한 간세포 표적화 모이어티가 이 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0116] GalNAc는 간세포의 동모양 표면에서 주로 발현되고, 말단 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유하는 순환 당단백질 (아시알로당단백질)의 결합, 내재화 및 후속적인 제거에서 주요 역할을 하는 아시알로당단백질 수용체 (ASGPR)에 대한 고친화도 리간드이다. GalNAc 모이어티와 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드의 (간접적인 또는 직접적인) 접합은 이들 올리고뉴클레오티드를 이들 간세포 상에서 발현된 ASGPR에 대해 표적화하기 위해 이용될 수 있다.

[0117] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 1가 GalNAc에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 1개 초과의 1가 GalNAc에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된다 (즉, 2, 3 또는 4개의 1가 GalNAc 모이어티에 접합되고, 전형적으로 3 또는 4개의 1가 GalNAc 모이어티에 접합됨). 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 1개 이상의 2가 GalNAc, 3가 GalNAc, 또는 4가 GalNAc 모이어티에 접합된다.

[0118] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 1개 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개) 뉴클레오티드 각각은 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스템-루프의 루프 (L)의 2 내지 4개 뉴클레오티드 각각은 별도의 GalNAc에 접합된다. 일부 실시양태에서, GalNAc 모이어티가 칫솔의 강모와 유사하고, 올리고뉴클레오티드가 칫솔과 유사하도록, 표적화 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 말단에서 2 내지 4개 뉴클레오티드에 접합된다 (예를 들어, 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 또는 3' 말단 상에서 2 내지 4개 뉴클레오티드 오버행 또는 연장부에 접합됨). 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥의 5' 또는 3' 말단에서 스템-루프를 포함하고, 스템의 루프의 1, 2, 3 또는 4개 뉴클레오티드는 GalNAc 모이어티에 개별적으로 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, GalNAc 모이어티는 센스 가닥의 뉴클레오티드에 접합된다. 예를 들어, 4개의 GalNAc 모이어티가 센스 가닥의 테트라루프에서 뉴클레오티드에 접합될 수 있고, 각각의 GalNAc 모이어티는 1개의 뉴클레오티드에 접합된다.

[0119] 적절한 방법 또는 화학 (예를 들어, 클릭 화학)을 이용하여 표적화 리간드를 뉴클레오티드에 연결시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 클릭 링커를 이용하여 표적화 리간드를 뉴클레오티드에 접합시킨다. 일부 실시양태에서, 아세탈-기반 링커를 이용하여 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 뉴클레오티드에 표적화 리간드를 접합시킨다. 아세탈-기반 링커는 예를 들어 2016년 6월 23일에 출원한 국제 특허 출원 공개 번호 WO2016100401 A1에 개시되어 있으며, 이러한 링커에 관한 내용은 본원에 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, 링커는 불안정한 링커이다. 그러나, 다른 실시양태에서, 링커는 상당히 안정하다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스 연장부 (3, 4, 5 또는 6개 이하의 염기 쌍 길이)가 표적화 리간드 (예를 들어, GalNAc 모이어티)와 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 사이에 제공된다.

[0120] **III. 제형**

[0121] 올리고뉴클레오티드 사용을 용이하게 하기 위해 다양한 제형이 개발되었다. 예를 들어, 분해를 최소화하거나, 전달 및/또는 흡수를 용이하게 하거나, 또는 제형에서 올리고뉴클레오티드에 대해 또 다른 유익한 성질을 제공하는 제형을 이용하여 올리고뉴클레오티드를 대상체 또는 세포 환경으로 전달할 수 있다. 일부 실시양태에서, CTNNB1의 발현을 감소시키기 위해 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 단일-가닥 또는 이중-가닥 올리고뉴클레오티

드)를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 이러한 조성물은 표적 세포의 직면한 환경으로 또는 전신으로 대상체에게 투여될 때 올리고뉴클레오티드의 충분한 부분이 세포에 들어가서 CTNNB1 발현을 감소시키도록 적합하게 제형화될 수 있다. 임의의 다양한 적합한 올리고뉴클레오티드 제형을 이용하여 본원에 개시된 바와 같이 CTNNB1의 감소를 위해 올리고뉴클레오티드를 전달할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 완충제 용액, 예컨대 인산염 완충된 식염수 용액, 리포좀, 미셀 구조체, 및 캡시드 중에서 제형화된다. 일부 실시양태에서, 네이키드 올리고뉴클레오티드 또는 그의 접합체는 물 또는 수성 용액 (예를 들어, pH 조정된 물) 중에서 제형화된다. 일부 실시양태에서, 네이키드 올리고뉴클레오티드 또는 그의 접합체는 염기성 완충된 수성 용액 (예를 들어, PBS) 중에서 제형화된다.

[0122] 양이온성 지질을 갖는 올리고뉴클레오티드의 제형을 이용하여 올리고뉴클레오티드가 세포에 형질감염되는 것을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 양이온성 지질, 예컨대 리포펙션, 양이온성 글리세롤 유도체, 및 다가 양이온성 분자 (예를 들어, 폴리리신)를 이용할 수 있다. 적합한 지질에는 올리고펙타민, 리포펙타민 (라이프 테크놀로지즈(라이프 테크놀로지즈)), NC388 (리보자임 파마슈티컬즈, 인크.(Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.), 콜로라도주 볼더), 또는 퓨진(FuGene) 6 (로쉐(Roche))이 포함되고, 이들 모두는 제조자의 지침에 따라 사용될 수 있다.

[0123] 따라서, 일부 실시양태에서, 제형은 지질 나노입자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 부형제는 리포좀, 지질, 지질 복합체, 미세구, 미세입자, 나노구, 또는 나노입자를 포함하거나, 또는 그를 필요로 하는 대상체의 세포, 조직, 기관 또는 신체에 투여하기 위해 달리 제형화될 수 있다 (예를 들어, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd edition, Pharmaceutical Press, 2013 참고).

[0124] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제형은 부형제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 부형제는 조성물에게 활성 성분의 개선된 안정성, 개선된 흡수, 개선된 가용성 및/또는 치료적 증강을 부여한다. 일부 실시양태에서, 부형제는 완충제 (예를 들어, 시트르산나트륨, 인산나트륨, 트리스 염기, 또는 수산화나트륨) 또는 비히클 (예를 들어, 완충된 용액, 바셀린, 디메틸 술폭시드, 또는 광유)이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 그의 보관 수명을 연장시키기 위해 동결건조된 다음, 사용하기 (예를 들어, 대상체에게 투여하기) 전에 용액으로 만들어진다. 따라서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나를 포함하는 조성물 중의 부형제는 동결건조보호제 (예를 들어, 만니톨, 락토스, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 폴리비닐 피롤리돈), 또는 붕괴 온도 조정제 (예를 들어, 덱스트란, 피콜 또는 젤라틴)일 수 있다.

[0125] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 그의 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화된다. 투여 경로의 예에는 비경구, 예를 들어, 정맥내, 피내, 피하, 경구 (예를 들어, 흡입), 경피 (국소), 경점막 및 직장 투여가 포함된다. 전형적으로, 투여 경로는 정맥내 또는 피하이다.

[0126] 주사 용도에 적합한 제약 조성물은 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위해 멸균 수성 용액 (수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 또는 피하 투여의 경우, 적합한 담체에는 생리 식염수, 정균수, 크레모포어(Cremophor) EL.TM. (바스프(BASF), 뉴저지주 파시패니) 또는 인산염 완충된 식염수 (PBS)가 포함된다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 여러 경우에, 조성물 중에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨 및 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 멸균성 주사 용액은 선택된 용매 중에 필요한 양의 올리고뉴클레오티드를 필요에 따라 상기 나열된 성분들 중 하나 또는 그들의 조합물과 함께 도입시킨 후에, 멸균 여과시킴으로써 제조될 수 있다.

[0127] 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 약 0.1%의 치료제 (예를 들어, CTNNB1 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드) 또는 그 초과를 함유할 수 있지만, 활성 성분(들)의 백분율은 총 조성물의 중량 또는 부피의 약 1% 내지 약 80% 또는 그 초과일 수 있다. 가용성, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 보관 수명, 뿐만 아니라 다른 약리학적 고려사항과 같은 인자가 이러한 제약 제형의 제조에 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 고려될 것이고, 따라서 다양한 용량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다.

[0128] 수많은 실시양태가 본원에 개시된 임의의 올리고뉴클레오티드의 간-표적화된 전달에 관한 것이지만, 다른 조직의 표적화 또한 고려된다.

[0129] **IV. 사용 방법**

[0130] **i. 세포에서 CTNNB1 발현의 감소**

[0131] 일부 실시양태에서, 세포에서 CTNNB1의 발현을 감소시키기 위한 목적으로 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중

어느 하나의 유효량을 세포에 전달하는 방법이 제공된다. 본원에 제공된 방법은 임의의 적절한 세포 유형에서 유용하다. 일부 실시양태에서, 세포는 CTNNB1을 발현하는 임의의 세포 (예를 들어, 간세포, 대식세포, 단핵구-유래된 세포, 전립선암 세포, 뇌, 내분비 조직, 골수, 림프절, 폐, 담낭, 간, 십이지장, 소장, 췌장, 신장, 위장관, 방광, 지방 및 연조직, 및 피부의 세포)이다. 일부 실시양태에서, 세포는 대상체로부터 수득되고 제한된 횟수의 계대를 겪을 수 있는 일차 세포이며, 따라서 세포는 그의 천연의 표현형 성질을 실질적으로 유지한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드가 전달되는 세포는 생체외 또는 시험관내에 있다 (즉, 배양물 중의 세포에 또는 세포가 존재하는 유기체에 전달될 수 있음). 구체적인 실시양태에서, 간세포에서 CTNNB1의 발현만을 감소시키기 위한 목적으로 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 유효량을 세포에 전달하는 방법이 제공된다.

[0132] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드를 함유하는 용액의 주사, 올리고뉴클레오티드로 피복된 입자의 충격, 올리고뉴클레오티드를 함유하는 용액에 세포 또는 유기체의 노출, 또는 올리고뉴클레오티드의 존재하에 세포 막의 전기천공을 비롯하여 적절한 핵산 전달 방법을 이용하여 도입될 수 있다. 올리고뉴클레오티드를 세포에 전달하는 다른 적절한 방법, 예컨대 지질-매개된 담체 수송, 화학물질-매개된 수송, 및 양이온성 리포좀 형질감염, 예컨대 인산칼슘 등이 이용될 수 있다.

[0133] 억제 결과는 세포 또는 대상체의 하나 이상의 성질을 평가하기 위한 적절한 검정에 의해, 또는 CTNNB1 발현을 나타내는 분자 (예를 들어, RNA, 단백질)를 평가하는 생화학적 기술에 의해 확인될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드가 CTNNB1의 발현 수준을 감소시키는 정도는 CTNNB1의 발현 수준 (예를 들어, mRNA 또는 단백질 수준)을 적절한 대조군 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드가 전달되지 않거나 또는 음성 대조군이 전달된 세포 또는 세포 집단에서 CTNNB1 발현 수준)과 비교함으로써 평가된다. 일부 실시양태에서, CTNNB1 발현의 적절한 대조군 수준은 예정된 수준 또는 값일 수 있고, 따라서 대조군 수준을 매번 측정할 필요는 없다. 예정된 수준 또는 값은 다양한 형태를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 예정된 수준 또는 값은 단일 컷-오프 값, 예컨대 중간 또는 평균일 수 있다.

[0134] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드의 투여는 세포에서 CTNNB1 발현 수준을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, CTNNB1 발현 수준에서의 감소는 CTNNB1의 적절한 대조군 수준과 비교하여 1% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 15% 이하, 20% 이하, 25% 이하, 30% 이하, 35% 이하, 40% 이하, 45% 이하, 50% 이하, 55% 이하, 60% 이하, 70% 이하, 80% 이하, 또는 90% 이하로의 감소일 수 있다. 적절한 대조군 수준은 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단에서의 CTNNB1 발현 수준일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 따른 세포로의 올리고뉴클레오티드의 전달 효과는 한정된 기간 후에 평가된다. 예를 들어, CTNNB1 수준은 올리고뉴클레오티드를 세포에 도입한지 적어도 8 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간; 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 14 일 후에 세포에서 분석될 수 있다.

[0135] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 세포에서 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 그의 센스 및 안티센스 가닥)를 발현하도록 조작된 트랜스진의 형태로 전달된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 본원에 개시된 임의의 올리고뉴클레오티드를 발현하도록 조작된 트랜스진을 이용하여 전달된다. 트랜스진은 바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 우두 바이러스, 수두 바이러스, 아데노-연관된 바이러스 또는 단순 포진 바이러스) 또는 비-바이러스 벡터 (예를 들어, 플라스미드 또는 합성 mRNA)를 이용하여 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 대상체에게 직접적으로 주사될 수 있다.

[0136] **ii. 치료 방법**

[0137] 본 개시내용의 측면은 대상체에서 담관 부족의 치료를 위해 CTNNB1 발현을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 유효량을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 치료는 예를 들어 대상체에서 담관 및/또는 재생을 촉진시켜, 담즙산의 배출을 촉진시키기 위해 이용될 수 있다. 상기 치료는 또한 예를 들어 대상체에서 담즙산 합성을 억제하여, 간 손상을 감소시키기 위해 이용될 수 있다. 본 개시내용은 담관 부족 및/또는 담관 부족과 연관된 질환 또는 장애 (예를 들어, 알라질 증후군 및 담도 폐쇄증)의 위험이 있는 (또는 그에 걸리기 쉬운) 대상체를 치료하는 예방적 및 치료적 방법 둘 다를 제공한다.

[0138] 특정 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료제 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드 또는 이를 코딩하는 벡터 또는 트랜스진)를 투여함으로써 대상체에서 본원에 기재된 질환 또는 장애를 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 치료하고자 하는 대상체는 예를 들어 간에서 β-카테닌 단백질 양의 감소로부터 치료적으로 이익을 얻을 것인 대상체이다.

[0139] 본원에 기재된 방법은 전형적으로 대상체에게 올리고뉴클레오티드의 유효량, 즉, 바람직한 치료 결과를 생성할 수 있는 양을 투여하는 것을 수반한다. 치료적으로 허용가능한 양은 질환 또는 장애를 치료할 수 있는 양일 수 있다. 임의의 한 대상체에게 적절한 용량은 대상체의 크기, 신체 표면적, 연령, 투여되는 특정한 조성물, 조성물 중의 활성 성분(들), 투여 시간 및 경로, 전반적인 건강, 및 동시에 투여되는 다른 약물을 비롯하여 특정 인자에 따라 좌우될 것이다.

[0140] 일부 실시양태에서, 대상체에게 본원에 개시된 조성물 중 어느 하나를 장내로 (예를 들어, 경구로, 위 공급관에 의해, 십이지장 공급관에 의해, 위루형성술을 통해 또는 직장으로), 비경구로 (예를 들어, 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입, 동맥내 주사 또는 주입, 근육내 주사), 국소적으로 (예를 들어, 표피, 흡입, 점안제를 통해 또는 점막을 통해), 또는 표적 기관 (예를 들어, 대상체의 간)으로 직접 주사에 의해 투여한다. 전형적으로, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드를 정맥내로 또는 피하로 투여한다.

[0141] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 0.1 mg/kg 내지 25 mg/kg (예를 들어, 1 mg/kg 내지 5 mg/kg) 범위의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 0.1 mg/kg 내지 5 mg/kg 범위의 또는 0.5 mg/kg 내지 5 mg/kg 범위의 용량으로 투여된다.

[0142] 비제한적인 세트의 예로서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 연 1회, 연 2회, 분기별로 (3 개월마다 한번), 격월로 (2 개월마다 한번), 매달 또는 매주 투여될 것이다.

[0143] 일부 실시양태에서, 치료하고자 하는 대상체는 인간 또는 비-인간 영장류 또는 다른 포유류 대상체이다. 다른 예시적인 대상체에는 길들여진 동물, 예컨대 개 및 고양이; 가축, 예컨대 말, 소, 돼지, 양, 염소 및 닭; 및 동물, 예컨대 마우스, 래트, 기니피그 및 햄스터가 포함된다.

[0144] **실시예**

[0145] *실시예 1: 담관 손상의 3,5-디에톡시카르보닐-1,4-디히드로콜리딘 (DDC)-공급 마우스 모델에서 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 처리의 평가.*

[0146] 담관 상피 세포 분화에 대해 CTNNB1 표적화의 효과를 결정하기 위해, 스위스 웹스터 마우스에게 0.1% 3,5-디에톡시카르보닐-1,4-디히드로콜리딘 (DDC)을 공급하고, CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 (서열식별번호: 1에 제시된 센스 가닥 서열 및 서열식별번호: 2에 제시된 안티센스 가닥 서열을 가짐)로 처리하였다. RNAi 올리고뉴클레오티드는 그의 센스 가닥 상의 테트라루프 (-GAAA-)의 4개 뉴클레오티드 각각에 접합된 단일의 1가 GalNac 모이어티 및 그의 안티센스 가닥의 5' 말단에 포스페이트 유사체를 포함하는 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하였다. 대조군으로서, DDC-공급 마우스를 PBS로 처리하였다. 담관 상피 마커 CK19에 대한 토끼 모노클로날 항체 (카탈로그 번호: ab52625, 아브캠(Abcam, 메사추사츠주 캠브릿지))를 사용하여 PBS 또는 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리한 DDC-공급 마우스로부터의 간 절편에 대해 면역조직화학 염색을 수행하였다 (도 1 및 도 2). 도 2에서, PBS 또는 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리한 정상 식사를 한 마우스로부터의 간 절편을 또한 평가하였다. 마우스에게 매주 (0, 7, 14, 21, 28, 35 일째) 투여하였고, 도 2에 나타낸 바와 같이 투여후 3 일째에 희생시켰다. 수지 캐스팅을 이용하여, 대조군 PBS로 또는 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리한 DDC-공급 마우스에서 세관 아키텍처를 가시화하였다 (도 5).

[0147] 도 1에 도시된 바와 같이, 24 일 동안 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 (서열식별번호: 1에 제시된 센스 가닥 서열 및 서열식별번호: 2에 제시된 안티센스 가닥 서열을 가짐)로 처리한 DDC-공급 마우스로부터의 간 절편은 PBS로 처리한 대조군 DDC-마우스와 비교하여 증가된 개수의 CK19 양성 세포를 가졌다. 유사한 결과가 도 2에 도시된 시간 경과 연구에서 확인되었다. DDC-공급은 CK19 염색의 개수에서의 증가를 초래하였고, 이는 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드의 첫번째 투여후 10 일, 24 일 및 38 일째에 PBS로 처리한 DDC-공급 마우스로부터의 간 절편과 비교하여 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 (서열식별번호: 1에 제시된 센스 가닥 서열 및 서열식별번호: 2에 제시된 안티센스 가닥 서열을 가짐)로 처리한 DCC-공급 마우스로부터의 간 절편에서 추가로 증가된다 (도 2). 대조군 PBS를 제공받은 마우스와 비교하여 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공받은 DDC-공급 마우스에서 더욱 작은 세관 또한 관찰되었다 (도 5). 추가로, CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리한 DDC-공급 마우스에서 CK19 양성-염색된 세포 및 총담관으로 주사된 잉크의 공동-국지화에 의해 입증되는 바와 같이 새로운 작은 담관이 충분히 형성되었고 담도계에 연결되었다 (도 6). 따라서, 결과는 CTNNB1 mRNA의 RNAi 올리고뉴클레오티드 표적화가 간 손상의 DDC-공급 마우스 모델에서 담관 상피 세포 분화를 유도하고, 담관 재생을 촉진시킨다는 것을 시사한다.

[0148] *실시예 2: 담관 손상의 Mdr2$^{-/-}$ 마우스 모델에서 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 처리의 평가.*

[0149] CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 (서열식별번호: 1에 제시된 센스 가닥 서열 및 서열식별번호: 2에 제시된 안티센스 가닥 서열을 가짐)를 담관 손상의 또 다른 마우스 모델 (*Mdr2*$^{-/-}$ 마우스)에서 또한 시험하였다. *Mdr2*$^{-/-}$ 마우스를 66 일 동안 PBS 또는 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리하였다. 처리한 마우스로부터의 간 절편을 담관 상피 마커 CK19에 대해 염색하였다. PBS로 처리한 *Mdr2*$^{+/-}$ 마우스로부터의 간 절편 또한 분석하였다.

[0150] 도 3에 도시된 바와 같이, *Mdr2*$^{-/-}$ 마우스는 *Mdr2*$^{+/-}$ 마우스와 비교하여 증가된 CK19 염색을 가졌다. CK19 양성 세포의 개수에서의 추가의 증가가 PBS로 처리한 *Mdr2*$^{-/-}$ 마우스와 비교하여 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리한 *Mdr2*$^{-/-}$ 마우스로부터의 간 절편에서 검출되었다. (도 3). 따라서, CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드는 또한 *Mdr2*$^{-/-}$ 마우스에서 담관 상피 세포 분화를 잠재적으로 유도한다.

[0151] *실시예 3: 정상 식사를 공급한 야생형 마우스에서 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 처리의 평가.*

[0152] 담관 상피 세포 분화에 대한 CTNNB1 표적화의 효과를 또한 야생형 마우스에서 평가하였다. CD-1 마우스를 대조군 PBS, 10 mg/kg CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 100 mg/kg CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 6 주 동안 주 1회 (Q1W x 6) 처리하였다. 이어서, 처리한 동물로부터의 간 절편을 담관 상피 마커 CK19를 인식하는 항체로 염색하였다.

[0153] 도 4에 도시된 바와 같이, 증가된 개수의 CK19-양성 세포가 PBS-처리한 마우스와 비교하여 10 또는 100 mg/kg CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리한 야생형 마우스로부터의 간 절편에서 관찰되었다. 이들 결과는 CTNNB1 mRNA의 RNA 표적화가 야생형 마우스에서 담관 상피 세포 분화를 잠재적으로 유도한다는 것을 나타낸다.

[0154] *실시예 4: 담관 손상의 DDC-공급 마우스 모델에서 담즙 합성에 대한 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 처리의 평가.*

[0155] 담즙 합성에 대한 CTNNB1 mRNA 표적화의 효과를 담관 손상의 DDC-공급 마우스 모델에서 특징분석하였다. 스위스 웹스터 암컷 마우스를 3가지 처리 상태 중 하나에 무작위화하였다. 첫번째 그룹에서는, 마우스에게 대조군 식사를 공급하고, PBS로 처리하였다. 두번째 그룹에서는, 마우스에게 0.1% DDC 식사를 공급하고, PBS로 처리하였다. 세번째 그룹에서는, 마우스에게 0.1% DDC 식사를 공급하고, CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리하였다. 간에서 총 담즙산 농도 (도 7a), 담즙 유속 (도 7b) 및 mRNA 발현 (도 7c)을 각각의 처리 그룹에 대해 평가하였다. 특히, CTNNB1, *Cyp7a1, Cyp27a, Cyp8B1* 및 *Shp* mRNA의 수준을 측정하였다 (도 7c).

[0156] 도 7a에 도시된 바와 같이, PBS 또는 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리한 DDC-공급 마우스는 대조군 식사를 공급한 마우스에 비해 낮은 담즙산 농도를 가졌다. 감소된 총 담즙산 농도에 대한 경향은 DDC-공급 마우스에서 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 처리에 의해 관찰되었다. 도 7b에 도시된 바와 같이, 담즙 유속은 대조군 식사를 공급한 마우스와 비교하여 DDC-공급 마우스에서 증가되었다. β-카테닌 RNAi 올리고뉴클레오티드로의 처리는 담즙 유속에서의 DDC-공급 유도된 증가를 부분적으로 정상화시켰다. 주목할만 하게는, DDC-공급 마우스의 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로의 처리는 *Cyp7a1* 및 *Cyp27a*의 발현을 감소시켰다 (도 7c). 이들 결과는 CTNNB1 RNAi 올리고뉴클레오티드가 담관 손상의 마우스 모델에서 담즙산 합성을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0157] 본원에 예시적으로 기재된 본 개시내용은 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재하에 적합하게 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본원의 각각의 예에서, 용어 "포함하는", "로 본질적으로 이루어진" 및 "로 이루어진"은 다른 두 용어와 교체될 수 있다. 사용된 용어 및 표현은 제한이 아니라 기재의 측면에서 사용되고, 이러한 용어 및 표현의 사용에 있어서 도시되고 기재된 특징 또는 그의 일부의 임의의 등가물을 제외하려는 의도는 없으며, 청구된 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능한 것으로 인식된다. 따라서, 본 발명이 바람직한 실시양태에 의해 구체적으로 개시되었지만, 본원에 개시된 개념의 임의적인 특징, 변형 및 변동이 관련 기술분야의 기술자에 의해 재분류될 수 있고, 이러한 변형 및 변동이 상기 기재 및 첨부된 청구항에 의해 한정되는 본 발명의 범위 내에서 고려된다는 것을 이해해야 한다.

[0158] 또한, 본 발명의 특징 또는 측면이 마쿠시(Markush) 그룹 또는 대안적인 다른 그룹에 관하여 기재되는 경우, 관련 기술분야의 기술자는 본 발명이 또한 마쿠시 그룹 또는 다른 그룹의 임의의 개별 구성원 또는 하위 그룹에 관하여 기재됨을 인식할 것이다.

[0159] 일부 실시양태에서, 서열 목록에 제시된 서열이 올리고뉴클레오티드 또는 다른 핵산의 구조를 기재하는데 있어서 지칭될 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 실시양태에서, 실제 올리고뉴클레오티드 또는 다른 핵산은, 명시된 서열과 본질적으로 동일하거나 유사한 상보성을 유지하면서, 명시된 서열과 비교하여 1개 이상의 대안적인 뉴클레오티드 (예를 들어, DNA 뉴클레오티드의 RNA 대응물 또는 RNA 뉴클레오티드의 DNA 대응물) 및/또는 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드 및/또는 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드간 연결 및/또는 1개 이상의 다른 변형을 가질 수 있다.

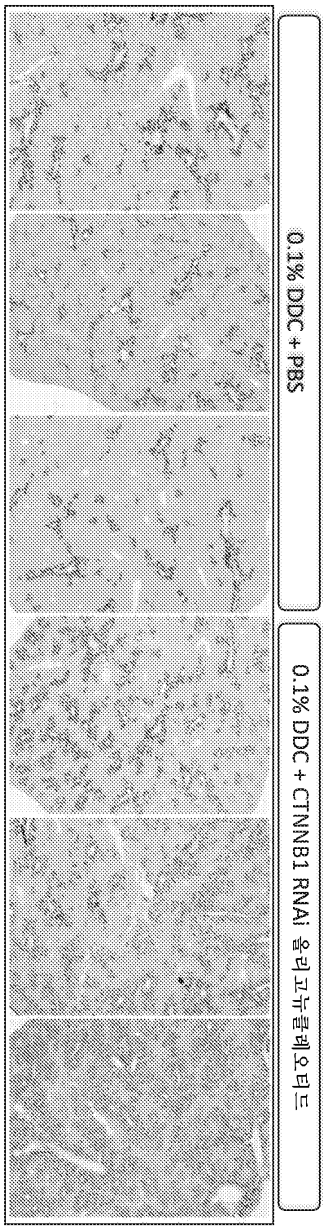
[0160] 본 발명의 기재하는 문맥에서 (특히 하기 청구항의 문맥에서) 단수 용어 및 유사한 지시대상의 사용은 본원에서 달리 지시되지 않거나 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는다면 단수 및 복수 둘 다를 포함하는 것으로 파악되어야 한다. 용어 "포함하는(comprising)", "갖는(having)", "포함하는(including)" 및 "함유하는(containing)"은 달리 언급되지 않는다면 개방형 용어로서 파악되어야 한다 (즉, "포함하나 이에 제한되지 않음"을 의미함). 본원에서 값의 범위의 기재는 단지 본원에서 달리 지시되지 않는다면 상기 범위 내에 속하는 각각의 별개의 값을 개별적으로 지칭하는 약칭 방법으로서 작용하기 위해 단지 의도되는 것이고, 각각의 별개의 값은 본원에 개별적으로 인용된 것과 같이 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법은 본원에서 달리 지시되지 않거나 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는다면 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 모든 예시 또는 예시적인 표현 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 보다 잘 설명하기 위해 의도된 것이고, 달리 청구되지 않는다면 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 명세서의 어떠한 표현도 본 발명의 실시에서 필수적인 것으로 청구되지 않은 임의의 요소를 나타내는 것으로 파악되어서는 안된다.

[0161] 본 발명의 실시양태가 본원에 기재된다. 이들 실시양태의 변동은 상기 기재를 읽은 후에 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백해질 수 있다.

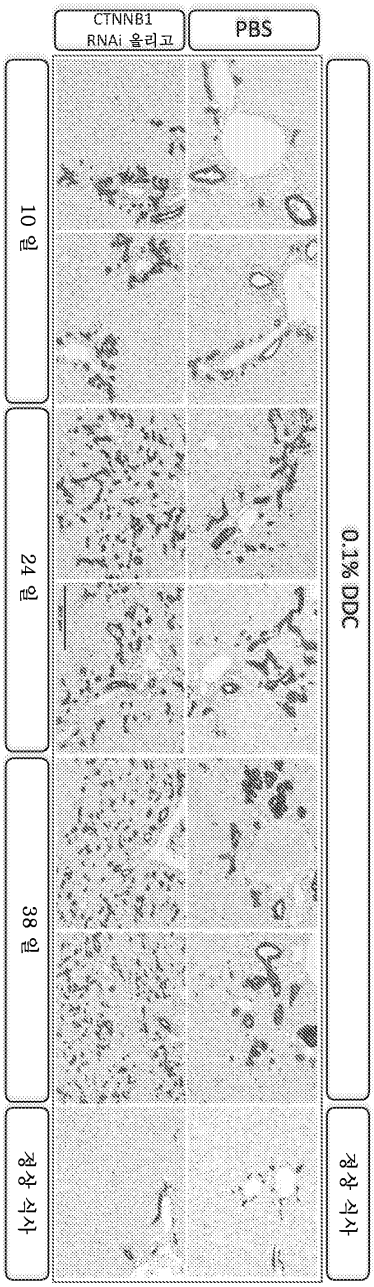
[0162] 본 발명자들은 숙련가들이 이러한 변동을 적절하게 이용할 것으로 예상하며, 본 발명자들은 본 발명이 본원에 구체적으로 기재된 것과 다르게 실시되는 것을 의도한다. 따라서, 본 발명자들은 적용가능한 법률에 의해 허용되는 바와 같이 본원에 첨부된 청구항에 인용된 대상의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 더욱이, 그의 모든 가능한 변동에서 상기 기재된 요소들의 임의의 조합은 본원에서 달리 지시되지 않거나 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는다면 본 발명에 포괄된다. 관련 기술분야의 기술자들은 일상적인 실험만으로도 본원에 기재된 본 발명의 구체적인 실시양태에 대한 여러 등가물을 인식할 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구항에 포괄되는 것으로 의도된다.

도면

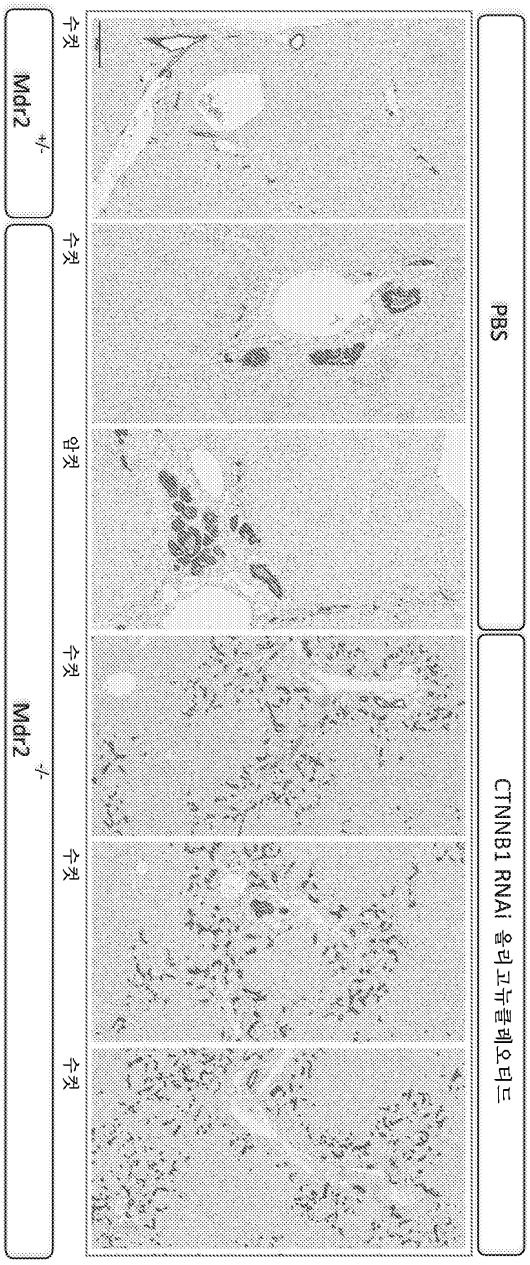
도면1



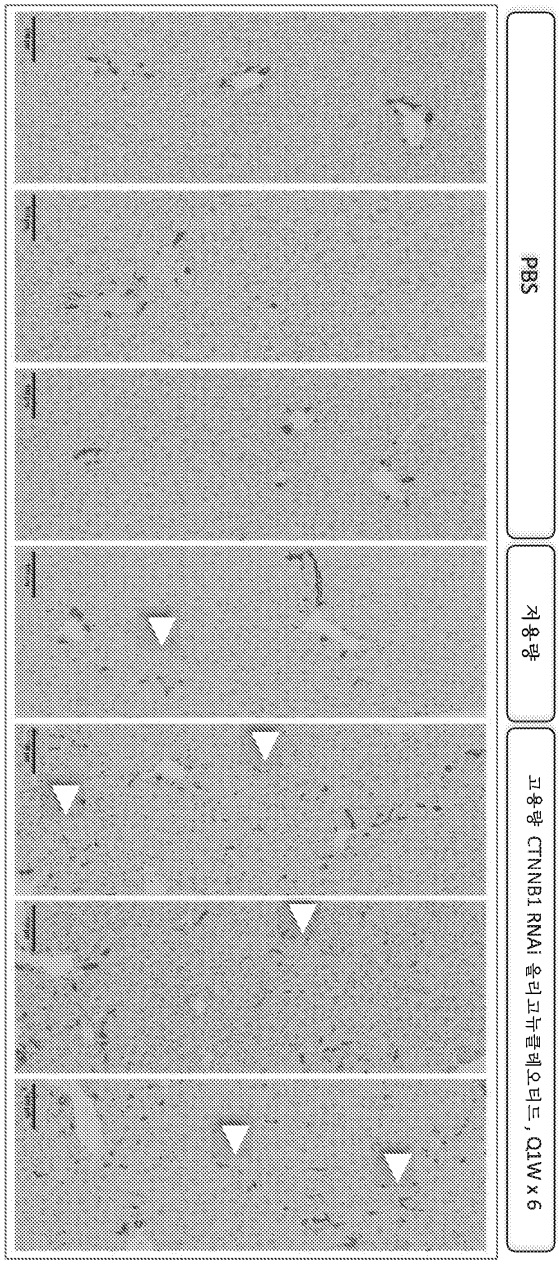
도면2



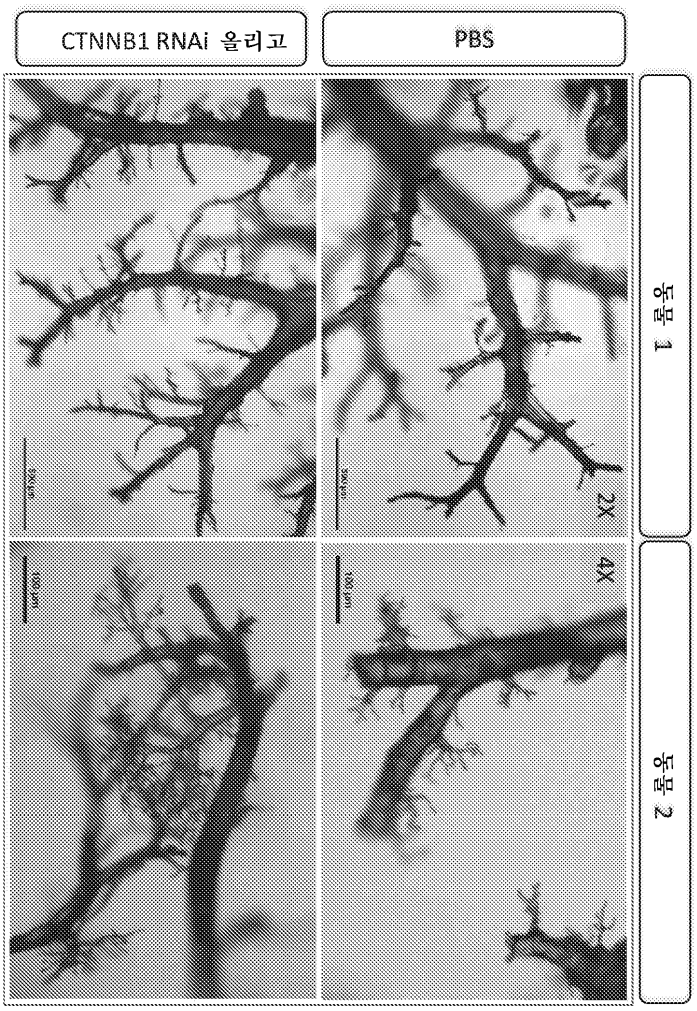
도면3



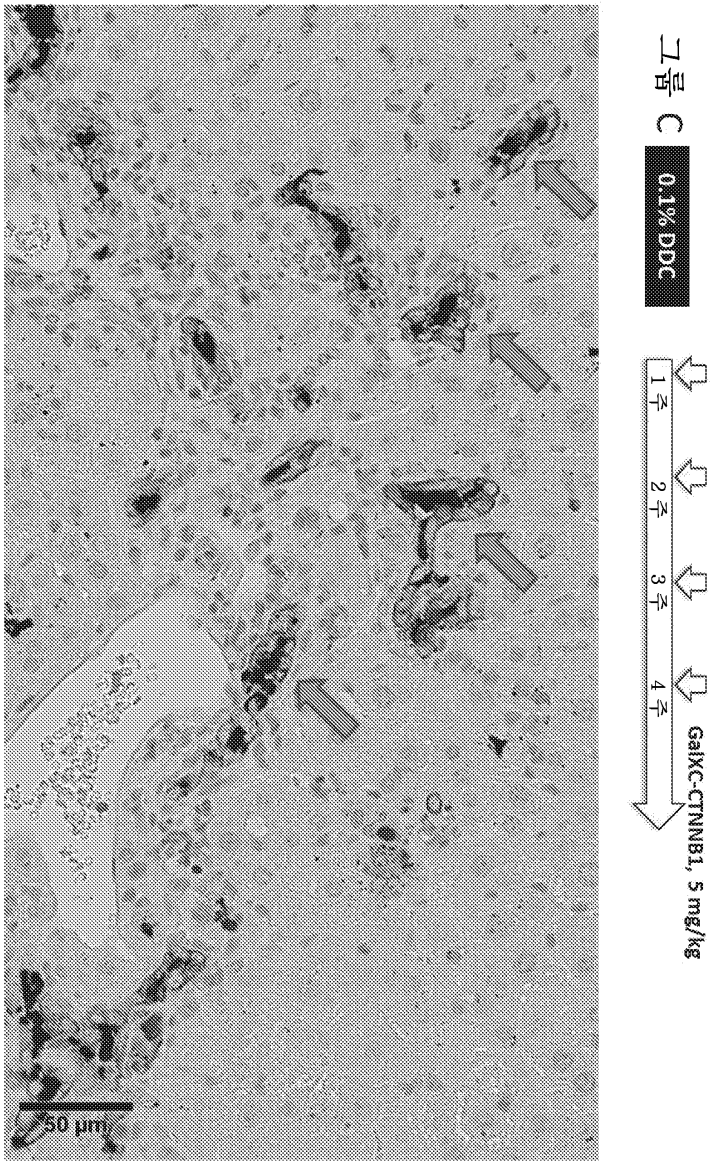
도면4



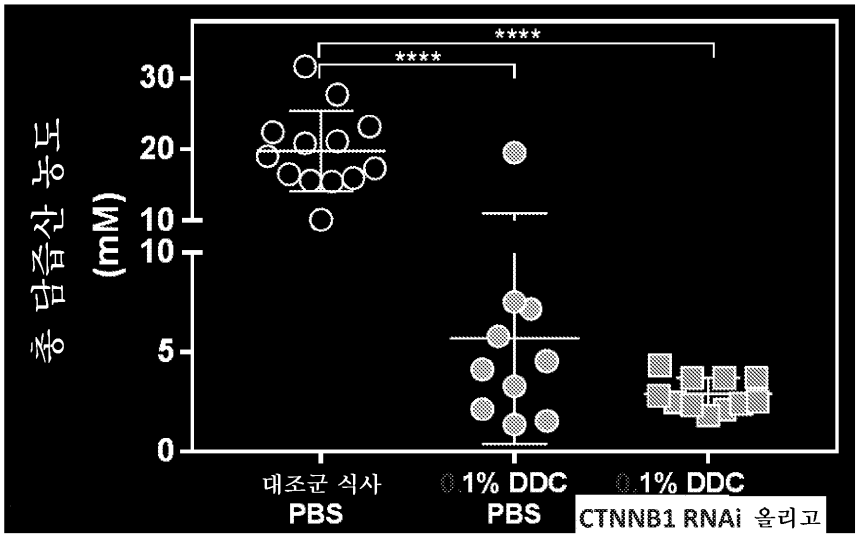
도면5



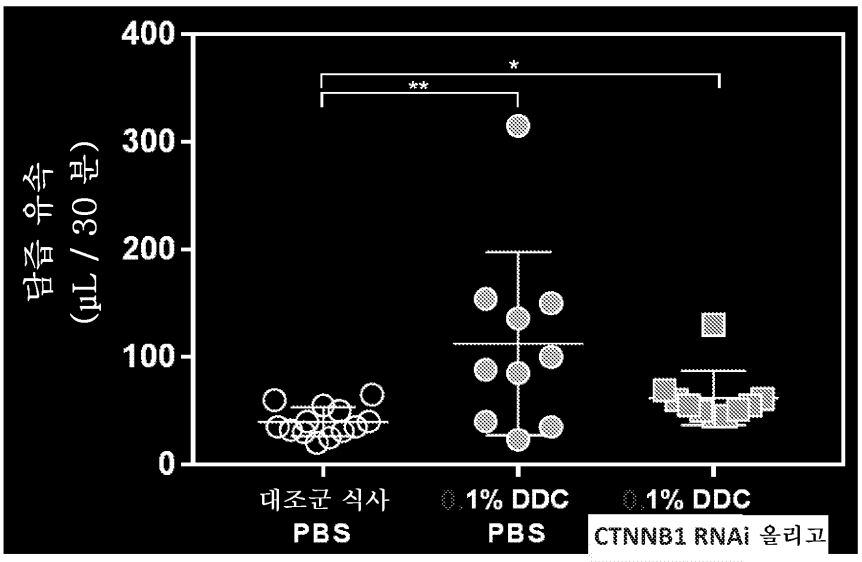
도면6



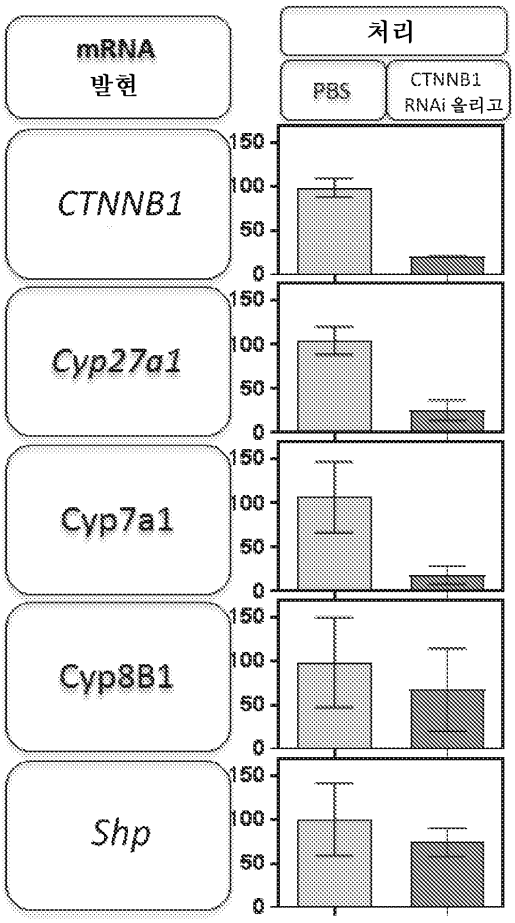
도면7a


****
****
30
20
10
10
5
0
총 담즙산 농도
(mM)
대조군 식사
PBS
0.1% DDC
PBS
0.1% DDC
CTNNB1 RNAi 올리고

도면7b


400
300
200
100
0
*
**
담즙 유속
(μL / 30 분)
대조군 식사
PBS
0.1% DDC
PBS
0.1% DDC
CTNNB1 RNAi 올리고

도면7c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Dicerna Pharmaceuticals, Inc.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING BILE DUCT PAUCITY-ASSOCIATED CONDITIONS

<130> D0800.70013WO00

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> 62/637,973

<151> 2018-03-02

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 1

cgaggaguaa caauacaaaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210

> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 2

uuuuguauug uuacuccucg gg 22

<210> 3

<211> 3720

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

aggatacagc ggcttctgcg cgacttataa gagctccttg tgcggcgcca ttttaagcct 60

ctcggtctgt ggcagcagcg ttggcccggc cccgggagcg gagagcgagg ggaggcggag 120

acggaggaag gtctgaggag cagcttcagt ccccgccgag ccgccaccgc aggtcgagga 180

cggtcggact cccgcggcgg gaggagcctg ttcccctgag ggtatttgaa gtataccata 240

caactgtttt gaaaatccag cgtggacaat ggctactcaa gctgatttga tggagttgga 300

catggccatg gaaccagaca gaaaagcggc tgttagtcac tggcagcaac agtcttacct 360

ggactctgga atccattctg gtgccactac cacagctcct tctctgagtg gtaaaggcaa 420

tcctgaggaa gaggatgtgg atacctccca agtcctgtat gagtgggaac agggattttc 480

tcagtccttc actcaagaac aagtagctga tattgatgga cagtatgcaa tgactcgagc 540

tcagagggta cgagctgcta tgttccctga gacattagat gagggcatgc agatcccatc 600

tacacagttt gatgctgctc atcccactaa tgtccagcgt ttggctgaac catcacagat 660

gctgaaacat gcagttgtaa acttgattaa ctatcaagat gatgcagaac ttgccacacg 720

tgcaatccct gaactgacaa aactgctaaa tgacgaggac caggtggtgg ttaataaggc 780

tgcagttatg gtccatcagc tttctaaaaa ggaagcttcc agacacgcta tcatgcgttc 840

tcctcagatg gtgtctgcta ttgtacgtac catgcagaat acaaatgatg tagaaacagc 900

tcgttgtacc gctgggacct tgcataacct ttcccatcat cgtgagggct tactggccat 960

ctttaagtct ggaggcattc ctgccctggt gaaaatgctt ggttcaccag tggattctgt 1020

gttgttttat gccattacaa ctctccacaa ccttttatta catcaagaag gagctaaaat 1080

ggcagtgcgt ttagctggtg ggctgcagaa aatggttgcc ttgctcaaca aaacaaatgt 1140

taaattcttg gctattacga cagactgcct tcaaatttta gcttatggca accaagaaag 1200

caagctcatc atactggcta gtggtggacc ccaagcttta gtaaatataa tgaggaccta 1260

tacttacgaa aaactactgt ggaccacaag cagagtgctg aaggtgctat ctgtctgctc 1320

tagtaataag ccggctattg tagaagctgg tggaatgcaa gctttaggac ttcacctgac 1380

agatccaagt caacgtcttg ttcagaactg tctttggact ctcaggaatc tttcagatgc 1440

tgcaactaaa caggaaggga tggaaggtct ccttgggact cttgttcagc ttctgggttc 1500

agatgatata aatgtggtca cctgtgcagc tggaattctt tctaacctca cttgcaataa 1560

ttataagaac aagatgatgg tctgccaagt gggtggtata gaggctcttg tgcgtactgt 1620

ccttcgggct ggtgacaggg aagacatcac tgagcctgcc atctgtgctc ttcgtcatct 1680

gaccagccga caccaagaag cagagatggc ccagaatgca gttcgccttc actatggact 1740

accagttgtg gttaagctct tacacccacc atcccactgg cctctgataa aggctactgt 1800

tggattgatt cgaaatcttg ccctttgtcc cgcaaatcat gcacctttgc gtgagcaggg 1860

tgccattcca cgactagttc agttgcttgt tcgtgcacat caggataccc agcgccgtac 1920

gtccatgggt gggacacagc agcaatttgt ggaggggggtc cgcatggaag aaatagttga 1980

aggttgtacc ggagcccttc acatcctagc tcgggatgtt cacaaccgaa ttgttatcag 2040

aggactaaat accattccat tgtttgtgca gctgctttat tctcccattg aaaacatcca 2100

aagagtagct gcaggggtcc tctgtgaact tgctcaggac aaggaagctg cagaagctat 2160

tgaagctgag ggagccacag ctcctctgac agagttactt cactctagga atgaaggtgt 2220

ggcgacatat gcagctgctg ttttgttccg aatgtctgag gacaagccac aagattacaa 2280

gaaacggctt tcagttgagc tgaccagctc tctcttcaga acagagccaa tggcttggaa 2340

tgagactgct gatcttggac ttgatattgg tgcccaggga gaacccctg gatatcgcca 2400

ggatgatcct agctatcgtt cttttcactc tggtggatat ggccaggatg ccttgggtat 2460

ggaccccatg atggaacatg agatgggtgg ccaccaccct ggtgctgact atccagttga 2520

tgggctgcca gatctggggc atgcccagga cctcatggat gggctgcctc caggtgacag 2580

caatcagctg gcctggtttg atactgacct gtaaatcatc ctttaggtaa gaagttttaa 2640

aaagccagtt tgggtaaaat acttttactc tgcctacaga acttcagaaa gacttggttg 2700

gtagggtggg agtggtttag gctatttgta aatctgccac aaaaacaggt atatactttg 2760

aaaggagatg tcttggaaca ttggaatgtt ctcagatttc tggttgttat gtgatcatgt 2820

gtggaagtta ttaactttaa tgtttttttgc cacagctttt gcaacttaat actcaaatga 2880

gtaacatttg ctgttttaaa cattaatagc agcctttctc tctttataca gctgtattgt 2940

ctgaacttgc attgtgattg gcctgtagag ttgctgagag ggctcgaggg gtgggctggt 3000

atctcagaaa gtgcctgaca cactaaccaa gctgagtttc ctatgggaac aattgaagta 3060

aacttttttgt tctggtcctt tttggtcgag gagtaacaat acaaatggat tttgggagtg 3120

actcaagaag tgaagaatgc acaagaatgg atcacaagat ggaatttatc aaaccctagc 3180

cttgcttgtt aaatttttttt ttttttttttt ttaagaatat ctgtaatggt actgactttg 3240

cttgctttga agtagctctt ttttttttttt ttttttttttt tttgcagtaa ctgtttttta 3300

agtctctcgt agtgttaagt tatagtgaat actgctacag caatttctaa tttttaagaa 3360

ttgagtaatg gtgtagaaca ctaattcata atcactctaa ttaattgtaa tctgaataaa 3420

gtgtaacaat tgtgtagcct ttttgtataa aatagacaaa tagaaaatgg tccaattagt 3480

ttccttttta atatgcttaa aataagcagg tggatctatt tcatgttttt gatcaaaaac 3540

tatttgggat atgtatgggt agggtaaatc agtaagaggt gttatttgga accttgtttt 3600

ggacagttta ccagttgcct tttatcccaa agttgttgta acctgctgtg atacgatgct 3660

tcaagagaaa atgcggttat aaaaaatggt tcagaattaa acttttaatt cattcgattg 3720