



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0078538
(43) 공개일자 2020년07월01일

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12N 15/113</i> (2010.01) <i>A61K 31/7088</i> (2006.01)
<i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C12N 15/113</i> (2013.01)
<i>A61K 31/7088</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7013634</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2018년10월17일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2020년05월13일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2018/056317</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2019/079472
국제공개일자 2019년04월25일</p> <p>(30) 우선권주장
62/573,999 2017년10월18일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
다이서나 파마수이티컬, 인크.
미국 02421 메사추세츠주 렉싱턴 헤이든 애비뉴 33</p> <p>(72) 발명자
가네쉬, 산티
미국 02421 메사추세츠주 렉싱턴 헤이든 애비뉴 33 다이서나 파마수이티컬, 인크. 내</p> <p>(74) 대리인
양영준, 이상남</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **베타 카테닌 핵산 억제제 분자**

(57) 요약

독특한 패턴의 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 강력한, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자가 본 명세서에 제공된다. β-카테닌 발현을 감소하기 위한 방법 및 조성물과, 암을 치료하기 위한 방법 및 조성물이 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

센스 가닥과, 안티센스 가닥과, 26개 뉴클레오타이드의 상기 센스 가닥과 상기 안티센스 가닥 사이 상보성의 영역을 포함하는 핵산 억제제 분자로서,

상기 센스 가닥은 서열번호: 11의 핵산을 포함하고;

상기 안티센스 가닥은 서열번호: 12의 핵산을 포함하고 그것의 3' 말단에 2개 단일-가닥 뉴클레오타이드 및 그것의 5' 말단에 10개 단일-가닥 뉴클레오타이드를 포함하는, 핵산 억제제 분자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 센스 가닥은 서열번호: 11의 핵산으로 구성되는, 핵산 억제제 분자.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 서열번호: 12의 핵산으로 구성되는, 핵산 억제제 분자.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 센스 가닥은 서열번호: 11의 핵산으로 구성되고 상기 안티센스 가닥은 서열번호: 12의 핵산으로 구성되는, 핵산 억제제 분자.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호: 11 및 서열번호: 12에서 2'-F 및 2'-OCH₃ 변형(modification) 이외에, 상기 핵산 억제제 분자는 임의의 추가의 변형을 함유하지 않는, 핵산 억제제 분자.

청구항 6

센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중-가닥 핵산 억제제 분자로서,

상기 센스 가닥은 서열번호: 13의 핵산 서열을 포함하고 상기 안티센스 가닥은 서열번호: 14의 핵산 서열을 포함하고 상기 센스 가닥과 안티센스 가닥은 함께 26개 염기쌍의 이중 영역(duplex region)을 형성하고 안티센스 가닥은 그것의 3' 말단에 2개 단일-가닥 뉴클레오타이드 및 그것의 5' 말단에 10개 단일-가닥 뉴클레오타이드를 포함하고;

서열번호: 13의 각각의 뉴클레오타이드 1, 3, 7, 9-11, 13, 15, 19, 및 20의 당 모이어티는 2'-F로 변형되고, 서열번호: 13의 각각의 뉴클레오타이드 2, 4-6, 8, 12, 14, 16-18, 및 24의 당 모이어티는 2'-OCH₃으로 변형되고, 서열번호: 13의 뉴클레오타이드 25 및 26은 데옥시리보뉴클레오타이드이고, 서열번호: 13의 뉴클레오타이드 21-23은 리보뉴클레오타이드이고; 그리고

서열번호: 14의 각각의 뉴클레오타이드 2, 6, 19, 21, 23, 25, 30, 31, 33, 및 35의 당 모이어티는 2'-F로 변형되고, 서열번호: 14의 각각의 뉴클레오타이드 1, 3-5, 7-9, 11-15, 20, 22, 24, 26, 32, 34, 및 36-38의 당 모이어티는 2'-OCH₃으로 변형되고, 서열번호: 14의 뉴클레오타이드 10은 데옥시리보뉴클레오타이드이고, 서열번호: 14의 뉴클레오타이드 16-18 및 27-29는 리보뉴클레오타이드인, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 가닥 및/또는 상기 안티센스 가닥의 5' 말단에 5'-포스페이트 모방체를 더 포함하는, 핵산 억제제 분자.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 나노입자와 함께 제형화

되는, 핵산 억제제 분자.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 지질 나노입자는 코어 지질 및 외피 지질을 포함하고, 상기 코어 지질은 제1 양이온성 지질 및 제1 폐길화된 지질을 포함하고 상기 외피 지질은 제2 양이온성 지질, 중성 지질, 스테롤, 및 제2 폐길화된 지질을 포함하는, 핵산 억제제 분자.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 제1 양이온성 지질은 DL-048이고, 상기 제1 폐길화된 지질은 DSG-MPEG이고, 상기 제2 양이온성 지질은 DL-103이고, 상기 중성 지질은 DSPC이고, 상기 스테롤은 콜레스테롤이고, 그리고 상기 제2 폐길화된 지질은 DSPE-MPEG인, 핵산 억제제 분자.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항의 핵산 억제제 분자의 치료 유효량 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 12

대상체에서 β -카테닌 유전자의 발현을 감소시키는 방법으로서, β -카테닌 유전자의 발현을 감소시키기에 충분한 양으로 상기 감소를 필요로 하는 대상체에게 청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 핵산 억제제 분자 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 투여는 정맥내, 근육내, 또는 피하 투여를 포함하는, 방법.

청구항 14

청구항 12 또는 13에 있어서, 상기 대상체는 인간인, 방법.

청구항 15

대상체에서 β -카테닌-연관된 장애를 치료하는 방법으로서, 청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 핵산 억제제 분자 또는 약제학적 조성물의 치료 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 투여는 정맥내, 근육내, 또는 피하 투여를 포함하는, 방법.

청구항 17

청구항 15 또는 16에 있어서, 상기 대상체는 인간인, 방법.

청구항 18

청구항 15 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 β -카테닌-연관된 장애는 암인, 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 암은 결장직장암, 간세포 암종, 또는 흑색종인, 방법.

청구항 20

β -카테닌-연관된 암을 치료하는데 사용하기 위한 청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 핵산 억제제 분자를 포함하는 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본원은 2017년 10월 18일 출원된, 명칭 "베타 카테닌 핵산 억제제 분자"의 미국 특허 가출원 번호 62/573,999, 및 2018년 1월 5일 출원된, 명칭 "면역요법을 강력하게 하기 위한 β -카테닌 및 IDO 발현 감소"의 미국 특허 가출원 번호 62/614,206에 대한 우선권을 주장하고, 그 전체 내용은 그것의 전체로 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0003] **서열목록**

[0004] 본원은 ASCII 형식으로 전자적으로 출원되고, 전체적으로 참고로 본 명세서에 통합된 서열목록을 함유한다. 2018년 10월 11일에 만들어진 상기 ASCII 사본은 0243_0008-PCT_SL.txt로 명명되고 크기는 19,219바이트이다.

배경 기술

[0005] 종양유전자인 β -카테닌은 세포에서 Wnt 신호전달의 주요 매개체이다. β -카테닌은 β -카테닌이 세포간 접촉성 복합체의 안정화에 기여하는 원형질막, β -카테닌 수준이 조절되는 세포질, 및 β -카테닌이 전사 조절 및 염색질 상호작용에 관여되는 핵을 포함한 다중 세포 위치에서 몇 개의 세포 기능을 수행한다.

[0006] (인간에서 CTNNB1 유전자에 의해 인코딩된) β -카테닌에서 돌연변이는 결장직장, 테스토이드, 자궁내막, 위, 간 세포, 간모세포종, 신장 (윌름스 종양), 수모세포종, 흑색종, 난소 (자궁내막모양), 췌장, 폐암종, 전립선, 갑상선 (역형성) 및 자궁 (자궁내막) 암과 구체적으로 연관된다 (Polakis P. Genes Dev. 14: 1837-51; Samowitz 등 Cancer Res. 59: 1442-4; Iwao 등 Cancer Res. 58: 1021-6; Mirabelli-Primdahl 등 Cancer Res. 59: 3346-51; Shitoh 등 J Clin Path. 52: 695-6; Tejpar 등 Oncogene 18: 6615-20; Kitaeva 등 Cancer Res. 57: 4478-81; Sparks 등 Cancer Res. 58: 1130-4; Miyaki 등 Cancer Res. 59: 4506-9; Park 등 Cancer Res. 59: 4257-60; Huang 등 Am J Pathol. 155: 1795-801; Nhieu 등 Am J Pathol. 155: 703-10; Legoix 등 Oncogene 18: 4044-6; Jeng 등 Cancer Lett. 152: 45-51; Koch 등 Cancer Res. 59: 269-73; Wei 등 Oncogene 19: 498-504; Koesters 등 Cancer Res. 59: 3880-2; Maiti 등 Cancer Res. 60: 6288-92; Zurawel 등 Cancer Res. 58: 896-9; Gamallo 등 Am J Pathol. 155: 527-36; Palacios and Gamallo Cancer Res. 58: 1344-7; Wright 등 Int J Cancer 82: 625-9; Gerdes 등 Digestion 60: 544-8; Chan 등 Nat Genet. 21: 410-3; Voeller 등 Cancer Res. 58: 2520-3; Garcia-Rostan 등 Cancer Res. 59: 1811-5; Fukuchi 등 Cancer Res. 58: 3526-8).

[0007] β -카테닌/Wnt 경로는 결장직장암의 80% 초과에서 일관되게 활성화된다. β -카테닌/Wnt 경로는 또한 간세포 암종 (HCC) 환자의 50% 초과에서 일관되게 활성화된다. 활성화된 Wnt 신호전달 및 핵 β -카테닌은 질환의 재발 및 불량한 예후와 상관된다 (Takigawa 등 2008, Curr Drug Targets November; 9 (11):1013-24).

[0008] β -카테닌 유전자에서 돌연변이는 β -카테닌의 인산화를 매개하고 프로테오솜에 의해 그것의 분해를 표적화하는, GSK3 α/β 또는 CKI α 와 같은 세포질 파괴 복합체의 성분에 의해 표적화된 세린 및 트레오닌 잔기에 영향을 주는 점 돌연변이 또는 β -카테닌의 N-말단의 일부의 결실로 이어지는 절단을 포함한다. 이들 돌연변이체 β -카테닌 단백질은 인산화에 대해 불응성이고 따라서 프로테아솜 분해를 피한다. 결과적으로, β -카테닌은 영향을 받은 세포 내에 축적된다. 안정화되고 핵-국소화된 β -카테닌은 결장암의 거의 모든 사례의 특징이다. (Clevers, H., 2006, Cell 127:469-480). 모린 등은 인산화 부위가 변경된 β -카테닌의 돌연변이가 세포가 β -카테닌의 APC-매개된 하향-조절에 비감수성이 되도록 하였고, 이 파괴된 기전이 결장 직장 종양형성에 중요하다는 것을 실증하였다. (Morin 등, 1997, Science 275:1787-1790).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] β -카테닌이 세포에서 Wnt 신호전달의 주요 매개체로서 기능하는 방법 및 β -카테닌의 돌연변이 및/또는 변경된 발현이 종양형성에서 역할을 수행할 수 있는 방법을 이해함에 있어서의 진보에도 불구하고, 암과 같은 CTNNB1 발현과 연관된 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있는 조성물에 대한 요구가 남아 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본원은 분자에서 다수의 뉴클레오타이드의 당 모이어티 중 2'-탄소에서 독특한 패턴의 2'-플루오로 ("2'-F) 및 2'-O-메틸 ("2'-OMe" 또는 "2'-OCH₃") 변형을 포함한, 독특한 패턴의 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 강력한, 최

적화된 이중-가닥 β-카테닌 핵산 억제제 분자를 제공한다. 임의의 이론에 구속되기를 원하지 않으면서, 본 특한 패턴의 뉴클레오타이드 변형은 β-카테닌 핵산 억제제 분자에 개선된 특성, 예컨대 감소된 면역원성, β-카테닌 mRNA 발현의 개선된 감소, 개선된 Ago2 결합, 또는 종양 성장의 개선된 억제 중 하나 이상을 제공한다.

- [0011] 일 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 서열번호: 11의 핵산을 포함하거나 이로 구성되는 센스 (또는 패신저) 가닥 및 서열번호: 12의 핵산을 포함하거나 이로 구성되는 안티센스 (또는 가이드) 가닥, 및 26 뉴클레오타이드의 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이의 상보성의 영역을 포함한다. 안티센스 가닥은 그것의 3' 말단에 2개 단일-가닥 뉴클레오타이드 및 그것의 5' 말단에 10개 단일-가닥 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호: 11의 핵산으로 구성되고 안티센스 가닥은 서열번호: 12의 핵산으로 구성된다.
- [0012] 일 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중-가닥 핵산 억제제 분자이고;
- [0013] 상기 센스 가닥은 서열번호: 13의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되고 상기 안티센스 가닥은 서열번호: 14의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되고 상기 센스 가닥과 안티센스 가닥은 함께 26개 염기쌍의 이중 영역 (duplex region)을 형성하고 상기 안티센스 가닥은 그것의 3' 말단에 2개 단일-가닥 뉴클레오타이드 및 그것의 5' 말단에 10개 단일-가닥 뉴클레오타이드를 포함하고;
- [0014] 서열번호: 13의 각각의 뉴클레오타이드 1, 3, 7, 9-11, 13, 15, 19, 및 20의 당 모이어티(sugar moiety)는 2'-F로 변형되고, 서열번호: 13의 각각의 뉴클레오타이드 2, 4-6, 8, 12, 14, 16-18, 및 24의 당 모이어티는 2'-OCH₃으로 변형되고, 서열번호: 13의 뉴클레오타이드 25 및 26은 데옥시리보뉴클레오타이드이고, 서열번호: 13의 뉴클레오타이드 21-23은 리보뉴클레오타이드이고; 그리고
- [0015] 서열번호: 14의 각각의 뉴클레오타이드 2, 6, 19, 21, 23, 25, 30, 31, 33, 및 35의 당 모이어티는 2'-F로 변형되고, 서열번호: 14의 각각의 뉴클레오타이드 1, 3-5, 7-9, 11-15, 20, 22, 24, 26, 32, 34, 및 36-38의 당 모이어티는 2'-OCH₃으로 변형되고, 서열번호: 14의 뉴클레오타이드 10은 데옥시리보뉴클레오타이드이고, 서열번호: 14의 뉴클레오타이드 16-18 및 27-29는 리보뉴클레오타이드이다.
- [0016] 일 측면은 대상체에서 암을 치료하는 방법에 대한 것으로, 상기 방법은 상기 대상체에게 본 명세서에서 기재된 바와 같은 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 방법은 치료 유효량의 면역치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 대상체는 인간이다.
- [0017] 또 다른 양태는 본 명세서에서 기재된 바와 같은 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자를 포함하는 약제학적 조성물에 대한 것이다. 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자를 포함하는 약제학적 조성물은 암 치료에 있어서의 용도를 위한 것이다. 특정 구현예에서, 본 약제학적 조성물은 면역치료제, 예컨대 항-CTLA-4 단클론성 항체, 항-PD-1 단클론성 항체, 항-PD-L1 단클론성 항체, 또는 항-CTLA-4 단클론성 항체와 항-PD-1 단클론성 항체의 조합과 병용되어 투여된다.
- [0018] 본 방법 또는 본 약제학적 조성물의 특정 구현예에서, 상기 암은 비-Wnt 활성화된 암이다. 다른 구현예에서, 상기 암은 Wnt 활성화된 암이다. 본 방법 또는 본 약제학적 조성물의 특정 구현예에서, 비-Wnt 활성화된 암은 흑색종, 신경교세포종, 또는 신장암이다.
- [0019] 본 방법 또는 조성물의 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 지질 나노입자와 함께 제형화된다. 특정 구현예에서, 지질 나노입자는 코어 지질 및 외피 지질을 포함하고, 상기 코어 지질은 제1 양이온성 지질 및 제1 폐길화된 지질을 포함하고 상기 외피 지질은 제2 양이온성 지질, 중성 지질, 스테롤, 및 제2 폐길화된 지질을 포함한다. 특정 구현예에서, 제1 양이온성 지질은 DL-048이고, 제1 폐길화된 지질은 DSG-MPEG이고, 제2 양이온성 지질은 DL-103이고, 중성 지질은 DSPC이고, 스테롤은 콜레스테롤이고, 제2 폐길화된 지질은 DSPC-MPEG이다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 본 명세서에 편입되고 그 일부를 구성하는 수반되는 도면들은 어떤 구현예들을 설명하고, 서술된 설명과 함께, 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법의 원리를 설명하는 역할을 한다.

도 1a는 β-카테닌 유전자를 표적화하고 상이한 뉴클레오타이드 변형 패턴인: 비연장된 M1 (NEX M1); 비연장된 M2 (NEX M2); 및 비연장된 M3 (NEX M3)을 갖는 3가지 예시적인 비-연장된 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 구조를

개략적으로 도시한다. 이 개략도에서, 음영처리되지 않은 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드를 나타내고, 줄무늬 뉴클레오타이드는 2'-OMe 변형을 함유하고, 음영처리된 염기는 2'-F 변형을 함유하고, 그리고 블랙 박스로 윤곽된 뉴클레오타이드는 테옥시리보뉴클레오타이드를 나타낸다. NEX M1의 패신저 및 가이드 가닥은 각각 서열번호: 1 및 서열번호: 2에 상응한다. NEX M2의 패신저 및 가이드 가닥은 각각 서열번호: 3 및 서열번호: 4에 상응한다. NEX M3의 패신저 및 가이드 가닥은 각각 서열번호: 5 및 서열번호: 6에 상응한다. 또한 3가지 분자에 대한 IC50 값 (pM)이 도시되어 있다.

도 1b는 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에서 상이한 비-연장된 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 인터페론 반응 (IFIT1 유도에 의해 측정됨)을 도시한다. NEX M1은 IFIT1의 상당한 상승을 유도한 반면 NEX M2는 중간 정도 상승을 나타냈다. 다른 한편으로, NEX M3은 단지 IFIT1의 최소 상승만을 나타냈다.

도 2a는 베타-카테닌 유전자를 표적화하고 상이한 뉴클레오타이드 변형 패턴인: 연장된 M1 (EX M1); 연장된 M2 (EX M2); 및 연장된 M3 (EX M3)을 갖는 3가지 예시적인 연장된 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 구조를 개략적으로 도시한다. 이 개략도에서, 음영처리되지 않은 뉴클레오타이드는 리보핵산 염기를 나타내고, 줄무늬 뉴클레오타이드는 2'-OMe 변형된 염기를 나타내고, 음영처리된 염기는 2'-F 변형된 염기를 나타내고, 그리고 블랙 박스로 윤곽된 뉴클레오타이드는 테옥시리보핵산 염기를 나타낸다. EX M1의 패신저 및 가이드 가닥은 각각 서열번호: 7 및 서열번호: 8에 상응한다. EX M2의 패신저 및 가이드 가닥은 각각 서열번호: 9 및 서열번호: 10에 상응한다. EX M3의 패신저 및 가이드 가닥은 각각 서열번호: 11 및 서열번호: 12에 상응한다. 또한 3가지 분자에 대한 IC50 값 (pM)이 도시되어 있다.

도 2b는 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에서 상이한 연장된 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 인터페론 반응 (IFIT1 유도에 의해 측정됨)을 도시한다. EX M1은 IFIT1의 상당한 상승을 유도한 반면 EX M2는 중간 정도 상승을 나타냈다. 다른 한편으로, NEX M3은 IFIT1의 상승을 본질적으로 나타내지 않았다.

도 3a는 4가지 상이한 공여체로부터의 인간 PBMC와 혼합될 때 NEX M1, NEX M3, 및 EX M3의 인터페론 수준에 대한 영향을 측정함에 의해 상대적 면역원성이 평가된 검정으로부터의 결과를 도시한다. NEX M3 및 EX M3은 4개의 공여체 모두에 대해 거의 또는 전혀 인터페론 반응을 나타내지 않고, 반면에 NEX M1은 공여체 1, 2, 및 4에 대해 보통의 인터페론 반응 및 공여체 3에 대해 실질적인 인터페론 반응 (과민성)을 나타낸다.

도 3b는 NEX M1, NEX M3, 및 EX M3으로 처리된 마우스로부터 수득된 상이한 시점 (처리-후 24 및 120시간)에서 LS411N 종양에서의 베타-카테닌 mRNA 녹다운의 양 ("효력")을 도시한다. 24시간에서, EX M3은 EX M2 및 NEX M3에 비교할 때 약간 더 나은 효력 및 NEX M1에 비교하여 유사한 효력을 실증했다. 처리 후 120시간에서, EX M3은 NEX M1에 비교할 때 개선된 효력을 나타냈다.

도 4a-d는 NEX M1 및 EX M3 작제물을 비교하는 다양한 검정으로부터 결과의 그래프 또는 이미지를 도시한다.

도 4a는 LS411N 종양을 담지하고 NEX M1 및 EX M3으로 처리된 마우스에서, EX M3이 투약후 3일차에 종양 조직에서 훨씬 높은 수준으로 존재했다는 것을 도시한다.

도 4b는 LS411N 종양을 담지하고 NEX M1 및 EX M3으로 처리된 마우스에서, EX M3이 투약후 3일차에서 종양 조직에서 증가된 아르고노트 (Ago) 2 결합/RNA-유도된 사일런싱 복합체 (RISC) 장입 효율성을 나타냈다는 것을 도시한다.

도 4c는 SW403 종양을 담지하고 NEX M1 및 EX M3으로 처리된 마우스에서, NEX M1은 비히클-처리된 동물에 비하여 약 55%까지 종양 성장을 억제했고, 반면에 EX M3은 80% 초과로 종양 성장을 억제했다는 것을 나타낸다. x-축은 NEX M1, EX M3, 또는 대조군이 투여된 (3 mg/kg의 투약량) 일자를 나타내는 화살표로 (SW403 종양의) 이식-후 일자를 열거한다.

도 4d는 도 4c에 묘사된 연구의 종단에서 수득된 SW403 종양에서 베타-카테닌 단백질 수준에서의 실질적인 감소가 있었다는 것을 면역조직화학에 의해 도시한다.

도 5는 β -카테닌 핵산 억제제 분자를 제형화하기 위해 사용될 수 있는 지질 나노입자 (LNP)의 하나의 비제한적인 구현예를 도시한다. LNP는 하기 코어 지질: DL-048 (양이온성 지질) 및 DSG-MPEG (폐길화된 지질), 및 하기 외피 지질: DL-103 (양이온성 지질), DSPC, 콜레스테롤, 및 DSPE-MPEG (폐길화된 지질)을 포함한다.

도 6은 Wnt 신호전달 경로의 간소화한 다이어그램을 도시한다. 좌측은 Wnt 리간드가 그것의 표면 수용체에 결합되지 않고, β -카테닌이 파괴 복합체에 격리되어 유비퀴틴화 및 분해에 대해 표적화되고, 그리고 표적 유전자가 재압축된 세포를 묘사한다. 우측은 Wnt 리간드가 그것의 표면 수용체에 결합한 후, 파괴 복합체가 분해되고, 안

정화된 β-카테닌이 방출되어 핵으로 이동하고, 그리고 표적 유전자가 활성화된 세포를 묘사한다.

도 7a는 실시예 5에 기재된 바와 같이 Wnt-활성화된, 4T1 종양이 이식되고 위약 또는 EX M3으로 처리된 Balb/C 마우스에 대한 치료 스케줄을 도시한다.

도 7b는 EX M3 치료가 β-카테닌 수준을 감소시키고 CD8 T-세포 침윤을 증가시키지만, 4T1 종양에서 IDO1 수준을 상당히 감소시키지 않는다는 것을 면역조직화학에 의해 도시한다.

도 7c는 EX M3 치료의 두 사이클이 Balb/C 마우스 안으로 이식된 4T1 종양에서 위약에 비교하여 종양 성장을 억제한다는 것을 도시한다.

도 8a는 실시예 5에 기재된 바와 같이, 4T1 종양이 이식되고 PBS 또는 EX M3으로 처리된 Balb/C 마우스에 대한 치료 스케줄을 도시한다.

도 8b는 4T1 종양의 EX M3 치료가 CD8+ T 세포를 증가시키고, 다중 관문 분자 (PD-1, LAG-3+, 및 Tim-3+)를 증가시키고, 조절인자 T 세포 (Treg)를 증가시키지만, 종양 미세환경에서 골수성 유래된 억제 세포 (MDSC)의 수를 상당히 변화시키지 않는다는 것을 유세포측정 분석에 의해 도시한다.

도 9a는 실시예 6에 기재된 바와 같이, 4T1 종양이 이식되고 비히클 또는 에파카도스타트로 불리는 IDO 억제제 (IDOi)로 처리된 Balb/C 마우스에 대한 치료 스케줄을 도시한다.

도 9b는 IDOi 치료가 4T1 종양에서 β-카테닌 수준을 감소시키고 CD8 T-세포 침윤을 증가시키고, IDO1 수준을 감소시킨다는 것을 면역조직화학에 의해 도시한다.

도 9c는 IDOi 치료의 두 사이클이 Balb/C 마우스 안으로 이식된 4T1 종양에서 위약에 비교하여 종양 성장을 억제한다는 것을 도시한다.

도 10a-c는 실시예 7에 기재된 바와 같이, 종양 퇴화를 나타내는 3가지 제제 모두의 조합으로, 4T1 종양이 이식된 Balb/C 마우스에 단일 제제 (도 10a), 2 종의 제제의 조합 (도 10b), 또는 3가지 제제의 조합 (도 10c)으로 투여된, IDOi (에파카도스타트), 항-PD-1 항체 (PD-1), 및 EX M3의 효능을 도시한다.

도 11a-b는 IDOi, 항-PD-1 항체 및/또는 EX M3으로 처리된 4T1 종양에서 CD8 (도 11a) 및 Foxp3 (도 11b)의 mRNA 수준을 도시하고 3가지 제제 모두의 조합만이 CD8 mRNA 수준을 상당히 증가시켰고 그리고 Foxp3 mRNA 수준을 상당히 감소시켰다는 것을 입증한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 개시내용이 보다 쉽게 이해되도록 하기 위해, 특정 용어들이 아래에 먼저 정의된다. 하기 용어들 및 다른 용어들에 대한 추가의 정의는 본 명세서를 통해 제시될 수 있다. 아래에 제시된 용어의 정의가 참조로 포함된 출원 또는 특허에서의 정의와 일치하지 않는 경우, 본원에 제시된 정의가 용어의 의미를 이해하기 위해 사용되어야 한다.

[0022] 본 명세서 및 첨부된 청구항들에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 복수의 참조를 포함한다. 따라서 예를 들어, "방법"에 대한 언급은 본 명세서에 기재된 및/또는 본 개시내용 등을 읽을 때 당해 분야의 숙련자에게 명백하게 될 하나 이상의 방법, 및/또는 단계들의 유형을 포함한다.

[0023] **투여:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 대상체에게 조성물을 "투여하는 것"은 조성물을 대상체에게 제공, 적용 또는 접촉시키는 것을 의미한다. 투여는, 예를 들어, 국소, 경구, 피하, 근육내, 복강내, 정맥내, 척추강내 및 진피내를 포함한, 임의의 수의 경로에 의해 달성될 수 있다.

[0024] **항체:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 면역글로불린 또는 이의 항원-결합 도메인을 지칭한다. 본 용어는 비제한적으로 다클론성, 단클론성, 단일특이적, 다중특이적, 비-특이적, 인간화된, 인간, 단일-사슬, 키메라, 합성, 재조합, 하이브리드, 돌연변이된, 그래프팅된, 및 시험관내 생성된 항체를 포함한다. 본 항체는 이의 불변 영역, 또는 부분, 예컨대 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론 및 뮤 불변 영역 유전자를 포함할 수 있다. 예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA₁, IgA₂, IgD, 및 IgE를 포함한 다양한 아이소타입의 중쇄 불변 영역이 사용될 수 있다. 예로써, 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다일 수 있다.

[0025] **항원-결합 도메인:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "항원-결합 도메인"은 항체와 항원 사이의 특이적 결

합을 담당할 수 있는 아미노산을 포함하는 항체 분자의 일부를 지칭한다. 특정 항원의 경우, 항원-결합 도메인은 항원의 일부에만 결합할 수 있다. 항체에 의해 구체적으로 인식되고 결합되는 항원의 일부는 "에피토프" 또는 "항원 결정기"로 지칭된다. 항원-결합 도메인은 Fab (단편 항원-결합(Fragment antigen-binding)); 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 갖는 2가 단편인, F(ab')₂ 단편; Fv 단편; 단일 사슬 Fv 단편 (scFv) 예를 들어, Bird 등 (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston 등 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)을 참조한다; 두 V_H 및 C_{H1} 도메인을 갖는 Fd 단편; dAb (Ward 등, (1989) *Nature* 341:544-546), 및 항원-결합 기능을 보유하는 다른 항체 단편을 포함한다. Fab 단편은 불변 영역들 사이에 디설파이드 결합에 의해 공유결합된 V_H-C_{H1} 및 V_L-C_L 도메인을 갖는다. Fv 단편은 더 작고 비-공유결합된 V_H 및 V_L 도메인을 갖는다. 비-공유결합된 도메인의 해리하는 경향을 극복하기 위해, scFv가 구축될 수 있다. scFv는 (1) V_H의 C-말단을 V_L의 N-말단에, 또는 (2) V_L의 C-말단을 V_H의 N-말단에 연결하는 가요성 폴리펩타이드를 함유한다. 15-mer (Gly₄Ser)₃ 펩타이드가 링커로서 사용될 수 있지만, 다른 링커도 당해 기술에 공지되어 있다. 이들 항체 단편은 당업계에서 통상인에게 알려진 통상적인 기술을 사용하여 획득되고, 상기 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 기능에 대해 평가된다.

[0026] **안티센스 가닥:** 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥: 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함한다. 안티센스 가닥 또는 이의 영역은 부분적으로, 실질적으로 또는 완전하게 표적 핵산의 상응하는 영역에 대해 상보성이다. 또한, 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 안티센스 가닥 또는 이의 영역은 부분적으로, 실질적으로 또는 완전하게 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 센스 가닥 또는 이의 영역에 상보성이다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 또한 표적 핵산 서열에 비-상보성인 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 비-상보성 뉴클레오타이드는 상보성 서열의 어느 하나의 측면 상에 있을 수 있거나 또는 상보성 서열의 양면 상에 있을 수 있다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥 또는 이의 영역이 부분적으로 또는 실질적으로 센스 가닥 또는 이의 영역에 상보성인 경우, 비-상보성 뉴클레오타이드는 상보성의 하나 이상의 영역 사이에 위치할 수 있다 (예를 들어, 하나 이상의 미스매치). 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 안티센스 가닥은 또한 일명 가이드 가닥이다.

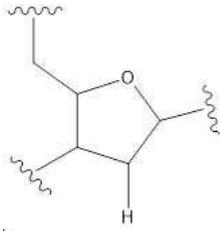
[0027] **대략:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 관심 있는 하나 이상의 값에 적용될 때 용어 "대략" 또는 "약"은 언급된 기준값에 유사한 값을 지칭한다. 특정 구현예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 언급되지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 분명하지 않는 한 (그와 같은 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우 제외) 언급된 기준값의 어느 하나의 방향 (초과 또는 미만)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만 내로 되는 값의 범위를 지칭한다.

[0028] **β-카테닌:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "β-카테닌"은 이와 같은 β-카테닌 단백질을 인코딩하는 폴리펩타이드 또는 핵산 서열을 지칭한다. 폴리펩타이드를 지칭할 때, "β-카테닌"은 β-카테닌 유전자/전사체 (CTNNB1)의 폴리펩타이드 유전자 산물 (유전자은행 기탁 번호 NM_001904.3 (인간 β-카테닌 전사 변이체 1), NM_001098209.1 (인간 β-카테닌 전사 변이체 2), NM_001098210.1 (인간 β-카테닌 전사 변이체 3), 및 NM_007614.2 & NM_007614.3 (마우스 β-카테닌)을 지칭한다.

[0029] **상보성:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성"은 2개의 뉴클레오타이드가 서로 염기쌍을 형성하도록 하는 (예를 들어, 2개의 대향하는 핵산 상 또는 단일 핵산 가닥의 대향하는 영역 상에서) 2개 뉴클레오타이드 간의 구조 관계를 지칭한다. 예를 들어, 대향하는 핵산의 피리미딘 뉴클레오타이드에 상보성인 일 핵산의 퓨린 뉴클레오타이드는 서로 수소 결합을 형성함에 의해 함께 염기쌍일 수 있다. 일부 구현예에서, 상보성 뉴클레오타이드는 왓슨-크릭 방식 또는 안정적인 듀플렉스의 형성을 허용하는 임의의 다른 방식으로 염기쌍일 수 있다. "**완전하게 상보성**" 또는 100% 상보성은 제1 올리고뉴클레오타이드 가닥의 각각의 뉴클레오타이드 단량체 또는 제1 올리고뉴클레오타이드 가닥의 분절이 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥의 각각의 뉴클레오타이드 단량체 또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥의 분절과 함께 염기쌍을 형성할 수 있는 상황을 지칭한다. 100% 미만 상보성은 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥 (또는 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥의 2개의 분절)의 전부가 아닌 일부 뉴클레오타이드 단량체가 서로 염기쌍을 형성할 수 있는 상황을 지칭한다. "**실질적인 상보성**"은 서로에 대해서 90% 또는 그 초과 상보성을 나타내는 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥 (또는 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥의 분절)을 지칭한다. "**충분히 상보성**"은 표적 mRNA에 의해 인코딩된 단백질의 양에서 감소가 있도록, 표적 mRNA와 핵산 억제제 분자 사이의 상보성을 지칭한다.

[0030] **상보성 가닥:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성 가닥"은 다른 가닥에 대해 부분적으로, 실질적으로 또는 완전하게 상보성인 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 가닥을 지칭한다.

[0031] **데옥시리보푸라노실:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "데옥시리보푸라노실"은 자연 발생 DNA에서 발견되고, 하기 예시된 바와 같이, 2'-탄소에 수소기를 갖는 푸라노실을 지칭한다:



[0032]

[0033] **데옥시리보뉴클레오타이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "데옥시리보뉴클레오타이드"는 천연 뉴클레오타이드 (본 명세서에서 정의된 바와 같음) 또는 당 모이어티의 2'-위치에 수소기를 갖는 변형된 뉴클레오타이드 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)를 지칭한다.

[0034] **dsRNAi 억제제 분자:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "dsRNAi 억제제 분자"는 센스 가닥 (패신저) 및 안티센스 가닥 (가이드)을 갖는 이중-가닥 핵산 억제제 분자를 지칭하고, 여기서 상기 안티센스 가닥 또는 상기 안티센스 가닥의 일부는 표적 mRNA의 절단에서 아르고노트 2 (Ago2) 엔도뉴클레아제에 의해 사용된다.

[0035] **듀플렉스:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "듀플렉스"는 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)과 관련하여 뉴클레오타이드의 2개의 역평행 서열의 상보성 염기 짝짓기를 통해 형성된 구조를 지칭한다.

[0036] **부형제:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "부형제"는, 예를 들어 원하는 점조도 또는 안정화 효과를 제공하거나 또는 기여하도록 조성물에 포함될 수 있는 비-치료제를 지칭한다.

[0037] **푸라노실:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "푸라노실"은 4개 탄소 원자 및 1개 산소 원자를 갖는 5-원 고리를 포함하는 구조를 지칭한다.

[0038] **뉴클레오타이드간 연결 기:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "뉴클레오타이드간 연결 기" 또는 "뉴클레오타이드간 연결"은 2개의 뉴클레오사이드 모이어티를 공유적으로 연결할 수 있는 화학기를 지칭한다. 전형적으로, 화학기는 포스포 또는 포스포이트 기를 함유하는 인-함유 연결 기이다. 포스포 연결 기는 포스포디에스테르 연결, 포스포로디티오에이트 연결, 포스포로티오에이트 연결, 포스포트리에스테르 연결, 티오노알킬포스포네이트 연결, 티오알킬포스포트리에스테르 연결, 포스포르아미다이트 연결, 포스포네이트 연결 및/또는 보라노포스페이트 연결을 포함하는 것으로 의도된다. 많은 인-함유 연결기가, 예를 들어, 미국 특허 번호 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 및 5,625,050에 개시된 바와 같이 당해 분야에서 잘 알려져 있다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 인 원자를 함유하지 않는 하나 이상의 뉴클레오타이드간 연결 기, 이러한 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오타이드간 연결기, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오타이드간 연결 기, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 복소환형 뉴클레오타이드간 연결기, 비제한적으로, 실록산 백본을 갖는 것들을 포함하는 것; 설파이드, 설파사이드 및 설피온 백본; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 리보아세틸 백본; 알켄 함유 백본; 설페이트 백본; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 백본; 설포네이트 및 설피온아미드 백본; 및 아마이드 백본을 함유한다. 비-인 함유 연결기는, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 및 5,677,439에서 개시된 바와 같이 당해 분야에서 잘 알려져 있다.

[0039] **면역 관문 분자:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역 관문 분자"는 정상 생리 조건 하에서 면역계가 외부 병원체에 대해 반응할 때 자기-내성의 유지 (또는 자가면역의 예방) 및 숙주세포 및 조직의 보호에 중요한 면역 세포, 예컨대 T 세포 상의 분자를 지칭한다. 특정 면역 관문 분자는 항원에 대한 T 세포 반응에 관여된 신호를 증폭하는 공통자극 분자이고 반면에 특정 면역 관문 분자는 항원에 대한 T 세포 반응에 관여된 신호를 감소시키는 억제성 분자 (예를 들어, CTLA-4 또는 PD-1)이다.

[0040] **변형된 핵염기:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 핵염기"는 천연 핵염기 또는 보편적인 핵염기가

아닌 임의의 핵염기를 지칭한다. 적합한 변형된 핵염기는 디아미노퓨린 및 그것의 유도체, 알킬화된 퓨린 또는 피리미딘, 아실화된 퓨린 또는 피리미딘 티올레이트화 퓨린 또는 피리미딘, 및 기타 동종의 것을 포함한다. 다른 적합한 변형된 핵염기는 퓨린 및 피리미딘의 유사체를 포함한다. 적합한 유사체, 비제한적으로, 1-메틸아데닌, 2-메틸아데닌, N6-메틸아데닌, N6-이소펜틸아데닌, 2-메틸티오-N6-이소펜틸아데닌, N,N-디메틸아데닌, 8-브로모아데닌, 2-티오시토신, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, 5-에틸시토신, 4-아세틸시토신, 1-메틸구아닌, 2-메틸구아닌, 7-메틸구아닌, 2,2-디메틸구아닌, 8-브로모구아닌, 8-클로로구아닌, 8-아미노구아닌, 8-메틸구아닌, 8-티오구아닌, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-아이오도우라실, 5-에틸우라실, 5-프로필우라실, 5-메톡시우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 5-(카복시하이드록시메틸)우라실, 5-(메틸아미노메틸)우라실, 5-(카복시메틸아미노메틸)-우라실, 2-티오우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 5-(2-브로모비닐)우라실, 우라실-5-옥시아세트산, 우라실-5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 슈도우라실, 1-메틸슈도우라실, 퀴오신, 하이포잔틴, 잔틴, 2-아미노퓨린, 6-하이드록시아미노퓨린, 니트로피롤릴, 니트로인돌릴 및 디플루오로톨릴, 6-티오피린 및 2,6-디아미노퓨린 니트로피롤릴, 니트로인돌릴 및 디플루오로톨릴을 포함한다. 전형적으로 핵염기는 질소성 염기를 함유한다. 특정 구현예에서, 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, 미국 공개된 특허 출원 번호 20080274462를 참고한다.

[0041] **변형된 뉴클레오사이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 뉴클레오사이드"는 포스페이트 기 또는 변형된 포스페이트 기 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)에 연결되지 않고 변형된 핵염기 (본 명세서에서 정의된 바와 같음), 보편적인 핵염기 (본 명세서에서 정의된 바와 같음) 또는 변형된 당 모이어티 (본 명세서에서 정의된 바와 같음) 중 하나 이상을 함유하는 당 (예를 들어, 데옥시리보스 또는 리보오스 또는 이의 유사체)과 N-글리코시드 결합에 복소환형 질소성 염기를 지칭한다. 변형된 또는 보편적인 핵염기 (또한 본 명세서에서 일명 염기 유사체)는 일반적으로 뉴클레오사이드 당 모이어티의 1'-위치에 위치되고 1'-위치에서 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 이외의 핵염기를 지칭한다. 특정 구현예에서, 변형된 또는 보편적인 핵염기는 질소성 염기이다. 특정 구현예에서, 변형된 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, 미국 공개된 특허 출원 번호 20080274462를 참고한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 핵염기 (무염기성)를 함유하지 않는다. 본 개시내용의 맥락에서 적합한 변형된 또는 보편적인 핵염기 또는 변형된 당류는 본 명세서에 기재되어 있다.

[0042] **변형된 뉴클레오타이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 뉴클레오타이드"는 포스페이트 기 또는 변형된 포스페이트 기 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)에 연결되고 변형된 핵염기 (본 명세서에서 정의된 바와 같음), 보편적인 핵염기 (본 명세서에서 정의된 바와 같음) 또는 변형된 당 모이어티 (본 명세서에서 정의된 바와 같음) 중 하나 이상을 함유하는 당 (예를 들어, 데옥시리보스 또는 리보오스 또는 이의 유사체)과 N-글리코시드 결합에 복소환형 질소성 염기를 지칭한다. 변형된 또는 보편적인 핵염기 (또한 본 명세서에서 일명 염기 유사체)는 일반적으로 뉴클레오사이드 당 모이어티의 1'-위치에 위치되고 1'-위치에서 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 이외의 핵염기를 지칭한다. 특정 구현예에서, 변형된 또는 보편적인 핵염기는 질소성 염기이다. 특정 구현예에서, 변형된 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, 미국 공개된 특허 출원 번호 20080274462를 참고한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 핵염기 (무염기성)를 함유하지 않는다. 본 개시내용의 맥락에서 적합한 변형된 또는 보편적인 핵염기, 변형된 당 모이어티, 또는 변형된 포스페이트 기는 본 명세서에 기재되어 있다.

[0043] **변형된 포스페이트 기:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 포스페이트 기"는 천연 뉴클레오타이드에서 발생하지 않는 포스페이트 기의 변형을 지칭하고, 인 원자를 포함하는 포스페이트 모방체 및, 포스페이트를 포함하지 않는 음이온성 포스페이트 모방체 (예를 들어 아세테이트)를 포함한, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 비-자연 발생 포스페이트 모방체를 포함한다. 변형된 포스페이트 기는 또한, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 예를 들어, 포스포로티오에이트를 포함한 인-함유 뉴클레오타이드간 연결 기, 및 비-인 함유 연결 기 양자를 포함한 비-자연 발생 뉴클레오타이드간 연결 기를 포함한다.

[0044] **변형된 당 모이어티:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "변형된 당 모이어티"는 치환된 당 모이어티 (본 명세서에서 정의된 바와 같음) 또는 당 유사체 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)를 지칭한다.

[0045] **천연 뉴클레오사이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "천연 뉴클레오사이드"는 당 (예를 들어, 데옥시리보스 또는 리보오스 또는 이의 유사체)과 N-글리코시드 결합에서 복소환형 질소성 염기를 지칭한다. 천연 복소환형 질소성 염기는 아데닌, 구아닌, 시토신, 우라실 및 티민을 포함한다.

[0046] **천연 뉴클레오타이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "천연 뉴클레오타이드"는 포스페이트 기에 연결된

당 (예를 들어, 리보오스 또는 데옥시리보오스 또는 이의 유사체)과 N-글리코시드 결합에서 복소환형 질소성 염기를 지칭한다. 천연 복소환형 질소성 염기는 아데닌, 구아닌, 시토신, 우라실 및 티민을 포함한다.

- [0047] **천연 핵염기:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "천연 핵염기"는 RNA 및 DNA의 5개 일차, 자연 발생 복소환형 핵염기, 즉, 퓨린 염기: 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘 염기: 티민 (T), 시토신 (C), 및 우라실 (U)을 지칭한다.
- [0048] **천연 뉴클레오사이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "천연 뉴클레오사이드"는 포스페이트 기에 연결되지 않은 천연 당 모이어티 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)와 N-글리코시드 결합에서 천연 핵염기 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0049] **천연 뉴클레오타이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "천연 뉴클레오타이드"는 포스페이트 기에 연결된 천연 당 모이어티 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)와 N-글리코시드 결합에서 천연 핵염기 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0050] **천연 당 모이어티:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "천연 당 모이어티"는 리보푸라노실 (본 명세서에서 정의된 바와 같음) 또는 데옥시리보푸라노실 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)을 지칭한다.
- [0051] **비-T 세포 염증성 표현형:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "비-T 세포 염증성 표현형"은 종양 미세환경에서 침윤하는 CD8+ T 세포의 거의 전혀 축적 없음에 의해 입증된 바와 같이, 종양에 대한 기존의 T 세포 반응이 없는 종양 미세환경을 지칭한다. 전형적으로, 비-T 세포 염증성 표현형은 또한 종양 미세환경에서 CD8+ T 세포의 동원 및 축적을 증진하지 않는 제한된 케모카인 프로파일 및/또는 유형 I IFN 유전자 서명의 최소 또는 부재를 특징으로 한다.
- [0052] **비-Wnt 활성화된 질환 또는 장애:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "비-Wnt 활성화된" 질환 또는 장애는 Wnt/ β -카테닌 경로의 활성화와 연관되지 않은 질환 또는 장애를 지칭한다. "비-Wnt 활성화된" 질환 또는 장애는 특정 결장직장, 테스토이드, 자궁내막, 위, 간세포, 간모세포종, 신장 (윌름스 종양), 수모세포종, 흑색종, 신경교세포종, 난소 (자궁내막모양), 췌장, 폐암종, 전립선, 신장, 갑상선 (역형성) 및 자궁 (자궁내막) 암을 비롯한 특정 암 및/또는 증식성 질환, 병태, 또는 장애를 포함한다. 일 구현예에서, "비-Wnt 활성화된" 질환 또는 장애는 결장직장암, 간세포 암종, 또는 흑색종이다. 일 구현예에서, "비-Wnt 활성화된" 질환 또는 장애는 신경교세포종, 신장암, 또는 흑색종이다. 상기에 열거된 암 및/또는 증식성 질환을 포함한 질환 또는 장애는, 아래에 제공된 Wnt 활성화된 질환 또는 장애의 정의와 일치하는, 질환 또는 장애의 비-Wnt 활성화된 하위유형 및 질환 또는 장애의 Wnt 활성화된 하위유형 둘 모두를 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0053] **핵산 억제제 분자:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "핵산 억제제 분자"는 표적 유전자의 발현을 감소 또는 제거하는 올리고뉴클레오타이드 분자를 지칭하고 상기 올리고뉴클레오타이드 분자는 표적 유전자 mRNA에서 서열을 구체적으로 표적화하는 영역을 함유한다. 전형적으로, 핵산 억제제 분자의 표적화 영역은 명시된 표적 유전자에 대한 핵산 억제제 분자의 효과를 지향하도록 표적 유전자 mRNA 상의 서열에 대해 충분히 상보성인 서열을 포함한다. 핵산 억제제 분자는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 및/또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0054] **핵염기:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "핵염기"는 천연 핵염기 (본 명세서에서 정의된 바와 같음), 변형된 핵염기 (본 명세서에서 정의된 바와 같음), 또는 보편적인 핵염기 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0055] **뉴클레오사이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "뉴클레오사이드"는 천연 뉴클레오사이드 (본 명세서에서 정의된 바와 같음) 또는 변형된 뉴클레오사이드 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0056] **뉴클레오타이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "뉴클레오타이드"는 천연 뉴클레오타이드 (본 명세서에서 정의된 바와 같음) 또는 변형된 뉴클레오타이드 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0057] **돌출부:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "돌출부"는 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 어느 하나의 가닥의 어느 하나의 말단에서 말단 비-염기 짝짓기 뉴클레오타이드(들)를 지칭한다. 특정 구현예에서, 돌출부는 제1 가닥 또는 영역이 듀플렉스를 형성하는 상보성 가닥의 말단을 넘어서 신장하는 하나의 가닥 또는 영역으로부터 유래한다. 염기쌍의 수소 결합을 통해 듀플렉스를 형성할 수 있는 2개의 올리고뉴클레오타이드 영역 중 하나 또는 둘 모두는 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 영역에 의해 공유된 상보성의 3'- 및/또는 5'-말단을 넘어서 신장하는 5'- 및/또는 3'-말단을 가질 수 있다. 듀플렉스의 3'- 및/또는 5'-말단을 넘어서 신장하는 단일-가닥 영역이

돌출부로 지칭된다.

[0058] **약제학적 조성물:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적 조성물"은 약리적 유효량의 β -카테닌 핵산 억제제 분자 또는 면역치료제, 예컨대 항체 (예를 들어, 항-CTLA-4, 항-PD-1, 또는 항-PD-L1 항체 중 하나 이상을 포함함) 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.

[0059] **약제학적으로 허용가능한 부형제:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용가능한 부형제"는 상기 부형제가 합리적인 유익/유해 비율에 비례하는 과도한 유해한 부작용 (예컨대 독성, 자극, 및 알러지성 반응) 없이 인간 및/또는 동물에 사용하기에 적합한 것임을 의미한다.

[0060] **포스페이트 모방체:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "포스페이트 모방체"는 포스페이트 기의 정전 및 입체 특성을 모방하는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에서의 화학 모이어티를 지칭한다. 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부착될 수 있는 많은 포스페이트 모방체가 개발되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,927,513; Prakash 등 *Nucleic Acids Res.*, 2015, 43(6):2993-3011를 참고한다). 전형적으로, 이들 5'-포스페이트 모방체는 포스파타제-저항성 연결기를 함유한다. 적합한 포스페이트 모방체는, 전체적으로 본 명세서에 참고로 통합된 국제공개 번호 WO 2018/045317에 기재된 바와 같이, 5'-포스포네이트, 예컨대 5'-메틸렌포스포네이트 (5'-MP) 및 5'-(E)-비닐포스포네이트 (5'-VP) 및 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 뉴클레오타이드의 당 모이어티 (예를 들어, 리보오스 또는 데옥시리보스 또는 이의 유사체)의 4'-탄소에 결합된 4'-포스페이트 유사체, 예컨대 4'-옥시메틸포스포네이트, 4'-티오메틸포스포네이트, 또는 4'-아미노메틸포스포네이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 4'-옥시메틸포스포네이트는 식 $-O-CH_2-PO(OH)_2$ 또는 $-O-CH_2-PO(OR)_2$ 에 의해 제시되고, 여기서 R은 H, CH_3 , 알킬기, 또는 보호기로부터 독립적으로 선택된다. 특정 구현예에서, 알킬기는 CH_2CH_3 이다. 더욱 전형적으로, R은 H, CH_3 , 또는 CH_2CH_3 으로부터 독립적으로 선택된다. 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 대한 다른 변형이 개발되어 졌다 (예를 들어, WO 2011/133871를 참고한다).

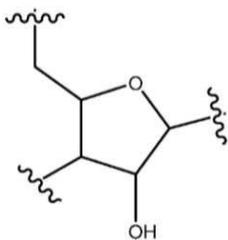
[0061] **강력하게 하다:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "강력하게 하다" 또는 "강력하게 하는"은 또 다른 치료제 (예를 들어, 억제제 면역 관문 분자의 길항제, 예컨대 CTLA-4 또는 PD-1, 또는 공통자극 관문 분자의 효능제)의 치료 효과를 증가 또는 향상시키는 일 치료제 (예를 들어, β -카테닌 핵산 억제제 분자)의 능력을 지칭한다.

[0062] **보호기:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "보호기"는 원하는 반응의 특정 조건 하에서 작용기를 가역적으로 무반응성으로 하는 기로 통상적인 화학적 관점에서 사용된다. 원하는 반응 후, 보호기는 보호된 작용기를 탈보호하기 위해 제거될 수 있다. 모든 보호기는 합성되는 분자의 실질적인 비율을 분해하지 않는 조건 하에서 제거 가능하여야 한다.

[0063] **감소(한다):** 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "감소" 또는 "감소한다"는 일반적으로 당업계에서 허용된 바와 같은 그것의 의미를 지칭한다. 핵산 억제제 분자와 관련하여, 본 용어는 일반적으로 유전자의 발현, 또는 RNA 분자 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 서브유닛을 인코딩하는 동등한 RNA 분자의 수준, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 서브유닛의 활성이 핵산 억제제 분자의 부재에서 관측된 것 이하로의 감소를 지칭한다.

[0064] **저항:** 면역요법에 관련하여 사용된 용어 "저항" 또는 "저항성"은 면역요법에 대해 의료적으로 상당한 반응을 나타내지 않는 암 및/또는 증식성 질환, 병태 또는 장애를 지칭한다. 본 명세서에서 개시된 바와 같이, 면역요법에 대한 저항은 β -카테닌 발현을 감소시킴에 의해 역전될 수 있다.

[0065] **리보푸라노실:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "리보푸라노실"은 자연 발생 RNA에서 발견되고 하기에 예시된 바와 같이 2'-탄소에 하이드록실 기를 갖는 푸라노실을 지칭한다:



[0066] **리보뉴클레오타이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "리보뉴클레오타이드"는 천연 뉴클레오타이드 (본 명세서에서 정의된 바와 같음) 또는 당 모이어티의 2'-위치에 하이드록실 기를 갖는 변형된 뉴클레오타이드 (본 명세서에서 정의된 바와 같음)를 지칭한다.

명세서에서 정의된 바와 같음)를 지칭한다.

- [0068] **센스 가닥**: 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥인: 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함한다. 센스 가닥 또는 이의 영역은 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 안티센스 가닥 또는 이의 영역에 부분적으로, 실질적으로 또는 완전하게 상보성이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 또한 안티센스 가닥에 비-상보성인 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 비-상보성 뉴클레오타이드는 상보성 서열의 어느 하나의 측면 상에 있을 수 있거나 또는 상보성 서열의 양면 상에 있을 수 있다. 특정 구현예에서, 센스 가닥 또는 이의 영역이 부분적으로 또는 실질적으로 안티센스 가닥 또는 이의 영역에 상보성인 경우, 비-상보성 뉴클레오타이드는 상보성의 하나 이상의 영역 사이에 위치할 수 있다 (예를 들어, 하나 이상의 미스매치). 센스 가닥은 또한 소위 패신저 가닥이다.
- [0069] **대상체**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 마우스, 토끼, 및 인간을 포함한 임의의 포유동물을 의미한다. 일 구현예에서, 상기 대상체는 인간이다. 용어들 "개체" 또는 "환자"는 "대상체"와 교환가능한 것으로 의도된다.
- [0070] **치환체 또는 치환된**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어들 "치환체" 또는 "치환된"은 치환체의 라디칼로 주어진 구조에서의 수소 라디칼의 대체를 지칭한다. 임의의 주어진 구조에서 한 곳보다 많은 위치가 1개 초과로 치환체로 치환될 수 있을 때, 본 치환체는 달리 나타내지 않는 한 모든 위치에서 동일 또는 상이할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "치환된"은 유기 화합물과 양립가능한 모든 허용되는 치환체를 포함하는 것으로 고려된다. 허용되는 치환체는 유기 화합물의 비환형 및 환형, 분지 및 비분지, 탄소환형 및 복소환형, 방향족 및 비방향족 치환체를 포함한다. 본 개시내용은 임의의 방식으로 유기 화합물의 허용가능한 치환체로 제한하기 위한 것은 아니다.
- [0071] **치환된 당 모이어티**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "치환된 당 모이어티"는 하나 이상의 변형을 포함하는 푸라노실을 포함한다. 전형적으로, 변형은 당의 2'-, 3'-, 4'-, 또는 5'-탄소 위치에서 일어난다.
- [0072] **당 유사체**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "당 유사체"는, 얻어진 뉴클레오타이드가 (1) 올리고뉴클레오타이드 안으로의 편입 및 (2) 상보성 뉴클레오타이드에 혼성화할 수 있도록, 푸라노실을 포함하지 않고 뉴클레오타이드의 자연 발생 당 모이어티를 대체할 수 있는 구조를 지칭한다. 그와 같은 구조는 푸라노실에 대한 상대적으로 간단한 변경, 예컨대 상이한 수의 원자를 포함하는 고리 (예를 들어, 4, 6, 또는 7-원 고리); 비-산소 원자 (예를 들어, 탄소, 황, 또는 질소)로 푸라노실의 산소의 대체; 또는 원자의 수 및 산소의 대체에서의 변경들 모두를 전형적으로 포함한다. 그와 같은 구조는 또한 치환된 당 모이어티에 대해 기재된 것들과 상응하는 치환을 포함할 수 있다. 당 유사체는 또한 보다 복잡한 당 대체물질 (예를 들어, 펩타이드 핵산의 비-고리계)를 포함한다. 당 유사체는 비제한적으로 모폴리노, 사이클로헥세닐 및 사이클로헥시톨을 포함한다.
- [0073] **당 모이어티**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "당 모이어티"는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드의 천연 당 모이어티 또는 변형된 당 모이어티를 지칭한다.
- [0074] **표적 부위**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "표적 부위", "표적 서열", "표적 핵산", "표적 영역", "표적 유전자"는 상호교환적으로 사용되고, 예를 들어, 그 표적 서열에 부분적으로, 실질적으로, 또는 완전하게 또는 충분히 상보성인 그것의 가이드/안티센스 영역 내의 서열을 함유하는 dsRNAi 억제제 분자에 의해 매개된 절단에 대해 "표적화된" RNA 또는 DNA 서열을 지칭한다.
- [0075] **T 세포-염증성 종양 표현형**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "T 세포-염증성 표현형"은 종양 미세환경에서 침윤하는 CD8+ T 세포의 축적에 의해 입증된 바와 같이, 종양에 대한 기존의 T 세포 반응을 갖는 종양 미세환경을 지칭한다. 전형적으로, T 세포-염증성 표현형은 또한 종양 미세환경에 CD8+ T 세포를 동원할 수 있는 넓은 케모카인 프로파일 (CXCL9 및/또는 CXCL10을 포함함) 및/또는 유형 I IFN 유전자 서명을 특징으로 한다.
- [0076] **치료 유효량**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "치료 유효량" 또는 "약리적 유효량"은 의도된 약리학적, 치료적 또는 예방적 결과를 생성하는데 효과적인 β -카테닌 핵산 억제제 분자 또는 면역치료제, 예컨대 항체 (예를 들어, 항-CTLA-4, 항-PD-1, 또는 항-PD-L1 항체 중 하나 이상을 포함함)의 양을 지칭한다.
- [0077] **보편적인 핵염기**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "보편적인 핵염기"는 자연 발생 핵산에서 전형적으로 발견된 염기 중 하나 초과와 짝지을 수 있고 따라서 듀플렉스에서 이와 같은 자연 발생 염기를 치환할 수 있는 염기를 지칭한다. 염기는 각각의 자연 발생 염기와 짝짓기 가능할 필요는 없다. 예를 들어, 특정 염기는 퓨린과 단독으로 또는 선택적으로 또는 피리미딘과 단독으로 또는 선택적으로 짝을 이룬다. 보편적인 핵염기는 왓슨-크릭 또는 비-왓슨-크릭 상호작용 (예를 들어, 휴그스틴 상호작용)을 통해 수소 결합을 형성함에 의해 염기쌍을 형성

할 수 있다. 대표적인 보편적인 핵염기는 이노신 및 그것의 유도체를 포함한다.

[0078] **Wnt 활성화된 질환 또는 장애:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "Wnt 활성화된" 질환 또는 장애는 활성화된 Wnt/ β -카테닌 경로와 연관된 질환 또는 장애를 지칭한다. "Wnt-연관된" 질환 또는 장애는 결장직장, 데스모이드, 자궁내막, 위, 간세포, 간모세포종, 신장 (윌름스 종양), 수모세포종, 흑색종, 난소 (자궁내막모양), 췌장, 폐암종, 전립선, 갑상선 (역형성) 및 자궁 (자궁내막) 암을 비롯한 암 및/또는 증식성 질환, 병태, 또는 장애를 포함한다. 일 구현예에서, "Wnt 활성화된" 질환 또는 장애는 결장직장암, 간세포 암종, 또는 흑색종이다. 상기에 열거된 암 및/또는 증식성 질환을 포함한 질환 또는 장애는, 아래에 제공된 비-Wnt 활성화된 질환 또는 장애의 정의와 일치하는, 질환 또는 장애의 Wnt 활성화된 버전 및 질환 또는 장애의 비-Wnt 활성화된 버전 둘 모두를 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0079] **Wnt/ β -카테닌 경로:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "Wnt/ β -카테닌 경로"는 β -카테닌을 포함하는 다운스트림 신호전달 경로를 개시하는, Wnt 리간드, 수용체, 및 공-수용체의 조합을 통해 매개된 세포에서 분자 신호전달 경로를 지칭한다 (예를 들어, 도 6 참고). Wnt 신호전달의 부재에서, β -카테닌은 세포의 세포질에서 유비퀴틴화를 통해 분해에 대해 표적화된다. Wnt 리간드 및 Wnt 신호전달의 존재에서, β -카테닌은 안정화되고, 전사 인자, 예컨대 T 세포 전사 인자 (TCF) 및 림프양 향상된 전사 인자 (LEF)와 상호작용할 수 있고 유전자 전사를 활성화할 수 있는 세포 핵으로 이동한다. Wnt/ β -카테닌 경로의 탈조절 및 활성화는 β -카테닌 유전자 또는, β -카테닌 기능을 음성적으로 조절하는 선종성 결장 폴립증 (APC)을 인코딩하는 유전자에서의 돌연변이에 의해 가장 흔하게 야기되지만, 또한 Axin, LEF, 및 ICAT와 같이, Wnt/ β -카테닌 경로의 다른 성분을 인코딩하는 유전자에서의 돌연변이에 의해 야기될 수 있다.

[0080] **상세한 설명**

[0081] 본원은 독특한 패턴의 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 강력한, 최적화된 이중-가닥 β -카테닌 핵산 억제제 분자를 제공한다. 실시예에서 나타낸 바와 같이, 이중-가닥 핵산 분자의 센스 및 안티센스 가닥에서 뉴클레오타이드의 변형 패턴을 변경하는 것은, 센스 및 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열이 동일한 경우에서조차도, 종양 세포에서 감소된 면역원성 및 β -카테닌 mRNA 발현의 개선된 감소를 포함한 개선된 특성을 초래할 수 있다. 면역요법에 반응하지 않는 암 (예를 들어, 면역 관문 분자의 차단)을 포함한, 암을 치료하기 위한 방법 및 조성물을 비롯하여, **시험관내 또는 생체내 β -카테닌 유전자의 수준 또는 발현을 감소시키기 위한 최적화된, 이중-가닥 β -카테닌 핵산 억제제 분자 및 이를 포함하는 조성물을 사용하는 방법**이 또한 제공된다.

[0082] **최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자**

[0083] 본 명세서에 기재된 이중-가닥 β -카테닌 핵산 억제제 분자는 독특한 패턴의 뉴클레오타이드 변형을 포함하고, 동일한 패턴의 뉴클레오타이드 변형을 공유하지 않는 β -카테닌 핵산 억제제 분자에 비하여 개선된 특성을 보인다. 특정 구현예에서, 본 최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자의 센스 가닥은 서열번호: 11의 핵산을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자의 센스 가닥은 서열번호: 11의 핵산으로 구성된다. 특정 구현예에서, 본 최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자의 안티센스 가닥은 서열번호: 12의 핵산을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자의 안티센스 가닥은 서열번호: 12의 핵산으로 구성된다. 일 구현예에서, 본 센스 가닥은 서열번호: 11의 핵산으로 구성되고 본 안티센스 가닥은 서열번호: 12의 핵산으로 구성된다. 일 구현예에서, 본 센스 가닥은 서열번호: 11의 핵산을 포함하고 본 안티센스 가닥은 서열번호: 12의 핵산을 포함한다.

[0084] 특정 구현예에서, 상기 최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중-가닥 핵산 억제제 분자이고, 상기 센스 가닥은 서열번호: 11의 핵산을 포함하거나 이로 구성되고 상기 안티센스 가닥은 서열번호: 12의 핵산을 포함하거나 이로 구성되고 그리고 상기 센스 가닥과 안티센스 가닥은 함께 26개 염기쌍의 이중 영역을 형성하고, 그리고 상기 안티센스 가닥은 그것의 3' 말단에 2개 단일-가닥 뉴클레오타이드 및 그것의 5' 말단에 10개 단일-가닥 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0085] 이 최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자의 개략도는 도 2a ("EX M3")에 제시되어 있고, 이것은 센스 및 안티센스 가닥의 서열, 센스와 안티센스 가닥 사이의 상보성의 영역, 및 독특한 패턴의 변형된 뉴클레오타이드를 도시한다.

[0086] 독특한 패턴의 변형된 뉴클레오타이드는 또한 서열번호: 11 및 서열번호: 12로 제시된다. 서열번호: 11 및 서열번호: 12에서 제시된 바와 같이, 변형된 β -카테닌 핵산 억제제 분자에서 대부분의 뉴클레오타이드의 당 모이어티는 2'-F 또는 2'-OCH₃ 중 어느 하나로 변형된다. 구체적으로, 센스 가닥 (서열번호: 11)의 경우, 도 2a에 도

시된 바와 같이, 각각의 뉴클레오타이드 1, 3, 7, 9-11, 13, 15, 19, 및 20의 당 모이어티는 2'-F로 변형되고, 각각의 뉴클레오타이드 2, 4-6, 8, 12, 14, 16-18, 및 24의 당 모이어티는 2'-OCH₃으로 변형된다. 안티센스 가닥 (서열번호: 12)의 경우, 도 2에 도시된 바와 같이, 각각의 뉴클레오타이드 2, 6, 19, 21, 23, 25, 30, 31, 33, 및 35의 당 모이어티는 2'-F로 변형되고, 각각의 뉴클레오타이드 1, 3-5, 7-9, 11-15, 20, 22, 24, 26, 32, 34, 및 36-38의 당 모이어티는 2'-OCH₃으로 변형된다. 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자에서 나머지 뉴클레오타이드는 2'-F 또는 2'-OCH₃ 중 어느 하나로 변형되지 않는다. 더 구체적으로, 센스 가닥 (서열번호: 11)의 경우, 뉴클레오타이드 25 및 26은 데옥시리보뉴클레오타이드이고 뉴클레오타이드 21-23은 리보뉴클레오타이드이다. 전형적으로, 뉴클레오타이드 25 및 26은 천연 데옥시리보뉴클레오타이드이고 뉴클레오타이드 21-23은 천연 리보뉴클레오타이드이다. 안티센스 가닥 (서열번호: 12)의 경우, 뉴클레오타이드 10은 데옥시리보뉴클레오타이드이고 뉴클레오타이드 16-18 및 27-29는 리보뉴클레오타이드이다. 전형적으로, 뉴클레오타이드 10은 천연 데옥시리보뉴클레오타이드이고 뉴클레오타이드 16-18 및 27-29는 천연 리보뉴클레오타이드이다.

- [0087] 일 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중-가닥 핵산 억제제 분자이고;
- [0088] 상기 센스 가닥은 서열번호: 13의 핵산 서열 (agaaucaaaaugauguagaacagcc)을 포함하거나 이로 구성되고 상기 안티센스 가닥은 서열번호: 14의 핵산 서열 (uagcuaucgtggcuguuucuacaucauuuguauucugc)을 포함하거나 이로 구성되고 그리고 상기 센스 가닥과 안티센스 가닥은 함께 26개 염기쌍의 이중 영역을 형성하고 상기 안티센스 가닥은 그것의 3' 말단에 2개 단일-가닥 뉴클레오타이드 및 그것의 5' 말단에 10개 단일-가닥 뉴클레오타이드를 포함하고;
- [0089] 여기서 서열번호: 13의 각각의 뉴클레오타이드 1, 3, 7, 9-11, 13, 15, 19, 및 20의 당 모이어티는 2'-F로 변형되고 서열번호: 13의 각각의 뉴클레오타이드 2, 4-6, 8, 12, 14, 16-18, 및 24의 당 모이어티는 2'-OCH₃으로 변형되고, 서열번호: 13의 뉴클레오타이드 25 및 26은 천연 데옥시리보뉴클레오타이드이고, 서열번호: 13의 뉴클레오타이드 21-23은 천연 리보뉴클레오타이드이고;
- [0090] 여기서 서열번호: 14의 각각의 뉴클레오타이드 2, 6, 19, 21, 23, 25, 30, 31, 33, 및 35의 당 모이어티는 2'-F로 변형되고, 서열번호: 14의 각각의 뉴클레오타이드 1, 3-5, 7-9, 11-15, 20, 22, 24, 26, 32, 34, 및 36-38의 당 모이어티는 2'-OCH₃으로 변형되고, 서열번호: 14의 뉴클레오타이드 10은 천연 데옥시리보뉴클레오타이드이고, 서열번호: 14의 뉴클레오타이드 16-18 및 27-29는 천연 리보뉴클레오타이드이다.
- [0091] 관련된 양태는 서열번호: 11의 핵산을 포함하거나 이로 구성되는 올리고뉴클레오타이드에 대한 것이다. 또 다른 양태는 서열번호: 12의 핵산을 포함하거나 이로 구성되는 올리고뉴클레오타이드에 대한 것이다.
- [0092] 서열번호: 13의 핵산을 포함하거나 이로 구성되는 올리고뉴클레오타이드가 또한 제공되고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 1, 3, 7, 9-11, 13, 15, 19, 및 20의 당 모이어티는 2'-F로 변형되고; 각각의 뉴클레오타이드 2, 4-6, 8, 12, 14, 16-18, 및 24의 당 모이어티는 2'-OCH₃으로 변형되고; 뉴클레오타이드 25 및 26은 데옥시리보뉴클레오타이드이고; 뉴클레오타이드 21-23은 리보뉴클레오타이드이다. 전형적으로, 뉴클레오타이드 25 및 26은 천연 데옥시리보뉴클레오타이드이고, 뉴클레오타이드 21-23은 천연 리보뉴클레오타이드이다.
- [0093] 서열번호: 14의 핵산을 포함하거나 이로 구성되는 올리고뉴클레오타이드가 또한 제공되고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 2, 6, 19, 21, 23, 25, 30, 31, 33, 및 35의 당 모이어티는 2'-F로 변형되고; 각각의 뉴클레오타이드 1, 3-5, 7-9, 11-15, 20, 22, 24, 26, 32, 34, 및 36-38의 당 모이어티는 2'-OCH₃으로 변형되고; 뉴클레오타이드 10은 데옥시리보뉴클레오타이드이고; 뉴클레오타이드 16-18 및 27-29는 리보뉴클레오타이드이다. 전형적으로, 뉴클레오타이드 10은 천연 데옥시리보뉴클레오타이드이고, 뉴클레오타이드 16-18 및 27-29는 천연 리보뉴클레오타이드이다.
- [0094] **다른 변형**
- [0095] 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 서열번호: 11 및 서열번호: 12에 제시된 바와 같이, 특정 뉴클레오타이드의 당 모이어티의 2'-탄소에 독특한 패턴의 2'-F 및 2'-OMe 변형을 포함하는, 독특한 패턴의 뉴클레오타이드 변형을 함유한다.
- [0096] 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자의 뉴클레오타이드는 핵염기, 포스페이트 기, 또는 당 모이어티의 다른 일부를 포함하여, 뉴클레오타이드의 다른 부분에서 일어나는 하나 이상의 추가의 변형을 함유

한다.

- [0097] 예를 들어, 특정 구현예에서, 당 모이어티의 고리 구조는, 비제한적으로, 잠금 핵산 ("LNA") (예를 들어, Koshkin 등 (1998), *Tetrahedron*, 54,3607-3630 참고); 브릿징된 핵산 ("BNA") (예를 들어, 미국 특허 번호 7,427,672 및 Mitsuoka 등 (2009), *Nucleic Acids Res.*, 37(4):1225-38 참고); 및 비잠금 핵산 ("UNA") (예를 들어, Snead 등 (2013), *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2,e103(doi: 10.1038/mtna.2013.36) 참고)에 존재하는 변형된 고리 구조를 포함하여, 변형될 수 있다. 추가의 변형은 또한 뉴클레오타이드의 당 모이어티의 다른 부분, 예컨대, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 5'-탄소에서 일어날 수 있다.
- [0098] 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 또한, 당해 분야에서 알려진 바와 같이 그리고 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 1'-위치에 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 이외의 하나 이상의 변형된 핵염기를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 또는 보편적인 핵염기는 질소성 염기이다. 특정 구현예에서, 변형된 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, 미국 공개된 특허 출원 번호 20080274462를 참고한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 핵염기 (무염기성)를 함유하지 않는다. 변형된 핵염기의 전형적인 예는 5'-메틸시토신이다.
- [0099] 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 또한 하나 이상의 변형된 포스페이트 기를 포함할 수 있다. 변형된 포스페이트 기는 천연 뉴클레오타이드에서 발생하지 않는 포스페이트 기의 변형을 지칭하고, 인 원자를 포함하는 포스페이트 모방체 및, 포스페이트를 포함하지 않는 음이온성 포스페이트 모방체 (예를 들어 아세테이트)를 포함한, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 비-자연 발생 포스페이트 모방체를 포함한다. 변형된 포스페이트 기는 또한, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 인-함유 뉴클레오타이드간 연결 기 및 비-인 함유 연결 기 양자를 포함한, 비-자연 발생 뉴클레오타이드간 연결 기를 포함한다. 전형적으로, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 하나 이상의 인-함유 뉴클레오타이드간 연결 기를 함유한다. 다른 구현예에서, 핵산 억제제 분자의 뉴클레오타이드간 연결 기 중 하나 이상은 비-인 함유 연결기이다. 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 하나 이상의 인-함유 뉴클레오타이드간 연결 기 및 하나 이상의 비-인 함유 뉴클레오타이드간 연결 기를 함유한다.
- [0100] 핵산 억제제 분자의 5'-말단은 천연 치환체, 예컨대 하이드록실 또는 포스페이트 기를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 하이드록실 기는 핵산 억제제 분자의 센스 또는 안티센스 가닥의 5'-말단에 부착된다. 특정 구현예에서, 포스페이트 기는 핵산 억제제 분자의 5'-말단에 부착된다. 전형적으로, 포스페이트는 올리고뉴클레오타이드 합성 이전에 단량체에 첨가된다. 다른 구현예에서, 5'-인산화는 핵산 억제제 분자가, 예를 들어, 세포질 Clp1 키나제에 의해 사이토졸 안으로 도입된 후 자연적으로 달성된다. 일부 구현예에서, 5'-말단 포스페이트는 포스페이트 기, 예컨대 5'-일인산염 [(HO)₂(O)P-O-5'], 5'-이인산염 [(HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'] 또는 5'-삼인산 [(HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5']이다.
- [0101] 특정 구현예에서 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자의 1개 또는 2개 뉴클레오타이드는 글루타티온-민감한 모이어티로 가역적으로 변형된다. 전형적으로, 글루타티온-민감한 모이어티는 당 모이어티의 2'-탄소에 위치하고 디설파이드 브릿지 또는 설포닐기를 포함한다. 특정 구현예에서, 글루타티온-민감한 모이어티는, 예를 들어, 전체적으로 본 명세서에 참고로 통합된 국제출원 번호 PCT/US2017/048239에서 기재된 바와 같이, 포스포르아미다이트 올리고뉴클레오타이드 합성 방법과 양립가능하다. 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자의 2개 초과 뉴클레오타이드가 글루타티온-민감한 모이어티로 가역적으로 변형된다. 특정 구현예에서, 대부분의 뉴클레오타이드가 글루타티온-민감한 모이어티로 가역적으로 변형된다. 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자의 전부 또는 실질적으로 전부의 뉴클레오타이드가 글루타티온-민감한 모이어티로 가역적으로 변형된다.
- [0102] 적어도 1개의 글루타티온-민감한 모이어티는 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 패신저 가닥 또는 가이드 가닥의 5'- 또는 3'-말단 뉴클레오타이드에 전형적으로 위치된다. 그러나, 적어도 1개의 글루타티온-민감한 모이어티는 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자 내 관심 있는 임의의 뉴클레오타이드에 위치될 수 있다.
- [0103] **β-카테닌 발현을 감소시키는 방법**
- [0104] 본 명세서에서 기재된 바와 같은, 최적화된 핵산 억제제 분자는 β-카테닌 mRNA 발현을 감소시키는 방법에 사용될 수 있다. 전형적으로, β-카테닌 mRNA 발현을 감소시키는 방법은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 최적화된 핵산 억제제 분자를 샘플 또는 그것을 필요로 하는 대상체에게 β-카테닌 유전자의 발현을 감소시키기에 충분한 양으로 투여하는 것을 포함한다. 본 방법은 시험관내 또는 생체내에서 수행될 수 있다.

[0105] β -카테닌 RNA의 수준 또는 활성은 현재 당업계에서 알려져 있거나 또는 이후에 개발되는 적합한 방법에 의해 결정될 수 있다. 표적 RNA 및/또는 표적 유전자의 "발현"을 측정하기 위해 사용된 방법은 표적 유전자 및 그것의 인코딩된 RNA의 특성에 의존할 수 있다는 것이 인정될 수 있다. 예를 들어, 표적 β -카테닌 RNA 서열이 단백질을 인코딩하는 경우, 용어 "발현"은 β -카테닌 유전자 (게놈 또는 외인성 기원의 것)로부터 유래된 단백질 또는 β -카테닌 RNA/전사체를 지칭할 수 있다. 그와 같은 사례에서 표적 β -카테닌 RNA의 발현은 직접적으로 β -카테닌 RNA/전사체의 양을 측정함에 의해 또는 β -카테닌 단백질의 양을 측정함에 의해 결정될 수 있다. 단백질은 단백질 검정 예컨대 염색 또는 면역블로팅에 의하거나, 또는 단백질이 측정될 수 있는 반응을 촉매하는 경우에는, 반응 속도를 측정함에 의해 측정될 수 있다. 그와 같은 모든 방법은 당해 기술에 공지되어 있고 사용될 수 있다. 표적 β -카테닌 RNA 수준이 측정되는 경우, RNA 수준을 검출하기 위해 기술적으로 인식된 방법이 사용될 수 있다 (예를 들어, RT-PCR, 노던 블랏팅, 등). β -카테닌 RNA를 표적화함에 있어, 대상체에서, 조직에서, 세포에서, 시험관내 또는 생체내에서, 또는 세포 추출물에서 β -카테닌 RNA 또는 단백질의 수준을 감소시키는 핵산 억제제 분자의 효능의 측정이 또한, 예를 들어, 국제 출원 번호 PCT/US2017/022510에서 개시된 바와 같이, β -카테닌-연관된 표현형의 감소 정도 (예를 들어, 질환 또는 장애, 예를 들어, 암 또는 종양 형성, 성장, 전이, 확산, 등)를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 상기 측정은 세포, 세포 추출물, 조직, 조직 추출물 또는 다른 적합한 원료 물질 상에서 이루어 질 수 있다.

[0106] **약제학적 조성물**

[0107] 본 개시내용은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자의 치료 유효량, 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0108] 이들 약제학적 조성물은 통상적인 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있거나, 또는 멸균 여과될 수 있다. 수득한 수용액은 그대로 사용하기 위해 포장될 수 있거나, 또는 동결건조되고, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 수성 부형제와 조합된다. 제제의 pH는 전형적으로 3 내지 11, 더 바람직하게는 5 내지 9 또는 6 내지 8, 그리고 가장 바람직하게는 7 내지 8, 예컨대 7 내지 7.5일 것이다.

[0109] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 치료 용도에 적용된다. 따라서, 본 개시내용의 일 측면은 대상체에게 본 개시내용의 약제학적 조성물의 치료 유효량을 투여함에 의해, 비제한적으로, 질환 또는 병태를 앓고 있는 인간을 포함한, 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있는 약제학적 조성물을 제공한다. 전형적으로, 질환 또는 병태는 본 명세서에서 기재된 바와 같은 암이다.

[0110] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 그것을 필요로 하는 대상체의 치료를 위한 약제의 제조를 위해 본 명세서에서 기재된 바와 같은 약제학적 조성물의 치료 유효량의 사용을 특징으로 한다. 전형적으로, 상기 대상체는 본 명세서에서 기재된 바와 같은 암을 갖는다.

[0111] **약제학적으로-허용가능한 부형제**

[0112] 본 개시내용에서 유용한 약제학적으로-허용가능한 부형제는 통상적인 것이다. Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)은 하나 이상의 치료적 조성물의 약제학적 전달에 적합한 조성물 및 제형을 기술한다. 약제학적으로-허용가능한 부형제로 작용할 수 있는 물질의 일부 예는 하기를 포함한다: 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 그것의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 맥아; 젤라틴; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일, 예컨대 땅콩 오일, 목화씨 오일, 잇꽃 오일, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 대두 오일; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 알루미늄 하이드록사이드; (등장성 염수; 링거액); 에틸 알코올; pH 완충 용액; 폴리올, 예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 기타 동종의 것; 및 약제학적 제형에 이용된 다른 무독성 양립가능한 물질.

[0113] **투약 형태**

[0114] 약제학적 조성물은 통상적인 실시예 따라 선택될 수 있는, 임의의 의도된 투여 경로에 대한 통상적인 부형제로 제형화될 수 있다.

[0115] 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자를 함유하고 비경구 투여에 적합하다. 약제학적 조성물은 선택적으로 면역치료제, 예컨대 억제성 면역 관문 분자의 길항제 (예를 들어, 항-CTLA-4, 항-PD-1, 또는 항-PD-L1 항체 중 하나 이상) 또는 공통자극 관문 분자의 효능제를 함유한다. 전형적으로, 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 본 개시내용의 약제학적 조성물은 비경구 투여, 예

를 들어, 피하, 근육내, 정맥내 또는 경막외 주입을 위해 액체 형태로 제형화된다.

[0116] 비경구 투여에 적합한 투약 형태는 전형적으로, 예로써, 멸균 수용액, 염수, 저분자량 알코올 에컨대 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 젤라틴, 지방산 에스테르 에컨대 에틸 올레에이트, 및 기타 동종의 것을 포함한, 비경구 투여를 위한 하나 이상의 적합한 비히클을 포함한다. 비경구 제형은 당, 알코올, 산화방지제, 완충액, 정균제, 의도된 수령체의 혈액과 등장성을 제형에 부여하는 용질 또는 현탁제 또는 증점제를 함유할 수 있다. 예를 들어, 계면활성제의 사용에 의해 적절한 유체성이 유지될 수 있다. 액체 제형은 멸균 주입가능 용액과 재구성에 의해 추후 사용을 위해 동결건조되고 보관될 수 있다.

[0117] 약제학적 조성물은 또한 잘 알려진 기술을 사용하여 국소 또는 경피 투여, 직장 또는 질 투여, 안구 투여, 비강 투여, 볼 투여, 또는 설하 투여를 비롯한 다른 투여 경로에 대해 제형화될 수 있다.

[0118] **전달 제제**

[0119] 본 명세서에서 기재된 바와 같은, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는, 예를 들어, 리포솜 및 지질 에컨대 미국 특허 번호 6,815,432, 6,586,410, 6,858,225, 7,811,602, 7,244,448 및 8,158,601에 개시된 것들; 중합체성 물질 에컨대 미국 특허 번호 6,835,393, 7,374,778, 7,737,108, 7,718,193, 8,137,695 및 미국 공개된 특허 출원 번호 2011/0143434, 2011/0129921, 2011/0123636, 2011/0143435, 2011/0142951, 2012/0021514, 2011/0281934, 2011/0286957 및 2008/0152661에 개시된 것들; 캡시드, 캡소이드(capsoid), 또는 섭취, 분포 또는 흡수를 돕기 위한 수용체 표적화된 분자를 포함한, 다른 분자, 분자 구조 또는 화합물의 혼합물과 혼합, 캡슐화, 접합 또는 달리는 연관될 수 있다.

[0120] 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 지질 나노입자 (LNP)에서 제형화된다. 지질-핵산 나노입자는 전형적으로 핵산과 지질을 혼합함에 의해 자발적으로 형성되어, 복합체를 형성한다. 원하는 입자 크기 분포에 의존하여, 수득한 나노입자 혼합물은, 예를 들어, LIPEX[®] 압출기 (Northern Lipids, Inc)와 같은 열 배럴 압출기를 사용하여 폴리카보네이트 막 (예를 들어, 100 nm 컷-오프)을 통해 선택적으로 압출될 수 있다. 치료 용도를 위한 지질 나노입자를 제조하기 위해, 예를 들어 투석 또는 집선 유동 여과에 의해 달성될 수 있는 나노입자 및/또는 교환 완충액을 형성하는데 사용된 용매 (예를 들어, 에탄올)를 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 핵산 간섭 분자를 함유하는 지질 나노입자를 제조하는 방법은, 예를 들어, 미국 공개된 특허 출원 번호 2015/0374842 및 2014/0107178에 개시된 바와 같이, 당해 기술에 공지되어 있다.

[0121] 특정 구현예에서, LNP는 양이온성 리포솜을 포함하는 코어 지질 성분 및 폐길화된 지질을 포함한다. LNP는 추가로 하나 이상의 외피 지질, 에컨대 양이온성 지질, 구조 또는 중성 지질, 스테롤, 폐길화된 지질, 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0122] LNP에 사용하기 위한 양이온성 지질은 예를 들어 미국 공개된 특허 출원 번호 2015/0374842 및 2014/0107178에서 논의된 바와 같이 당해 기술에 공지되어 있다. 전형적으로, 양이온성 지질은 생리적 pH에서 총 양전하를 갖는 지질이다. 특정 구현예에서, 양이온성 리포솜은 DODMA, DOTMA, DL-048, 또는 DL-103이다. 특정 구현예에서 구조 또는 중성 지질은 DSPC, DPPC 또는 DOPC이다. 특정 구현예에서, 스테롤은 콜레스테롤이다. 특정 구현예에서, 폐길화된 지질은 DMPE-PEG, DSPE-PEG, DSG-PEG, DMPE-PEG2K, DSPE-PEG2K, DSG-PEG2K, 또는 DSG-MPEG이다. 일 구현예에서, 양이온성 지질은 DL-048이고, 폐길화된 지질은 DSG-MPEG이고, 하나 이상의 외피 지질은 DL-103, DSPC, 콜레스테롤, 및 DSPE-MPEG이다. 예를 들어, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자를 제형화하기 위해 사용될 수 있는 LNP의 하나의 비제한적인 구현예를 도시하는, 도 5를 참고한다.

[0123] 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 관심 있는 조직으로 올리고뉴클레오타이드의 전달을 지시하는 리간드에 공유적으로 접합된다. 많은 이러한 리간드가 탐구되었다. 예를 들어, Winkler, Ther. Deliv. 4(7): 791-809 (2013) 참고. 예를 들어, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 간 안으로 올리고뉴클레오타이드의 흡수를 지향하도록 하나 이상의 당 리간드 모이어티 (예를 들어, N-아세틸갈락토사민 (GalNAc))에 접합될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,994,517; 미국 특허 번호 5,574,142; WO 2016/100401 참고. 전형적으로, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 3개 또는 4개 당 리간드 모이어티에 접합된다. 사용될 수 있는 다른 리간드는, 비제한적으로, 만노스-6-포스페이트, 콜레스테롤, 폴레이트, 트랜스페린, 및 갈락토스를 포함한다 (다른 특이적 예시적인 리간드에 대해, 예를 들어, WO 2012/089352 참고).

[0124] **투여/치료의 방법**

[0125] 하나의 구현예는 대상체에게 본 명세서에서 기재된 바와 같은 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자의 치료 유

효율을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, β -카테닌-연관된 장애를 치료하는 방법에 대한 것이다. 특정 구현예에서, β -카테닌-연관된 장애는 암이다.

[0126] 이러한 암의 비-제한적인 예는 담도암, 방광암, 이행 세포 암종, 요상피 암종, 뇌암, 신경아교종, 별아교세포종, 유방 암종, 화생 암종, 자궁경부암, 자궁경부 편평상피 세포 암종, 직장암, 결장직장 암종, 결장암, 선천성 비폴립증 결장직장암, 결장직장 선암종, 위장 간질성 종양 (GIST), 자궁내막암종, 자궁내막 기질 육종, 식도암, 식도 편평상피 세포 암종, 식도 선암종, 안구 흑색종, 포도막 흑색종, 담낭 암종, 담낭 선암종, 신장 세포 암종, 투명 세포 신장 세포 암종, 이행 세포 암종, 요상피 암종, 윌름스 종양, 백혈병, 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구성 (CLL), 만성 골수성 (CML), 만성 골수단핵구성 (CMML), 간암, 간 암종, 간종양, 간세포 암종, 담관암종, 간모세포종, 폐암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 중피종, B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 미만성 큰 B-세포 림프종, 외투 세포 림프종, T 세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 전구체 T-림프아구성 림프종/백혈병, 주변 T 세포 림프종, 다발성 골수종, 비인두 암종 (NPC), 신경교세포종, 구강인두 암, 구강 편평상피 세포 암종, 골육종, 난소 암종, 췌장 암, 췌장 관상 선암종, 가성유두상 신 생물, 썬파리 세포 암종을 포함한다. 전립선암, 전립선 선암종, 피부암, 흑색종, 악성 흑색종, 피부 흑색종, 소장 암종, 위암, 위 암종, 위장 간질성 종양 (GIST), 자궁암, 또는 자궁 육종. 특정 구현예에서, 본 개시내용은 간암, 간 암종, 간종양, 간세포 암종, 담관암종 및 간모세포종을 치료하는 방법을 특징으로 한다. 치료 방법의 특정 구현예에서, 상기 암은 결장직장암, 간세포 암종, 또는 흑색종이다. 치료 방법의 특정 구현예에서, 상기 암은 흑색종, 신경교세포종, 또는 신장암이다.

[0127] 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 암과 같은 Wnt 활성화된 질환 또는 장애에 관련된 증상의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다. 다른 구현예에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 암과 같은 비-Wnt 활성화된 질환 또는 장애에 관련된 증상의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다.

[0128] 일부 구현예에서, 상기 암은 활성화된 Wnt/ β -카테닌 경로와 연관된다. 다른 구현예에서, 상기 암은 비-Wnt 활성화된 암이다. 특정 구현예에서, 대상체는 최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자를 투여하기 전 비-Wnt 활성화된 암이 있는 것으로 확인되었다. 대상체는 당업자가 이용가능한 임의의 방법을 사용하여 비-Wnt 활성화된 암이 있는 것으로 확인될 수 있다. 그러나, 전형적으로, 대상체로부터의 샘플은 상기 대상체가 비-Wnt 활성화된 암을 갖는지 여부를 결정하기 위해 분석된다. 특정 구현예에서, 샘플은 조직, 세포, 혈액, 또는 소변을 포함한다. 특정 구현예에서, 샘플은 활성화된 Wnt/ β -카테닌 경로, 불활성 Wnt/ β -카테닌 경로 및/또는 비-T 세포 염증성 표현형과 연관된 하나 이상의 바이오마커에 대해 분석된다. 비제한적으로, 핵산 (예를 들어, mRNA), 단백질, 및 펩타이드를 포함한 임의의 적절한 바이오마커가 임의의 적합한 검정 또는 기술을 사용하여 분석될 수 있다. 특정 구현예에서, 바이오마커는 활성화된 Wnt/ β -카테닌 경로와 연관된 유전자 돌연변이, 예컨대 Axin, LEF, 및 ICAT와 같은, Wnt/ β -카테닌 경로에 관여된 β -카테닌 또는 APC 또는 하나 이상의 다른 성분을 인코딩하는 유전자에서의 돌연변이이다.

[0129] 특정 구현예에서, 암을 치료하는 방법은 치료 유효량의 면역치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 면역치료제는 억제성 면역 관문 분자의 길항제 또는 공통자극 관문 분자의 효능제이다. 특정 구현예에서, 억제성 면역 관문 분자의 길항제는 항-CTLA-4, 항-PD-1, 항-PD-L1 항체, 또는 이들의 조합이다.

[0130] 특정 구현예에서, 상기 암은 면역요법에 대해 내성이지만, 상기 면역요법에 대한 내성은 β -카테닌 핵산 억제제 분자, 예컨대 본 명세서에 기재된 최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자와 조합한 면역요법을 투여함에 의해 역전될 수 있다. 전형적으로, 면역요법에 반응하지 않는 암은 종양 미세환경에서 거의 내지 전혀 침윤하는 CD8+ T 세포가 없는, 비-T 세포 염증성 표현형 (차가운 또는 비-염증성 종양으로도 알려져 있음)을 특징으로 한다. β -카테닌 발현을 감소시키는 것은 차가운 또는 비-염증성 종양을 뜨거운 또는 염증성 종양으로 전환시키고 활성화된 Wnt/ β -카테닌 경로를 갖지 않는 종양에서도 면역요법의 효과를 강력하게 할 수 있다. 환언하면, β -카테닌 억제제를 면역요법과 조합시킴에 의해, 면역요법에 정상적으로 반응하지 않는 차가운 또는 비-염증성 종양을 치료하는 것이 가능하다. 이 조합 요법 접근법은, 예를 들어, 전체적으로 본 명세서에 참고로 통합된 미국 가출원 번호 62/477,783에 기재된 바와 같이, 활성화된 Wnt/ β -카테닌 경로를 갖는 및 갖지 않는 암을 포함한, 광범위한 암에 걸쳐 생체내 종양 성장을 강력하게 억제하는 것으로 밝혀졌다. 특정 구현예에서, 상기 암은 비-Wnt 활성화된 암이다. 특정 구현예에서, 상기 암은 Wnt 활성화된 암이다.

[0131] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 암이 있는 대상체에게 본 명세서에서 기재된 바와 같은 최적화된 β -카테닌 핵산 억제제 분자를, 암에 대한 면역요법의 치료 효과를 강력하게 하거나 또는 달리는 암이 면역요법에 대해 민감하도록 하기에 충분한 양을 투여하는 것을 포함하는, 암에 대한 생체내 면역 반응을 강력하게 하는 방법을 제공

한다. 전형적으로, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자를 투여하기 이전에, 상기 암은 면역요법에 내성인 비-T 세포 염증성 표현형과 연관되고 변형된 β-카테닌 핵산 억제제 분자를 투여하는 것은 상기 비-T 세포 염증성 표현형을 T 세포-염증성 표현형으로 전환시켜, 상기 암이 면역요법에 반응성이 되도록 한다. 특정 구현예에서, 면역요법에 내성인 암은 Wnt 활성화된 암이다. 다른 구현예에서, 면역요법에 내성인 암은 비-Wnt 활성화된 암이다.

[0132] **투약 및 스케줄**

[0133] 전형적으로, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 비경구로 (예컨대 정맥내, 근육내, 또는 피하 투여를 통해) 투여된다. 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 국소 투여 또는 전신 투여를 통해 전달된다. 그러나, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 또한, 예를 들어, 불, 설하, 직장, 질, 요도내, 국소, 안구내, 비강내, 및/또는 귀내의를 포함한, 당해 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 투여될 수 있고, 그 투여는 정제, 캡슐, 파립, 수성 현탁액, 젤, 스프레이, 좌약, 고약, 연고, 등을 포함할 수 있다.

[0134] 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 20 마이크로그램 내지 10 밀리그램/수령체의 체중 킬로그램/일, 100 마이크로그램 내지 5 밀리그램/킬로그램, 0.25 밀리그램 내지 5.0 밀리그램/킬로그램, 또는 0.5 내지 3.0 밀리그램/킬로그램의 투약량으로 투여된다. 전형적으로, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 약 0.25 내지 2.0 밀리그램/수령체의 체중 킬로그램/일의 투약량으로 투여된다.

[0135] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 매일, 또는 간헐적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자의 간헐적 투여는 주당 1 내지 6 일, 월간 1 내지 6 일, 매주 1회, 격주로, 매일, 격월로, 또는 연간 1회 또는 2회 투여될 수 있거나 또는 다수의 매년, 매일, 매주, 또는 일일 용량으로 분할될 수 있다. 전형적으로, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 매주 또는 2 주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 간헐적 투약은 초기 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자 또는 면역치료제 투여와 함께 주기로 투여하고, 이어서 최대 1주일, 최대 1개월, 최대 2개월, 최대 3개월 또는 최대 6개월 또는 그 초과 동안 투여되지 않은 휴지기를 의미할 수 있거나) 또는 이것은 격일, 격주, 격월 또는 격년에 투여를 의미할 수 있다.

[0136] 면역치료제와 조합될 때, β-카테닌 핵산 억제제 분자는 전형적으로 면역치료제와는 별도로, 그리고 상이한 스케줄로 투여된다. 면역치료제를 함유하는 약제학적 조성물은 전형적으로 정맥내로 투여된다. 예를 들어, 단일 제제로 사용될 때, 이필리무맙 (항-CTLA-4 항체)는 총 4 용량에 대해 매 3 주 3 mg/kg의 권고된 용량으로 90분에 걸쳐 정맥내로 투여된다. 유사하게, 단일 제제로 사용될 때, 니볼루맙 (항-PD-1 항체)은 2주마다 60분에 걸쳐 240 mg (또는 3 mg/kg)의 권고된 용량으로 정맥내로 투여된다. 니볼루맙이 이필리무맙과 조합하여 투여될 때, 니볼루맙의 권고된 용량이 60분에 걸쳐 정맥내로 1 mg/kg 투여되고, 이어서 같은 날에 총 4 용량에 대한 매 3주 3 mg/kg의 권고된 용량에서 이필리무맙, 및 그 다음 매 2주 240 mg의 권고된 용량에서의 니볼루맙이 투여된다.

[0137] 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 면역치료제 전에 투여된다. 특정 구현예에서, 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자는 면역치료제 후에 투여된다. 특정 구현예에서, 환자는 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자로 치료를 시작하기 전에 치료제로 이전에 치료되었다. 최적화된 β-카테닌 핵산 억제제 분자 또는 면역치료제의 치료 유효량은 투여 경로 및 환자의 신체적 특성, 예컨대 대상체의 크기 및 체중, 질환의 진행 또는 침투 정도, 대상체의 연령, 건강, 및 성별에 의존할 수 있고 이들 및 다른 인자에 의존하여 필요에 따라 조정될 수 있다.

[0138] **실시예**

[0139] **실시예 1: 변형된 베타-카테닌 (BCAT) 핵산 억제제 분자**

[0140] 변형 패턴이 분자의 상이한 특성, 예컨대 면역원성, β-카테닌 mRNA 발현의 조절, 및/또는 Ago2 결합에 영향을 미칠 수 있는지를 평가하기 위해 베타-카테닌 유전자를 표적화하는 몇 개의 핵산 억제제 분자가 상이한 변형 패턴으로 제조되었다. 이를 위해, 도 1a에서 나타낸 바와 같이, 분자의 우측편에서 (즉, 패신저 가닥의 3' 말단 및 가이드 가닥의 5' 말단에서) 평활 말단을 갖는 "비-연장된" 분자 및, 도 2a에서 나타낸 바와 같이, 그것의 5' 말단에서 10개 뉴클레오타이드의 단일-가닥 연장을 갖는 가이드 가닥을 갖는 다음 세대 "연장된" 분자인, 어느 하나의 생성을 포함한 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 대안적인 구조 부류가 시험되었다. 도 1a 및 2a에서, 음영처리되지 않은 뉴클레오타이드는 리보오스를 함유하고, 밝게 음영처리된 뉴클레오타이드는 2'-OMe 변형을 갖는 리보오스를 함유하고, 더 어두운 음영처리된 뉴클레오타이드는 2'-F 변형을 갖는 리보오스를 함유하고, 굵은 박스에 의해 둘러싸인 뉴클레오타이드는 데옥시리보스를 함유한다.

[0141] **비-연장된 핵산 억제제 분자**

[0142] 3개의 비-연장된 핵산 억제제 분자가 작제되었다: NonExtend M1 (NEX M1), NonExtend M2 (NEX M2), 및 NonExtend M3 (NEX M3). NEX M1은 각각 25개 및 27개 염기쌍으로 구성되는 패신저 및 가이드 가닥을 갖는다. 이와 함께, 패신저 및 가이드 가닥은 2-염기쌍을 갖는 25개 염기쌍, 단일-가닥, 가이드 가닥의 3' 말단에 돌출부로 구성되는 이중 영역을 형성한다. 수많은 2'-OMe 변형 (밝게 음영처리된 박스)은 NEX M1의 패신저 및 가이드 가닥 안으로 편입된다. 패신저 가닥의 3'-말단에서 마지막 2개의 뉴클레오타이드는 테옥시리보스를 함유한다. 도 1a.

[0143] 몇 개의 2'-F 변형 (더 어두운 음영처리된 염기)은 NEX M1 안으로 도입되어 NEX M2를 생성한다. 염기의 변형 패턴에서의 반경을 제외하고, NEX M2의 패신저 및 가이드 가닥의 뉴클레오타이드 서열은 NEX M1의 것들과 동일하다. 도 1a. 다음으로, NonExtend M3 (NEX M3)은 NEX M2에 4개의 추가의 2'-F 변형을 부가함에 의해 생성되었다. NEX M2 및 NEX M3의 패신저 및 가이드 가닥은 NEX M1에서와 동일한 뉴클레오타이드 서열, 25개 염기쌍 이중 영역, 및 3' 돌출부를 가지고, 차이는 단지 2'-F 변형 패턴이었다.

[0144] NEX M1은 NEX M2 또는 NEX M3 구조로 전환시키는 것은 도 1a에서 나타난 바와 같이 세포에서 이들 작제물의 IC50 값 (각각 0.9 pM, 0.8 pM, 및 0.8 pM)에 의해 실증된 바와 같이 고유 효력에 영향을 주지 않았다. 이들 서열에서 변형 패턴이 이중-가닥 핵산 작제물의 면역원성에 영향을 주는지 여부를 결정하기 위해, NEX M1, NEX M2, 및 NEX M3으로 인간 PBMC를 치료한 후 인터페론 반응이 측정되었다. PBMC는 Ficoll-Histopaque를 사용하여 구배 원심분리에 의해 상이한 공여체로부터의 인간 혈액 샘플에서 분리되었다. 분리된 PBMC는 상이한 기간 동안 DOTAP (리포솜 형질감염 시약 및 면역 아주반트)와 혼합된 이중-가닥 핵산 작제물로 처리되고 IFIT1 유도 (인터페론 유도된 유전자)는 고체 상태 cDNA 합성과 이어서 qPCR에 의해 모니터링되었다. Bcl2 유전자를 표적화하는 비변형된 이중-가닥 핵산 억제제 분자 (21 개의 뉴클레오타이드)는 DOTAP (Avanti Polar Lipids, 알라바마 주 앨러배스터 소재)와 혼합되고 이 실험에서 참조로 사용되었다. NEX M1은 IFIT1의 상당한 상승을 실증한 반면 NEX M2는 중간 정도 상승을 나타냈다. 다른 한편으로, NEX M3은 NEX M1 및 NEX M2에 비교하여 매우 조용하여, NEX M3에서 2'-OMe 및 2'-F 변형의 특이적 조합이 인간 PBMC에서 NEX M3에 의해 유도된 인터페론 반응을 실질적으로 감소시켰음을 시사한다 (도 1b).

[0145] **연장된 핵산 억제제 분자**

[0146] 차세대, 연장된, 이중-가닥 핵산 작제물이 가이드 가닥의 5'-말단에 10-염기쌍 단일-가닥 돌출부를 부가함에 의해 생성되었다. 이 10-염기쌍 단일-가닥 돌출부는 또한 추가의 2'-OMe 및 2'-F 변형을 포함한다. 추가의 C/G 염기쌍은 도 2a에서 나타난 바와 같이 10-염기쌍 단일-가닥 돌출부 전에 듀플렉스의 우측편에 또한 편입되었다. NEX M1, NEX M2 및 NEX M3 작제물 안으로 추가의 C/G 염기쌍 및 10-염기쌍 연장의 편입은 도 2a에서 나타난 바와 같이 각각 EX M1, EX M2 및 EX M3 작제물을 생성했다.

[0147] EX M1의 고유 효력은 약간 영향을 받았지만 편입은 도 2a에서 IC50 값에 의해 나타난 바와 같이 EX M2 및 EX M3의 효력에 실질적으로 영향을 주지 않았다. 인간 PBMC에서 EX M1, EX M2, 및 EX M3의 인터페론 반응은 실시예 2에서 상기에 기재된 바와 같이 측정되었다. 줄어든 면역 자극에 대한 추세는 비연장된 작제물에서 관측된 추세에 유사하게, EX M1 대 EX M2 대 EX M3으로부터 관측되어 (도 2b), 연장된, 이중-가닥 핵산 작제물 안으로 2'-OMe 및 2'-F 변형의 특이적 조합은 인터페론 반응을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0148] **실시예 2: 선택된 BCAT 작제물의 추가의 평가**

[0149] 최소 인터페론 반응을 갖는 비연장된 작제물 (NEX M3)이 4개 상이한 공여체로부터 인간 PBMC에서 (이전에 기재된 바와 같은 IFIT1 유도에 의해 측정된 바와 같이) 인터페론 반응에 대해 최소 인터페론 반응을 갖는 연장된 작제물 (EX M3)에 비교되었다. NEX M1이 또한 본 비교에 포함되었다.

[0150] NEX M3 및 EX M3은 모든 4개 공여체 PBMC에서 본질적으로 인터페론 반응을 나타내지 않았고, 반면에 NEX M1은 공여체 1, 2, 및 4로부터의 PMBC로 처리될 때 보통의 인터페론 반응 및 과민성 공여체 3으로부터의 PMBC로 처리될 때 실질적인 인터페론 반응을 나타냈다 (도 3a). 따라서, NEX M3 및 EX M3에서 2'-OMe 및 2'-F 변형의 특이적 조합은 인간 PBMC에서 이들 핵산 작제물에 의해 야기된 인터페론 반응을 성공적으로 감소시켰다.

[0151] **실시예 3: 종양에서 베타-카테닌 (CTNNB1) mRNA 녹다운**

[0152] 변형 패턴이 종양에서 표적 참여에 어떻게 영향을 미치는지 확인하기 위해, NEX M1, NEX M3, 및 EX M3 작제물이 EnCore 지질 나노입자 (LNP)에 제형화되고 활성에 대해 시험되었다. 핵산 제형화된 LNP는 종양 담지 마우스에서

상이한 시점에서 평가되었다. 종양을 생성하기 위해, 6-8 주령 Hsd: 무흉선 누드-Foxn1tm 마우스에 오른쪽 어깨 하에 LS411N (5x10⁶ 세포)이 피하로 주입되었다. 종양 부피는 2-3일마다 측정되어 종양 성장을 모니터링하였다. 종양이 200-250mm³에 도달되었을 때, 동물은 무작위 추출되고 상이한 집단에 배정되어 도 3b에 열거된 바와 같이 상이한 이중-가닥 핵산 억제제 분자 작제물을 수반하는 LNP가 주입되었다. LNP는 10 ml/kg의 총 부피로 측면 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 투여되었다. 종양 샘플은 복용 24 및 120시간 후에서 수집되고 mRNA 분석을 거쳤다. EX M3은 NEX M3에 비교될 때 약간 더 나은 효력을 실증했지만 투약24시간 후 NEX M1에 유사한 효력을 가졌다 (도 3b). 그러나, EX M3은 NEX M1에 비교하여 투약 120시간 후 개선된 효력을 나타냈으나 NEX M3에는 유사한 효력을 가졌다. 인터페론 반응 및 효력과 기간 효과에 기초하여, EX M3이 추가의 특성규명을 위해 선택되었다.

[0153] 실시예 4: EX M3에 NEX M1 비교

[0154] EX M3의 특성은 이것을 초기 생성 NEX M1과 비교함에 의해 추가로 평가되었다. 이 증가된 효력에 대한 가능한 기전을 조사하기 위해, 종양 균질물에서 각각의 작제물의 노출 수준 및 Ago2 결합 (RISC 편입) 수준이 또한 비교되었다. EX M3 (안티센스 가닥)은 종양 이식 후 16일차에서, 3일 (종양 이식 후 14, 15, 및 16일차) 동안 3mg/kg으로 LS411N 종양 담지 마우스를 치료한 후 NEX M1보다 대략 5-100x 더 높은 수준으로 종양 조직에서 검출되었다 (도 4a). 또한, 종양 이식 후 16일차에서, EX M3 (안티센스 가닥)은 3일 (종양 이식 후 14, 15, 및 16일차) 동안 3mg/kg으로 LS411N 종양 담지 마우스를 치료한 후 NEX M1보다 대략 5-10x 많은 Ago2 결합/RISC 장입을 나타내어 (도 4b), EX M3이 초기 생성 NEX M1보다 더 안정하고 활성인 것으로 나타난다는 것을 입증한다.

[0155] EX M3의 개선된 특성이 항종양 효능으로 번역되었는지 여부를 알아보기 위해, SW403 종양 담지 마우스는 qdx3, 3 mg/kg 용량 수준 (2 사이클)에서 위약 및 PBS와 함께 LNP-제형화된 NEX M1 또는 EX M3으로 처리되었다. 2번의 매주 투약 사이클 (qdx3, 3 mg/kg) 후, NEX M1은 비히클-처리된 동물에 비하여 약 55%의 종양 성장 억제를 유도하였고, 반면에 EX M3은 80% 초과 성장 억제를 유도했다 (도 4c). 연구의 종단에서, 종양은 또한 베타-카테닌 단백질에 대해 염색되었다. 도 4d에서 나타난 바와 같이, NEX M1-처리된 종양에 비하여 EX M3-처리된 종양으로부터 베타-카테닌 단백질 수준에서 실질적인 감소가 있어, EX M3 작제물에 의해 야기된 개선된 효력 및 기간은 EX M3으로 처리된 종양에서 증가된 항종양 효능으로 이어졌다는 것을 시사한다.

[0156] 실시예 5: Wnt 활성 4T1 종양에서 β-카테닌 억제

[0157] Balb/C 마우스에 4T1 종양이 이식되었다. 150-200 mm³의 평균 종양 크기를 갖는, 4T1 종양 세포 이식 후 6일에서, 마우스는 2개의 그룹으로 분류되고 도 7a에서 나타난 바와 같이, 이식-후 6 및 7일차 및 12 및 13일차에 3 mg/kg으로 위약 또는 EX M3 중 어느 하나로 처리되었다. 마지막 용량 48시간 후, 종양이 수집되고 β-카테닌, CD8 및 IDO1 단백질 수준에 대해 면역조직화학에 의해 분석되었다. 도 7b에서 나타난 바와 같이, EX M3 처리는 β-카테닌 수준을 감소시키고 CD8 수준을 증가시키지만 2번의 처리 라운드 후 IDO1 수준을 상당히 감소시키지는 않았다.

[0158] 또 다른 연구에서, 4T1 종양 세포가 Balb/C 마우스에 이식되고 이식-후 4일에, 마우스는 2개의 그룹으로 무작위 추출되고 위약 또는 EX M3으로 처리되었다. 마우스에는 도 7c에서 나타난 바와 같이 4 및 5일차에 3mg/kg으로 위약 또는 EX M3의 2번의 용량이 투여되었다. 이 조합 투약 사이클은 그 다음 9 및 10일 차에 반복되었다. 종양 성장은 치료 기간의 과정에 걸쳐 종양 크기를 측정함으로써 모니터링되었다. EX M3 단독으로 마우스 처리는 약 40%의 종양 성장 억제를 초래했다. 도 7c.

[0159] 또 다른 유사한 연구에서, 4T1 종양을 담지하는 마우스는 도 8a에서 나타난 바와 같이 이식-후 6 및 7일차 및 12 및 13일차에 3 mg/kg으로 PBS 또는 EX M3으로 처리되었다. 종양은 마지막 용량 24시간 후 수집되고 추출된 종양으로부터 준비된 단일-세포 현탁액 상에서 표면 마커를 측정하기 위해 유세포분석을 거쳤다. PBS 대조군은 종양 면역 미세환경 상에서 상당한 효과가 없었고, 반면에 EX M3 처리는 세포독성 T-세포 (CD8), 및 다중 체크포인트 (PD-1, LAG-3 및 Tim-3)에서 유의미한 증가를 초래했다. EX M3 처리는 면역계의 다른 세포를 조절 또는 억제하는데 중요한 역할을 하는 조절 T 세포 (Treg)를 상당히 증가시켰다. 도 8b. 면역억제성 MDSC 세포에 대해서는 효과가 관측되지 않았다. 도 8b.

[0160] 실시예 6: Wnt 활성 4T1 종양에서 IDO1 억제

[0161] 또 다른 효능 연구가 IDO1 억제제인, 에파카도스타트 (IDOi)로 4T1 종양에서 수행되었다. 4T1 종양 담지 마우스는 2개의 그룹으로 무작위 추출되고 도 9a에서 나타난 바와 같이 이식-후 6 및 8일차에 용량당 100 mg/kg으로 매일 2회 비히클 또는 IDOi로 경구로 처리되었다. 종양은 마지막 용량 48시간 후 수집되고 β-카테닌, CD8 및

IDO1 수준을 조사하기 위해 면역조직화학으로 거쳤다. 100 mg/kg에서 IDOi는 IDO1 수준을 거의 완전히 감소시켰다. 도 9b. β -카테닌 수준은 완만하게 줄어들었고 CD8 수준은 약간 증가했다. 도 9b. 관련된 연구에서, 4T1 종양을 담지하는 마우스에는 도 9c에서 나타낸 바와 같이 이식-후 6 및 8일차에 일당 100 mg/kg으로 매일 2회 위약 또는 IDOi가 투여되었다. 종양 성장은 치료 기간의 과정에 걸쳐 종양 크기를 측정함으로써 모니터링되었다. IDOi 단독으로 마우스 처리는 종양 성장 억제를 초래하여, β -카테닌에 부가하여, 4T1 종양 또한 종양 성장에 대해 IDO1에 의존적이라는 것을 시사한다. 도 9c.

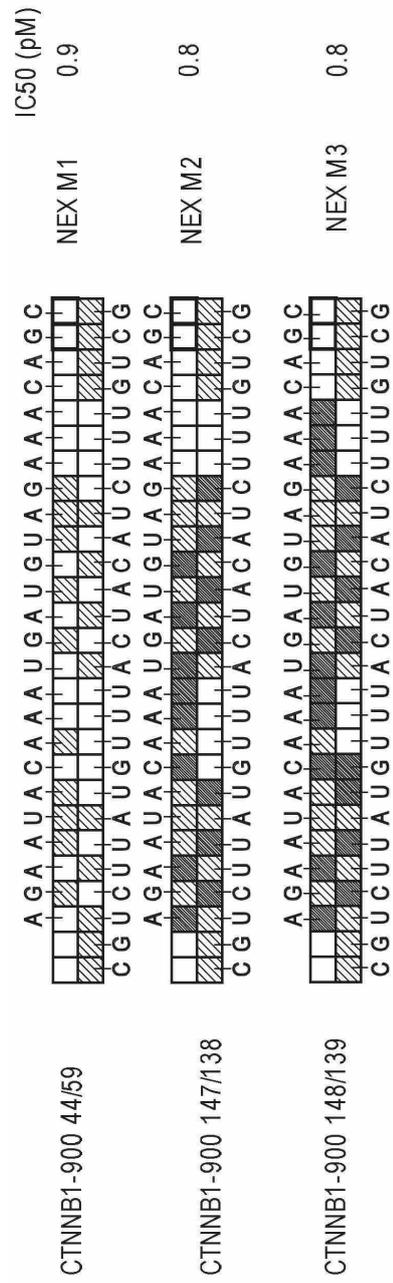
[0162] 실시예 7: β -카테닌 억제 및/또는 관문 억제제와 조합하여 Wnt 활성 4T1 종양에서 IDO1억제

[0163] 다음으로, 4T1 종양에서 EX M3 및 IDOi 또는 EX M3 및 관문 억제제 (항 PD-1 항체)와 조합 요법 또는 EX M3, IDO1, 및 항-PD-1 항체와 삼중 조합 요법이 평가되었다. 4T1 종양 담지 마우스는 8개 그룹(n=5)으로 분류되었고, 도 10c에서 나타낸 바와 같이 이식-후 4 및 6일차에서 IDOi (용량당 100 mg/kg으로 경구로) 및 이식-후 5 및 6일차에서 EX M3 또는 위약 (용량당 3 mg/kg iv)으로 매일 2회 전처리되고, 이어서 이식-후 7 및 8일차에 항-PD-1 항체 (용량당 5 mg/kg ip)로 처리되었다. 마우스에는 또한 단일 제제로 EX M3, IDOi 및 PD-1 항체 (도 10a) 및 2 종의 제제의 조합 (도 10b)이 투여되었다. 단일요법으로 EX M3, IDOi, 또는 항-PD1 항체를 투여 받은 마우스는 보통의 항종양 효능을 나타냈다. 도 10a. EX M3 및 항-PD-1 항체 또는 EX M3 및 IDOi로 조합 요법이 투여된 마우스는 종양 성장의 속도를 감소하는 종양 정체를 실증했다. 도 10b. 현저하게, 모든 3가지 제제 (EX M3, IDOi 및 항-PD-1 항체)로 처리된 마우스는 모든 3가지 제제의 투여 후 개시하는 종양 부피의 확실한 감소와 함께, 도 10c에서 나타낸 바와 같이 종양 퇴화를 실증했다. 특히, 도 10c에서 나타낸 바와 같이, EX M3, 에파카도스타트 (IDOi), 및 항-PD-1 항체의 삼중 조합의 항종양 효과는 에파카도스타트 (IDOi) 및 항-PD-1의 이중 조합으로 관측된 효과에 비해 현저하게 우월하였으며, 이는 현재 페이스 III 연구에서 평가되고 있다.

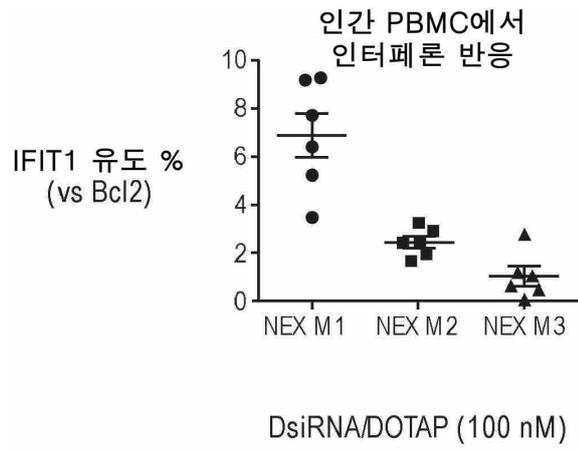
[0164] 연구의 종단 (마지막 항-PD-1 항체 처리 72시간 후)에서, 종양은 수집되고 특정 T 세포 마커를 분석하기 위해 qPCR을 거쳤다. 다른 그룹에 비교하여 삼중 조합 치료가 투여된 마우스에서 관측된 CD8 mRNA에서 실질적인 증가가 있었다. 도 11a. FoxP3은 Treg로 불리는 면역억제성 T 세포에 대한 마커이다. Foxp3 mRNA 수준은 항-PD-1 항체가 위약 또는 EX M3 처리에 첨가될 때 증가되었다. 도 11b. 이들 수준은 IDOi의 첨가로 배경 수준으로 복귀되었다. 도 11b. 임의의 이론에 구속됨이 없이, 이들 mRNA 데이터는 EX M3, IDOi, 및 항-PD-1 항체의 삼중 조합은 CD8 T 세포에서 실질적인 증가 및 면역억제성 Treg의 감소된 수준 양자를 초래하였고, 4T1 종양 미세환경 내에서 T 세포 모집단에서의 이들 변경은 관측된 종양 퇴화에 기여하기 쉽다는 것을 시사한다.

도면

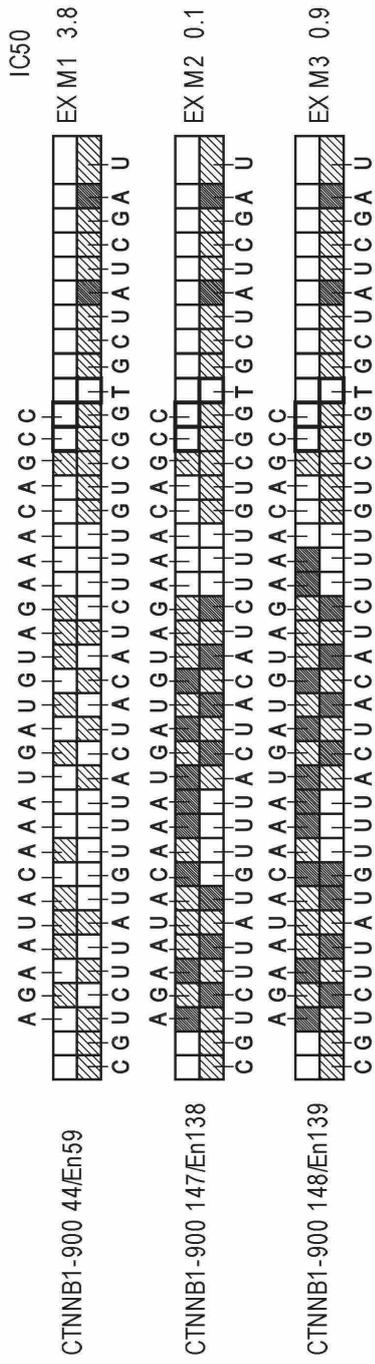
도면1a



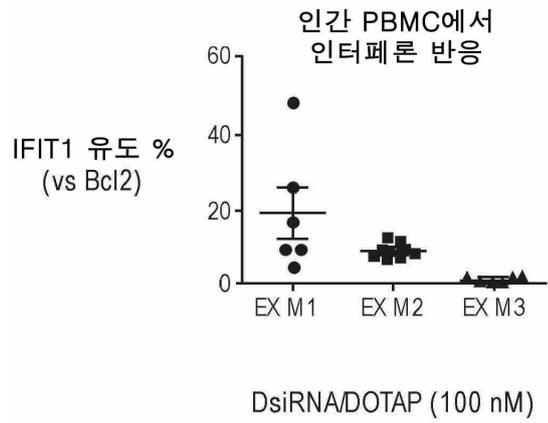
도면1b



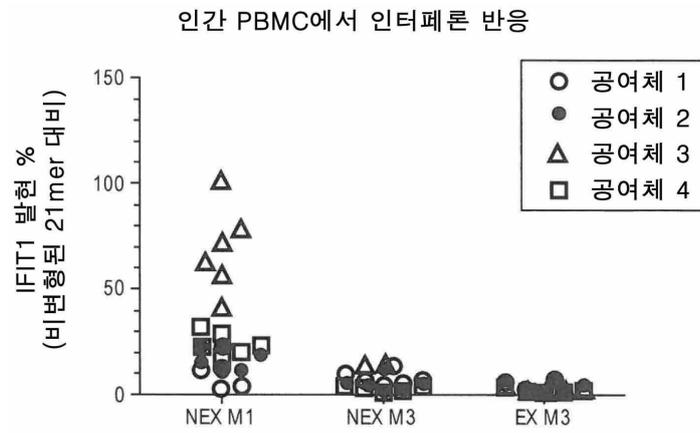
도면2a



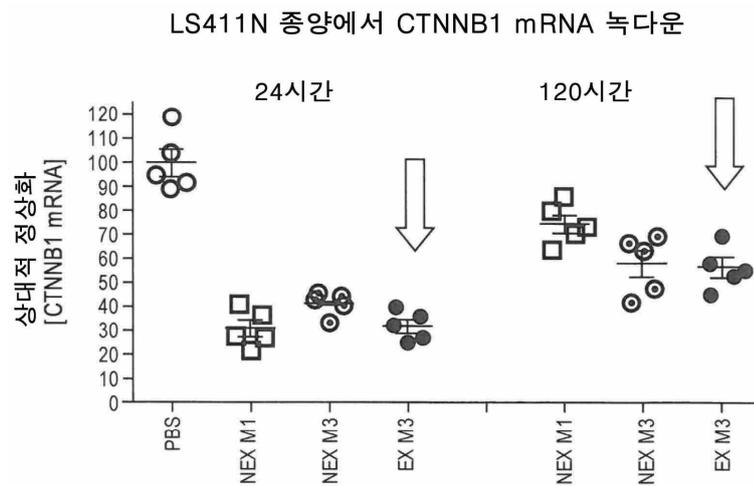
도면2b



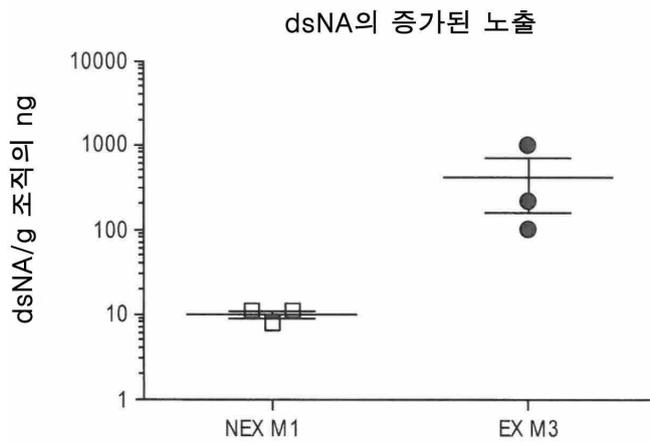
도면3a



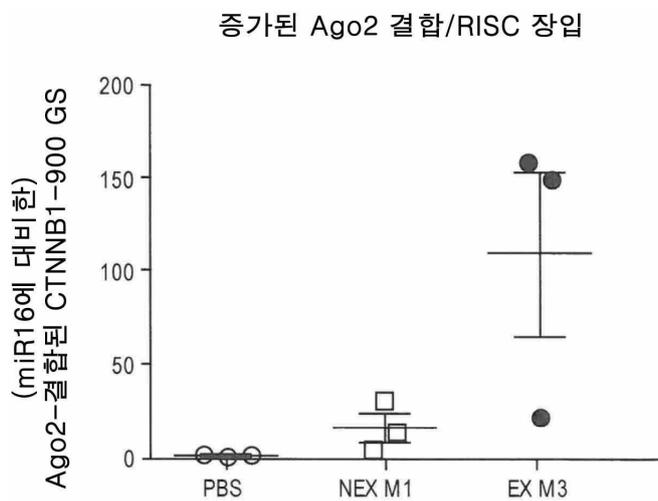
도면3b



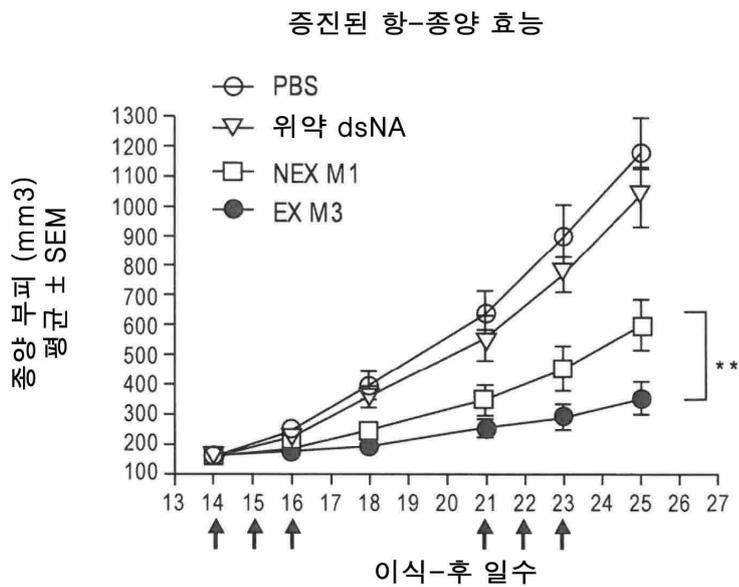
도면4a



도면4b

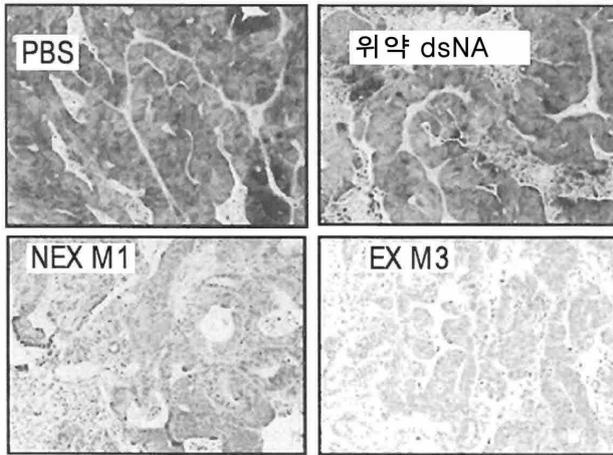


도면4c

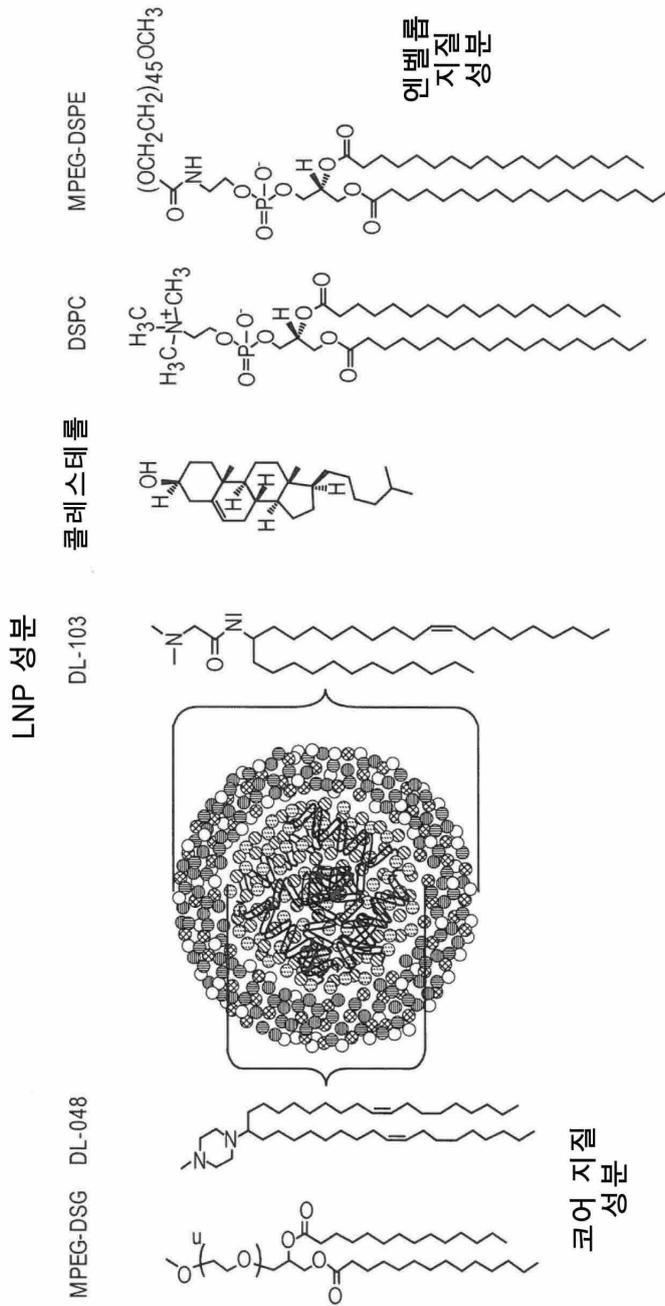


도면4d

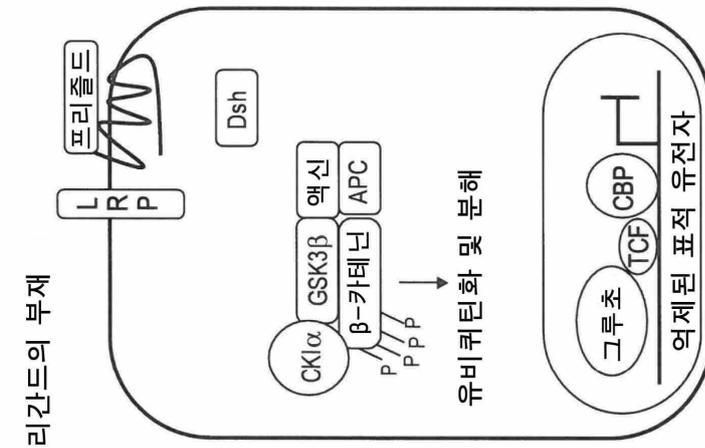
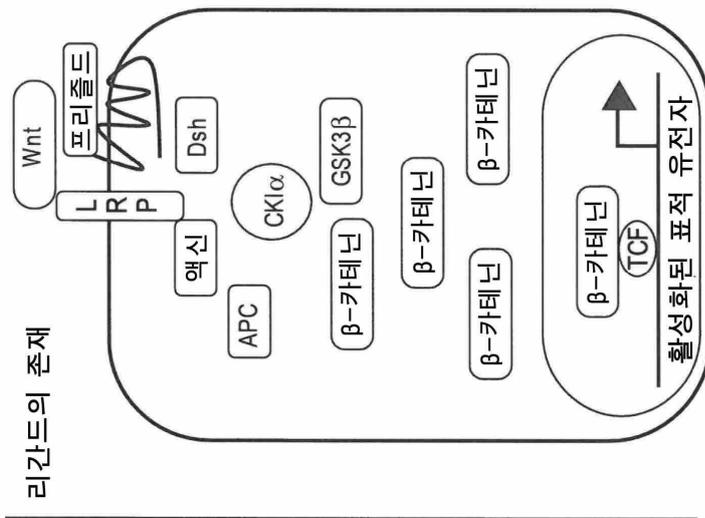
베타-카테닌 단백질의 실질적인 감소



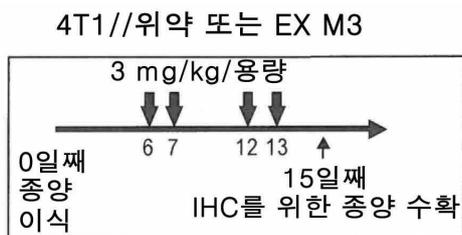
도면5



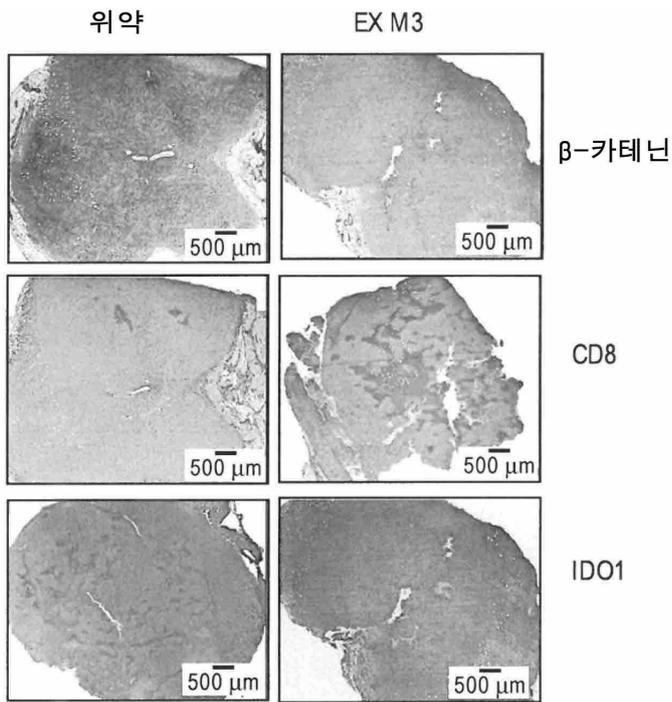
도면6



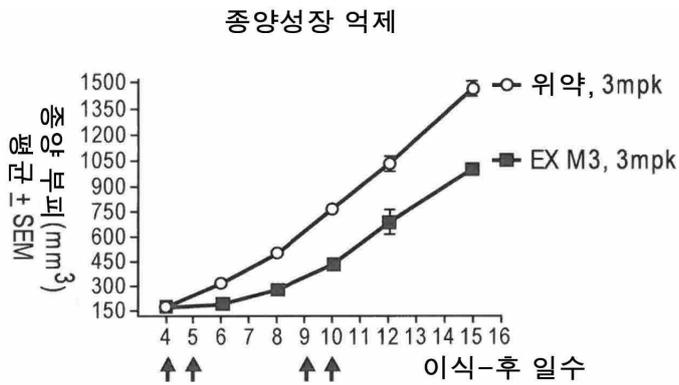
도면7a



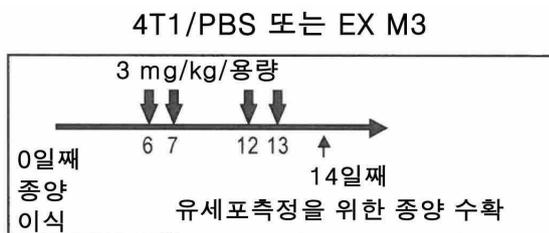
도면7b



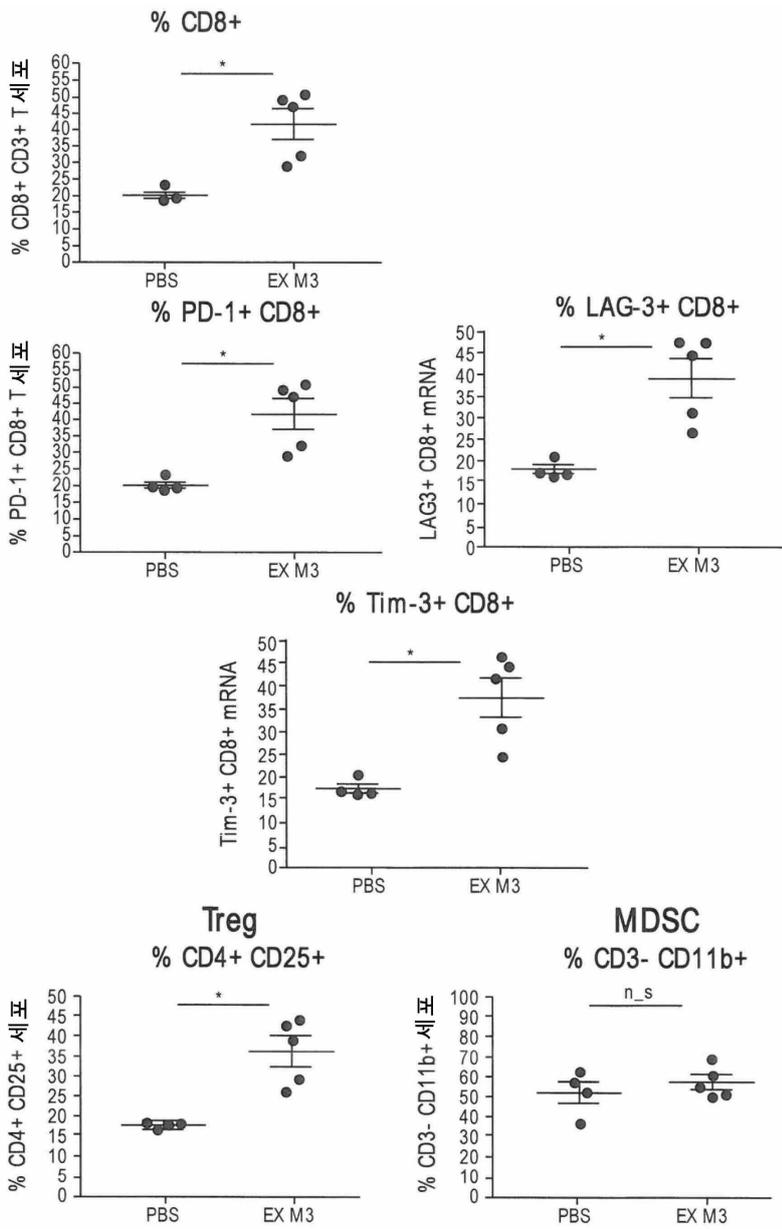
도면7c



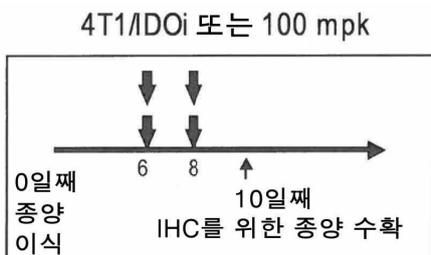
도면8a



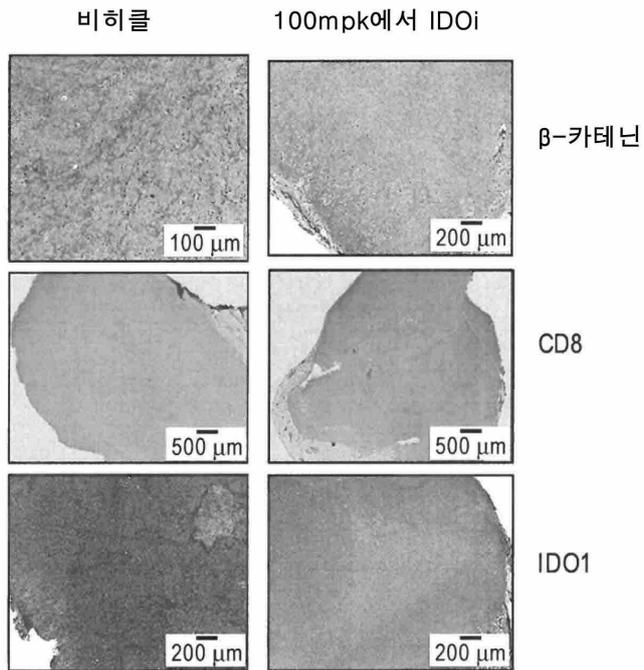
도면8b



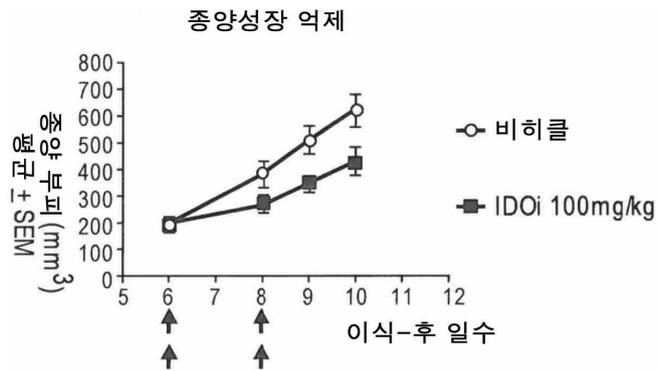
도면9a



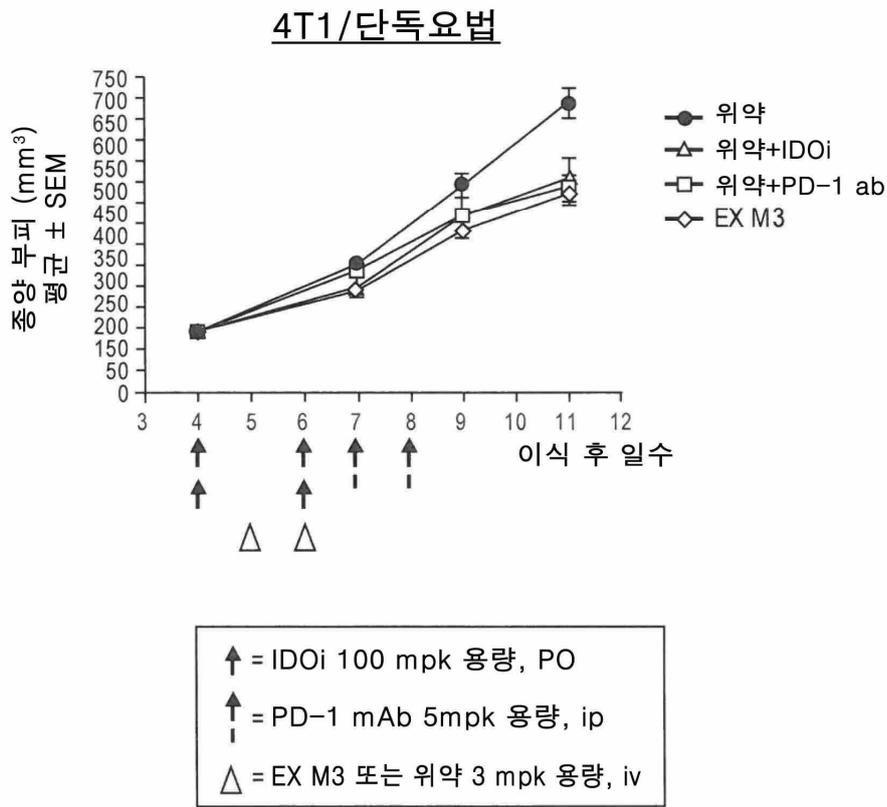
도면9b



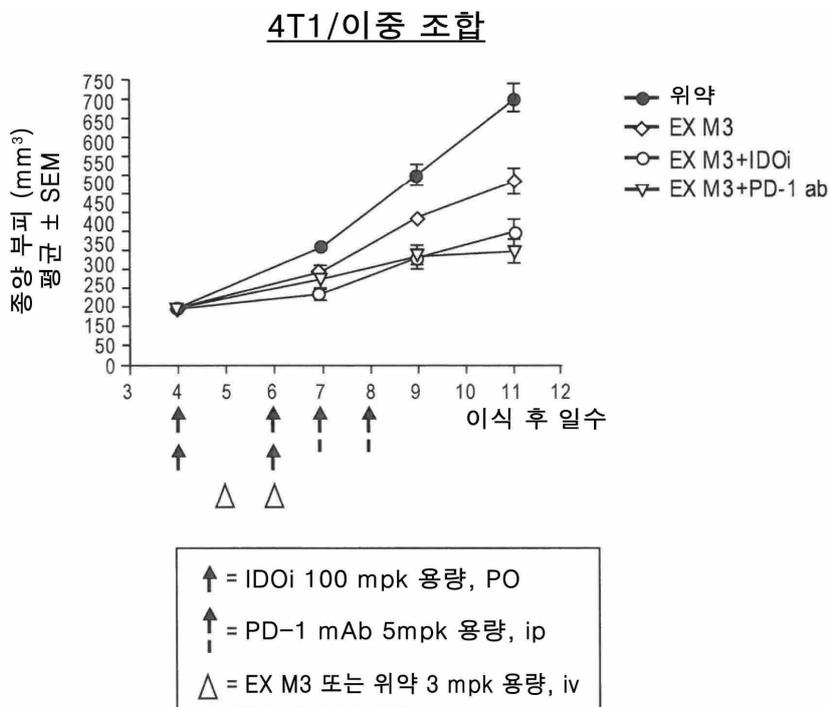
도면9c



도면10a

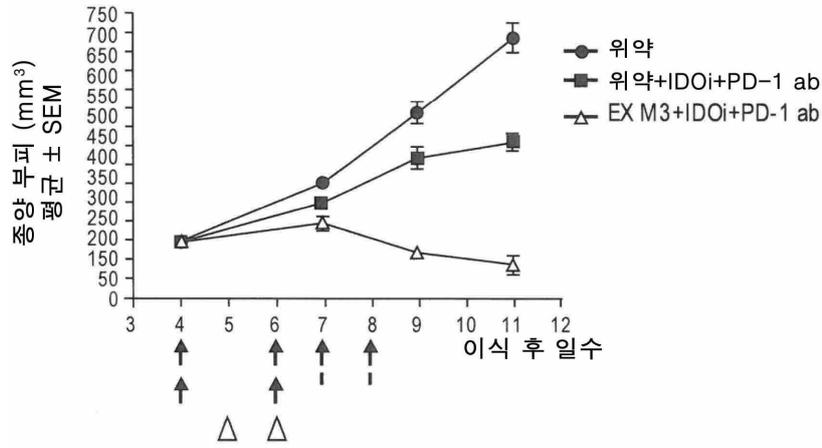


도면10b



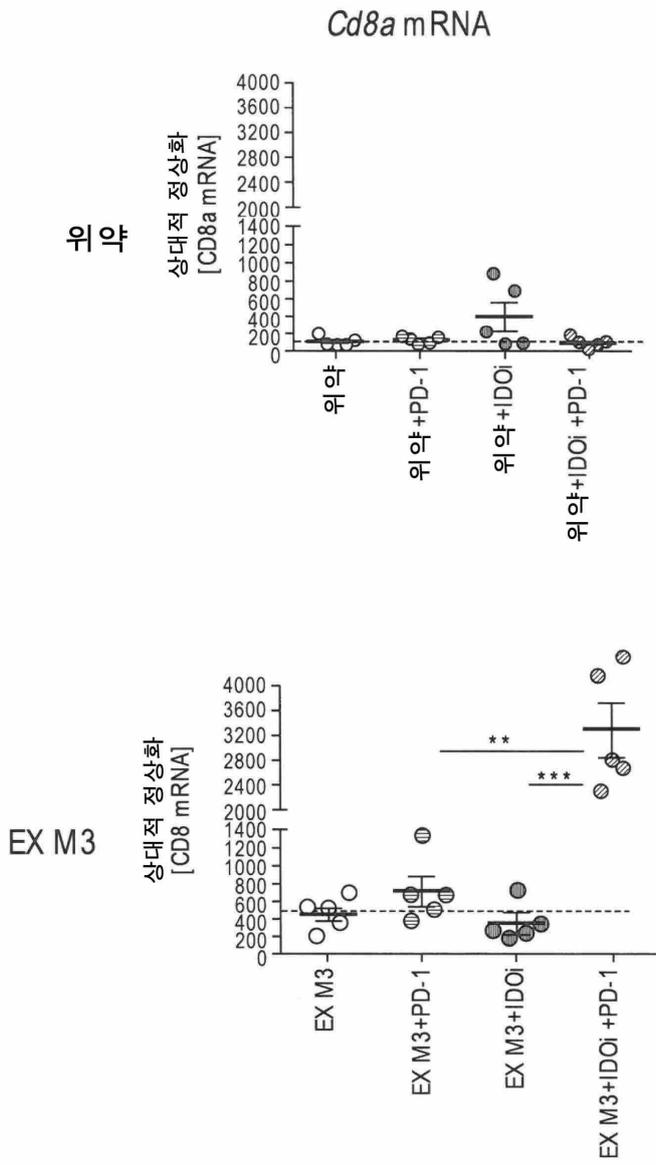
도면10c

4T1/삼중 조합

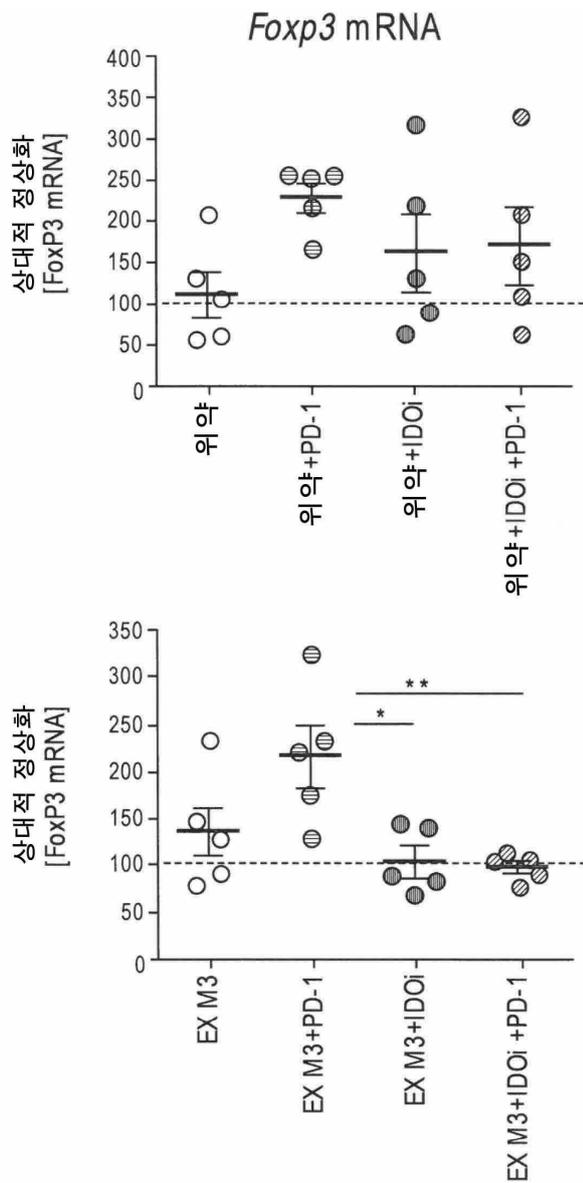


↑ = IDOi 100 mpk 용량, PO
 ↑ = PD-1 mAb 5mpk 용량, ip
 △ = EX M3 또는 위약 3 mpk 용량, iv

도면11a



도면11b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DICERNA PHARMACEUTICALS, INC.

<120> BETA CATENIN NUCLEIC ACID INHIBITOR MOLECULE

<130> 0243.0008-PCT

<140><141><150> 62/573,999

<151> 2017-10-18

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (4)..(6)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (9)..(11)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'Ome modified base
<220>
<221> modified_base
<222> (13)..(13)

<223> RNA base
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> RNA base
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(18)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(23)
 <223> RNA base
 <220><221> modified_base
 <222> (24)..(25)
 <223> DNA base
 <400> 1
 agaauacaaa ugauguagaa acagc
 <210> 2
 <211> 27
 <212> RNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(4)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(8)
 <223> RNA base
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base

25

<222> (10)..(10)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> RNA base

<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (16)..(20)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (23)..(23)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<
<222> (24)..(24)
<223> RNA base
<220><221> modified_base

<222> (25)..(27)

<223> 2'Ome modified base

<400> 2

gcuguuucua caucauuugu auucugc

27

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (4)..(6)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (9)..(11)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)

 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(18)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(23)
 <223> RNA base
 <220><221> modified_base
 <222> (24)..(25)
 <223> DNA base
 <400> 3
 agaaauacaaa ugauguagaa acagc
 <210> 4
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(4)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(7)

25

<223> RNA base
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221
 > modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(19)
 <223> RNA base
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (25)..(27)

<223> 2'Ome modified base

<400> 4

gcuguuucua caucuuugu auucugc

27

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (4)..(6)

<223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(11)
 <223> 2'F modified base

 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(18)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(21)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(23)
 <223> RNA base
 <220><221> modified_base

 <222> (24)..(25)

<223> DNA base

<400> 5

agaauacaaa ugauguagaa acagc

25

<210> 6

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (5)..(7)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(18)
 <
 223> RNA base
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(20)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (24)..(24)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (25)..(27)
 <223> 2'Ome modified base
 <400> 6
 gcuguuucua caucauuugu auucugc

27

<210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (4)..(6)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (9)..(11)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (16)..(18)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (19)..(23)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (25)..(26)

<223> DNA base

<400> 7

agaauacaaa ugauguagaa acagcc

26

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (3)..(5)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'F modified base
<220><221> modified_base
<222> (7)..(9)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> DNA base
<220><221> modified_base
<222> (11)..(15)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base

<222> (16)..(19)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (23)..(23)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (24)..(24)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (25)..(25)
<223> RNA base
<220><221> modified_base

<222> (26)..(26)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (27)..(31)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (32)..(32)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (33)..(33)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (34)..(34)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (35)..(35)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (36)..(38)

<223> 2'Ome modified base

<400> 8

uagcuaucgt ggcuguuucu acaucauuug uauucugc

38

<210> 9

<211>

26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'F modified base
<220><221> modified_base
<222> (4)..(6)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)
<223> 2'F modified base
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (9)..(11)
<223> 2'F modified base
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'F modified base
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'F modified base
<220><221> modified_base
<222> (16)..(18)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (19)..(23)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (25)..(26)

<223> DNA base

<400> 9

agaauacaaa ugauguagaa acagcc

26

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (3)..(5)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (7)..(9)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> DNA base
<220><221> modified_base
<222> (11)..(15)
<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base
<222> (16)..(18)
<223> RNA base
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'F modified base
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 2'F modified base
<220><221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base
<222> (23)..(23)
<223> 2'F modified base
<220><221> modified_base
<222> (24)..(24)
<223> 2'Ome modified base
<220><221> modified_base

<222> (25)..(25)
<223> 2'F modified base
<220><221> modified_base
<222> (26)..(26)
<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (27)..(30)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (31)..(31)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (32)..(32)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (33)..(33)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (34)..(34)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (35)..(35)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (36)..(38)

<223> 2'Ome modified base

<400> 10

uagcuaucgt ggcuguuucu acaucauuug uauucugc

38

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (4)..(6)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (9)..(11)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (16)..(18)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (21)..(23)

<223> RNA base

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (25)..(26)

<223> DNA base

<400> 11

agaauacaaa ugauguagaa acagcc

26

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'F modified base

<220><221> modified_base

<222> (3)..(5)

<223>

2'Ome modified base

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(9)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> DNA base
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(15)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(18)
 <223> RNA base
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'Ome modified base
 <220>
 ><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (24)..(24)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (25)..(25)
 <223> 2'F modified base

<220><221> modified_base
 <222> (26)..(26)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (27)..(29)
 <223> RNA base
 <220><221> modified_base

<222> (30)..(31)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (32)..(32)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (33)..(33)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (34)..(34)
 <223> 2'Ome modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (35)..(35)
 <223> 2'F modified base
 <220><221> modified_base
 <222> (36)..(38)
 <223> 2'Ome modified base

<400> 12

uagcuaucgt ggcuguuucu acaucauuug uauucugc

38

<210> 13

<211

> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 13

agaauacaaa ugauguagaa acagcc

26

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 14

uagcuaucgt ggcuguuucu acaucauuug uauucugc

38