



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0152270
(43) 공개일자 2022년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/713 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7034708
(22) 출원일자(국제) 2021년03월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/021049
(87) 국제공개번호 WO 2021/178778
국제공개일자 2021년09월10일
(30) 우선권주장
62/985,950 2020년03월06일 미국(US)

(71) 출원인
알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드
미국 매사추세츠주 02142 캄브릿지 헨리 에이. 테
르미어 스퀘어 웨스트 켄달 스트리트 675
(72) 발명자
찬 에이미
미국 매사추세츠주 02142 캄브릿지 헨리 에이. 테
르미어 스퀘어 웨스트 켄달 스트리트 675
야나스 마야
미국 매사추세츠주 02142 캄브릿지 헨리 에이. 테
르미어 스퀘어 웨스트 켄달 스트리트 675
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

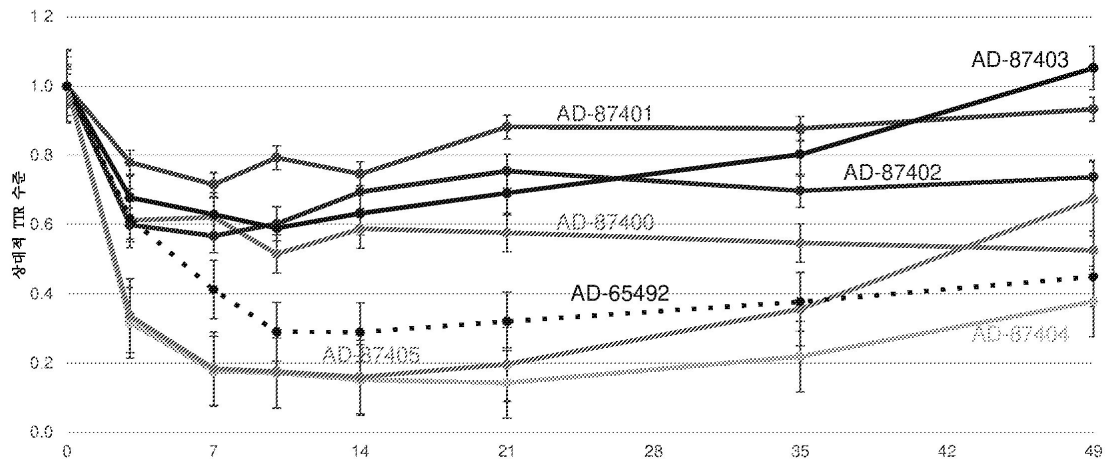
전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 트랜스티레틴 (TTR)의 발현을 억제하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 RNAi 제제, 예를 들어, 트랜스티레틴 (TTR) 유전자를 표적화하는 이중 가닥 RNAi 제제를 사용하여 TTR 관련 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 9/00 (2018.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/32 (2013.01)

C12N 2310/344 (2013.01)

C12N 2310/351 (2013.01)

(72) 발명자

맥도갈 로빈 디.

미국 매사추세츠주 02142 캠프릿지 헨리 에이. 테
르미어 스퀘어 웨스트 켄달 스트리트 675

람스덴 디안

미국 매사추세츠주 02142 캠프릿지 헨리 에이. 테
르미어 스퀘어 웨스트 켄달 스트리트 675

슈레겔 마크 케이.

미국 매사추세츠주 02142 캠프릿지 헨리 에이. 테
르미어 스퀘어 웨스트 켄달 스트리트 675

서덜랜드 제시카 이.

미국 매사추세츠주 02142 캠프릿지 헨리 에이. 테
르미어 스퀘어 웨스트 켄달 스트리트 675

명세서

청구범위

청구항 1

센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중 가닥 RNAi 제제로서, 여기서,

상기 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각이 독립적으로 30개 이하의 뉴클레오타이드 길이이고;

상기 센스 가닥이 변형된 뉴클레오타이드 서열 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (서열번호 6)를 포함하고;

상기 안티센스 가닥이 변형된 뉴클레오타이드 서열 5'-usCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfuccasusc-3' (서열번호 7)을 포함하고,

여기서, a, c, g, 및 u는 각각 2'-0-메틸아데노신-3'-포스페이트, 2'-0-메틸시티딘-3'-포스페이트, 2'-0-메틸구아노신-3'-포스페이트, 및 2'-0-메틸우리딘-3'-포스페이트이고;

Af, Cf, Gf, 및 Uf는 각각 2'-플루오로아데노신-3'-포스페이트, 2'-플루오로시티딘-3'-포스페이트, 2'-플루오로 구아노신-3'-포스페이트, 및 2'-플루오로우리딘-3'-포스페이트이고;

(Tgn)은 티미딘-글리콜 핵산 (GNA) S-이성체이고;

s는 포스포로티오에이트 링커인, RNAi 제제.

청구항 2

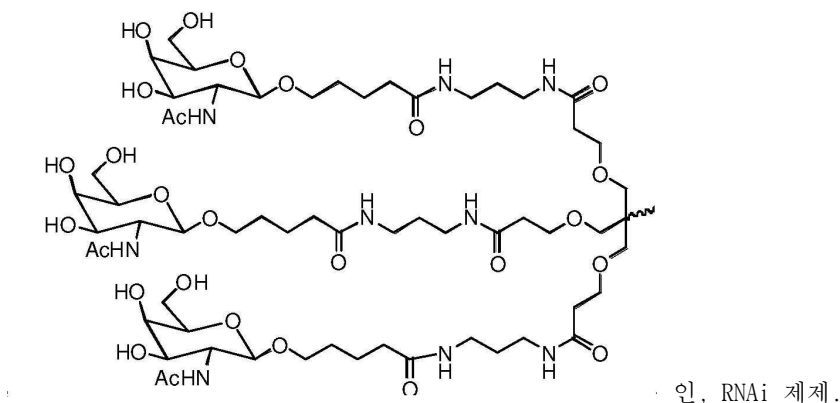
제1항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 제제의 센스 가닥이 적어도 하나의 리간드에 접합되는, RNAi 제제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 리간드가 2가 또는 3가 측쇄 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체인, RNAi 제제.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 리간드가

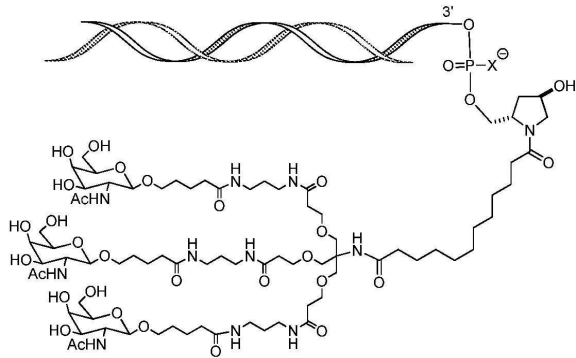


청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드가 상기 센스 가닥의 3' 말단에 부착된, RNAi 리간드.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 제제가 하기의 도식에 나타낸 바와 같은 리간드에 접합되고,



여기서, X가 O 또는 S인, RNAi 제제.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 가닥이 21개 뉴클레오타이드 길이이고 상기 안티센스 가닥이 23개 뉴클레오타이드 길이인, RNAi 제제.

청구항 8

TTR 관련 질환을 앓는 사람 대상체를 치료하는 방법에서 RNAi 제제의 용도로서, 상기 방법이 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중 가닥 RNAi 제제의 25 mg 내지 1000 mg의 고정된 용량을 상기 대상체에게 투여함을 포함하고, 여기서,

상기 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각이 독립적으로 30개 이하의 뉴클레오타이드 길이이고;

상기 센스 가닥이 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (서열번호 6)를 포함하고;

상기 안티센스 가닥이 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (서열번호 7)을 포함하고,

여기서, a, c, g, 및 u는 각각 2'-O-메틸아데노신-3' -포스페이트, 2'-O-메틸시티딘-3' -포스페이트, 2'-O-메틸 구아노신-3' -포스페이트, 및 2'-O-메틸우리딘-3' -포스페이트이고;

Af, Cf, Gf, 및 Uf는 각각 2' -플루오로아데노신-3' -포스페이트, 2' -플루오로시티딘-3' -포스페이트, 2' -플루오로구아노신-3' -포스페이트, 및 2' -플루오로우리딘-3' -포스페이트이고;

(Tgn)은 티미딘-글리콜 핵산 (GNA) S-이성체이고;

s는 포스포로티오에이트 링커인, 용도.

청구항 9

TTR 관련 질환의 진단 기준을 충족하지 않는 사람 대상체에서 TTR의 발현을 억제하는 방법에서 RNAi 제제의 용도로서, 상기 방법이 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중 가닥 RNAi 제제의 25 mg 내지 1000 mg의 고정된 용량을 상기 대상체에게 투여함을 포함하고, 여기서,

상기 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각이 독립적으로 30개 이하의 뉴클레오타이드 길이이고;

상기 센스 가닥이 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (서열번호 6)를 포함하고;

상기 안티센스 가닥이 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (서열번호 7)을 포함하고,

여기서, a, c, g, 및 u는 각각 2'-O-메틸아데노신-3' -포스페이트, 2'-O-메틸시티딘-3' -포스페이트, 2'-O-메틸 구아노신-3' -포스페이트, 및 2'-O-메틸우리딘-3' -포스페이트이고;

Af, Cf, Gf, 및 Uf는 각각 2' -플루오로아데노신-3' -포스페이트, 2' -플루오로시티딘-3' -포스페이트, 2' -플루오로구아노신-3' -포스페이트, 및 2' -플루오로우리딘-3' -포스페이트이고;

(Tgn)은 티미딘-글리콜 핵산 (GNA) S-이성체이고;

s는 포스포로티오에이트 링커인, 용도.

청구항 10

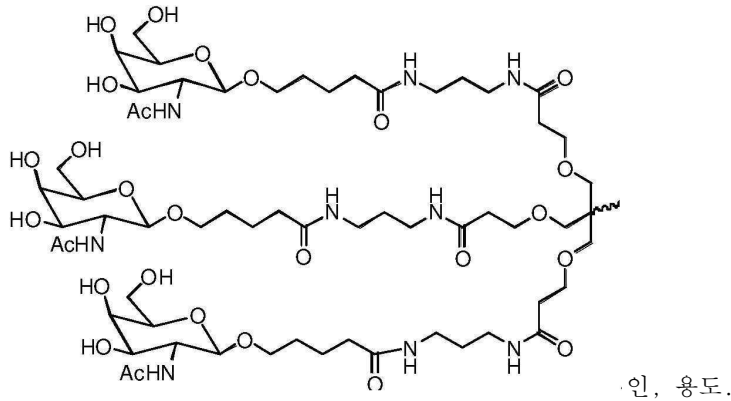
제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 제제의 센스 가닥이 적어도 하나의 리간드에 접합되는, 용도.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 리간드가 2가 또는 3가 측쇄 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체인, 용도.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 리간드가

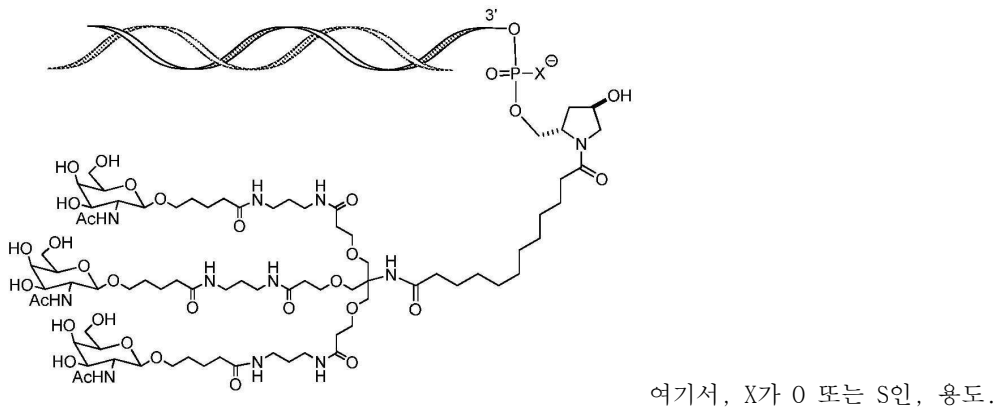


청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드가 상기 센스 가닥의 3' 말단에 부착된, 용도.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 제제가 하기의 도식에 나타낸 바와 같은 리간드에 접합되고,



청구항 15

제8항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 가닥이 21개 뉴클레오타이드 길이이고, 상기 안티센스 가닥이 23개 뉴클레오타이드 길이인, 용도.

청구항 16

제8항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 신경계 손상, 삶의 질, 진행중인 신경 손상, 또는 심혈관 손상의 적어도 하나의 지표를 개선시킴을 포함하는, 용도.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 지표가 신경계 손상 지표인, 용도.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 신경계 손상 지표가 신경병증 손상 (NIS) 스코어, 변형된 NIS (mNIS+7) 스코어, NIS-W 스코어, 복합 자율 증상 스코어(COMPASS-31), 매디안 체질량 지수(mBMI) 스코어, 6-분 걷기 시험(6MWT) 스코어, 및 10-미터 걷기 시험 스코어의 그룹으로부터 선택된 지표에서 기준선으로부터의 변화인, 용도.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 지표가 삶의 질 지표인, 용도.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 삶의 질 지표가 SF-36®건강 조사 스코어, Norfolk 삶의 질-당뇨병성 신경병증(Norfolk QOL-DN) 스코어, 및 Rasch-구축 전체 불구 스케일 (R-ODS) 스코어의 그룹으로부터 선택되는 지표에서 기준선으로부터의 변화인, 용도.

청구항 21

제16항에 있어서, 상기 지표가 진행중인 신경 손상인, 용도.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 진행중인 신경 손상 지표가 신경필라멘트 경쇄 (NfL), RSP03, CCDC80, EDA2R, NT-proBNP, 및 N-CDase 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질의 혈장 단백질 수준에서 기준선으로부터의 변화인, 용도.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 진행중인 신경 손상의 지표가 신경필라멘트 경쇄 (NfL) 단백질 수준의 혈장 수준에서의 변화인, 용도.

청구항 24

제16항에 있어서, 상기 지표가 심혈관 손상 지표인, 용도.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 심혈관 손상의 지표가 심혈관 병원 입원, 보다 양호한 건강 상태를 나타내는 증가된 스코어와 함께 캔자스시티 심근병증 설문지 전체 요약(KCCQ-OS)을 사용한 기준선으로부터의 변화, 심장초음파 평가에 의한 평균 좌심실(LV) 벽 두께의 기준선으로부터의 변화, 심장초음파 평가에 의한 전체적인 종방향 긴장의 기준선으로부터의 변화, 및 N-말단 프로호르몬 B형 나트륨이뇨 펩타이드(NTproBNP)의 기준선으로부터의 변화인, 용도.

청구항 26

제8항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사람 대상체가 TTR 관련 질환의 발병과 관련된 TTR 유전자 돌연변이를 갖는, 용도.

청구항 27

제8항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TTR 관련 질환이 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA), 전신성 가족성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP), 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC), 연수막 / 중추신경계(CNS) 아밀로이드증, 고티록신혈증 및 심장 아밀로이드증으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 용도.

청구항 28

제8항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사람 대상체가 트랜스티레틴 매개 아밀로이드증(ATTR 아밀로이드증)을 갖고, 상기 RNAi 제제 방법의 사용이 상기 사람 대상체에서 아밀로이드 TTR 침착물을 감소시키는, 용

도.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 ATTR이 유전성 ATTR (h-ATTR)인, 용도.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 ATTR이 비-유전성 ATTR (wt ATTR)인, 용도.

청구항 31

제8항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 제제가 피하 투여 또는 정맥내 투여에 의해 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 피하 투여가 자가 투여인, 용도.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 자가 투여가 사전 충전된 주사기 또는 자동-주사 주사기를 통해서 수행되는, 용도.

청구항 34

제8항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사람 대상체로부터 유래된 샘플 중에 TTR mRNA 발현 또는 TTR 단백질 발현의 수준을 평가하는 단계를 추가로 포함하는, 용도.

청구항 35

제8항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 제제가 3개월 마다 1회 내지 연간 1회로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 36

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 약 3개월 마다 1회, 약 6개월 마다 1회, 또는 연간 1회로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 37

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 3개월 마다 1회로 25 mg 내지 300 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 38

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 3개월 마다 1회로 25 mg 내지 200 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 39

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 3개월 마다 1회로 75 mg 내지 200 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 40

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 3개월 마다 1회로 25 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 41

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 3개월 마다 1회로 75 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 42

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 3개월 마다 1회로 100 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 43

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 3개월 마다 1회로 200 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 44

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 3개월 마다 1회로 300 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 45

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 6개월 마다 1회 내지 12개월 마다 1회로 400 mg 내지 600 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 46

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 6개월 마다 1회 내지 12개월 마다 1회로 400 mg 내지 600 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 47

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 6개월 마다 1회 내지 12개월 마다 1회로 400 mg 또는 600 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 48

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 12개월 마다 1회로 700 mg 내지 1000 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 49

제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제가 12개월 마다 1회로 700 mg, 800 mg, 900 mg 또는 1000 mg의 고정된 용량으로 상기 사람 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 50

제8항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 치료학적 제제를 상기 사람 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 용도.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 추가의 치료학적 제제가 TTR 사량체 안정화제 또는 비-스테로이드성 항염증 제제인, 용도.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

[0001]

[0002]

본 출원은 2020년 3월 6일자로 출원된 미국 가출원 제62/985,950호에 대한 우선권을 주장하며, 이의 전문은 본

원에 참조로 인용된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하고, 이는 그 전체가 참조로 인용된다. 2021년 2월 26일자로 생성된 상기 ASCII 복사본은 파일명이 121301_12320_SL.txt이며, 크기가 44,455 바이트이다.

배경 기술

[0005] 트랜스티레틴 (TTR) (또한 전구알부민으로서 공지된)은 혈청 및 뇌척수액 (CSF) 중에서 발견된다. TTR은 레티놀-결합 단백질 (RBP) 및 티록신 (T4)을 수송하고 또한 혈액 및 CSF 중에서 RBP와의 연합을 통해 레티놀 (비타민 A)의 운반체로서 작용한다. 트랜스티레틴은 티록신 및 레티놀의 이의 수송 (**transport of thyroxine and retinol**)때문에 이름이 붙여졌다. TTR은 또한 프로테아제로서 기능하고, apoA-I (주요 HDL 아포지질단백질), 아밀로이드 β -펩타이드, 및 뉴로펩타이드 Y를 포함하는 단백질을 절단할 수 있다. 문헌(Liz, M.A. *et al.* (2010) *IUBMB Life*, 62(6):429-435)을 참조한다.

[0006] TTR은 베타 시트 구조가 풍부한 4개의 동일한 127개 아미노산 서브유닛(단량체)의 사량체이다. 각 단량체는 2개의 4가닥 베타 시트와 프롤레이트 타원체 모양을 갖는다. 역평행 베타 시트 상호작용은 단량체를 이량체에 연결한다. 각 단량체로부터의 짧은 루프는 주요 이량체-이량체 상호작용을 형성한다. 이들 2개 쌍의 루프는 이량체의 반대되는 볼록 베타 시트를 분리하여 내부 채널을 형성한다.

[0007] 간은 TTR 발현의 주요 부위이다. 다른 중요한 발현 부위는 맥락충, 망막(특히 망막 색소 상피) 및 췌장을 포함한다.

[0008] 트랜스티레틴은 아밀로이드 원섬유 형성의 전구체 단백질인 적어도 27개의 독특한 유형의 단백질 중 하나이다. 문헌(Guan, J. *et al.* (Nov. 4, 2011) *Current perspectives on cardiac amyloidosis*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011)을 참조한다. 기관 및 조직에서 아밀로이드 원섬유의 세포외 침착은 아밀로이드증의 특징이다. 아밀로이드 원섬유는 잘못 폴딩된 단백질 응집체로 구성되고, 이는 전구체 단백질의 과잉 생산 또는 특정 돌연변이로 인해 발생할 수 있다. TTR의 아밀로이드 생성 가능성은 이의 광범위한 베타 시트 구조와 관련이 있을 수 있고; X선 결정학 연구는 특정 아밀로이드 생성 돌연변이가 단백질의 4량체 구조를 불안정하게 한다는 것을 지적한다. 예를 들어, 문헌(Saraiva M.J.M. (2002) *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(12):1-11)을 참조한다.

[0009] 아밀로이드증은 아밀로이드 침착물을 특징으로 하는 아밀로이드 질환의 그룹에 대한 일반적인 용어이다. 아밀로이드 질환은 이들의 전구체 단백질을 기준으로 분류되고; 예를 들어 명칭은 아밀로이드 때문에 "A"로 시작하고 이어서 전구체 단백질, 예를 들어, 아밀로이드 생성 트랜스티레틴 (**amloidogenic transthyretin**)에 대한 ATTR이 뒤따른다. *Ibid.*

[0010] 수많은 TTR 관련 질환이 있고, 이의 대부분은 아밀로이드 질환이다. 정상 서열 TTR은 노인의 심장 아밀로이드증과 관련이 있고, 노인성 전신 아밀로이드증(SSA)(노인성 심장 아밀로이드증(SCA) 또는 심장 아밀로이드증이라고도 함)이라고 호칭된다. SSA는 흔히 다른 많은 기관에 미세한 침착물을 동반한다. TTR 아밀로이드증은 다양한 형태로 나타난다. 말초 신경계가 더 두드러지게 영향을 받는 경우, 이 질환은 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP)으로 호칭된다. 심장이 주로 관련되지만 신경계가 관여하지 않는 경우, 이 질환은 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC)으로 호칭된다. TTR 아밀로이드증의 세 번째 주요 유형은 연수막 또는 수막뇌혈관 아밀로이드증, 중추신경계(CNS) 아밀로이드증 또는 아밀로이드증 VII 형태로도 공지된 연수막 아밀로이드증이다. TTR의 돌연변이는 또한 아밀로이드성 유리체 혼탁, 수근관 증후군 및 정상갑상선 고티록신혈증을 유발할 수 있고, 이는 티록신에 대한 친화성이 증가된 돌연변이 TTR 분자로 인해 티록신과 TTR의 증가된 연관성으로 인해 2차적인 것으로 사료되는 비-아밀로이드성 질환인 것으로 사료된다. 예를 들어, 문헌(Moses *et al.*(1982) *J. Clin. Invest.*, 86, 2025-2033)을 참조한다.

[0011] 비정상적인 TTR 대립유전자는 유전되거나 체세포 돌연변이를 통해 획득될 수 있다. Guan, J. *et al.* (Nov. 4, 2011) *Current perspectives on cardiac amyloidosis*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011. 트랜스티레틴 연합된 ATTR은 가장 흔한 형태의 유전성 전신 아밀로이드증이다. Lobato, L. (2003) *J. Nephrol.*, 16:438-442. TTR 돌연변이는 TTR 아밀로이드 형성 과정을 가속화하고 ATTR 발병에 대해 가장 중요한 위험 인자이다. 85개 초과 아밀로이드 생성 TTR 변이체는 전신 가족성 아밀로이드증을 유발하는 것으로 공지되어 있다. 일부 돌연변이는 심근병증 또는 유리체 혼탁과 관련이 있지만, TTR

돌연변이는 일반적으로 말초 신경계의 특히 침범과 함께 전신 아밀로이드 침착물을 유발한다. *Ibid.*

[0012] V30M 돌연변이는 가장 만연된 TTR 돌연변이다. 예를 들어, 문헌(Lobato, L. (2003) *J Nephrol*, 16:438-442)을 참조한다. V122I 돌연변이는 아프리카계 미국인 인구의 3.9%가 갖고 있고 FAC의 가장 흔한 원인이다. 문헌(Jacobson, D.R. et al. (1997) *N. Engl. J. Med.* 336(7):466-73)을 참조한다. SSA는 80세 이상 인구의 25% 이상에 영향을 미치는 것으로 추정된다. 문헌(Westermark, P. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(7): 2843-5)을 참조한다.

[0013] 따라서, TTR 관련 질환에 대한 효과적인 치료가 당업계에 필요하다.

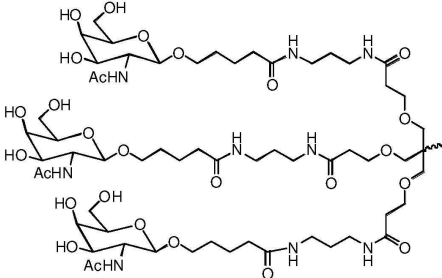
발명의 내용

[0014] 발명의 개요

[0015] 본 발명은 TTR의 발현을 억제하기 위한 조성물 및 방법, 및 TTR 유전자를 표적화하는, 이중 가닥 RNAi 제제를 사용하여 사람 대상체에서 트랜스티레틴-(TTR-) 관련 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

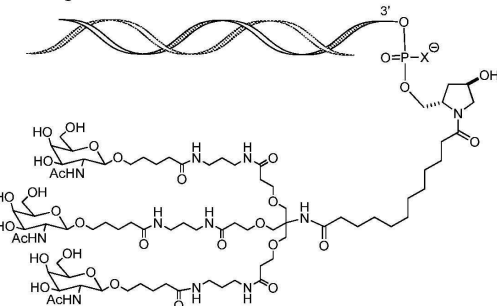
[0016] 본 발명은 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중 가닥 RNAi 제제를 제공하고, 여기서: 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 길이가 30개 이하의 뉴클레오타이드이고; 센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (서열번호 6)를 포함하고; 안티센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usCfsuugGf(Tgn)uAfcAugAfaAfucccasusc-3' (서열번호 7)를 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 각각 2'-O-메틸아데노신-3' -포스페이트, 2'-O-메틸시티딘-3' -포스페이트, 2'-O-메틸구아노신-3' -포스페이트, 및 2'-O-메틸우리딘-3' -포스페이트이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 각각 2' -플루오로아데노신-3' -포스페이트, 2' -플루오로시티딘-3' -포스페이트, 2' -플루오로구아노신-3' -포스페이트, 및 2' -플루오로우리딘-3' -포스페이트이고; (Tgn)은 티미딘-글리콜 핵산 (GNA) S-이성체이고; s는 포스포로티오에이트 링커이다.

[0017] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제의 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다. 특정 구현예에서, 리간드는 2가 또는 3가 측쇄 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체이다. 특정 구현예에서, 리간드는

[0018]  이다.

[0019] 특정 구현예에서, 리간드는 센스 가닥의 3' 말단에 부착된다.

[0020] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 하기의 도식에 나타난 바와 같이 리간드에 접합되고,

[0021]  여기서, X는 O 또는 S이다.

[0022] 특정 구현예에서, 센스 가닥은 길이가 21개 뉴클레오타이드이고, 안티센스 가닥은 길이가 23개 뉴클레오타이드이다.

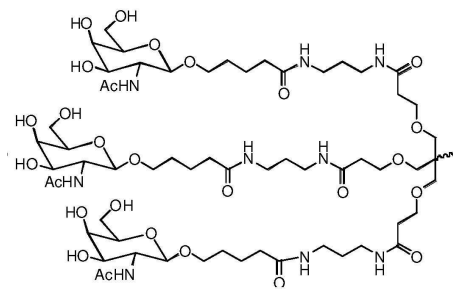
[0023] 본 발명은 이중 가닥 RNAi 제제의 약 25 mg 내지 약 1000 mg의 고정된 용량의 투여를 포함하는, TTR 관련 질환을 앓는 사람 대상체를 치료하는 방법에서 이중 가닥 RNAi 제제의 용도를 제공하고, 여기서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 길이가 30개 이하의 뉴클레오타이드이고; 센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서

열 5' -usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (서열번호 6)를 포함하고; 안티센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (서열번호 7)을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 각각 2'-O-메틸아데노신-3' -포스페이트, 2'-O-메틸시티딘-3' -포스페이트, 2'-O-메틸구아노신-3' -포스페이트, 및 2'-O-메틸우리딘-3' -포스페이트이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 각각 2' -플루오로아데노신-3' -포스페이트, 2' -플루오로시티딘-3' -포스페이트, 2' -플루오로구아노신-3' -포스페이트, 및 2' -플루오로우리딘-3' -포스페이트이고; (Tgn)은 티미딘-글리콜 핵산 (GNA) S-이성체이고; s는 포스포로티오에이트 링커이다.

[0024] 본 발명은 또한 이중 가닥 RNAi 제제의 약 25 mg 내지 약 1000 mg의 고정된 용량의 투여를 포함하는, TTR 관련 질환의 진단학적 기준을 충족하지 않는 사람 대상체에서 TTR의 발현을 억제하는 방법에서 이중 가닥 RNAi 제제의 용도를 제공하고, 여기서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 길이가 30개 이하의 뉴클레오타이드이고; 센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (서열번호 6)를 포함하고; 안티센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (서열번호 7)을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 각각 2'-O-메틸아데노신-3' -포스페이트, 2'-O-메틸시티딘-3' -포스페이트, 2'-O-메틸구아노신-3' -포스페이트, 및 2'-O-메틸우리딘-3' -포스페이트이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 각각 2' -플루오로아데노신-3' -포스페이트, 2' -플루오로시티딘-3' -포스페이트, 2' -플루오로구아노신-3' -포스페이트, 및 2' -플루오로우리딘-3' -포스페이트이고; (Tgn)은 티미딘-글리콜 핵산 (GNA) S-이성체이고; s는 포스포로티오에이트 링커이다.

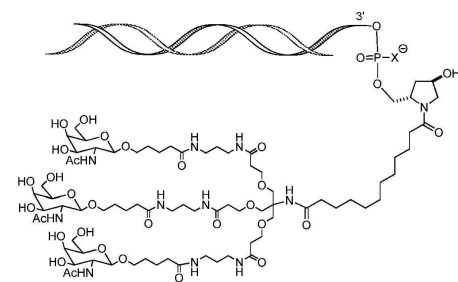
[0025] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제의 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다. 특정 구현예에서, 리간드는 2가 또는 3가 측쇄 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체이다. 특정 구현예에서, 리간드는

[0026]



[0027] 이다.

[0028] 특정 구현예에서, 리간드는 센스 가닥의 3' 말단에 부착된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 하기의 도식에 나타낸 바와 같이 리간드에 접합되고,



[0029] 여기서, X는 O 또는 S이다.

[0030] 특정 구현예에서, 센스 가닥은 길이가 21개 뉴클레오타이드이고, 안티센스 가닥은 길이가 23개 뉴클레오타이드이다.

[0031] 특정 구현예에서, 본 발명의 용도는 신경학적 손상, 삶의 질, 신경 손상, 심혈관 건강의 적어도 하나의 지표를 개선하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 평가된 지표는 예를 들어 신경병증 손상(NIS) 스코어 또는 변형된 NIS(mNIS+7) 스코어를 사용하는 신경학적 손상이다. 특정 구현예에서, 지표는 예를 들어, SF-36®건강 조사 스코어, 노퍽(Norfolk) 삶의 질-당뇨병성 신경병증(Norfolk QOL-DN) 스코어, NIS-W 스코어, Rasch-구축된 전체 불구 스케일(R-ODS) 스코어, 복합 자율신경계 증상 스코어(COMPASS-31), 메디안 체질량 지수(mBMI) 스코어, 6분 걷기 시험(6MWT) 스코어 및 10미터 걷기 시험 스코어를 사용하여 평가된 삶의 질 지표이다. 특정 구현예에서, 지표는 평가된 신경 손상, 예를 들어 신경필라멘트 경쇄(NfL), RSPO3, CCDC80, EDA2R, NT-proBNP, 및 N-CDase 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 수준의 변화, 예를 들어, 사람 혈액 샘플, 또는 그로부터 유래된 혈청

또는 혈장에서의 변화로 평가된 신경 손상이다. 특정 구현예에서, 신경 손상의 지표는 신경필라멘트 경쇄(NfL) 단백질 수준의 기준선으로부터의 변화이다. 특정 구현예에서, 심혈관 손상의 지표는 더 나은 건강 상태, 심장초음파 평가에 의한 평균 좌심실(LV) 벽 두께의 기준선으로부터의 변화, 심장초음파 평가에 의한 전체적인 종방향 긴장의 기준선으로부터의 변화, 및 N-말단 프로호르몬 B형 나트륨이뇨 펩타이드(NTproBNP)의 기준선으로부터의 변화를 나타내는 증가된 스코어와 함께 캔자스시티 심근병증 설문지 전체 요약(KCCQ-OS)을 사용한 심혈관 입원이다.

- [0032] 특정 구현예에서, 사람 대상체는 TTR 관련 질환, 예를 들어 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA), 전신성 가족성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP), 연수막/중추 신경계(CNS) 아밀로이드증, 및 고티록신혈증의 발병과 관련된 TTR 유전자 돌연변이를 보유한다.
- [0033] 특정 구현예에서, 사람 대상체는 트랜스티레틴-매개 아밀로이드증(ATTR 아밀로이드증)을 갖고 이중 가닥 RNAi 제제의 사용은 사람 대상체에서 아밀로이드 TTR 침착물을 감소시킨다. 특정 구현예에서, ATTR 아밀로이드증은 유전성 ATTR(h-ATTR) 아밀로이드증이다. 특정 구현예에서, ATTR 아밀로이드증은 비-유전성 ATTR(wt ATTR) 아밀로이드증이다.
- [0034] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 피하 또는 정맥내로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 피하 투여는 자가 투여이다. 특정 구현예에서, 자가-투여는 사전 충전된 주사기 또는 자동-주사기 장치를 통한다.
- [0035] 특정 구현예에서, 용도는 사람 혈액 샘플, 또는 이로부터 유래된 혈청 또는 혈장과 같은 사람 대상체로부터 유래된 샘플에서 TTR mRNA 발현 또는 TTR 단백질 발현의 수준을 평가하는 것을 추가로 포함한다.
- [0036] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 매달 1회, 격월 1회, 3개월마다 1회, 4개월마다 1회, 5개월마다 1회, 또는 6개월마다 1회 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 고정 용량의 이중 가닥 RNAi 제제는 사람 대상체에게 약 3개월마다 1회 투여된다. 특정 구현예에서, 고정 용량의 이중 가닥 RNAi 제제는 사람 대상체에게 약 6개월마다 1회 투여된다.
- [0037] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 사람 대상체에게 만성적으로 투여된다.
- [0038] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 분기별 약 1회 내지 연간 약 1회로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 분기별 약 1회, 약 6개월마다 1회, 또는 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.
- [0039] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg 내지 약 300 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg 내지 약 200 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 75 mg 내지 약 200 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 50 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 75 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 100 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 200 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg 내지 약 300 mg; 약 25 mg 내지 약 200 mg; 약 75 mg 내지 약 200 mg; 약 25 mg; 약 50 mg; 약 75 mg; 약 100 mg; 약 200mg; 또는 약 300 mg의 고정 용량으로 분기별 1회, 즉, 3개월 마다 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.
- [0040] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 400 mg 내지 약 600 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 400 mg 또는 약 600 mg의 고정 용량으로 6개월 마다 약 1회, 내지 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 400 mg 또는 약 600 mg의 고정 용량으로 6개월마다 약 1회, 또는 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.
- [0041] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 700 mg 내지 약 1000 mg 또는 약 700 mg 내지 약 900 mg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 700 mg, 약 800 mg, 약 900 mg 또는 약 1000 mg의 고정된 용량으로 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.
- [0042] 특정 구현예에서, 용도는 추가 치료학적 제제, 예를 들어, TTR 사량체 안정화제 또는 비스테로이드성 항염증제를 사람 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0043] 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 방법을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 이중 가닥 RNAi 제제; 및 사

용 설명서를 포함하는 표지를 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명은 추가로 하기의 상세한 설명 및 도면에 의해 추가로 설명된다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 0일에 지적된 이중 가닥 RNAi 제제의 단일 1 mg/kg 용량을 투여한 후 V30M 유전자전이 마우스(그룹당 n=3)에서 상대적인 혈청 TTR 단백질 수준을 도시하는 그래프이다.

도 2는 0일에 지적된 이중 가닥 RNAi 제제의 단일 1 mg/kg 용량 또는 3 mg/kg 용량을 투여한 후 시노몰구스 몽키 (그룹당 n=3)에서 상대적인 혈청 TTR 단백질 수준을 도시하는 그래프이다. 결과는 3개의 독립적인 연구로부터 기원한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 본 발명은 트랜스티레틴-(TTR-) 관련 질환의 진단 기준을 충족하지 못하는 사람 대상체에서 TTR 발현을 억제함을 포함하는 TTR의 발현을 억제하는 방법, 및 TTR 유전자를 표적화하는 이중 가닥 RNAi 제제를 사용하여 트랜스티레틴-(TTR-) 관련 질환을 갖는 사람 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 여기서, 상기 센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (서열번호 6)을 포함하고; 안티센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usCfsuugGf(Tgn)uAfcAugAfaAfucccasusc-3' (서열번호 7)을 포함한다.

[0047] 하기의 상세한 설명은 TTR 유전자의 발현을 선택적으로 억제하기 위한 RNAi 제제를 함유하는 조성물을 제조하고 사용하는 방법, 및 TTR 유전자의 발현의 억제 또는 감소가 이득이 되는 질환 및 장애를 갖는 대상체를 치료하기 위한 조성물, 용도 및 방법을 기재한다.

[0048] I. 정의

[0049] 본 발명이 보다 용이하게 이해될 수 있도록 하기 위해, 특정 용어를 먼저 정의한다. 또한, 파라미터의 값 또는 값의 범위가 인용될 때마다, 인용된 값의 중간 값 및 범위도 본 발명의 일부인 것으로 의도된다는 점에 유의해야 한다.

[0050] 단수형 관사 ("a" 및 "an")는 본원에서 하나 또는 하나 이상 (즉, 적어도 하나)의 해당 관사의 문법적 대상을 지칭하는데 사용된다. 예를 들어, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과 요소, 예를 들어, 다수의 요소를 의미한다.

[0051] 용어 "포함하는"은 문구 "을 포함하지만 이에 제한되지 않는"을 의미하기 위해 본원에 사용되고 이와 상호교환적으로 사용된다.

[0052] 용어 "또는"은 달리 명백하게 지적되지 않는 경우, 용어 "및/또는"을 의미하기 위해 본원에 사용되고 이와 상호교환적으로 사용된다.

[0053] 용어 "약"은 당업계의 전형적인 관용성 범위 내, 예를 들어 용량 사이 시간에서 허용 가능한 변동, 투여 단위 양의 허용 가능한 변동을 의미하는 데 사용된다. 예를 들어, "약"은 평균으로부터 약 2 표준 편차 이내로서 이해될 수 있다. 특정 구현예에서, 약은 +10%를 의미한다. 특정 구현예에서, 약은 +5%를 의미한다. 약이 일련의 숫자 또는 범위 앞에 존재하는 경우, "약"은 일련의 또는 범위내 숫자 각각을 수식할 수 있는 것으로 이해된다.

[0054] 숫자 또는 일련의 숫자 앞의 "적어도", "이상", 또는 "초과"라는 용어는 "적어도"라는 용어에 인접한 숫자와 문맥상 분명한 바와 같이 논리적으로 포함될 수 있는 모든 후속 숫자 또는 정수를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 핵산 분자 내 뉴클레오타이드의 수는 정수이어야 한다. 예를 들어, "21개 뉴클레오타이드 핵산 분자의 적어도 18개 뉴클레오타이드"는 18, 19, 20, 또는 21개 뉴클레오타이드가 지적된 성질을 가짐을 의미한다. 적어도가 일련의 숫자 또는 범위 앞에 존재하는 경우, "적어도"는 일련의 또는 범위내 숫자 각각을 수식할 수 있는 것으로 이해된다.

[0055] 본원에 사용된 바와 같은 "이하" 또는 "미만"은 구문에 인접한 값으로 이해되고, 문맥상 논리적으로 0까지 논리적으로 낮은 값 또는 정수로서 이해된다. 예를 들어, "2개 이하의 뉴클레오타이드"의 오버행을 갖는 듀플렉스는 2, 1, 또는 0개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖는다. "이하"가 일련의 숫자 또는 범위 앞에 존재하는 경우, "이하"는 일련의 또는 범위내 숫자 각각을 수식할 수 있는 것으로 이해된다.

- [0056] 본원에 사용된 바와 같이, 검출 방법은 존재하는 분석물의 양이 상기 방법의 검출 수준 미만인 결정을 포함할 수 있다.
- [0057] 본원에 사용된 바와 같은 “트랜스티레틴” (“TTR”)은 널리 공지된 유전자 및 단백질을 지칭한다. TTR은 또한 전구알부민, HsT2651, PALB, 및 TBPA로서 공지되어 있다. TTR은 레티놀 결합 단백질(RBP), 티록신(T4) 및 레티놀의 수송체로서 기능하고 이것은 또한 프로테아제로서 작용한다. 간은 TTR을 혈액으로 분비하고 맥락층은 TTR을 뇌척수액으로 분비한다. TTR은 또한 췌장 및 망막 색소 상피에서 발현된다. TTR의 가장 큰 임상적 관련성은 정상(야생형) 및 돌연변이 TTR 단백질 둘다가 아밀로이드 원섬유를 형성하여 세포의 침착물로 응집되어 아밀로이드증을 유발할 수 있다는 것이다. 예를 들어, 검토를 위해 문헌(Saraiva M.J.M. (2002) *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(12):1-11)을 참조한다. 래트 트랜스티레틴의 분자 클로닝 및 뉴클레오타이드 서열, 및 mRNA 발현의 분포는 문헌(참조: Dickson, P.W. et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260(13)8214-8219)에 기재되어 있다. 사람 TTR의 X-선 결정 구조는 문헌(참조: Blake, C.C. et al. (1974) *J Mol Biol* 88, 1-12)에 기재되어 있다. 사람 TTR mRNA 전사체의 서열은 센터(National Center for Biotechnology Information (NCBI) RefSeq 승인 번호 NM_000371 (예를 들어, 서열번호 1 및 5)에서 찾을 수 있다. 마우스 TTR mRNA의 서열은 RefSeq 승인 번호 Nn_013697.2에서 찾을 수 있고, 래트 TTR mRNA의 서열은 RefSeq 승인 번호 Nn_012681.1에서 찾을 수 있다. TTR mRNA 서열의 추가의 예는 대중에게 가용한 데이터베이스, 예를 들어, GenBank, UniProt, 및 OMIM을 사용하여 용이하게 가용하다.
- [0058] 본원에 사용된 바와 같은 “TTR 관련 질환”은 TTR 유전자 또는 단백질과 관련된 임의의 질환을 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 질환은 예를 들어 TTR 단백질의 과잉 생산, TTR 유전자 돌연변이, TTR 단백질의 비정상적인 절단, TTR 사량체의 불안정성, TTR과 다른 단백질 또는 기타 내인성 또는 외인성 물질 간의 비정상적인 상호작용에 의해 유발될 수 있다. “TTR 관련 질환”은 TTR이 비정상적인 세포의 응집체 또는 아밀로이드 침착물의 형성에 역할을 하는 임의의 유형의 트랜스티레틴 매개 아밀로이드증(ATTR 아밀로이드증), 예를 들어 유전성 ATTR(h-ATTR) 아밀로이드증 또는 비-유전성 ATTR(ATTR) 아밀로이드증을 포함한다. TTR 관련 질환은 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA), 전신성 가족성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP), 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC), 연수막/중추신경계(CNS) 아밀로이드증, 아밀로이드성 유리체 혼탁, 수근관 증후군 및 고티록신혈증을 포함한다. TTR 아밀로이드증의 증상은 감각 신경병증(예를 들어, 감각 이상, 말단 사지의 감각 감퇴), 자율 신경병증(예를 들어, 위궤양 또는 기립성 저혈압과 같은 위장 기능부전), 운동 신경병증, 발작, 치매, 골수병증, 다발신경병증, 수근관 증후군, 자율신경 부전, 심근병증, 유리체 혼탁, 신부전, 신장병증, 실질적으로 감소된 mBMI(변형된 체질량 지수), 뇌신경 기능부전 및 각막 격자 이영양증을 포함한다.
- [0059] 본원에 사용된 용어 “서열을 포함하는 가닥”은 표준 뉴클레오타이드 명명법을 사용하여 언급된 서열에 의해 기재된 뉴클레오타이드 쌍을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0060] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 “iRNA”, “RNAi 제제”, “iRNA 제제”, “RNA 간섭 제제”라는 용어는 본원에 정의된 바와 같은 RNA를 함유하고 RNA 유도된 사일런싱 복합체(RISC) 경로를 통한 RNA 전사체의 표적화된 절단을 매개하는 제제를 지칭한다. iRNA는 RNA 간섭 (RNAi)으로서 공지된 공정을 통해 mRNA의 서열 특이적 분해를 지시한다. iRNA는 예를 들어, 세포에서, 예를 들어, 포유동물 대상체와 같은 대상체 내 세포에서 TTR 유전자의 발현을 조절, 예를 들어, 억제한다.
- [0061] 본원에 사용된 바와 같은, 본 발명의 조성물, 용도 및 방법에 사용하기 위한 “iRNA”는 이중 가닥 RNA이고 본원에서 “이중 가닥 RNA 제제”, “이중 가닥 RNA(dsRNA) 분자”, “dsRNA 제제” 또는 “dsRNA”로서 지칭된다. 용어 “dsRNA”는 표적 RNA, 즉, TTR 유전자에 대해 “센스” 및 “안티센스” 배향을 갖는 것으로 지칭되는 2개의 역평행 및 실질적으로 상보적인 핵산 가닥을 포함하는 듀플렉스 구조를 갖는 리보핵산 분자의 복합체를 지칭한다. 이중 가닥 RNAi 제제는 본원에서 RNA 간섭 또는 RNAi로 지칭되는 전사후 유전자 사일런싱 기전을 통해 표적 RNA, 예를 들어 mRNA의 분해를 촉발한다.
- [0062] 본원에 사용된 용어 “변형된 뉴클레오타이드”는 독립적으로 변형된 당 모이어티, 변형된 뉴클레오타이드 간 연결, 또는 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 따라서, 용어 변형된 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 간 연결, 당 모이어티 또는 뉴클레오타이드에 대한 예를 들어 기능성 그룹 또는 원자의 치환, 추가 또는 제거를 포함한다. 본 발명의 제제에 사용하기에 적합한 변형은 본원에 기재되거나 당업계에 공지된 모든 유형의 변형을 포함한다. siRNA 유형의 분자에 사용된 바와 같은 임의의 상기 변형은 본원 명세서 및 청구범위의 목적을 위해 “RNAi 제제”에 의해 포괄된다.
- [0063] 듀플렉스 영역은 RISC 경로를 통해 표적하는 표적 RNA의 특이적 분해를 허용하는 임의의 길이일 수 있고, 길이

는 약 21 내지 36개 염기쌍, 예를 들어 약 21-30개 염기쌍, 예를 들어 약 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, 또는 21-22개 염기쌍 길이의 범위일 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNAi 제제는 dsRNA 제제이고, 이의 각각의 가닥은 21-23개 뉴클레오타이드를 포함하고, 이는 TTR mRNA 서열과 상호작용하여 표적 mRNA의 절단을 지시한다. 이론에 얽매이고자 하는 것 없이 세포 내로 도입된 긴 이중 가닥 RNA는 다이서(Dicer)로 공지된 III형 엔도뉴클레아제에 의해 siRNA로 분해된다(문헌참조: Sharp et al.(2001) *Genes Dev.*15:485). 리보뉴클레아제 III형 효소인 다이서는 dsRNA를 특징적인 2개의 염기 3' 오버행을 갖는 19-23개 염기쌍의 짧은 간섭 RNA로 가공한다(문헌참조: Bernstein, et al.,(2001) *Nature* 409:363). 이어서 siRNA는 하나 이상의 헬리카제가 siRNA 듀플렉스를 푸는 RNA 유도된 사일런싱 복합체(RISC)에 통합되어 상보적 안티센스 가닥이 표적 인지를 안내할 수 있게 한다(문헌참조: Nykanen, et al.,(2001) *Cell* 107:309). 적절한 표적 mRNA에 결합하면 RISC 내의 하나 이상의 엔도뉴클레아제는 표적을 절단하여 사일런싱을 유도한다(문헌참조: Elbashir, et al.,(2001) *Genes Dev.*15:188). 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNAi 제제는 24-30개 뉴클레오타이드의 dsRNA이고 이는 TTR mRNA 서열과 상호작용하여 표적 RNA의 절단을 지시한다.

[0064] 본원에 사용된 용어 "뉴클레오타이드 오버행"은 iRNA의 듀플렉스 구조, 예를 들어, dsRNA로부터 돌출된 적어도 하나의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드를 지칭한다. 예를 들어, dsRNA의 한 가닥의 3'-말단이 다른 가닥의 5'-말단을 넘어 확장되거나 그 반대의 경우 뉴클레오타이드 오버행이 있다. dsRNA는 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 오버행을 포함할 수 있고; 대안적으로 오버행은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 적어도 3개의 뉴클레오타이드, 적어도 4개의 뉴클레오타이드, 적어도 5개의 뉴클레오타이드 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 오버행은 테옥시뉴클레오타이드/뉴클레오사이드를 포함하는 뉴클레오타이드/뉴클레오사이드 유사체를 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 오버행(들)은 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 이들의 임의의 조합 상에 있을 수 있다. 또한, 오버행의 뉴클레오타이드(들)는 dsRNA의 안티센스 또는 센스 가닥의 5'-말단, 3'-말단 또는 양쪽 말단 상에 존재할 수 있다. dsRNA의 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 1개 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함한다. 다른 구현예에서, RNAi 제제의 적어도 하나의 가닥은 적어도 1개 뉴클레오타이드의 5' 오버행을 포함한다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 2개 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개 뉴클레오타이드의 5' 오버행을 포함한다. 여전히 다른 구현예에서, RNAi 제제의 하나의 가닥의 3' 및 5' 말단 둘다 적어도 1개 뉴클레오타이드의 오버행을 포함한다.

[0065] 하나의 구현예에서, dsRNA의 안티센스 가닥은 3' -말단 또는 5' -말단에 1-9개 뉴클레오타이드, 예를 들어, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-9, 5-9개, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개 뉴클레오타이드 오버행을 갖는다. 하나의 구현예에서, dsRNA의 센스 가닥은 3' -말단 또는 5' -말단에 1-9개 뉴클레오타이드, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개 뉴클레오타이드를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 상기 오버행에서 하나 이상의 뉴클레오타이드는 뉴클레오사이드 티오포스페이트로 대체된다.

[0066] "평활(blunt)" 또는 "평활 말단(blunt end)"은 이중 가닥 RNAi 제제의 말단에 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드가 없고, 즉 뉴클레오타이드 오버행이 없음을 의미한다. "평활 말단화된" RNAi 제제는 이의 전체 길이 상에서 이중 가닥이고, 즉 분자의 어느 한 말단에서도 뉴클레오타이드 오버행이 없는 dsRNA이다. 본 발명의 RNAi 제제는 한 말단에 뉴클레오타이드 오버행을 갖는 RNAi 제제(즉, 하나의 오버행 및 하나의 평활 말단을 갖는 제제) 또는 양 말단에 뉴클레오타이드 오버행을 갖는 RNAi 제제를 포함한다.

[0067] 용어 "안티센스 가닥" 또는 "가이드 가닥"은 표적 서열, 예를 들어, TTR mRNA에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 iRNA, 예를 들어, dsRNA의 가닥을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "상보성 영역"은 본원에 정의된 바와 같은 서열, 예를 들어 표적 서열, 예를 들어, TTR 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 안티센스 가닥 상의 영역을 지칭한다. 상보성 영역이 표적 서열에 완전히 상보적이지 않은 경우, 미스매치는 분자의 내부 또는 말단 영역에 있을 수 있다. 일반적으로 가장 허용되는 미스매치는 말단 영역, 예를 들어 iRNA의 5'- 또는 3'-말단의 5, 4, 3, 2 또는 1개 뉴클레오타이드 내에 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 제제는 안티센스 가닥 내에 뉴클레오타이드 미스매치를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 제제는 센스 가닥 내에 뉴클레오타이드 미스매치를 포함한다. 하나의 구현예에서, 뉴클레오타이드 미스매치는 예를 들어 iRNA의 3'-말단으로부터 5, 4, 3, 2 또는 1개의 뉴클레오타이드 내에 있다. 또 다른 구현예에서, 뉴클레오타이드 미스매치는 예를 들어, iRNA의 3' -말단 뉴클레오타이드 내에 있다.

[0068] 본원에 사용된 용어 "센스 가닥" 또는 "패신저 가닥"은 용어가 본원에 정의된 바와 같은 안티센스 가닥의 영역

에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 iRNA의 가닥을 지칭한다.

- [0069] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "절단 영역"은 절단 부위에 바로 인접하여 위치하는 영역을 지칭한다. 절단 부위는 절단이 일어나는 표적 상의 부위이다. 일부 구현예에서, 절단 영역은 절단 부위의 어느 하나의 말단 상에 및 이에 바로 인접하여 3개의 염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단 영역은 절단 부위의 어느 하나의 말단 상에 및 이에 바로 인접하여 2개의 염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단 부위는 구체적으로 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 10 및 11에 의해 결합된 부위에 존재하고, 절단 영역은 뉴클레오타이드 11, 12 및 13을 포함한다.
- [0070] 본원에 사용된 바와 같이, 달리 지적되지 않는 경우, 용어 "상보성"은 제2 뉴클레오타이드 서열과 관련하여 제1 뉴클레오타이드 서열을 기재하기 위해 사용되는 경우, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 특정 조건하에서 하이브리드화하여 듀플렉스 구조를 형성하는 능력을 지칭한다. 상기 조건은 예를 들어, "엄중 조건"일 수 있고, 여기서, 엄중 조건은 다음을 포함할 수 있다: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA, 12 내지 16시간 동안 50℃ 또는 70℃, 이어서 세척(문헌참조: 예를 들어, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). 유기체 내부에서 접할 수 있는 바와 같은 생리학적 관련 조건과 같은 다른 조건을 적용할 수 있다. 당업자는 하이브리드화된 뉴클레오타이드의 궁극적인 적용에 따라 2개의 서열의 상보성 시험에 가장 적합한 조건 세트를 결정할 수 있을 것이다.
- [0071] iRNA 내, 예를 들어, 본원에 기재된 dsRNA 내 상보성 서열은 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 하나 또는 둘다의 뉴클레오타이드 서열의 전체 길이에 걸쳐 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 염기쌍 형성을 포함한다. 상기 서열은 본원에서 서로에 대해 "완전한 상보성"으로서 언급될 수 있다. 그러나, 제1 서열이 본원의 제2 서열과 관련하여 "실질적으로 상보성"으로서 언급되는 경우, 2개의 서열은 완전히 상보성일 수 있거나, 이들은 30개 이하의 염기쌍의 듀플렉스에 대한 하이브리드화 시 하나 이상, 그러나 일반적으로 5, 4, 3, 또는 2개 이하의 미스매칭된 염기쌍을 형성할 수 있고, 이들의 궁극적인 적용, 예를 들어, 시험관내 또는 생체내 유전자 발현의 억제와 가장 관련된 조건하에서 하이브리드화하는 능력을 보유한다. 그러나, 2개의 올리고뉴클레오타이드가 하이브리드화 시 하나 이상의 단일 가닥 오버행을 형성하도록 디자인된 경우, 상기 오버행은 상보성 결정과 관련하여 미스매치로서 간주되지 않는다. 예를 들어, 보다 긴 올리고뉴클레오타이드가 보다 짧은 올리고뉴클레오타이드에 완전히 상보적인 21개 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는, 길이가 21개 뉴클레오타이드인 하나의 올리고뉴클레오타이드 및 길이가 23개 뉴클레오타이드인 또 다른 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 dsRNA는 본원에 기재된 목적을 위해 "완전히 상보성"으로서 여전히 언급될 수 있다.
- [0072] 본원에 사용된 바와 같은 "상보성" 서열은 또한 하이브리드화하는 이들의 능력과 관련하여 상기 요건이 충족되는 한, 비-왓슨-클릭 염기쌍 또는 비-천연 및 변형된 뉴클레오타이드로부터 형성된 염기쌍을 포함하거나 이들로부터 전적으로 형성될 수 있다. 상기 비-왓슨-클릭 염기쌍은 G:U 위블 또는 후그슈타인 염기쌍 형성을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0073] 본원에서 용어 "상보성", "완전히 상보성" 및 "실질적으로 상보성"은 dsRNA의 센스 가닥과 안티센스 가닥 간의 염기 매칭 또는 이들의 사용과 관련된 내용으로부터 이해되는 바와 같이 iRNA 체제의 안티센스 가닥과 표적 서열과 같은 2개의 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 간의 염기 매칭과 관련하여 사용될 수 있다.
- [0074] 본원에 사용된 바와 같은, 전령 RNA (mRNA)의 "적어도 일부와 실질적으로 상보성"인 폴리뉴클레오타이드는 관심 대상의 mRNA (예를 들어, TTR 유전자를 암호화하는 mRNA)의 연속 부분에 실질적으로 상보성인 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 서열이 실질적으로 TTR 유전자를 암호화하는 mRNA의 비-중단 부분에 실질적으로 상보성인 경우 TTR mRNA의 적어도 일부에 상보성이다.
- [0075] 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 안티센스 폴리뉴클레오타이드는 표적 TTR 서열에 완전히 상보성이다. 다른 구현예에서, 본원에 기재된 안티센스 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 8 (5' - UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')에 완전히 상보성이다. 하나의 구현예에서, 안티센스 폴리뉴클레오타이드 서열은 5' - UCUUGGUACAUGAAUCCCAUC -3' (서열번호 9)이고, 여기서, 안티센스 가닥의 위치 7에서 U는 T일 수 있다.
- [0076] 본원에 사용된 "참조 수준"은 검정에서 수득된 수준, 예를 들어, 바이오마커 수준, 예를 들어, 단백질 바이오마커 수준이 비교되는 미리 결정된 수준으로 이해된다. 특정 구현예에서, 참조 수준은 건강한 집단, 예를 들어,

바이오마커의 변경된 수준과 관련된 질병 또는 병태를 갖지 않고 소인, 예를 들어, 변화된 수준의 바이오마커와 관련된 질병 또는 병태에 대한 유전적 소인을 갖지 않는 집단에 대해 결정된 대조군 수준일 수 있다. 특정 구현예에서, 집단은 특정 기준, 예를 들어 연령, 성별에 대해 매칭되어야 한다. 특정 구현예에서, 바이오마커의 참조 수준은 더 이른 시간, 예를 들어, 증후성 질환의 발병 전 또는 치료 시작 전의 동일한 대상체로부터의 수준이다. 전형적으로, 샘플은 임상적으로 관련된 간격, 예를 들어 바이오마커의 변화가 관찰될 수 있는 시간상 충분히 분리된 간격, 예를 들어, 적어도 3개월 간격, 적어도 6개월 간격, 또는 적어도 9개월 간격에서 획득된다. 시간이 경과함에 따라 대상체로부터 2개 초과 샘플이 획득되는 경우, 이전 샘플 중 어느 하나가 참조 수준으로 작용할 수 있는 것으로 이해된다.

[0077] 본원에 사용된 바와 같이, "참조 수준과 비교한 변화" 등은 바이오마커 수준의 통계적으로 또는 임상적으로 유의적인 변화, 예를 들어 참조 수준과 비교하여 단백질 바이오마커 수준의 변화가 검정 방법의 전형적인 표준 편차보다 더 큰 것으로 이해된다. 더욱이 상기 변화는 임상적으로 관련되어야만 한다. 참조 수준과 비교되는 상기 변화는 퍼센트 변화로서 결정될 수 있다. 예를 들어, 참조 수준이 바이오마커 X에 대해 100 pg/ml이고 대상체에서 바이오마커 X의 수준이 150 pg/ml인 경우, 상기 수준은 $((150 \text{ pg/ml} - 100 \text{ pg/ml}) / 100 \text{ pg/ml}) \times 100\% = 50\%$ 에 의해 계산되는 50%까지 증가된다. 상기 대상체에서 바이오마커 X의 수준이 300 pg/ml인 경우, 상기 수준은 300%까지 증가된다. 상기 대상체에서 바이오마커 X의 수준이 50 pg/ml인 경우, 상기 수준은 50%까지 감소된다. 특정 구현예에서, 참조 수준과 비교하여 상기 변화는 적어도 50%까지 증가된다. 특정 구현예에서, 참조 수준과 비교하여 상기 변화는 적어도 100%, 적어도 200% 또는 적어도 300%까지 증가된다. 특정 구현예에서, 참조 샘플과 비교하여 상기 변화는 적어도 25%까지 감소된다. 특정 구현예에서, 참조 샘플과 비교하여 상기 변화는 적어도 50%까지 감소된다.

[0078] 본원에 사용된 "대상체로부터의 생물학적 샘플" 또는 "대상체로부터의 샘플"은 대상체로부터 분리된 하나 이상의 체액, 세포 또는 조직을 포함한다. 생물학적 체액의 예는 혈액, 혈청 및 장액, 혈장, 뇌척수액, 안액, 림프, 소변, 타액 등을 포함한다. 조직 샘플은 조직, 기관 또는 국소 영역으로부터의 샘플을 포함할 수 있다. 예를 들어, 샘플은 특정 기관, 기관의 일부 또는 해당 기관 내의 체액이나 세포로부터 유래할 수 있다. 특정 구현예에서, 샘플은 간 조직일 수 있거나 간으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, "대상체로부터의 생물학적 샘플"은 대상체로부터의 혈액 또는 혈액 유래된 혈청 또는 혈장을 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 체액은 세포가 실질적으로 없고, 예를 들어 세포가 없다.

[0079] 본원에 사용된 바와 같이, "임상적으로 관련된 차이"는 평가에 대한 전형적인 관찰자간 변동보다 적어도 더 큰 차이로 이해되고, 여기서 상기 관찰자는 동일한 개체가 거의 동시에, 예를 들어, 연속된 날과 같이 일주일 이내에 동일한 평가를 수행하는 숙련된 의료 전문가, 간병인 또는 환자일 수 있다. 특정 환자 관찰은 주관적이고, 짧은 시간 프레임 내에 다른 관찰자가 수행할 때 거의 동일해야 하는 것(예를 들어, 체중, 심박수)으로 이해된다. mNIS+7의 일부 양상(예를 들어, 터치 압력, 진동, 관절 위치 및 동작에 대한 반응) 및 노퍽(Norfolk)-삶의 질(예를 들어, 통증 수준, 뜨겁거나 차가운 손과 발, 서 있는 동안의 안정성)과 같은 기타 정성적 측정은 매일 그리고 관찰자마다 다양할 수 있다. 따라서 혼성 스코어는 관찰을 집계하는 데 사용되고, 관찰자 간의 더 큰 변동은 임상적으로 관련된 변화의 임의의 징후 없이 예상된다. 바이오마커 수준에 대한 검정은 샘플 내 및 샘플 간의 변동의 공지된 수준을 갖는다. 임상적으로 관련된 차이의 결정은 당업자, 예를 들어 TTR 관련 질환을 갖는 환자를 치료한 경험이 있는 건강 의료 전문가, 임상 실험실 전문가의 능력 범위 내에 있다.

[0080] 본원에 사용된 "만성적으로 투여되는"은 무기한 간격 동안, 예를 들어, 간 이식까지의 대상체의 남은 생애 동안 투여로서 이해된다.

[0081] 본원에 사용된 바와 같은 "TTR을 안정화하는 치료학적 제제" 또는 "TTR 사량체를 안정화하는 치료학적 제제"는 TTR 사량체의 서브유닛의 해리, 예를 들어, 단량체로의 해리를 감소시키거나 방지하는 제제이다. 일부 구현예에서, 제제는 예를 들어 TTR 아밀로이드 플라크를 형성하는 TTR 단량체 또는 TTR 단량체의 단백질용해 단편의 수준을 감소시킴으로써 TTR 아밀로이드 플라크의 형성을 감소시킨다. 상기 제제는 타파미디스, 디플루니살 및 Ag10을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0082] 본원에 사용된 용어 "치료학적 제제의 투여"는 대상체에게 치료학적 제제를 제공하는 것으로서 이해된다. 구현예에서, 치료학적 제제는, 예를 들어 치료학적 제제의 표지에 의해 제공된 바와 같은 제제에 대한 적절한 용량에서 및 투여 경로에 의해 제공된다.

[0083] **II. TTR 관련 질환을 표적화하기 위한 방법**

- [0084] 본 발명은 이중 가닥 RNAi 제제 및 이중 가닥 RNAi 제제 및 사람 대상체에서 TTR 관련 질환, 예를 들어 트랜스티레틴-매개 아밀로이드증(ATTR 아밀로이드증), 예를 들어 유전성 ATTR(h-ATTR) 아밀로이드증 또는 비-유전성 ATTR(wt ATTR) 아밀로이드증을 치료하기 위한; 또는 TTR 관련 질환의 진단 기준을 아직 충족하지 않지만 TTR 관련 질환이 발병할 위험에 처한 대상체, 예를 들어 TTR 아밀로이드증과 관련된 TTR 돌연변이를 갖는 대상체, TTR 아밀로이드증의 진단 기준을 아직 충족하지 않는 TTR 아밀로이드증의 일부 징후를 갖는 대상체, TTR 아밀로이드증과 관련된 변경된 바이오마커 수준을 갖는 대상체에서 TTR의 발현을 억제하기 위한 방법에서 이들의 용도를 제공한다. 방법은 본 발명의 치료학적 유효량의 RNAi 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0085] 하나의 양상에서, 본 발명은 TTR 관련 질환을 앓고 있거나 TTR 관련 질환이 발병할 위험에 처한 사람 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 방법은 약 25 mg 내지 약 1000 mg의 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제를 사람 대상체에게 투여함을 포함하고, 여기서, 센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' - usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (서열번호 6)를 포함하고; 안티센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' - usCfsuugGf(Tgn)uAfcAugAfaAfucccasusc-3' (서열번호 7)을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 각각 2'-O-메틸아데노신-3' -포스페이트, 2'-O-메틸시티딘-3' -포스페이트, 2'-O-메틸구아노신-3' -포스페이트, 및 2'-O-메틸우리딘-3' -포스페이트이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 각각 2' -플루오로아데노신-3' -포스페이트, 2' -플루오로시티딘-3' -포스페이트, 2' -플루오로구아노신-3' -포스페이트, 및 2' -플루오로우리딘-3' -포스페이트이고; (Tgn)은 티미딘-글리콜 핵산 (GNA) S-이성체이고; s는 포스포로티오에이트 링커이다.
- [0086] 또 다른 양상에서, 본 발명은 TTR 관련 질환을 앓고 있거나 TTR 관련 질환이 발병할 위험에 처한 사람 대상체에서 신경학적 손상 또는 삶의 질의 질의 적어도 하나의 지표를 개선시키는 방법을 제공한다. 방법은 약 25 mg 내지 약 1000 mg의 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제를 사람 대상체에게 투여함을 포함하고, 여기서, 상기 센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (서열번호 6)를 포함하고; 상기 안티센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usCfsuugGf(Tgn)uAfcAugAfaAfucccasusc-3' (서열번호 7)를 포함한다.
- [0087] 또 다른 측면에서, 본 발명은 TTR 관련 질환을 앓고 있거나 TTR 관련 질환을 발병할 위험에 처한 사람 대상에서 신경병증 손상 스코어(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소, 감속 또는 정지시키는 방법을 제공한다. 방법은 약 25 mg 내지 약 1000 mg의 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제를 사람 대상체에게 투여함을 포함하고, 여기서, 상기 센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (서열번호 6)를 포함하고; 상기 안티센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usCfsuugGf(Tgn)uAfcAugAfaAfucccasusc-3' (서열번호 7)를 포함한다.
- [0088] 또 다른 양상에서, 본 발명은 TTR 관련 질환을 앓고 있거나 TTR 관련 질환이 발병할 위험에 처한 사람 대상체에서 6분 걷기 시험 (6MWT)을 증가시키는 방법을 제공한다. 방법은 약 25 mg 내지 약 1000 mg의 고정된 용량의 이중 가닥 RNAi 제제를 사람 대상체에게 투여함을 포함하고, 여기서, 상기 센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (서열번호 6)를 포함하고; 상기 안티센스 가닥은 변형된 뉴클레오타이드 서열 5' -usCfsuugGf(Tgn)uAfcAugAfaAfucccasusc-3' (서열번호 7)를 포함한다.
- [0089] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 분기별 약 1회 내지 연간 약 1회로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 분기별 약 1회, 약 6개월마다 1회, 또는 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.
- [0090] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg 내지 약 300 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg 내지 약 200 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 75 mg 내지 약 200 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 50 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 75 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 100 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 200 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg 내지 약 300 mg; 약 25 mg 내지 약 200 mg; 약 50 mg 내지 약 300 mg; 약 25 mg; 약 50 mg; 약 100 mg; 약 200mg; 또는 약 300 mg의 고정 용량으로 분기별 1회, 즉, 3개월 마다 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.
- [0091] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 400 mg 내지 약 600 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 400 mg 또는 약 600 mg의 고정 용량으로 6개월 마다 약

1회, 내지 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 400 mg 또는 약 600 mg의 고정 용량으로 6개월마다 약 1회, 또는 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.

[0092] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 700 mg 내지 약 1000 mg 또는 약 700 mg 내지 약 900 mg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 700 mg, 약 800 mg, 약 900 mg 또는 약 1000 mg의 고정된 용량으로 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.

[0093] 하나의 구현예에서, 대상체는 TTR 유전자 발현의 감소가 이득이 되는 질환, 장애 또는 병태에 대해 치료되거나 평가되는 사람이고; TTR 유전자 발현의 감소가 이득이 되는 질환, 장애 또는 병태에 대한 위험이 있는 사람, 예를 들어 TTR 관련 질병의 진단 기준을 충족하지 않지만 TTR 관련 질환의 적어도 하나의 징후 또는 증상을 나타내거나 TTR 관련 질환의 적어도 하나의 위험 인자를 갖는 사람; TTR 유전자 발현의 감소가 이득이 되는 질환, 장애 또는 병태를 갖는 사람; 또는 본원에 기재된 바와 같이 TTR 유전자 발현의 감소가 이득이 되는 질환, 장애 또는 병태에 대해 치료받는 사람이다.

[0094] 일부 구현예에서, 사람 대상체는 TTR-관련 질환을 앓고 있다. 다른 구현예에서, 대상체는 TTR 관련 질환의 발병 위험에 처한 대상체, 예를 들어, TTR 관련 질병의 발병과 관련된 TTR 유전자 돌연변이를 갖는 대상체, TTR 관련 질환의 가족력이 있는 대상체 또는 TTR 관련 질환에 대한 진단 기준을 충족시키지 않으면서 TTR 관련 질환의 발병을 암시하는 징후 또는 증상을 갖는 대상체이다.

[0095] 본원에 사용된 "TTR 관련 질환"은 원섬유 전구체가 변이체 또는 야생형 TTR 단백질로 이루어진 아밀로이드 침착물의 형성에 의해 야기되거나 이와 관련된 임의의 질환을 포함한다. 돌연변이 및 야생형 TTR은 다양한 형태의 아밀로이드 침착(아밀로이드증)을 유발한다. 아밀로이드증은 잘못 폴딩된 단백질의 형성 및 응집을 수반하여 장기 기능을 손상시키는 세포와 침착물을 초래한다. TTR 응집과 관련된 임상적 증상은 예를 들어, 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA); 전신성 가족성 아밀로이드증; 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP); 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC); 및 연수막 또는 수막뇌혈관성 아밀로이드증, 중추신경계(CNS) 아밀로이드증 또는 아밀로이드증 VII 형태로도 공지된 연수막 아밀로이드증을 포함한다.

[0096] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNAi 제제는 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC)을 앓고 있는 대상체에게 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNAi 제제는 혼합 표현형을 갖는 FAC를 앓고 있는 대상체, 즉 심장 및 신경계 손상 둘 다를 갖는 대상체에게 투여된다. 여전히 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNAi 제제는 혼합 표현형을 갖는 FAP를 앓고 있는 대상체, 즉 신경계 및 심장 손상 둘 다를 갖는 대상체에게 투여된다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNAi 제제는 동소 간 이식(OLT(orthotopic liver transplantation))으로 치료된 FAP를 앓고 있는 대상체에게 투여된다.

[0097] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNAi 제제는 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA)을 앓고 있는 대상체에게 투여된다. 본 발명의 방법의 다른 구체예에서, 본 발명의 RNAi 제제는 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC) 및 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA)을 앓고 있는 대상체에게 투여된다. 정상 서열 TTR은 노인의 심장 아밀로이드증을 유발하고, 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA)(노인성 심장 아밀로이드증(SCA) 또는 심장 아밀로이드증이라고도 함)이라고 호칭된다. SSA는 흔히 다른 많은 기관에 미세한 침착물을 동반한다. TTR 돌연변이는 TTR 아밀로이드 형성 과정을 촉진시키고 임상적으로 유의적인 TTR 아밀로이드증(또한 ATTR (아밀로이드증 트랜스티레틴 유형)으로 호칭됨)의 발병에 대해 가장 중요한 위험 인자이다. 85개 초과 아밀로이드 생성 TTR 변이체는 전신 가족성 아밀로이드증을 유발하는 것으로 공지되어 있다.

[0098] 본 발명의 방법의 일부 구현예에서, 본 발명의 RNAi 제제는 트랜스티레틴(TTR) 관련 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP)을 앓고 있는 대상체에게 투여된다. 이러한 대상체는 유리체 혼탁 및 녹내장과 같은 안구 징후를 앓을 수 있다. 망막 색소 상피(RPE)에 의해 합성된 아밀로이드 생성 트랜스티레틴(ATTR)이 안구 아밀로이드증의 진행에서 중요한 역할을 한다는 것은 당업자에게 알려져 있다. 이전 연구에 따르면 RPE 세포를 감소시키는 범망막 레이저 광응고가 유리체에서 아밀로이드 침착의 진행을 방지하여 RPE에서 ATTR 발현의 효과적인 억제에 안구 아밀로이드증에 대한 새로운 치료요법이 될 수 있음을 보여주었다(문헌참조: 예를 들어, Kawaji, T., et al., Ophthalmology. (2010) 117: 552-555). 또 다른 TTR 관련 질환은 "이상트랜스티레틴혈증성 고티록신혈증" 또는 "이상전구알부민혈증성 고티록신혈증"로도 알려진 고티록신혈증이다. 이러한 유형의 고티록신혈증은 티록신에 대한 친화도가 증가된 돌연변이체 TTR 분자로 인해 티록신과 TTR의 증가된 연관성에 이차적일 수 있다. 예를 들어, 문헌(Moses et al.(1982)*J.Clin.Invest.*, 86, 2025-2033)을 참조한다.

[0099] 본 발명의 RNAi 제제는 피하, 정맥내 및 근육내 주사, 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는

당업계에 공지된 임의의 투여 방식을 사용하여 대상체에게 투여될 수 있다.

[0100]

일부 구현예에서, 제제는 피하로 대상체에게 투여된다.

[0101]

일부 구현예에서, 대상체는 피하 주사, 예를 들어 복부, 대퇴부 또는 상완 주사를 통해 단일 용량의 RNAi 제제를 투여받는다. 다른 구현예에서, 대상체는 피하 주사를 통해 분할 용량의 RNAi 제제를 투여받는다. 하나의 구현예에서, 분할 용량의 RNAi 제제는 대상체 상의 2개의 상이한 해부학적 위치에서 피하 주사를 통해 대상체에게 투여된다. 예를 들어, 대상체는 25 mg 내지 1000 mg의 용량으로 피하로 주사될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 피하 투여는 예를 들어 미리 충전된 주사기 또는 자동주사 주사기를 통한 자가 투여이다. 일부 구현예에서, 피하 투여를 위한 RNAi 제제의 용량은 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체의 1 ml 이하의 용적에 함유된다. 일부 구현예에서, RNAi 제제는 비-발열성 제형 중에 있다.

[0102]

일부 구현예에서, RNAi 제제는 대상체 내의 세포에서 TTR 발현을 억제하기에 효과적인 양으로 대상체에게 투여된다. 대상체 내 세포에서 TTR 발현을 억제하는 데 효과적인 양은 TTR mRNA, TTR 단백질, 또는 아밀로이드 침착물과 같은 관련 변수의 억제를 포함하는 방법을 포함하는 하기 논의된 방법을 사용하여 평가할 수 있다.

[0103]

일부 구현예에서, RNAi 제제는 치료학적 유효량으로 대상체에게 투여된다.

[0104]

본원에 사용된 "치료학적 유효량"은 TTR 관련 질환을 치료하기 위해 환자에게 투여될 때 질환의 치료에 영향을 미치기에 충분한 RNAi 제제의 양을 포함하는 것으로 의도된다(예를 들어, 적당한 대조군과 비교하여 기존의 질환의 진행을 감소시키거나, 유지하거나, 감속시키거나; 적절한 대조군과 비교하여 질환의 하나 이상의 증상을 감소시키거나, 유지하거나 감속시킴에 의해). "치료학적 유효량"은 RNAi 제제, 제제가 투여되는 방식, 질환 및 이의 중증도 및 병력, 연령, 체중, 가족력, 유전학적 구성, TTR 발현에 의해 매개되는 병리학적 과정의 단계, 경우에 따라 선행 또는 병용 치료의 유형 및 치료될 환자의 기타 개별적인 특징에 의존하여 다양할 수 있다. TTR 아밀로이드증, 다발신경병증 및 심근병증에 대한 진단 기준은 하기에서 추가로 논의된다.

[0105]

본원에 사용된 바와 같은 "치료학적 유효량"은 TTR 관련 질환의 진단 기준을 아직 충족하지 않는 대상체, 예를 들어, hTTR 아밀로이드증 다발신경병증으로 진단되지 않은 대상체; 단계 1 FAP의 진단 기준을 충족하지 않지만 상기 질환에 걸리기 쉬운 대상체, 예를 들어, TTR 아밀로이드증과 관련된 TTR 돌연변이가 있는 대상체, 기립성 저혈압, 심부전, 심장 부정맥, 좌심실 벽 두께, 심실 중격 벽 두께, 심장 후벽 두께 설사, 변비, 발기 부전, 녹내장, 유리체내 침착, 가리비 동공; 수근관 증후군, 요추 척추관 협착증 및 이두박근 건 과열; 기준 샘플과 비교하여 상승된 신경섬유 경쇄(NfL) 수준, 예를 들어, 혈청 내 적어도 37 pg/ml의 NfL 수준을 갖는 대상체에 투여되는 경우 질환 또는 질환의 하나 이상의 증상을 예방하거나 개선하기에 충분한, RNAi 제제의 양을 포함하는 것으로 의도된다. 개선될 수 있는 증상은 감각 신경병증(예를 들어, 감각 이상, 말단 사지의 감각 이상), 자율 신경병증(예를 들어, 위궤양 또는 기립성 저혈압과 같은 위장 기능부전), 운동 신경병증, 발작, 치매, 척수병증, 다발신경병증, 수근관 증후군, 자율신경계 부전, 심근병증, 유리체 혼탁, 신부전, 신장병증, 실질적으로 감소된 mBMI(변형된 체질량 지수), 뇌신경 기능부전, 각막 격자 이영양증, 심장초음파 평가에 의한 좌심실(LV) 벽 비후, 심장초음파 평가에 의한 증가된 전체 종방향 긴장 증가 평가, 증가된 N-말단 프로호르몬 B형 나트륨이노 펩타이드(NTproBNP) 및 심장 사건으로 인한 입원을 포함한다. 질환의 감소는 질환 과정을 서행시키거나 후기 발병 질환의 중증도를 감소시킴을 포함한다. "용량"은 RNAi 제제, 제제가 투여되는 방식, 질환 위험 정도, 병력, 연령, 체중, 가족력, 유전적 구성, 경우에 따라 선행 또는 병용 치료의 유형 및 치료될 환자의 기타 개별적인 특징에 따라 다양할 수 있다.

[0106]

"치료학적 유효량"은 또한 임의의 치료에 적용할 수 있는 합리적인 이득/위험 비율로 일부 목적하는 국소 또는 전신 효과를 생성하는 RNAi 제제의 양을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용되는 RNAi 제제는 그러한 치료에 적용할 수 있는 합리적인 이득/위험 비율을 생성하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다.

[0107]

본원에 사용된 "치료학적 유효량"이라는 문구는 또한 TTR 발현에 의해 매개되는 병리학적 과정 또는 병리학적 과정의 증상(들)의 치료, 예방 또는 관리에 이득을 제공하는 양을 포함한다. TTR 아밀로이드증의 증상은 감각 신경병증(예를 들어, 감각 이상, 말단 사지의 감각 이상), 자율 신경병증(예를 들어, 위궤양 또는 기립성 저혈압과 같은 위장 기능부전), 운동 신경병증, 발작, 치매, 척수병증, 다발신경병증, 수근관 증후군, 자율신경계 부전, 심근병증, 유리체 혼탁, 신부전, 신장병증, 실질적으로 감소된 mBMI(변형된 체질량 지수), 뇌신경 기능부전, 각막 격자 이영양증, 심장초음파 평가에 의한 좌심실(LV) 벽 비후, 심장초음파 평가에 의한 증가된 전체 종방향 긴장 증가 평가, 증가된 N-말단 프로호르몬 B형 나트륨이노 펩타이드(NTproBNP) 및 심장 사건으로 인한 입원을 포함한다.

- [0108] 하나의 구현예에서, 예를 들어, 대상체가 FAP, 혼합 표현형을 갖는 FAP, 혼합 표현형을 갖는 FAC, 또는 FAP를 갖고 OLT를 갖는 경우, 본 발명의 dsRNA 제제를 사용한 대상체의 치료는 신경병증의 진행을 서행시킨다. 또 다른 구현예에서, 예를 들어, 대상체가 FAP, 혼합 표현형을 갖는 FAP, 혼합 표현형을 갖는 FAC, 또는 FAP를 갖고 OLT를 갖는 경우, 본 발명의 dsRNA 제제를 사용한 대상체의 치료는 신경병증 및 심근병증의 진행을 서행시킨다. 또 다른 구현예에서, 예를 들어, 대상체가 심장 침범을 갖는 경우, 본 발명의 방법은 심장 구조 및 기능을 개선하고, 예를 들어, 상기 방법은 평균 좌심실 벽 두께 및 종방향 긴장을 감소시키고 심장 스트레스 바이오마커, N-말단 프로 b-형 나트륨이노 펩타이드(NT-proBNP)의 발현 수준을 감소시킨다.
- [0109] 치료학적 또는 예방학적 유효량의 본 발명의 RNAi 제제의 투여는 또한 TTR 관련 질환을 앓고 있거나 발병할 위험이 있는 대상체에서 신경학적 손상 또는 삶의 질에 대한 적어도 하나의 지표를 개선시키는 방법에 유용하다.
- [0110] 예를 들어, 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 적어도 대상체에서 신경학적 손상의 지표를 개선시킨다. 대상체에서 "신경학적 손상의 적어도 하나의 지표를 개선하는 것"은 신경학적 손상을 서행시키거나, 감소시키거나 정지시키거나, 신경학적 손상과 관련된 임의의 증상을 개선하는 본 발명의 방법의 능력을 지칭한다. 신경계 손상의 임의의 적절한 척도를 사용하여 대상체가 신경계 손상, 또는 신경계 손상과 관련된 증상의 개선을 감소, 서행 또는 정지시켰는지의 여부를 결정할 수 있다.
- [0111] 하나의 적합한 척도는 신경병증 손상 스코어(NIS)이다. NIS는 특히 말초 신경병증과 관련하여 쇠약, 감각 및 반사를 측정하는 스코어링 시스템을 지칭한다. NIS 스코어는 쇠약에 대한 근육의 표준 그룹(1은 25% 쇠약, 2는 50% 쇠약, 3은 75% 쇠약, 3.25는 중력에 대항하는 움직임, 3.5는 제거된 중력과 함께 움직임, 3.75는 움직임이 없는 근육 압박임, 및 4는 마비됨), 근육 스트레치 반사의 표준 그룹(0은 정상, 1은 감소, 2는 부재), 터치 압력, 진동, 관절 위치 및 운동, 핀프릭(모두 검지 및 엄지 발가락으로 등급이 매겨짐: 0은 정상, 1은 감소, 2는 부재)을 평가한다. 평가는 연령, 성별 및 체력에 대해 보정된다.
- [0112] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 투여 시작으로부터 18개월에 NIS를 적어도 5점까지 감소시킨다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 본원에 제공된 RNAi 제제로 치료를 개시한 지 18개월째에 NIS를 안정화시킨다. 다른 구현예에서, 방법은 질환의 자연력을 나타내는 적절한 대조군 그룹, 예를 들어 문헌 [참조: Adams et al., N Engl J Med 2018;379]에 제공된 바와 같은 위약 대조군 그룹과 비교하여 증가하는 NIS 스코어를 서행시킨다. 질병 진행 속도는 치료 개시 시 대상체의 질병 중증도, 치료 기간, 이전 치료 및 경우에 따라 존재하는 특정 TTR 돌연변이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 인자에 의존한다.
- [0113] 사람 대상체에서 NIS를 결정하기 위한 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌(참조: Dyck, PJ et al., (1997) *Neurology* 1997. 49(1):pgs.229-239; Dyck PJ. (1988) *Muscle Nerve*. Jan;11(1):21-32)에 찾을 수 있다.
- [0114] 신경학적 손상의 또 다른 적합한 측정은 변형된 신경병증 손상 스코어(mNIS+7)이다. 당업자에게 공지된 바와 같이, mNIS+7은 작고 큰 신경 섬유 기능(NCS 및 QST)의 전기생리학적 측정 및 자율 기능 측정(체위 혈압)과 조합된 신경학적 손상(NIS)의 임상 시험 기반 평가를 지칭한다. mNIS+7 스코어는 NIS+7 스코어(NIS + 7개 시험을 나타냄)의 변형이다. NIS+7은 쇠약 및 근육 스트레치 반사를 분석한다. 7개 시험 중 5개는 신경 전도 특성을 포함한다. 이들 특성은 비골 신경 복합 근육 활동 전위 진폭, 운동 신경 전도 속도 및 운동 신경 원위 잠복기(MNDL), 경골 MNDL 및 비복 감각 신경 활동 전위 진폭이다. 이들 값은 연령, 성별, 키 및 체중의 변수에 대해 보정된다. 7개 시험 중 나머지 2개는 진동 검출 임계값과 심호흡에 따른 심박수 감소를 포함한다.
- [0115] mNIS+7 스코어는 NIS+7을 변형하여 스마트 체성감각 정량적 감지 시험(Smart Somatotopic Quantitative Sensation Testing), 새로운 자율 평가의 사용, 척골 신경, 비골 신경 및 경골 신경의 진폭의 복합 근육 활동 전위 및 척골 신경 및 비복 신경의 감각 신경 활동 전위의 사용을 고려한다 (문헌참조: Suanprasert, N. et al., (2014) *J.Neurol.Sci.*, 344(1-2): pgs. 121-128).
- [0116] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 투여 시작으로부터 18개월에 mNIS+7을 적어도 5점까지 감소시킨다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 본원에 제공된 RNAi 제제로 치료를 개시한 지 18개월째에 mNIS+7을 안정화시킨다. 다른 구현예에서, 방법은 질환의 자연력을 나타내는 적절한 대조군 그룹, 예를 들어 문헌 [참조: Adams et al., N Engl J Med 2018;379]에 제공된 바와 같은 위약 대조군 그룹과 비교하여 증가하는 mNIS+7 스코어를 서행시킨다. 질병 진행 속도는 치료 개시 시 대상체의 질병 중증도, 치료 기간, 이전 치료 및 경우에 따라 존재하는 특정 TTR 돌연변이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 인자에 의존한다.

- [0117] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 적어도 대상체에서 삶의 질의 적어도 하나의 지표를 개선시킨다. 대상체에서 “삶의 질의 적어도 하나의 지표를 개선하는”은 삶의 질 악화를 서행시키거나 정지시키거나 삶의 질을 개선시키는 본 발명의 방법의 능력을 지칭한다. 삶의 질의 임의의 적합한 측정은 대상체가 서행되거나 정지된 삶의 질 악화 또는 개선된 삶의 질을 갖는지의 여부를 결정하는 데 사용될 수 있다.
- [0118] 예를 들어, SF-36® 건강 조사는 신체 기능, 신체 건강 문제로 인한 역할 제한, 신체 통증, 일반적인 건강, 활력(에너지 및 피로), 사회적인 기능, 정서적 문제로 인한 역할 제한, 및 정신 건강(심리적 고통 및 심리적 안녕)의 8개 건강 파라미터를 측정하는 자가 보고 다수 항목 스케일을 제공한다. 각각의 스케일은 각 질문이 동일한 가중치를 갖는다는 가정 하에 0-100 스케일로 직접 변환된다. 스코어가 낮을 수록 기능장애가 많다. 스코어가 높을수록 기능장애가 적은 것이고, 즉, 제로 스코어는 최대 기능장애에 해당하고 100의 스코어는 기능장애가 없는 것과 동일하다. 설문 조사는 또한 물리적 구성 요소 요약 및 정신적 구성 요소 요약을 제공한다.
- [0119] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 대상체에게 SF-36 신체 건강 관련 파라미터(신체 건강, 역할-신체적, 신체 통증 또는 일반 건강) 중 적어도 하나 또는 SF-36 정신 건강 관련 매개변수(활력, 사회적 기능, 역할-정서적 또는 정신 건강)의 적어도 하나에서 기준선 대비 개선을 제공한다. 상기 개선은 투여 시작으로부터 9개월째에 임의의 하나 이상의 파라미터에 대한 스케일에서, 예를 들어 적어도 2 또는 적어도 3점의 증가의 형태를 취할 수 있다.
- [0120] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 임의의 하나 이상의 파라미터에 대한 투여 시작으로부터 9개월째에 감소하는 SF-36 파라미터 스코어를 정지시키고, 예를 들어, 상기 방법은 예를 들어, SF-36 평가를 수행하는 개체에 대해 관찰된 변동 내에서 SF-36의 임상적으로 유의적인 변화를 유도하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 투여개시로부터 9개월째에 SF-36 스코어가 감소하는 속도, 질환의 자연력을 보여주는 적당한 대조군 그룹, 예를 들어, 문헌(참조: Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21)에 제공된 바와 같은 위약 대조군 그룹과 비교하여 SF-36 스코어의 감소 속도에 비해 본 발명의 RNAi 제제로 처리된 대상체에서 SF-36 스코어의 감소 속도를 서행시킨다. 질병 진행 속도는 치료 개시 시 대상체의 질병 중증도, 치료 기간, 이전 치료 및 경우에 따라 존재하는 특정 TTR 돌연변이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 인자에 의존한다.
- [0121] 삶의 질에 대한 또 다른 적합한 측정은 Norfolk 삶의 질-당뇨병성 신경병증(Norfolk QOL-DN) 설문지이다. Norfolk QOL-DN은 기존 도구에서 포착되지 않은 대형 섬유, 소형 섬유 및 자율 신경병증과 관련된 DN의 전체 스펙트럼을 포착하도록 디자인된 검증된 종합 설문지이다.
- [0122] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 기준선으로부터 대상체의 Norfolk QOL-DN 스코어, 예를 들어 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료 개시로부터 9개월째에 약 -2.5, -3.0, -3.5, -4.0, -4.5, 또는 -5.0의 변화를 개선한다. 다른 구현예에서, 방법은 증가하는 Norfolk QOL-DN 스코어를 정지시키고, 예를 들어, 방법은 예를 들어 QOL-DN 평가를 수행하는 개체 간에 관찰된 변동 내에서 Norfolk QOL-DN 스코어의 임상적으로 유의적인 변화를 초래하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 QOL-DN 스코어가 증가하는 속도, 예를 들어 질환의 자연력을 보여주는 적당한 대조군 그룹, 예를 들어, 문헌(참조: Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21)에 제공된 바와 같은 위약 대조군 그룹과 비교하여 QOL-DN 스코어의 증가 속도에 비해 본 발명의 RNAi 제제로 처리된 대상체에서 QOL-DN 스코어의 증가 속도를 서행시킨다. 질병 진행 속도는 치료 개시 시 대상체의 질병 중증도, 치료 기간, 이전 치료 및 경우에 따라 존재하는 특정 TTR 돌연변이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 인자에 의존한다.
- [0123] 삶의 질에 대한 또 다른 적합한 측정은 예를 들어 NIS-W 스코어에 의한 평가시 운동 강도이다. NIS-W 스코어는 머리, 몸통 및 사지 근육의 쇠약을 합산한 종합 스코어이다. NIS(W)(쇠약을 측정하는 스케일의 부분 참조)를 사용하여 근육은 중간 등급과 함께 정상(0) 또는 완전 마비(4)로 평가되고; 1은 임상 강도 시험에서 25% 쇠약한 것으로 간주되는 근육을 나타내고, 2는 50%, 3은 75%, 3.25는 중력에 대항하는 움직임, 3.50은 제거된 중력과 함께 움직임, 3.75는 근육 압박임이다.
- [0124] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 NIS-W 스코어에서 기준선 대비 개선을 대상체에게 제공한다. 이러한 개선은 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료를 개시한지 18개월에 대상체의 NIS-W 스코어의 적어도 5, 6, 7, 8, 9 또는 10점의 감소 형태를 취할 수 있다. 다른 구현예에서, 방법은 NIS-W 스코어의 감소를 정지시키고, 예를 들어, 상기 방법은 질환의 자연력을 보여주는 적당한 대조군 그룹, 예를 들어, 문헌(참조: Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21)에 제공된 바와 같은 위약 대조군 그룹과 비교하여 NIS-W 스코어의 임상적으로 유의적인 증가를 유도하지 않거나 NIS-W 스코어의 증가 속도의 서행을 유도하지 않는다. 질병 진행 속도는 치료 개시 시 대상체의 질병 중증도, 치료 기간, 이전 치료 및 경우에 따라 존재하는 특정 TTR 돌연변이를 포함하지

만 이에 제한되지 않는 다수의 인자에 의존한다.

- [0125] 삶의 질에 대한 또 다른 적절한 지표는 라쉬(Rasch)가 구축한 전체 기능장애 스케일(R-ODS)로, 이는 환자의 활동 및 사회 참여 제한을 포착하도록 디자인된 환자 설문지이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 R-ODS 스코어에서 기준선 대비 개선을 대상체에게 제공한다. 이러한 개선은 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료를 개시한지 18개월에 대상체의 R-ODS 스코어의 적어도 2, 예를 들어, 적어도 2, 3, 4 또는 5점의 증가 형태를 취할 수 있다. 다른 구현예에서, 방법은 감소하는 R-ODS 스코어를 정지시키고, 예를 들어 방법은 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료를 개시한지 18개월에 R-ODS 점수의 임상적으로 유의한 감소를 초래하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료를 개시한지 18개월째에 R-ODS 스코어가 감소하는 속도, 예를 들어, 질환의 자연력을 보여주는 적당한 대조군 그룹, 예를 들어, 문헌 (참조: Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21)에 제공된 바와 같은 위약 대조군 그룹과 비교하여 R-ODS 스코어의 감소 속도에 비해 본 발명의 RNAi 제제로 처리된 대상체에서 R-ODS 스코어의 감소 속도를 서행시킨다. 질병 진행 속도는 치료 개시 시 대상체의 질병 중증도, 치료 기간, 이전 치료 및 경우에 따라 존재하는 특정 TTR 돌연변이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 인자에 의존한다.
- [0126] 0에서 100까지의 증상 스코어를 제공하는 자율신경실조증의 증상을 평가하는 환자 설문지인 복합 자율신경계 증상 스코어(COMPASS-31)는 삶의 질에 대한 또 다른 적합한 지표이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 COMPASS-31 스코어에서 기준선 대비 개선을 대상체에게 제공한다. 이러한 개선은 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료를 개시한지 18개월에 대상체의 COMPASS-31 스코어의 적어도 5, 예를 들어, 적어도 5, 6, 7, 8, 9 또는 10점의 증가 형태를 취할 수 있다. 다른 구현예에서, 방법은 감소하는 COMPASS-31 스코어를 정지시키고, 예를 들어 방법은 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료를 개시한지 18개월에 COMPASS-31 스코어의 임상적으로 관련된 변화를 초래하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 COMPASS-31 스코어가 감소하는 속도, 예를 들어 질환의 자연력을 보여주는 적당한 대조군 그룹, 예를 들어, 문헌 (참조: Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21)에 제공된 바와 같은 위약 대조군 그룹과 비교하여 COMPASS-31 스코어의 감소 속도에 비해 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료를 개시한지 18개월에 COMPASS-31 스코어의 감소 속도를 서행시킨다. 질환 진행 속도는 치료 개시 시 대상체의 질환 중증도, 치료 기간, 이전 치료 및 경우에 따라 존재하는 특정 TTR 돌연변이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 인자에 의존한다.
- [0127] 다른 삶의 질 지표는 예를 들어, 매디안 체질량 지수 (mBMI)에서 변화에 의해 평가된 바와 같이 영양 상태를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 mBMI에서 기준선 대비 개선을 대상체에게 제공한다. 상기 개선은 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료 개시한지 18개월에 적어도 2, 3, 4, 5 이상의 mBMI 스코어 증가 형태를 취할 수 있다. 다른 구현예에서, 방법은 감소하는 mBMI 지수 스코어를 정지시키고, 예를 들어 방법은 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료를 개시한지 18개월에 mBMI 스코어의 임상적으로 유의적인 변화를 초래하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 mBMI 스코어가 감소하는 속도, 예를 들어 질환의 자연력을 보여주는 적당한 대조군 그룹, 예를 들어, 문헌 (참조: Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21)에 제공된 바와 같은 위약 대조군 그룹과 비교하여 대상체에서 mBMI 스코어의 감소 속도에 비해 본 발명의 RNAi 제제로 처리된 대상체에서 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료를 개시한지 18개월에 mBMI 스코어의 감소 속도를 서행시킨다. 질환 진행 속도는 치료 개시 시 대상체의 질환 중증도, 치료 기간, 이전 치료 및 경우에 따라 존재하는 특정 TTR 돌연변이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 인자에 의존한다.
- [0128] 또 다른 삶의 질 지표는 운동 능력 평가를 포함한다. 운동 능력의 한 가지 적합한 측정은 6분 걷기 시험(6MWT)이고, 이는 대상체가 6분 동안 얼마나 멀리 걸을 수 있는지, 즉 6분 도보 거리(6MWD)를 측정한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료를 개시한지 18개월에 6MWD에서 기준선으로부터 적어도 10미터, 예를 들어, 적어도 10, 15, 20, 또는 약 30미터 증가를 대상체에게 제공한다.
- [0129] 또 다른 적합한 측정은 보행 속도를 측정하는 10미터 걷기 시험이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 10미터 걷기 시험에서 본원에 제공된 RNAi 제제를 사용한 치료를 개시한지 18개월에 기준선으로부터 적어도 0.025 미터/초, 예를 들어, 적어도 0.025, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 또는 약 5.0 미터/초로의 증가를 제공한다.
- [0130] 일부 구현예에서, 혈장 바이오마커 수준의 변화는 ATTR 아밀로이드증에서 진행 중인 신경 손상 또는 다발신경병증의 진행의 감소의 지표이다. 예를 들어, 치료 시작 시 NFL 수준과 비교하여 9개월째 신경필라멘트 경쇄(NfL) 수준의 감소는 ATTR 아밀로이드증에서 진행 중인 신경 손상 또는 다발신경병증 진행의 감소의 지표일 수 있다. 특정 구현예에서, 다른 단백질, 특히 RSP03, CCDC80, EDA2R 및 NT-proBNP의 수준의 감소는 단독으로 또는 치료

시작 시에 이의 상응하는 수준과 비교하여 치료 시작으로부터 9개월째에 NfL 수준의 감소와 조합하여 ATTR 아밀로이드증에서 진행 중인 신경 손상의 감소 또는 다발신경병증의 진행의 감소의 지표일 수 있다. 특정 구현예에서, 치료 시작 시의 상응하는 수준과 비교하여 치료 시작으로부터 9개월째에 단독으로 또는 상기 열거된 다른 마커와 조합하여 N-CDase 수준의 증가는 ATTR 아밀로이드증에서 진행 중인 신경 손상 또는 다발신경병증의 진행의 감소의 지표일 수 있다. 예를 들어 본원에서 제공되는 RNAi 제제를 사용한 치료 개시로부터 9개월째에서와 같이 ATTR 아밀로이드증에서 신경 손상 또는 다발신경병증의 감소의 지표로 작용할 수 있는 추가 바이오마커는 표 1에 제공된다. ATTR 아밀로이드증에서 진행 중인 신경 손상 또는 다발신경병증의 진행의 감소는 양의 베타 계수를 갖는 단백질의 감소와 상관관계가 있다. ATTR 아밀로이드증에서 진행 중인 신경 손상 또는 다발신경병증의 진행의 감소는 음의 베타 계수를 갖는 단백질의 증가와 상관관계가 있다. 바이오마커 수준의 변화는 통계적으로 유의적인 변화, 즉 검정의 고유한 변동성보다 큰 변화인 것으로 이해된다.

[0131] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 심혈관 지표의 개선, 예를 들어 캔자스시티 심근병증 설문지 전체 요약(KCCQ-OS)의 증가, 기준선과 비교하여 심장초음파 평가에 의한 좌심실(LV) 벽 비후 감소, 기준선과 비교하여 심장초음파 평가에 의한 감소된 전체적인 종방향 긴장, 기준선과 비교하여 N-말단 프로호르몬 B형 나트륨이뇨 펩타이드(NTproBNP) 감소, 및 심장 사건으로 인한 입원 감소를 제공한다.

[0132] 본 발명의 방법은 또한 치료되는 대상체의 예후를 개선할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 질환의 자연력을 보여주는 적당한 대조군 그룹, 예를 들어, 문헌(참조: Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21)에 제공된 바와 같은 위약 대조군 그룹과 비교하여 치료 기간 동안에 임상적 악화 사건의 가능성의 감소 또는 감소된 병원입원을 대상체에 제공한다. 특정 구현예에서, 치료 동안에 임상적 악화 사건의 가능성의 감소는 예를 들어, 문헌(참조: Maurer et al., N Engl J Med 2018;379:11-21)에 제공된 적당한 대조군 그룹과 비교하여, 예를 들어, 핑켈슈타인-쇼엔펠트 방법(Finkelstein-Schoenfeld method)에 따른 평가시 모든 원인의 사망률 또는 심혈관 관련 병원입원의 감소를 포함할 수 있다. 질환 진행 속도는 치료 개시 시 대상체의 질환 중증도, 치료 기간, 이전 치료 및 경우에 따라 존재하는 특정 TTR 돌연변이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 인자에 의존한다.

[0133] 대상체에게 투여되는 RNAi 제제의 용량은 예를 들어, TTR 유전자 발현의 목적하는 수준의 억제(예를 들어, TTR mRNA 발현, TTR 단백질 발현, 또는 상기 정의된 바와 같은 아밀로이드 침착물의 감소에 기초하여 평가된 바와 같이) 또는 목적하는 치료학적 효과를 달성하고, 이와 동시에 바람직하지 않은 부작용을 피하기 위해 특정 용량의 위험과 이득의 균형을 이루도록 조정될 수 있다.

[0134] 하나의 구현예에서, 본 발명의 iRNA 제제가 "고정 용량"(예를 들어, mg 단위의 용량)으로서 대상체에게 투여된다는 것은 iRNA 제제의 1회 용량이 체중과 같은 임의의 특정 대상체-관련 인자에 관계없이 모든 대상체에 대해 사용됨을 의미한다.

[0135] 일부 구현예에서, RNAi 제제는 약 25 mg 내지 약 1000 mg, 예를 들어, 약 25 mg, 약 50 mg, 약 100 mg, 약 200 mg, 약 300 mg, 약 400 mg, 약 500 mg, 약 600 mg, 약 700 mg, 약 800 mg, 약 900 mg, 또는 약 1000 mg의 고정 용량으로서 투여된다.

[0136] 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 분기별 약 1회 내지 연간 약 1회로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 분기별 약 1회, 약 6개월마다 1회, 또는 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.

[0137] 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg 내지 약 300 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg 내지 약 200 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 약 75 mg 내지 약 200 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 약 50 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 약 75 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 약 100 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 약 200 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 약 25 mg 내지 약 300 mg; 약 25 mg 내지 약 200 mg; 약 75 mg 내지 약 200 mg; 약 25 mg; 약 50 mg; 약 100 mg; 약 200mg; 또는 약 300 mg의 고정 용량으로 분기별 1회, 즉, 3개월 마다 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.

[0138] 특정 구현예에서, 이종 가닥 RNAi 제제는 약 400 mg 내지 약 600 mg/kg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여

된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 400 mg 또는 약 600 mg의 고정 용량으로 6개월 마다 약 1회, 내지 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 400 mg 또는 약 600 mg의 고정 용량으로 6개월마다 약 1회, 또는 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.

- [0139] 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 700 mg 내지 약 1000 mg 또는 약 700 mg 내지 약 900 mg의 고정 용량으로 사람 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 제제는 약 700 mg, 약 800 mg, 약 900 mg 또는 약 1000 mg의 고정된 용량으로 연간 약 1회 사람 대상체에게 투여된다.
- [0140] 특정 구현예에서, 투여는 피하 투여, 예를 들어 미리 충전된 주사기 또는 자동주사 주사기를 통한 자가 투여이다. 일부 구현예에서, 피하 투여를 위한 RNAi 제제의 용량은 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체의 1 ml 이하의 용적에 함유된다.
- [0141] 이들 임의의 일정은 임의로 1회 이상 반복으로 반복될 수 있다. 반복 수는 목적하는 효과의 달성, 예를 들어, TTR 유전자의 억제, 레티놀 결합 단백질 수준, 비타민 A 수준 또는 치료 효과의 달성, 예를 들어, 아밀로이드 침착물 감소 또는 TTR 관련 질환의 증상 감소에 따라 다양할 수 있다. 특정 구현예에서, iRNA 제제는 무기한 기간 동안, 예를 들어 환자의 일생 동안 만성적으로 투여된다.
- [0142] 일부 구현예에서, RNAi 제제는 다른 치료학적 제제 또는 다른 치료학적 용법과 함께 투여된다. 예를 들어, TTR 관련 질환을 치료하기에 적합한 다른 제제 또는 다른 치료학적 용법은 간 이식, 심장 이식, 심박조율기 이식, 체내에서 단량체 TTR 수준을 감소시킬 수 있는 제제; TTR 아밀로이드 생성에 필요한 사량체 해리를 방지하는 TTR 사량체를 동력학적으로 안정화시키는 타파미디스(Vyndagel® 또는 Vyndamax® 또는 AG10; 예를 들어, 심장 침범이 있는 TTR 아밀로이드증에서 부종을 감소시키기 위해 사용될 수 있는 디플루니살 및 이노제와 같은 비스테로이드성 항염증 약물(NSAIDs)을 포함할 수 있다.
- [0143] 하나의 구현예에서, 대상체는 RNAi 제제의 초기 용량 및 1회 이상의 유지 용량을 투여받는다. 유지 용량 또는 용량들은 초기 용량, 예를 들어 초기 용량의 절반과 같거나 더 낮을 수 있다. 치료 후 환자는 환자의 조건에서의 변화에 대해 모니터링될 수 있다.
- [0144] 본 발명의 방법의 일부 구현예에서, 혈청 또는 혈장 TTR 수준에 의해 평가되는 TTR 유전자의 발현은 적어도 85%, 일부 실시양태에서는 적어도 90%까지 억제된다. 본원에 제공된 iRNA 제제를 사용한 TTR 발현의 억제는 간에서 TTR의 발현을 억제하고 다른 조직, 예를 들어 눈에서의 TTR 발현을 실질적으로 억제하지 않는 것으로 이해된다.
- [0145] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “억제하는”은 “감소시키는”, “사일런싱”, “하향조절하는”, “억제하는 (suppressing)”, 및 기타 유사 용어와 상호교환적으로 사용되고, 임의의 억제 수준을 포함한다. 일부 구현예에서, 억제는 통계학적으로 유의적이거나 임상적으로 유의적인 억제를 포함한다.
- [0146] “TTR의 발현을 억제하는”이라는 문구는 TTR 유전자의 변이체 또는 돌연변이체를 포함하는 임의의 TTR 유전자의 발현 억제를 지칭하는 것으로 의도된다. 따라서, TTR 유전자는 야생형 TTR 유전자, 돌연변이 TTR 유전자(예를 들어, 아밀로이드 침착을 일으키는 돌연변이 TTR 유전자)일 수 있다.
- [0147] 억제는 대조군 수준과 비교하여 TTR 발현과 관련된 하나 이상의 변수의 절대적 또는 상대적 수준의 감소에 의해 평가될 수 있다. 대조군 수준은 당업계에서 사용되는 임의의 유형의 대조군 수준, 예를 들어, 투여 전 수준, 처리되지 않거나 대조군(예를 들어, 완충제만의 대조군 또는 불활성 제제 대조군)으로 처리된 유사 대상체, 세포 또는 샘플로부터 결정된 수준일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, TTR 발현의 억제는 전형적으로 적절한 샘플(예를 들어, 과거 대조군 샘플, 정상 샘플 또는 임상 시험에서 결정된 수준)에서 TTR 수준을 결정함으로써 또는 본원 또는 PCT 공개 WO2010048228, WO2013075035, 및 WO2017023660에 제공된 것들, 또는 TTR의 발현을 억제하는 다른 제제, 예를 들어 안티센스 올리고뉴클레오타이드 제제, 다이스 기질 제제(예를 들어 WO20118139917 및 WO20118139917 참조)를 사용한 대상체의 치료 전; 및 본원에 제공된 iRNA 제제로 치료한 후 평가된다. 본원에서 제공되는 iRNA 제제는 내구성이 있지만 느리게 작용하는 것으로 이해된다. 따라서, 녹다운 수준은 최저점에 도달하기에 충분한 시간 후, 예를 들어 사람 대상체에서 iRNA 제제의 첫 번째 투여 후 적어도 3주 후 또는 TTR 녹다운의 정상 상태가 달성되었을 때, 예를 들어 본원에서 제공되는 iRNA 제제를 사용한 다중 투여 후 결정된다.
- [0148] TTR 유전자의 발현의 억제는 TTR 유전자가 전사되고, 처리된 (예를 들어, 세포 또는 세포들과 본원 개시내용의 iRNA를 접촉시킴에 의해 또는 본 발명의 RNAi 제제를 세포가 존재하거나 존재했던 대상체에게 투여함에 의해) 제1 세포 또는 세포들 그룹 (상기 세포는 예를 들어, 대상체로부터 유래된 샘플 중에 존재할 수 있다)에 의해

발현되는 mRNA의 양의 감소에 의해 나타나 TTR 유전자의 발현은 제1 세포 또는 세포들 그룹과 실질적으로 동일하지만 그와 같이 처리되지 않은 제2 세포 또는 세포들 그룹 (대조군 세포(들))과 비교하여 억제된다. 일부 구현예에서, 퍼센트 억제는 하기 식을 사용하여 대조군 세포에서 mRNA 수준의 퍼센트로서 처리된 세포에서 mRNA 수준을 표현함에 의해 평가된다:

$$\frac{(\text{대조군 세포에서 mRNA}) - (\text{처리된 세포에서 mRNA})}{(\text{대조군 세포에서 mRNA})} \cdot 100\%$$

[0149]

[0150] 발현의 퍼센트 억제를 결정하기 위해, 예를 들어 대상체로부터 수득된 혈액 샘플에서 혈청 TTR 단백질 농도에 대해 유사한 계산을 수행할 수 있다. 치료 후 혈청 또는 혈장 샘플에서 TTR이 검출되지 않은 경우, 존재하는 TTR의 양이 사용된 검정의 검출 하한치에 있는 것으로 고려된다.

[0151]

일부 구현예에서, 퍼센트 억제는 검증되고 임상적으로 허용되는 방법을 사용하여 결정된다.

[0152]

대안적으로, TTR 유전자의 발현 억제는 TTR 유전자 발현, 예를 들어 TTR 단백질 발현, 레티놀 결합 단백질 수준, 비타민 A 수준 또는 TTR을 포함하는 아밀로이드 침착물의 존재와 기능적으로 연계된 파라미터의 감소 측면에서 평가될 수 있다. TTR 유전자 사일런싱은 TTR을 발현하는 임의의 세포에서 항시성으로, 또는 계능 가공에 의해 및 당업계에 공지된 임의의 검정에 의해 결정될 수 있다. 간은 TTR 유전자 발현의 주요 부위이다. 발명의 다른 유의적인 부위는 망막 및 맥락충을 포함한다.

[0153]

III. 본 발명의 iRNA

[0154]

본 발명의 방법에 사용하기 위해 적합한 iRNA는 대상체, 예를 들어 포유류, 예를 들어, TTR 관련 질환을 갖는 사람 내의 세포와 같은 세포에서 TTR 유전자의 발현을 억제하기 위한 이중 가닥 리보핵산(dsRNA) 분자를 포함한다. dsRNA는 TTR 유전자의 발현에서 형성된 mRNA의 적어도 일부에 상보성인 상보성 영역을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 상보성 영역은 길이가 약 21개 내지 30개 이하의 뉴클레오타이드(예를 들어, 길이가 약 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 또는 21개 뉴클레오타이드)이다. TTR 유전자를 발현하는 세포와의 접촉 시, iRNA는 Hep3B 세포가 본원에 제공된 방법을 사용하여 10nM의 iRNA 제제로 형질감염되는 경우 TTR 유전자(예를 들어, 사람, 비-사람 영장류, 또는 비-영장류 포유류 TTR 유전자)의 발현을 예를 들어, WO2013075035의 실시예 4에 제공된 방법을 사용한 실시간 PCR에 의한 평가시 적어도 약70%까지 선택적으로 억제한다.

[0155]

dsRNA는 상보성인 2개의 RNA 가닥을 포함하고, 하이브리드화하여 dsRNA가 사용되는 조건하에서 듀플렉스 구조를 형성한다. dsRNA의 하나의 가닥(안티센스 가닥)은 표적 서열과 실질적으로 상보적이고 일반적인 완전히 상보적인 상보성 영역을 포함한다. 표적 서열은 TTR 유전자의 발현 동안에 형성된 mRNA의 서열로부터 유래할 수 있다. 다른 가닥(안티센스 가닥)은 안티센스 가닥에 상보적인 영역을 포함하여, 2개의 가닥은 적합한 조건하에서 조합되는 경우 하이브리드화하여 듀플렉스 구조를 형성한다. 본원 다른 곳에 기재되고 당업계에 공지된 바와 같이, dsRNA의 상보성 서열은 또한 별개의 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 것과는 대조적으로 단일 핵산 분자의 자가-상보성 영역으로서 포함될 수 있다.

[0156]

일반적으로, 듀플렉스 구조는 길이가 21 내지 30개 염기쌍이다. 유사하게, 표적 서열과 상보성 영역의 길이는 22개 및 30개 뉴클레오타이드이다.

[0157]

dsRNA는 하기에서 추가로 논의되는 바와 같이 당업계에 공지된 표준 방법에 의해 합성될 수 있다.

[0158]

본 발명의 iRNA 화합물은 2단계 과정을 사용하여 제조될 수 있다. 첫번째로, 이중 가닥 RNA 분자의 개별 가닥은 별도로 제조된다. 이어서, 성분 가닥은 어닐링된다. siRNA 화합물의 개별 가닥은 용액상 또는 고체상 유기 합성 또는 돌다를 사용하여 제조될 수 있다. 유기 합성은 비천연 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 가닥을 용이하게 제조할 수 있다는 이점을 제공한다. 본 발명의 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드는 용액상 또는 고체상 유기 합성 또는 돌다를 사용하여 제조될 수 있다.

[0159]

IV. 본 발명의 변형된 iRNA

[0160]

본 발명의 방법에 사용하기 위한 iRNA 제제는 센스 및 안티센스 가닥에서 한정된 화학적 변형을 포함한다. 어느 한 가닥의 길이가 23개 초과 뉴클레오타이드의 안티센스 가닥 및 21개 초과 뉴클레오타이드의 센스 가닥을 제공하도록 연장되는 경우, 뉴클레오타이드는 당 변형, 백본 변형 및 염기 변형을 포함하지만 이에 제한되지 않는 변형을 포함할 수 있다. 변형은 예를 들어, 말단 변형, 예를 들어, 5' -말단 변형 (인산화, 접합, 역위 연결)

또는 3' -말단 변형(접합, DNA 뉴클레오타이드, 역위 연결 등); 염기 변형, 예를 들어, 안정화 염기, 또는 파트너의 확장된 레퍼토리와 염기쌍을 형성하는 염기로의 대체, 염기의 제거(무염기 뉴클레오타이드), 또는 접합된 염기; 당 변형(예를 들어, 2' -위치 또는 4' -위치에서) 또는 당의 대체; 또는 포스포디에스테르 연결의 변형 또는 대체를 포함하는 백본 변형을 포함한다. 본원에 기재된 구현예에 유용한 iRNA 화합물의 특정 예는 변형된 백본을 함유하거나 어떠한 천연 뉴클레오타이드 간 연결을 함유하지 않는 RNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 변형된 골격을 갖는 RNA는 무엇 보다 골격 내 인 원자를 갖지 않는 것들을 포함한다. 본 명세서의 목적을 위해서 및 당업계에서 때로 언급되는 바와 같이, 이들의 뉴클레오타이드 간 골격 내 인 원자를 갖지 않는 변형된 RNA는 또한 올리고뉴클레오타이드인 것으로 고려될 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 iRNA는 이의 뉴클레오타이드 간 백본 내 인 원자를 갖는다.

[0161] 변형된 RNA 골격은 예를 들어, 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 3' -알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 3' -아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트를 포함하는 포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상 3' -5' 연결을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 뉴클레오타이드 유닛의 인접한 쌍이 3'-5' 에서 5' -3' 로 연결되거나, 2' -5'에서 5' -2'로 연결된 역위 극성을 갖는 것들을 포함한다. 다양한 염, 혼합 염 및 유리된 산 형태가 또한 포함된다.

[0162] 본원에서 인 원자를 포함하지 않는 변형된 RNA 골격은 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오타이드 간 연결, 혼합 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오타이드 간 연결, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 뉴클레오타이드 간 연결에 의해 형성된 골격을 갖는다. 이들은 모르폴리노 연결 (부분적으로 뉴클레오타이드의 당 부분으로부터 형성된); 실록산 골격; 설파이드, 설파사이드 및 설펜 골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 알켄 함유 골격; 설파메이트 골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌하이드라지노 골격; 설포네이트 및 설펜아미드 골격; 아마이드 골격; 및 혼합 N, O, S 및 CH₂성분 부분을 갖는 기타의 것들을 갖는 것들을 포함한다.

[0163] 다른 구현예에서, 적합한 RNA 모사체는 당 및 뉴클레오타이드 간 연결 둘다, 즉, 뉴클레오타이드 유닛의 백본이 신규 그룹으로 대체된 iRNA에 사용하기 위해 고려된다. 염기 유닛은 적당한 핵산 표적 화합물과의 하이브리드화를 위해 유지된다. 우수한 하이브리드화 성질을 갖는 것으로 나타난 RNA 모사체인 하나의 상기 올리고머 화합물은 펩타이드 핵산 (PNA)으로서 언급된다. PNA 화합물에서, RNA의 당 골격은 아마이드 함유 골격, 특히 아미노에틸 글라이신 골격으로 대체된다. 뉴클레오타이드는 보유되고 직접적으로 또는 간접적으로 골격의 아마이드 부분의 아자 질소 원자에 결합된다.

[0164] 본원 개시내용에서 특징으로 하는 일부 구현예는 포스포로티오에이트 백본, 및 헤테로원자 백본 및 특히 미국 특허 제5,489,677호의 --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[메틸렌 (메틸이미노) 또는 MMI 백본으로서 공지된], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- 및 --N(CH₃)--CH₂--CH₂-- 및 상기 언급된 미국 특허 제5,602,240호의 아마이드 백본을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 갖는 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 특징으로 하는 RNA는 상기 언급된 미국 특허 제5,034,506호의 모르폴리노 골격 구조를 갖는다. 고유 포스포디에스테르 백본은 O-P(O)(OH)-OCH₂-로서 나타낼 수 있다.

[0165] 변형된 RNA는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다. iRNA, 예를 들어, 본원에서 특징으로 하는 dsRNA는 2' -위치에서 OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알킬닐; 또는 O-알킬-O-알킬 중 하나를 포함할 수 있고, 여기서, 알킬, 알케닐 및 알킬닐은 치환되거나 치환되지 않은 C₁내지 C₁₀알킬 또는 C₂내지 C₁₀알케닐 및 알킬닐일 수 있다. 예시적인 적합한 변형은 O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, 및 O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂,를 포함하고, 여기서, n 및 m은 1 내지 약 10이다. 다른 구현예에서, dsRNA는 2' 위치에서 하기 중 하나를 포함한다: C₁내지 C₁₀저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알코아릴, 아르알킬, O-알코아릴 또는 O-아르알킬, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알코아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단 그룹, 리포터 그룹, 삽입체, iRNA의 약독화 성질을 개선시키기 위한 그룹, 또는 iRNA의 약력학 성질을 개선시키기 위한 그룹, 및 유사한 성질을 갖는 기타 치환체. 일부 구현예에서, 변형은 2'-메톡시에톡시 (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, 또한 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로서 공지된) (문헌참조: Martin et

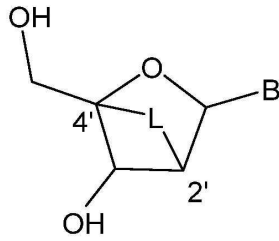
al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), 즉, 알콕시-알콕시 그룹을 포함한다. 또 다른 예시적인 변형은 하기에서 본원의 실시예에 기재된 바와 같이 2'-DMAOE로서도 공지된 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 즉, $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 그룹, 및 2'-디메틸아미노에톡시에톡시(또한 당업계에서 2'-O-디메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE로서 공지된), 즉, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₃)₂이다. 추가의 예시적인 변형은 다음을 포함한다: 5' -Me-2' -F 뉴클레오타이드, 5' -Me-2' -OMe 뉴클레오타이드, 5' -Me-2' -테옥시뉴클레오타이드, (이들 3개의 계열 중 R 및 S 이성체 둘다); 2' -알콕시알킬; 및 2' -NMA (N-메틸아세트아미드).

[0166] 기타 변형은 2'-메톡시(2'-OCH₃), 2'-아미노프로폭시 (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) 및 2'-플루오로 (2'-F)를 포함한다. 유사한 변형은 또한 iRNA의 RNA 상의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드 상의 당의 3' 위치 또는 2'-5' 연결된 dsRNA 및 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서 이루어질 수 있다. iRNA는 또한 펜토프라노실 당 대신에 사이클로부틸 모이어티와 같은 당 모방체를 가질 수 있다.

[0167] 본 발명의 iRNA의 RNA는 또한 뉴클레오타이드(흔히 단순히 “염기”로서 언급되는) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 “비변형된” 또는 “천연” 뉴클레오타이드는 퓨린 염기 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘 염기 티민(T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드는 데옥시티미딘 (dT), 5-메틸시토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 기타 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 기타 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실(슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 기타 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 기타 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-테아자구아닌 및 7-다아자아데닌 및 3-테아자구아닌 및 3-테아자아데닌과 같은 다른 합성 및 천연 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 이들 뉴클레오타이드는 특히 본 발명에서 특성화된 올리고머 화합물의 결합 친화성을 증가시키기 위해 유용하다. 이들은 2-아미노프로필아데닌, 5-프로필우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함하는, 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6개 치환된 퓨린을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은 0.6-1.2° C까지 핵산 듀플렉스 안정성을 증가시키는 것으로 나타났고(문헌참조: Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) 예시적으로 염기 치환이며, 보다 더 특히 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합되는 경우이다.

[0168] 본원 개시내용의 RNAi 제제는 또한 하나 이상의 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하도록 변형될 수 있다. “바이사이클릭 당”은 인접하거나 인접하지 않은 원자에 관계없이 2개의 탄소의 브릿징에 의해 형성된 환에 의해 변형된 푸라노실 환이다. “바이사이클릭 뉴클레오타이드” (“BNA”)는 인접하거나 인접해 있지 않은 상관 없이 당 환의 2개의 탄소 원자를 연결하여 바이사이클릭 환 시스템을 형성하는 브릿지를 포함하는 브릿징에 의해 형성된 환을 포함하는 당 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 브릿지는 당 환의 4' -탄소 및 2' -탄소를 2' -비사이클릭 (acyclic) 산소 원자를 통해 연결한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 제제는 하나 이상의 잠금 핵산 (LNA)를 포함할 수 있다. 잠금 핵산은 변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드이고, 여기서, 상기 리보스 모이어티는 2' 및 4' 탄소를 연결하는 여분의 브릿지를 포함한다. 다른 말로, LNA는 4'-CH₂-O-2' 브릿지를 포함하는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드이다. 상기 구조는 3' -엔도 구조 형태에서 리보스를 효과적으로 잠근다. siRNA로의 잠금 핵산의 첨가는 혈청에서 siRNA 안정성을 증가시키고 오프-표적 효과를 감소시키는 것으로 나타났다(문헌참조: Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, O. et al., (2007) *Mol. Canc. Ther.* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). 본원 개시내용의 폴리뉴클레오타이드에 사용하기 위한 바이사이클릭 뉴클레오타이드의 예는 4'와 2' 리보실 고리 원자 사이에 브릿지를 포함하는 뉴클레오타이드를 제한 없이 포함한다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 안티센스 폴리뉴클레오타이드 제제는 4'에서 2'로의 브릿지를 포함하는 하나 이상의 바이사이클릭 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0169] 잠금 뉴클레오타이드는 구조(입체화학 생략)로 나타낼 수 있고, 여기서 B는 핵염기 또는 변형된 핵염기이고 L은 2'-탄소를 리보스 환의 4'-탄소에 연결하는 연결 그룹이다.



[0170]

[0171] 상기 4' 에서 2' 로 브릿지된 바이사이클릭 뉴클레오사이드의 예는 4' -(CH₂)-O-2' (LNA); 4' -(CH₂)-S-2' ; 4' -(CH₂)-O-2' (ENA); 4' -CH(CH₃)-O-2' (또한 “속박된 에틸” 또는 “cEt” 로서 언급되는) 및 4' -CH(CH₂OCH₃)-O-2' (및 이의 유사체; 예를 들어, 미국 특허 제7,399,845호를 참조한다); 4' -C(CH₃)(CH₃)-O-2' (및 이의 유사체; 예를 들어, 미국 특허 제8,278,283호를 참조한다); 4' -CH₂-N(OCH₃)-2' (및 이의 유사체; 예를 들어, 미국 특허 제8,278,425호를 참조한다); 4' -CH₂-O-N(CH₃)-2' (예를 들어, 미국 특허 공개 공보 제2004/0171570호 참조); R이 H, C1-C12 알킬 또는 보호 그룹인 4' -CH₂-N(R)-O-2' (예를 들어, 미국 특허 제7,427,672호를 참조한다); 4' -CH₂-C(H)(CH₃)-2' (예를 들어, Chattopadhyaya et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134를 참조한다); 및 4' -CH₂-C(=CH₂)-2' (및 이의 유사체; 예를 들어 미국 특허 제8,278,426호를 참조한다). 이전 문헌의 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 인용된다.

[0172] 잠김 핵산 뉴클레오타이드의 제조를 교시하는 추가의 대표적인 미국 특허 및 미국 특허 공개 공보는 하기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 이들 각각의 전문이 본원에 참조로 인용되는 미국 특허 제6,268,490호; 제6,525,191호; 제6,670,461호; 제6,770,748호; 제6,794,499호; 제6,998,484호; 제7,053,207호; 제7,034,133호; 제7,084,125호; 제7,399,845호; 제7,427,672호; 제7,569,686호; 제7,741,457호; 제8,022,193호; 제8,030,467호; 제8,278,425호; 제8,278,426호; 제8,278,283호; 미국 공개 공보 제2008/0039618호; 및 미국 공개 공보 제2009/0012281호.

[0173] 임의의 전술한 바이사이클릭 뉴클레오사이드는 예를 들어 α-L-리보푸라노스 및 β-D-리보푸라노스를 포함하는 하나 이상의 입체화학적 당 배열을 갖도록 제조될 수 있다(WO 99/14226 참조).

[0174] 본원 개시내용의 RNAi 제제는 또한 하나 이상의 속박된 에틸 뉴클레오타이드를 포함하도록 변형될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 “속박된 에틸 뉴클레오타이드” 또는 “cEt”는 4'-CH(CH₃)-O-2' 브릿지(즉, 이전 구조에서 L)를 포함하는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 잠김 핵산이다. 하나의 구현예에서, 속박된 에틸 뉴클레오타이드는 본원에서 “S-cEt”로 지칭되는 S 형태로 있다.

[0175] 본 발명의 iRNA는 또한 하나 이상의 “형태적으로 제한된 뉴클레오타이드” (“CRN”)를 포함할 수 있다. CRN은 리보스의 C2' 및 C4' 탄소 또는 리보스의 C3 및 -C5' 탄소를 연결하는 링커를 갖는 뉴클레오타이드 유사체이다. CRN은 리보스 환을 안정한 형태로 잠그고 mRNA에 대한 하이브리드화 친화성을 증가시킨다. 링커는 안정성과 친화성을 위한 최적의 위치에 산소를 배치하여 리보스 환 퍼커링(puckering)을 감소시키는 데 충분한 길이이다.

[0176] 본 발명의 iRNA의 하나 이상의 뉴클레오타이드는 또한 하이드록시메틸 치환된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. “하이드록시메틸 치환된 뉴클레오타이드”는 또한 “잠금 해제된” (“UNA”) 변형으로서 지칭되는 바이사이클릭 2' -3' -세코-뉴클레오타이드이다.

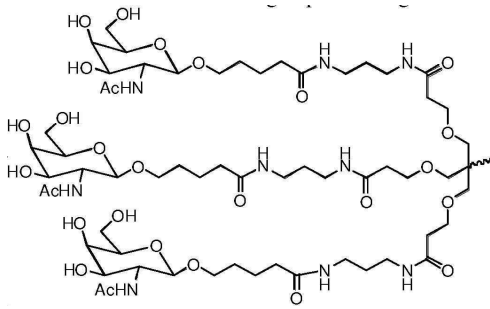
[0177] RNA 분자의 말단으로 잠재적으로 안정화된 변형은 N-(아세틸아미노카프로일)-4-하이드록시프롤리놀 (Hyp-C6-NHAc), N-(카프로일)-4-하이드록시프롤리놀 (Hyp-C6), N-(아세틸-4-하이드록시프롤리놀 (Hyp-NHAc), 티미딘-2'-O-데옥시티미딘 (에테르), N-(아미노카프로일)-4-하이드록시프롤리놀 (Hyp-C6-아미노), 2-도코사노일-우리딘-3' -포스페이트, 역위 염기 dT(idT) 등을 포함할 수 있다. 상기 변형의 개시내용은 WO 2011/005861에서 찾을 수 있다.

[0178] 본 발명의 iRNA의 뉴클레오타이드의 기타 변형은 RNAi 제제의 안티센스 가닥 상의 5' 포스페이트 또는 5' 포스페이트 모사체, 예를 들어, 5' -말단 포스페이트 또는 포스페이트 모사체를 포함한다. 적합한 포스페이트 모사체는 예를 들어, 미국 특허 공개 공보 제2012/0157511호에 기재되어 있고, 이의 전문은 본원에 참조로 인용된다.

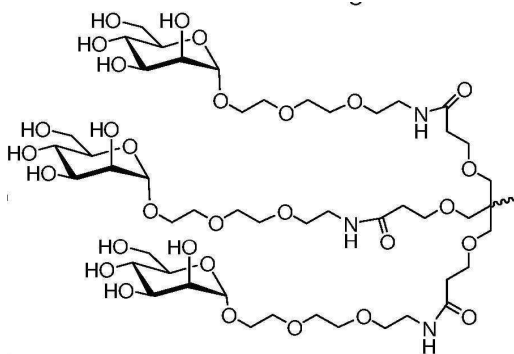
[0179] V. 리간드에 접합된 iRNA

- [0180] 본 발명의 iRNA의 RNA의 또 다른 변형은 iRNA의 활성, 세포 분포, iRNA의 세포 흡수를 증진시키는 하나 이상의 리간드, 모이어티 또는 접합체를 RNA에 화학적으로 연결하는 것을 포함한다. 상기 모이어티는 콜레스테롤 모이어티 (문헌참조: Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553-6556)와 같은 지질 모이어티, 콜산(문헌참조: Manoharan et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), 티오에테르, 예를 들어, 베릴-S-트리틸티올(문헌참조: Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), 티오콜레스테롤 (문헌참조: Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), 지방족 설페, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운데실 잔기 (문헌참조: Saison-Behmoaras et al., *EMBOJ*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49-54), 인지질, 예를 들어, 디-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸-암모늄 1,2-디-0-헥사데실-rac-글리세로-3-포스포네이트(문헌참조: Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 설페(문헌참조: Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), 또는 아다만탄 아세트산(문헌참조: Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), 팔미틸 모이어티 (문헌참조: Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카보닐옥시콜레스테롤 모이어티 (문헌참조: Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0181] 하나의 구현예에서, 리간드는 이것이 도입되는 iRNA 제제의 분포, 표적화 또는 수명을 변경시킨다. 일부 구현예에서 리간드는 예를 들어, 리간드가 부재인 종과 비교하여 선택된 표적, 예를 들어 분자, 세포 또는 세포 유형, 구획, 예를 들어 세포 또는 기관 구획, 조직, 기관 또는 신체의 영역에 대해 증진된 친화성을 제공한다. 예시적인 리간드는 듀플렉스된 핵산에서 듀플렉스 쌍형성에 관여하지 않는다.
- [0182] 리간드는 또한 표적화 그룹, 예를 들어, 세포 또는 조직 표적화제, 예를 들어, 렉틴, 당단백질, 지질 또는 단백질, 예를 들어, 콩팥 세포와 같은 특정 세포 유형에 결합하는 항체를 포함할 수 있다. 표적화 그룹은 티로트로핀, 멜라노트로핀, 렉틴, 당단백질, 계면활성제 단백질 A, 뮤신 탄수화물, 다가 락토스, 1가 갈락토스, N-아세틸-갈락토스아민, N-아세틸-글루코사민 다가 만노스, 다가 푸코스, 글리코실화된 폴리아미노산, 다가 갈락토스, 트랜스페린, 비스포스포네이트, 폴리글루타메이트, 폴리아스파르테이트, 지질, 콜레스테롤, 스테로이드, 담즙산, 플레이트, 비타민 B12, 비타민 A, 비오틴, 또는 RGD 펩타이드 또는 RGD 펩타이드 모사체일 수 있다. 특정 구현예에서, 리간드는 1가 또는 다가의 갈락토스를 포함한다. 특정 구현예에서, 리간드는 콜레스테롤을 포함한다.
- [0183] 본 발명의 리간드-접합된 올리고뉴클레오타이드는 (하기된) 올리고뉴클레오타이드 상으로 연결 분자의 부착으로부터 유래된 것과 같은 펜던트 반응성 관능기를 함유한 올리고뉴클레오타이드의 사용에 의해 합성될 수 있다. 상기 반응성 올리고뉴클레오타이드는 상업적으로 가용한 리간드, 임의의 다양한 보호기를 보유하는 합성된 리간드, 또는 이에 부착된 연결 모이어티를 갖는 리간드와 직접 반응할 수 있다.
- [0184] 본 발명의 접합체에 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 널리 공지된 고체상 합성 기술을 통해 편리하고 통상적으로 제조될 수 있다. 당업계에 공지된 상기 합성을 위한 임의의 다른 수단은 추가로 또는 대안적으로 사용될 수 있다. 또한 다른 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, 포스포로티오에이트 및 알킬화된 유도체를 제조하기 위한 유사한 기술을 사용하는 것이 공지되어 있다.
- [0185] A. 탄수화물 접합체
- [0186] 본 발명의 조성물 및 방법의 일부 구현예에서, iRNA 올리고뉴클레오타이드는 추가로 탄수화물을 포함한다. 탄수화물 접합된 iRNA는 본원에 기재된 바와 같이 생체내 치료학적 사용을 위해 적합한 조성물 뿐만 아니라 핵산의 생체내 전달을 위해 유리하다. 본원에 사용된 바와 같은, “탄수화물”은 각각의 탄소 원자에 결합된 산소, 질소 또는 황 원자와 함께 적어도 6개의 탄소 원자를 갖는 하나 이상의 모노사카라이드 유닛 (선형, 측쇄 또는 사이클릭일 수 있는)으로 구성된 탄수화물 자체인 화합물; 또는 각각의 탄소원자에 결합된 산소, 질소 또는 황 원자와 함께 각각 적어도 6개 탄소 원자를 갖는 하나 이상의 모노사카라이드 유닛(선형, 측쇄 또는 사이클릭일 수 있는)으로 구성된 탄수화물 모이어티를 일부로서 갖는 화합물을 언급한다. 대표적인 탄수화물은 당 (모노-, 디-, 트리-, 및 약 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 모노사카라이드 유닛을 함유하는 올리고사카라이드) 및 폴리사카라이드, 예를 들어, 전분, 글리코젠, 셀룰로스 및 폴리사카라이드 검을 포함한다. 특이적 모노사카라이드는 C5 이상 (예를 들어, C5, C6, C7, 또는 C8) 당을 포함하고; 디사카라이드 및 트리사카라이드는 2개 또는 3개의 모노사카라이드 유닛(예를 들어, C5, C6, C7, 또는 C8)을 갖는 당을 포함한다.

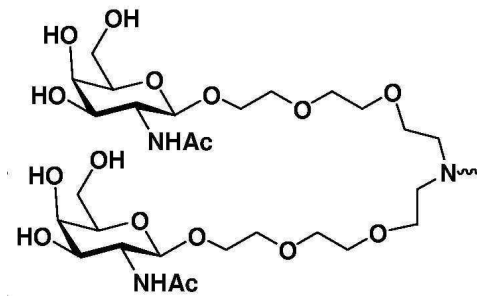
[0187] 하나의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 탄수화물 접합체는 모노사카라이드이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 탄수화물 접합체는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:



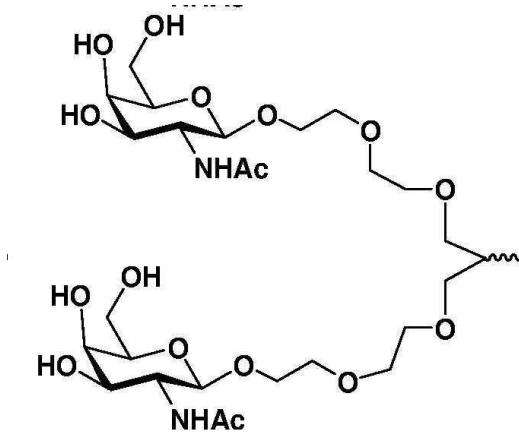
[0188] 화학식 II,



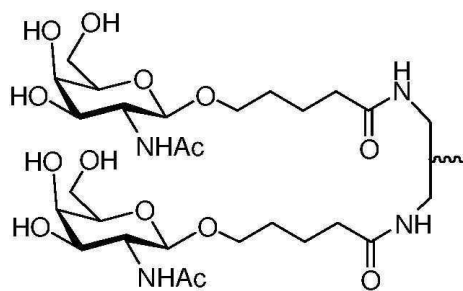
[0189] 화학식 III,



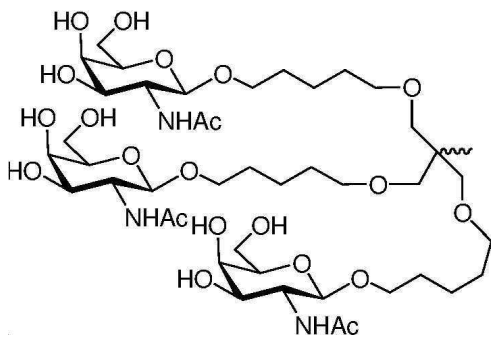
[0190] 화학식 IV,



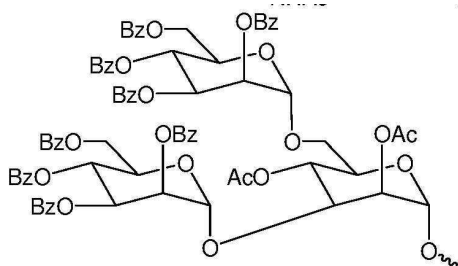
[0191] 화학식 V,



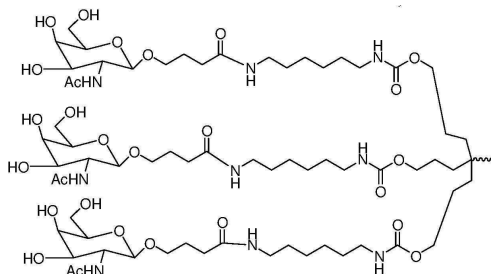
[0192] 화학식 VI,



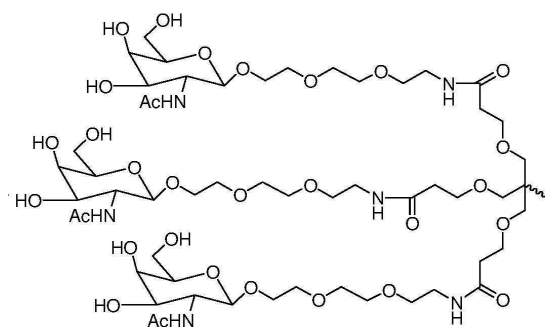
[0193] 화학식 VII,



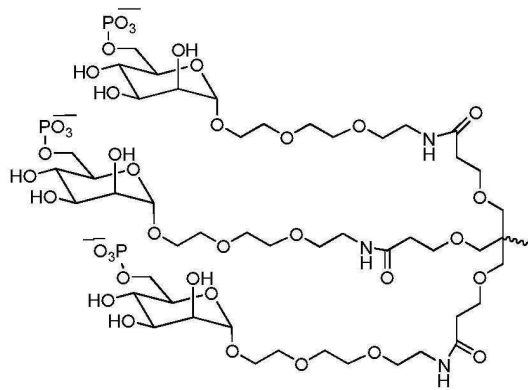
[0194] 화학식 VIII,



[0195] 화학식 IX,

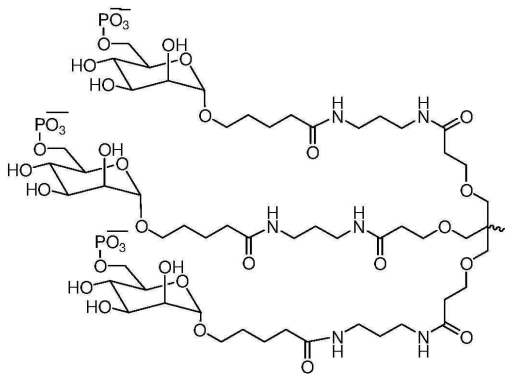


[0196] 화학식 X,



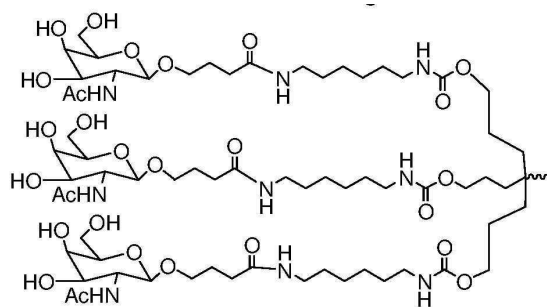
[0197]

화학식 XI,



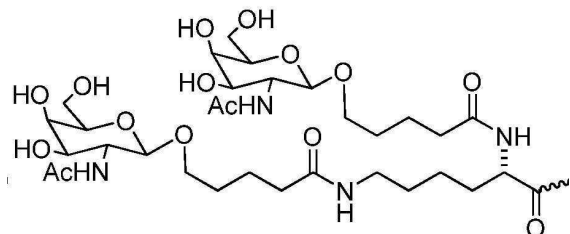
[0198]

화학식 XII,



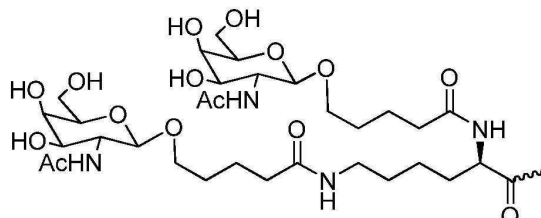
[0199]

화학식 XIII,



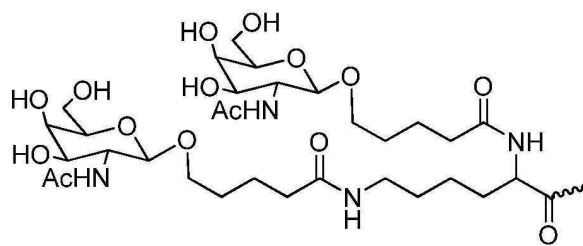
[0200]

화학식 XIV,

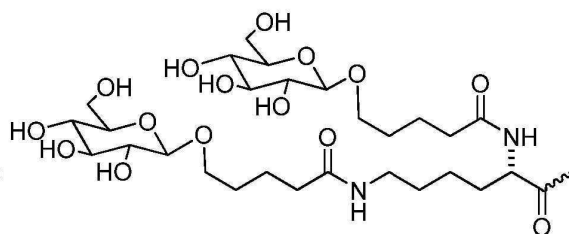


[0201]

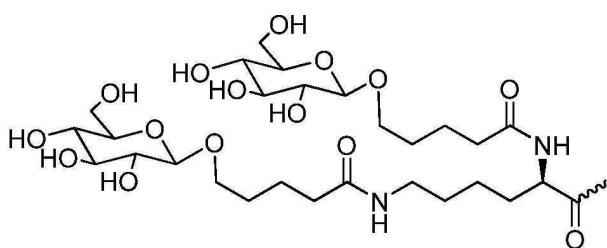
화학식 XV,



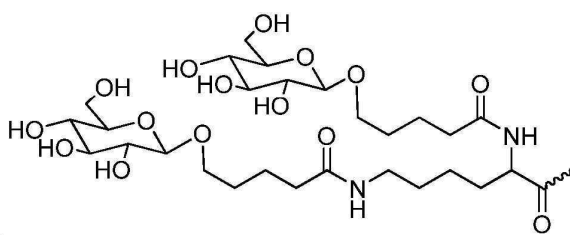
[0202] 화학식 XVI,



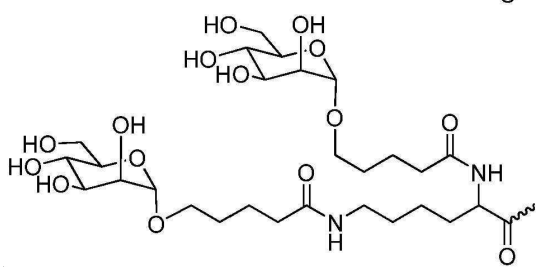
[0203] 화학식 XVII,



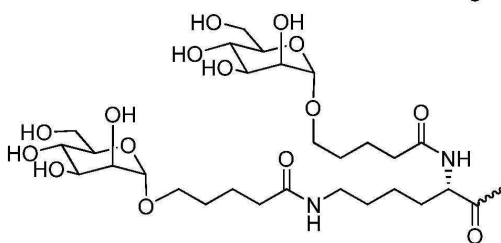
[0204] 화학식 XVIII,



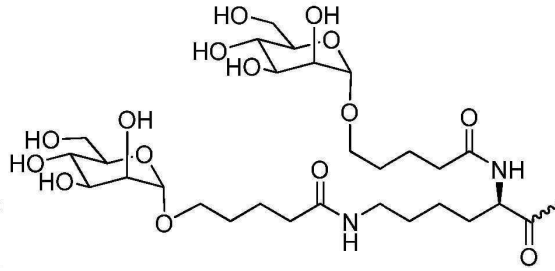
[0205] 화학식 XIX,



[0206] 화학식 XX,

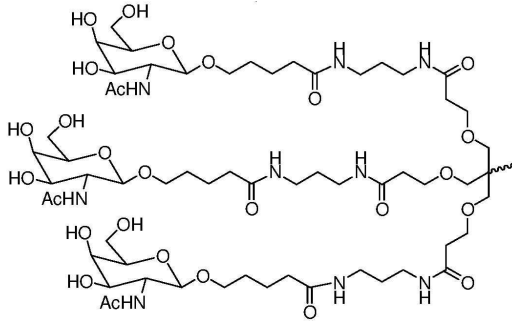


[0207] 화학식 XXI,



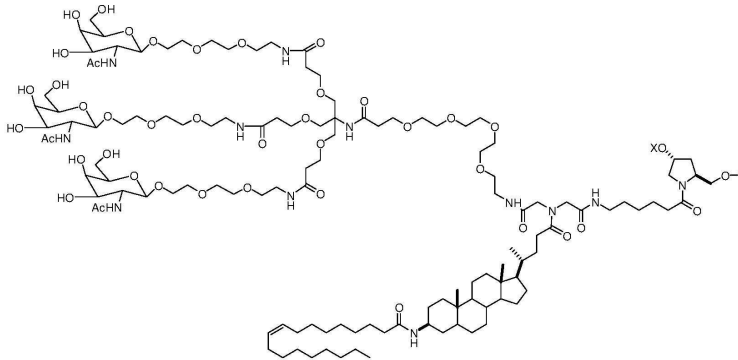
화학식 XXII.

하나의 구현예에서, 모노사카라이드는 N-아세틸갈락토사민, 예를 들어,



화학식 II이다.

본원에 기재된 구현예에 사용하기 위한 또 다른 대표적인 탄수화물 접합체는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:



(화학식 XXIII), X 또는 Y 중 하나가

올리고뉴클레오타이드인 경우, 다른 하나는 수소이다.

본 발명의 특정 구현예에서, GalNAc 또는 GalNAc 유도체는 1가 링커를 통해 본 발명의 iRNA 제제에 부착된다. 일부 구현예에서, GalNAc 또는 GalNAc 유도체는 2가 링커를 통해 본 발명의 iRNA 제제에 부착된다. 본 발명의 또 다른 구현예에서, GalNAc 또는 GalNAc 유도체는 3가 링커를 통해 본 발명의 iRNA 제제에 부착된다.

하나의 구현예에서, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 제제는 iRNA 제제에 부착된 하나의 GalNAc 또는 GalNAc 유도체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 제제는 다수의 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 또는 6개) GalNAc 또는 GalNAc 유도체를 포함하고, 각각은 독립적으로 다수의 1가 링커를 통해 이중가닥 RNAi 제제의 다수의 뉴클레오타이드에 부착되어 있다.

일부 구현예에서, 예를 들어, 본 발명의 iRNA 제제의 2개의 가닥이 한 가닥의 3'-말단과 각각의 다른 가닥의 5'-말단 사이에 중단되지 않은 뉴클레오타이드 세에 의해 연결되어 다수의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 헤어핀 루프를 형성하는 하나의 더 큰 분자의 일부인 경우, 헤어핀 루프 내의 각각의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드는 1가 링커를 통해 부착된 GalNAc 또는 GalNAc 유도체를 독립적으로 포함할 수 있다. 헤어핀 루프는 또한 듀플렉스의 하나의 가닥에 연장된 오버행에 의해 형성될 수 있다.

일부 구현예에서, 탄수화물 접합체는 추가로 상기된 바와 같은 하나 이상의 추가의 리간드, 이에 제한되지 않지만 예를 들어, PK 조절제 또는 세포 투과 펩타이드를 포함한다.

본 발명에 사용하기 위해 적합한 추가의 탄수화물 접합체는 PCT 공개공보 WO 2014/179620 및 WO 2014/179627에 기재된 것들을 포함하고, 이의 각각의 전문은 본원에 참조로 인용된다.

- [0218] B. 링커
- [0219] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 접합체 또는 리간드는 절단될 수 있거나 절단되지 않을 수 있는 다양한 링커를 사용하여 iRNA 올리고뉴클레오타이드에 부착될 수 있다.
- [0220] 용어 "링커" 또는 "연결 그룹"은 화합물의 두 부분을 연결하는, 예를 들어 화합물의 두 부분을 공유적으로 부착시키는 유기 모이어티를 의미한다. 링커는 전형적으로 직접적인 결합 또는 산소 또는 황과 같은 원자, 유닛, 예를 들어 NR8, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH 또는 원자 쌍을 포함하고, 이제 제한되지 않지만 예를 들어, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 아릴알킬, 아릴알케닐, 아릴알키닐, 헤테로아릴알킬, 헤테로아릴알케닐, 헤테로아릴알키닐, 헤테로사이클릴알킬, 헤테로사이클릴알케닐, 헤테로사이클릴알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알킬아릴알킬, 알킬아릴알케닐, 알킬아릴알키닐, 알케닐아릴알킬, 알케닐아릴알케닐, 알케닐아릴알키닐, 알키닐아릴알킬, 알키닐아릴알케닐, 알키닐아릴알키닐, 알킬헤테로아릴알킬, 알킬헤테로아릴알케닐, 알킬헤테로아릴알키닐, 알케닐헤테로아릴알킬, 알케닐헤테로아릴알케닐, 알케닐헤테로아릴알키닐, 알키닐헤테로아릴알킬, 알키닐헤테로아릴알케닐, 알키닐헤테로아릴알키닐, 알킬헤테로사이클릴알킬, 알킬헤테로사이클릴알케닐, 알킬헤테로사이클릴알키닐, 알케닐헤테로사이클릴알킬, 알케닐헤테로사이클릴알케닐, 알케닐헤테로사이클릴알키닐, 알키닐헤테로사이클릴알킬, 알키닐헤테로사이클릴알케닐, 알키닐헤테로사이클릴알키닐, 알킬아릴, 알케닐아릴, 알키닐아릴, 알킬헤테로아릴, 알케닐헤테로아릴, 알키닐헤테로아릴을 포함하고, 여기서 하나 이상의 메틸렌은 O, S, S(O), SO₂, N(R8), C(O), 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릭에 의해 중단되거나 말단화될 수 있고; 여기서, R8은 수소, 아실, 지방족 또는 치환된 지방족이다. 하나의 구현예에서, 링커는 약 1-24개 원자, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18개 원자, 7-17, 8-17, 6-16, 7-17, 또는 8-16개 원자이다.
- [0221] 절단가능한 연결 그룹은 세포 외부에서 충분히 안정할 수 있지만 표적 세포로 진입이 절단되어 링커가 함께 유지하고 있는 2개의 부분을 방출시키는 그룹이다. 하나의 구현예에서, 절단 가능한 연결 그룹은 대상체의 혈액에서 또는 제2 참조 조건 (예를 들어, 혈액 또는 혈청 중에서 발견되는 조건을 모방하거나 나타내는 것으로 선택될 수 있는)하에서 보다 표적 세포에서 또는 제1 참조 조건 (예를 들어, 세포내 조건을 모방하거나 나타내도록 선택될 수 있는)하에서 적어도 약 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 이상 또는 적어도 약 100배 신속하게 절단된다.
- [0222] 절단가능한 연결 그룹은 절단제, 예를 들어, pH, 산화환원 전위 또는 분해 분자의 존재에 민감할 수 있다. 일반적으로, 절단제는 혈청 또는 혈액에서 보다 세포 내부에서 보다 높은 수준 또는 활성인 상태로 보다 만연되어 있거나 발견된다. 상기 분해제의 예는 다음을 포함한다: 특정 기질에 대해 선택되거나 어떠한 기질 특이성을 갖지 않는 산화환원제로서, 이는 예를 들어, 산화 또는 환원 효소 또는 환원제, 예를 들어, 환원에 의해 산화환원 절단가능한 연결 그룹을 분해시킬 수 있는 세포에 존재하는 머캡탄을 포함하는 산화환원제; 에스테라제; 엔도솜 또는 산성 환경을 생성시킬 수 있는 제제, 예를 들어, 5 이하의 pH를 유도하는 것들; 일반산으로서 작용함에 의해 산 절단가능한 연결 그룹을 가수분해시키거나 분해할 수 있는 효소, 펩티다제 (이는 기질 특이적일 수 있다), 및 포스포타제.
- [0223] 절단가능한 연결 그룹, 예를 들어, 디설파이드 결합은 pH에 민감할 수 있다. 사람 혈청의 pH는 7.4이고, 평균 세포내 pH는 약간 보다 낮아 약 7.1-7.3이다. 엔도솜은 5.5-6.0의 범위에서 보다 산성의 pH를 갖고, 리소솜은 약 5.0에서 심지어 보다 산성의 pH를 갖는다. 일부 링커는 선택된 pH에서 절단되어 세포 내부의 리간드로부터 양이온성 지질을 방출하거나 세포의 목적하는 구획으로 양이온성 지질을 방출하는 절단가능한 연결 그룹을 갖는다.
- [0224] 링커는 특정 효소에 의해 절단될 수 있는 절단가능한 연결 그룹을 포함할 수 있다. 링커로 혼입된 절단가능한 연결 그룹의 유형은 표적화될 세포에 의존할 수 있다. 예를 들어, 간-표적화 리간드는 에스테르 그룹을 포함하는 링커를 통해 양이온성 지질에 연결될 수 있다. 간 세포에는 에스테라제가 풍부하고, 따라서 링커는 에스테라제가 풍부하지 않은 세포 유형에서 보다 간 세포에서 보다 효율적으로 절단된다. 에스테라제가 풍부한 다른 세포 유형은 폐, 신피질 및 고환의 세포를 포함한다.
- [0225] 펩타이드 결합을 함유하는 링커는 간 세포 및 활막세포와 같은 펩티다제가 풍부한 세포 유형을 표적화하는 경우 사용될 수 있다.
- [0226] 일반적으로, 후보 절단가능한 연결 그룹의 적합성은 후보 연결 그룹을 절단하는 분해제(또는 조건)의 능력을 시

협함으로써 평가될 수 있다. 또한 혈액 내에서 또는 다른 비표적 조직과 접촉할 때 절단에 저항하는 능력에 대해 후보 절단가능한 연결 그룹을 테스트하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 당업자는 제1 조건과 제2 조건 사이의 절단에 대한 상대적인 감수성을 결정할 수 있고, 여기서 제1 조건은 표적 세포에서 절단을 나타내도록 선택되고, 제2 조건은 다른 조직 또는 생물학적 유체, 예를 들어 혈액 또는 혈청 내 절단을 나타내도록 선택된다. 평가는 무세포 시스템, 세포, 세포 배양물, 기관 또는 조직 배양물 또는 전체 동물에서 수행될 수 있다. 무세포 또는 배양 조건에서 초기 평가를 수행하고 전체 동물에서 추가의 평가에 의해 확인하기 위해 유용할 수 있다. 일부 구현예에서, 유용한 후보 화합물은 혈액 또는 혈청 (또는 세포외 조건을 모방하도록 선택된 시험관 내 조건하에서)과 비교하여 세포(또는 세포내 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건하에서)에서 적어도 약 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 약 100배 이상 신속하게 절단된다.

[0227] *i. 산화환원 절단가능한 연결 그룹*

[0228] 하나의 구현예에서, 절단가능한 연결 그룹은 환원 또는 산화시 절단되는 산화환원 절단가능한 연결 그룹이다. 환원 절단가능한 연결 그룹의 예는 디설파이드 연결 그룹 (-S-S-)이다. 후보 절단 가능한 연결 그룹이 적합한 "환원적으로 절단가능한 연결 그룹"인지 또는 예를 들어 특정 iRNA 모이어티 및 특정 표적화제와 함께 사용하기에 적합한지의 여부를 결정하기 위해, 당업자는 본원에 기재된 방법을 살펴볼 수 있다. 예를 들어, 후보물은 세포, 예를 들어 표적 세포에서 관찰되는 절단 속도를 모방하는 당업계에 공지된 시약을 사용하여 디티오프로티톨(DTT) 또는 기타 환원제를 사용한 항온처리에 의해 평가될 수 있다. 후보물은 또한 혈액 또는 혈청 조건을 모방하도록 선택된 조건 하에서 평가될 수 있다. 하나에서, 후보 화합물은 혈액에서 최대 약 10%까지 절단된다. 다른 구현예에서, 유용한 후보 화합물은 혈액 (또는 세포외 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건하에서)과 비교하여 세포(또는 세포내 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건하에서)에서 적어도 약 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 약 100배 보다 신속하게 분해된다. 후보 화합물의 절단 속도는 세포내 배지를 모방하도록 선택된 조건 및 세포외 배지를 모방하도록 선택된 조건과 비교하여 표준 효소 동역학 검정을 사용하여 결정될 수 있다.

[0229] *ii. 포스페이트 기반 절단가능한 연결 그룹*

[0230] 특정 구현예에서, 절단가능한 링커는 포스페이트 기반 절단가능한 연결 그룹을 포함한다. 포스페이트 기반 절단가능한 연결 그룹은 포스페이트 그룹을 분해하거나 가수분해하는 제제에 의해 절단된다. 세포에서 포스페이트 그룹을 절단하는 제제의 예는 세포 내 포스파타제와 같은 효소이다. 포스페이트 기반 연결 그룹의 예는 -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S이고, 여기서 Rk는 각각 독립적으로 C1-C20 알킬, C1-C20 할로알킬, C6-C10 아릴, 또는 C7-C12 아릴알킬일 수 있다. 예시적인 구현예는 -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, 및 -O-P(S)(H)-S-를 포함한다. 하나의 구현예에서, 포스페이트 기반 연결 그룹은 -O-P(O)(OH)-O-이다. 이들 후보물은 상기된 것들과 유사한 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0231] *iii. 산 절단가능한 연결 그룹*

[0232] 특정 구현예에서, 절단가능한 링커는 산 절단가능한 연결 그룹을 포함한다. 산 절단가능한 연결 그룹은 산성 조건하에서 절단되는 연결 그룹이다. 일부 구현예에서, 산 절단가능한 연결 그룹은 pH가 약 6.5 이하 (예를 들어, 약 6.0, 5.75, 5.5, 5.25, 5.0 이하)인 산성 환경에서 또는 일반 산으로서 작용할 수 있는 효소와 같은 제제에 의해 절단된다. 세포에서 엔도솜 및 리소솜과 같은 특정 낮은 pH 기관은 산 절단 가능한 연결 그룹에 대한 절단 환경을 제공할 수 있다. 산 절단가능한 연결 그룹의 예는 하이드라존, 에스테르, 및 아미노산의 에스테르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 산 절단가능한 그룹은 화학식 -C=NN-, C(O)O, 또는 -OC(O)를 가질 수 있다. 예시적인 구현예는 에스테르의 산소에 부착된 탄소 (알콕시 그룹)가 아릴 그룹, 치환된 알킬 그룹 또는 3급 알킬 그룹, 예를 들어, 디메틸 펜틸 또는 t-부틸인 경우이다. 이들 후보물은 상기된 것들과 유사한 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0233] *iv. 에스테르 기반 연결 그룹*

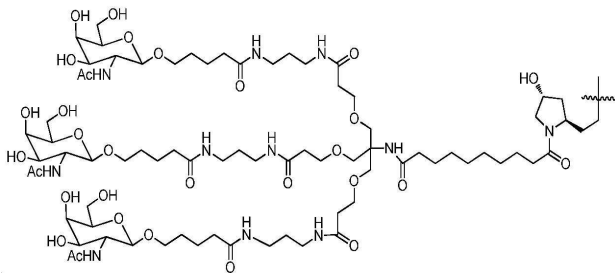
[0234] 또 다른 구현예에서, 절단가능한 링커는 에스테르 기반 절단가능한 연결 그룹을 포함한다. 에스테르 기반 절단가능한 연결 그룹은 세포내 에스테라제 및 아미다제와 같은 효소에 의해 절단된다. 에스테르 기반 절단가능한

연결 그룹의 예는 알킬렌, 알케닐렌 및 알키닐렌 그룹의 에스테르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 에스테르 절단가능한 연결 그룹은 일반식 $-C(O)O-$ 또는 $-OC(O)-$ 를 갖는다. 이들 후보물은 상기된 것들과 유사한 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

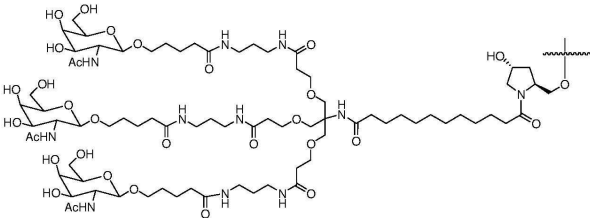
v. 펩타이드-기반 절단 그룹

여전히 또 다른 구현예에서, 절단가능한 링커는 펩타이드 기반 절단가능한 연결 그룹을 포함한다. 펩타이드 기반 절단가능한 연결 그룹은 세포에서 펩티다제 및 프로테아제와 같은 효소에 의해 절단된다. 펩타이드 기반 절단가능한 연결 그룹은 아미노산 사이에 형성된 펩타이드 결합이고 올리고펩타이드 (예를 들어, 디펩타이드, 트리펩타이드 등) 및 폴리펩타이드를 생성한다. 펩타이드 기반 절단가능한 그룹은 아마이드 그룹 ($-C(O)NH-$)을 포함하지 않는다. 아마이드 그룹은 임의의 알킬렌, 알케닐렌 또는 알키닐렌 사이에 형성될 수 있다. 펩타이드 결합은 아미노산 사이에 형성된 특별한 유형의 아마이드 결합이고 펩타이드 및 단백질을 생성한다. 펩타이드 기반 절단 그룹은 일반적으로 펩타이드 및 단백질을 생성하는 아미노산 사이에 형성된 펩타이드 결합 (즉, 아마이드 결합)으로 제한되고, 전체 아마이드 기능성 그룹을 포함하지 않는다. 펩타이드-기반 절단가능한 연결 그룹은 일반 화학식 $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ 을 갖고, 여기서, RA 및 RB는 2개의 인접한 아미노산의 R 그룹이다. 이들 후보물은 상기된 것들과 유사한 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

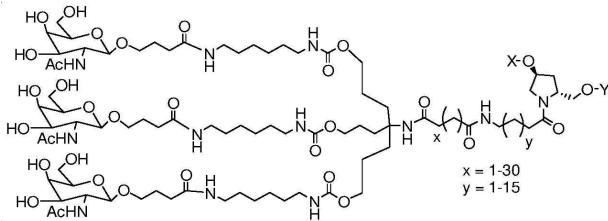
하나의 구현예에서, 본 발명의 iRNA는 링커를 통해 탄수화물에 접합된다. 본 발명의 조성물 및 방법의 링커와 iRNA 탄수화물 접합체의 비제한적인 예는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:



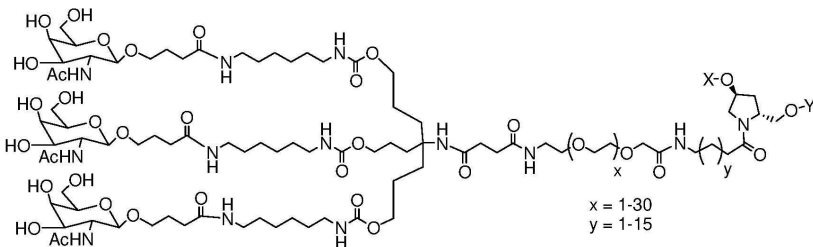
(화학식 XXIV),



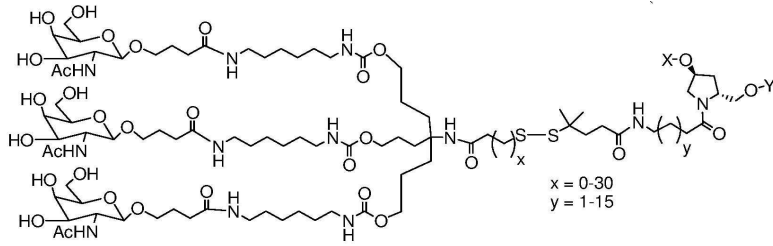
(화학식 XXV),



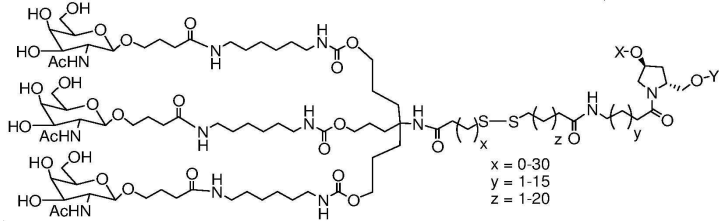
(화학식 XXVI),



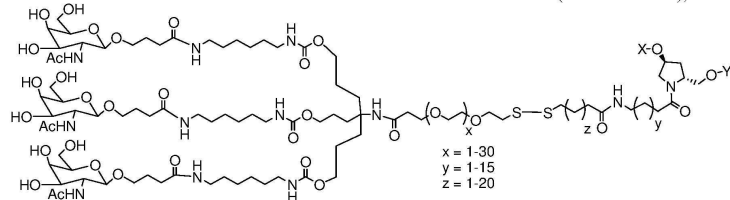
(화학식 XXVII),



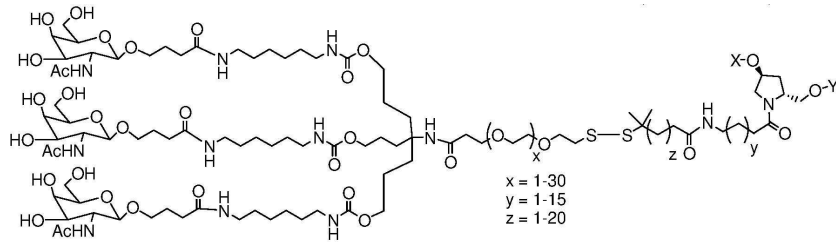
(화학식 XXVIII),



(화학식 XXIX),



(화학식 XXX), 및



(화학식 XXXI),

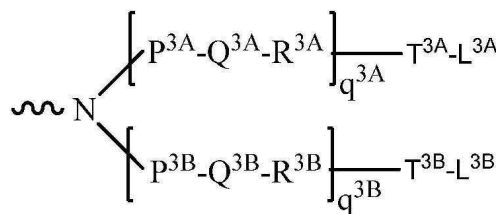
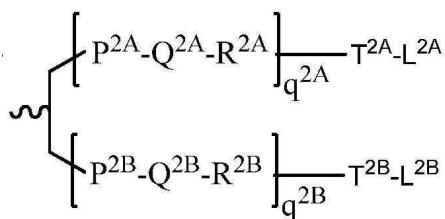
X 또는 Y 중 하나가 올리고뉴클레오타이드인 경우, 다른 하나는 수소이다.

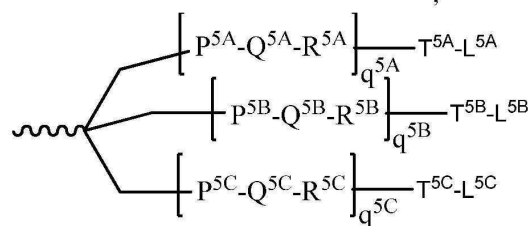
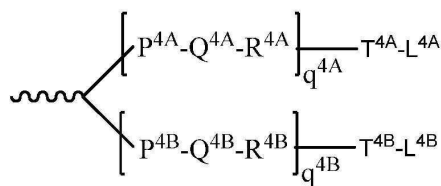
본 발명의 조성물 및 방법의 특정 구현예에서, 리간드는 2가 또는 3가 측쇄 링커를 통해 부착된 하나 이상의 “GalNAc” (N-아세틸갈락토사민) 유도체이다.

하나의 구현예에서, 본 발명의 dsRNA는 임의의 화학식 (XXXII) - (XXXV)으로 나타낸 구조의 그룹으로부터 선택된 2가 또는 3가 측쇄 링커에 접합된다:

화학식 XXXII

화학식 XXXIII





화학식 XXXIV

화학식 XXXV

여기서:

q2A, q2B, q3A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B 및 q5C는 독립적으로 각각 0 내지 20을 나타내고, 여기서, 반복 단위는 동일하거나 상이할 수 있고;

P^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{4A}, T^{5B}, T^{5C}는 각각 독립적으로 부재이거나 CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH 또는 CH₂O이고;

Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C}는 각각 독립적으로 부재이거나, 알킬렌, 치환된 알킬렌이고, 여기서 하나 이상의 메틸렌은 O, S, S(O), SO₂, N(R'^N), C(R')=C(R''), C≡C 또는 C(O) 중 하나 이상에 의해 중단되거나 말단화될 있고;

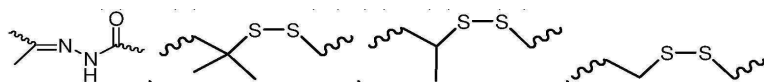
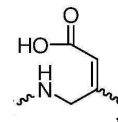
R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C}는 각각 독립적으로 부재이거나, NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH,

NHCH(R^a)C(O),

-C(O)-CH(R^a)-NH-,

CO,

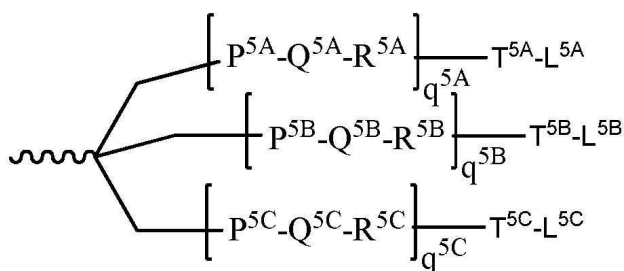
CH=N-O,



또는 헤테로사이클릴이고;

L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} 및 L^{5C}는 리간드, 즉, 각각 독립적으로 모노사카라이드 (예를 들어, GalNAc), 디사카라이드, 트리사카라이드, 테트라사카라이드, 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드이고; R^a는 H 또는 아미노산 측쇄이다. 3가 접합 GalNAc 유도체는 특히 화학식 XXXVI의 것들과 같은 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 제제와 함께 사용하기 위해 유용하다:

화학식 XXXVI



여기서 L^{5A}, L^{5B} 및 L^{5C}는 GalNAc 유도체와 같은 모노사카라이드를 나타낸다.

GalNAc 유도체를 접합시키는 적합한 2가 및 3가 측쇄 링커 그룹의 예는 화학식 II, VII, XI, X, 및 XIII로서 상기된 구조를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

RNA 접합체의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 제4,828,979호; 제4,948,882호; 제5,218,105호; 제5,525,465호; 제5,541,313호; 제5,545,730호; 제5,552,538호; 제5,578,717호; 제5,580,731호; 제5,591,584호; 제5,109,124호; 제5,118,802호; 제5,138,045호; 제5,414,077호; 제5,486,603호;

제5,512,439호; 제5,578,718호; 제5,608,046호; 제4,587,044호; 제4,605,735호; 제4,667,025호;
제4,762,779호; 제4,789,737호; 제4,824,941호; 제4,835,263호; 제4,876,335호; 제4,904,582호;
제4,958,013호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,082,830호; 제5,112,963호;
제5,214,136호; 제5,245,022호; 제5,254,469호; 제5,258,506호; 제5,262,536호; 제5,272,250호;
제5,292,873호; 제5,317,098호; 제5,371,241호; 제5,391,723호; 제5,416,203호; 제5,451,463호;
제5,510,475호; 제5,512,667호; 제5,514,785호; 제5,565,552호; 제5,567,810호; 제5,574,142호;
제5,585,481호; 제5,587,371호; 제5,595,726호; 제5,597,696호; 제5,599,923호; 제5,599,928호;
제5,688,941호; 제6,294,664호; 제6,320,017호; 제6,576,752호; 제6,783,931호; 제6,900,297호;
제7,037,646호; 및 제8,106,022호를 포함하지만 이에 제한되지 않고, 이들 각각의 전문은 본원에 참조로 인용된다.

[0268] 주어진 화합물의 모든 위치가 균일하게 변형될 필요는 없고, 실제로 상기한 변형 중 하나 이상은 단일 화합물 또는 심지어 iRNA 내의 단일 뉴클레오타이드에 도입될 수 있다. 본 발명은 또한 키메라 화합물인 iRNA 화합물을 포함한다.

[0269] VI. 본 발명의 iRNA의 전달

[0270] 세포, 예를 들어, 사람 대상체(예를 들어, 이를 필요로 하는 대상체, 예를 들어, 접촉 활성화 경로 유전자 발현과 관련된 질환, 장애 또는 병태를 갖는 대상체) 내 세포로의 본 발명의 iRNA의 전달은 다수의 상이한 방식으로 성취될 수 있다. 예를 들어, 전달은 세포를 본 발명의 iRNA와 시험관내 또는 생체내 접촉시킴에 의해 수행될 수 있다. 생체내 전달은 또한 iRNA, 예를 들어, dsRNA를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함에 의해 직접적으로 수행될 수 있다. 전달은 예를 들어 정맥내 투여 또는 피하 투여에 의해 수행될 수 있다. 특정 구현예에서, iRNA 제제는 피하 투여에 의해 전달된다. 특정 구현예에서, iRNA 제제는 사전 충전된 주사기 또는 자동-주사기 장치를 사용한 자가 투여에 의해 투여된다.

[0271] 일반적으로, 핵산 분자를 전달(시험관내 또는 생체내)하는 임의의 방법은 본 발명의 iRNA와 함께 사용하기 위해 채택될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell.Biol.*2(5):139-144 및 W09402595, 이의 전문은 본원에 참조로 인용된다). 생체내 전달을 위해, iRNA 분자를 전달하기 위해 고려할 인자들은 예를 들어, 전달된 분자의 생물학적 안정성, 비-특이적 효과의 예방, 및 표적 조직에서 전달된 분자의 축적을 포함한다.

[0272] VII. 본 발명의 약제학적 조성물

[0273] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 사용하기 위해 본원에 기재된 iRNA를 포함하는 약제학적 조성물 및 제형을 포함한다. 하나의 구현예에서, 본원에서는 본원에 기재된 바와 같은 iRNA 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하는 약제학적 조성물이 제공된다. iRNA를 함유하는 약제학적 조성물은 TTR 유전자의 발현 또는 활성과 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위해 유용하다. 상기 약제학적 조성물은 전달 방식을 기준으로 제형화된다. 하나의 예는 비경구 전달을 통한, 예를 들어 피하(SC) 또는 정맥내(IV) 전달에 의한 전신 투여용으로 제형화된 조성물이다. 본 발명의 약제학적 조성물은 TTR 유전자의 발현을 억제하기에 충분한 용량으로 투여될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 iRNA 제제, 예를 들어 dsRNA 제제는 약제학적으로 허용되는 담체 중에서 피하 투여용으로 제형화된다.

[0274] 다른 구현예에서, 약제학적 조성물의 단일 용량은 장기간 지속되어 후속 용량은 1개월 간격, 1, 2, 3, 또는 4개월 이하의 간격 또는 분기별(약 3개월 마다) 간격으로 투여된다. 본 발명의 일부 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 단일 용량은 1개월 마다 1회 투여된다. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 단일 용량은 격일로 1회 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 단일 용량은 분기별로, 즉 3개월 마다 1회 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 단일 용량은 4개월 마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 단일 용량은 5개월 마다 1회 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 단일 용량은 6개월 마다 1회 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 단일 용량은 12개월 마다 1회 투여된다.

[0275] VIII. 키트

[0276] 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 방법을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 하나 이상의 이중 가닥 RNAi 제제(들) 및 본 발명의 경우 임의의 방법에서 사용하기 위한 이중 가닥 제제(들)의 사용 지침을 제공하는 표지를 포함한다. 키트는 임의로 세포를 RNAi 제제와 접촉시키기 위한 수단(예를 들어, 주사 장치 또는 주

입 펌프), 또는 TTR의 억제제를 측정하기 위한 수단(예를 들어, TTR mRNA 또는 TTR 단백질의 억제제를 측정하기 위한 수단)을 추가로 포함할 수 있다. TTR의 억제제를 측정하기 위한 상기 수단은 예를 들어 혈장 샘플과 같은 대상체로부터 샘플을 수득하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 임의로 추가로 RNAi 제제(들)을 대상체에게 투여하기 위한 수단 또는 치료학적 유효량 또는 예방학적 유효량을 결정하기 위한 수단을 포함할 수 있다.

[0277] RNAi 제제는 재현탁 및 주사를 위한 멸균수 용액 또는 기타 적절한 용액, 예를 들어 PBS, 생리 식염수, 5mM 포스페이트 완충액과 같은 임의의 편리한 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, RNAi 제제는 주사용 멸균수 중 물 또는 다른 적절한 용액과 함께 300 mg, 200 mg, 100 mg, 또는 50 mg 바이알로 제공될 수 있다. 특정 구현예에서, RNAi 제제는 적절한 용적의 투여용 부형제 중에 300mg, 200mg, 100mg, 또는 50mg의 RNAi 제제를 함유하는 사전 충전된 주사기 또는 자가주사기를 포함하는 자가 투여용 키트로 제공되며, 임의로 추가로 사용 지침서를 포함한다. 특정 구현예에서, RNAi 제제는 약 동일한 시간에, 예를 들어, 1주 이내, 1일 이내, 1시간 이내에 제공되는 다중 주사에 의한 용량의 투여를 위한 다중 바이알 또는 장치에 제공될 수 있다.

[0278] IX. TTR 아밀로이드증 다발신경병증 진단 및 질환 부담 평가

[0279] TTR 아밀로이드증은 복잡한 다인성 질환이다. TTR-FAP의 진행을 모니터링하기 위해 기준의 확장 목록이 사용되었다: 신경병증 손상 스코어(NIS), NIS + 7, 및 변형된 NIS(mNIS) + 7 및 mNIS + 7_{Ionis}. 이들 진단학적 기준은 당업계에 널리 공지되어 있고 기준의 주요 내용은 하기에 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, TTR-FAP의 진단 기준을 충족시키는 것은 유전성 TTR-FAP와 관련된 돌연변이의 존재 여부에 관계없이 FAP 단계 1 기준을 충족시키는 것으로 이해된다. 신경병증 지표의 진행은 변형된 신경병증 손상 스코어(mNIS) + 7에서 최소 2점의 증가로서 간주된다.

[0280] 가족성 아밀로이드 다발신경병증(FAP) 단계.

[0281] 문헌(참조: Coutinho et al.)은 hATTR(이전에는 가족성 아밀로이드 신경병증이라고 함)의 신경병증 증상에 대한 임상 병기(staging) 시스템을 개발하였다. 스케일은 다음과 같이 1 내지 3의 범위이다(문헌참조: Ando et al. Orphanet J Rare Dis. 2013;8:31): FAP 단계 1: 도움 없이 걷기, 하지의 경미한 신경병증(감각, 자율신경 및 운동).

[0282] FAP 단계 2: 도움을 받아 걷기, 하지, 몸통 및 상지의 중등도 장애.

[0283] FAP 단계 3: 휠체어 또는 침대에 의지, 중증 신경병증.

[0284] 신경병증이 없는 대상체는 FAP 단계 0인 것으로 고려된다.

[0285] 신경병증 손상 스코어링 방법

[0286] 신경병증을 평가하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 마요 클리닉 신경학적 조사 시트(Mayo Clinic Neurologic Examination Sheet)와 신경병증 손상 스코어(Neuropathy Impairment Score)(NIS)의 최약 서브스코어에서도 최약(NIS-W)은 1에서 4점까지 25% 감소율로 스코어링하고, 별도로 신체의 각 측면의 주요 근육 그룹에 대해 스코어링한다(문헌참조: Dyck et al., Quantitating overall neuropathic symptoms, impairments, and outcomes. In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. Peripheral neuropathy. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005. p. 1031-52). 광범위한 그룹, 특히 두개골, 근위 및 말단 사지 근육은 NIS-W에서 최대 스코어 192점으로 평가된다. 주요 5개 근육 스트레치 반사의 감소는 일반적으로 신경과 전문의에 의해 평가되고, 발과 손의 촉각, 진동, 관절 운동 및 핀 찌르는 감각은 마요 클리닉 신경학적 조사 시트(Mayo Clinic Neurology Examination Sheet)에서 25% 감소율 및 1에서 4로 스코어링된다. 반사(NIS-R) 및 감각(NIS-S)의 NIS를 완료하기 위해 마요 클리닉 기록 스코어는 NIS 점수 스코어로 전환된다(즉, 마요 클리닉 스코어 1 또는 2는 NIS 점수 스코어 1에 부여되고 마요 클리닉 스코어 3 또는 4는 NIS 스코어 2에 부여된다). 따라서 신경과 전문의(NIS-R)가 평가하는 일반적인 반사의 최대 NIS 스코어는 $5 \times 2 \times 2 = 20$ 점이고 신경과 전문의(NIS-S)가 흔히 평가하는 4가지 감각 양식은 $8 \times 2 \times 2 = 32$ 점이다. 따라서, 최대 NIS 스코어는 $192 + 20 + 32 = 244$ 점이다. NIS는 이전의 간행물에 기재되었다(문헌참조: Dyck et al. 2005 and Dyck et al., Neurol. 1997;49:229-39).

[0287] NIS + 7은 당뇨병성 감각운동 다발신경병증, TTR FAP 및 기타 일반화된 감각운동 다발신경병증의 시험에서 1차 또는 공동 1차 결과 척도로 사용되었다(문헌참조: N. Suanprasert et al. J Neurol Sci 344 (2014) 121-128). NIS + 7은 단지 반사에 대한 천정 효과를 최소화하면서 근육 최약 및 근육 스트레치 반사 이상의 등급화된 증중도를 적절하게 평가한다. NIS + 7에서 7개 시험 중 5개는 신경 전도의 특성으로, 정상 편차(Z 스코어) 또는 점

수로 표시된다. NIS + 7에 포함된 특성은 이들의 이상이 당뇨병성 감각운동 다발신경병증을 민감하게 검출하기 때문에 선택되었다(문헌참조: Dyck et al. Muscle Nerve 2003;27(2):202-10). 포함된 특성은 비골 신경 복합 근육 활동 전위 (CMAP) 진폭, 운동 신경 전도 속도(MNCV) 및 운동 신경 원위 잠복기(MNDL), 경골 MNDL 및 비복 감각 신경 활동 전위(SNAP) 진폭이다. 이들의 측정된 값은 대형의 건강한 대상체 참조 코호트에 대한 보다 이른 연구를 기반으로 하는 연령, 성별, 키 또는 체중의 해당 변수를 보정하는 퍼센트 값에서 정상 편차로 전환될 수 있다. 추가로, 이들 퍼센트 값은 수득된 퍼센트 값(즉, N5th = 0점, ≤5th-N 1st = 1점 및 ≤1st = 2점)에서 NIS 점수로 표현할 수 있다(이상이 정상적인 분포의 상부 테일에 있는 경우에도 유사하게).

[0288] 쇠약 및 반사 이상 평가, 감각 상실 평가, 자율신경계 기능부전 및 신경 생리학적 시험 이상은 TTR FAP 시험에 사용하기 위해 NIS + 7에 의해 적절하게 평가되지 않는다. NIS + 7에서 감각 상실은 최적으로 평가되지 않는다: 1) 감각 상실의 신체 분포가 적절하게 고려되지 않고, 2) 소형 섬유에 비해 큰 감각 상실이 지나치게 강조되고, 3) 임상 평가보다 개선된 시험 방법 및 참조값과의 비교가 선호된다. 또한 심박수 심호흡(HRdb)만을 사용해서는 자율신경계 기능부전이 적절하게 평가되지 않는다. NIS + 7을 평가하기 위해 사용되는 신경 전도의 특성은 TTR FAP 연구에 이상적이지 않다.

[0289] 신경병증 손상 스코어 +7(mNIS+7) 및 NIS + 7의 업데이트 버전은 운동 강도, 반사, 감각, 신경 전도 및 자율 기능을 측정하는 복합 스코어이다. 상기 복합 측정의 2개의 버전은 다발신경병증이 있는 hATTR 아밀로이드증을 더 잘 반영하기 위해 NIS+7에서 조정되었고, 이노터센 및 파티시란 임상 시험에서 1차 결과로서 사용되었다. 이들 2개의 버전과 다른 신경병증 스코어링 시스템 간의 주요 차이점은 하기 표에 요약되어 있다(문헌참조: Adams et al., BMC Neurology, volume 17, Article number: 181 (2017)). 2개 스케일에서 점수가 낮을수록 신경계 기능이 더 우수함을 나타낸다(예를 들어, 스코어 증가는 신경계 손상의 악화를 반영한다).

신경병증 손상 스코어 기준

	NIS-LL	NIS	NIS+7	mNIS+7	mNIS+7 _{10nls}
총 스코어 평가 (스코어)	88	244	270	304	346.3
운동 강도/쇠약	신경학적 검사 [하지만] (64)	신경학적 검사 (192)	신경학적 검사 (192)	신경학적 검사 (192)	신경학적 검사 (192)
반사	신경학적 검사 [하지만] (8)	신경학적 검사 (20)	신경학적 검사 (20)	신경학적 검사 (20)	신경학적 검사 (20)
	-	-	-	QST - 다수의 부위에서 열 통증 및 접촉 압력 (80)	QST - 다수의 부위에서 열 통증 및 접촉 압력 (80)
감각	신경학적 검사 [하지만] (16)	신경학적 검사 (32)	신경학적 검사 (32)	-	신경학적 검사 (32)
	-	-	진동 검출 역치 (3.7)	-	-
복합 신경 전도 스코어	-	-	Σ5 - 비복 SNAP/비골 신경 CMAP, 경골 운동 신경 원위 잠복기, 운동 신경 전도 속도, 운동 신경 원위 잠복기 (18.6) ^a	Σ5 - 척골 CMAP 및 SNAP, 비골부 ^c CMAP, 경골 CMAP, 비복 SNAP (10) ^b	Σ5 - 척골 CMAP P 및 SNAP, 비골부 ^c CMAP, 경골 CMAP, 비복 SNAP (18.6) ^a
자율 기능	-	-	심호흡에 대한 심박수 반응 (3.7) ^a	체위 혈압 (2) ^b	심호흡에 대한 심박수 반응 (3.7) ^a

[0290]

[0291] 1. CMAP 화합물 근육 작용 전위; exam 검사; mNIS+7 변형된 NIS+7; NIS 신경병증

[0292] 손상 스코어; NIS-LL 하지만의 검사를 기준으로 하는 NIS; QST 정량적 감각 시험;

[0293] SNAP 감각 신경 작용 전위

- [0294] 2. ^a건강한-대상체 파라미터를 기준으로 하는 정상 편차로서 표현되는 스코어(0-3.72)
- [0295] 3. ^b한정된 카테고리에 따라 등급화된 스코어; 정상 (95 퍼센트) = 0점; 약간 감소된 (≥ 95 내지 <99 퍼센트)=1 점; 및 매우 감소된 (≥ 99 퍼센트)= 2점
- [0296] 4. ^c또한 비골로서 지칭될 수 있음
- [0297] **TTR 아밀로이드증 다발신경병증 (ATTR-CM)의 진단 및 질환 부담 평가**
- [0298] hATTR 아밀로이드증 및 심근병증을 갖는 환자는 전형적으로 심부전(HF) 및 심장 부정맥의 진행성 증상을 경험하고, 사망은 전형적으로 진단 후 2.5 내지 5년에 발생한다. TTR 아밀로이드 원섬유에 의한 세포외 매트릭스의 심장 침윤은 심실 벽 두께의 점진적인 증가 및 챔버 강성의 현저한 증가를 유발하여 이완기 기능 손상을 초래한다. 수축기 기능도 손상되고, 전형적으로 정상적인 박출률에도 불구하고 비정상적인 종방향 긴장에 의해 반영되고, 이는 질환의 말기까지 유지된다. ATTR 아밀로이드증 및 경색(AL) 심장 아밀로이드증을 갖는 환자에서 뇌 나트륨이노 펩타이드(NT-proBNP)의 종방향 긴장 및 N-말단 프로호르몬 둘다는 생존의 독립적인 예측 인자인 것으로 나타났다.
- [0299] 심장초음파검사는 심장 구조와 기능을 평가하는 데 일상적으로 사용되고; 통계학적 분석 계획에 미리 특정된 파라미터는 평균 좌심실(LV) 벽 두께, LV 질량, 종방향 긴장 및 박출률을 포함한다. 심박출량, 좌심방 크기, LV 말단-확장기 용적(LVEDV) 및 LV 말기-수축기 용적(LVESV). 심장초음파는 심장 이미징화에 일상적으로 사용된다. 심근 긴장은 벤더 독립적인 소프트웨어를 사용하여 반경 추적으로 평가할 수 있다(TOMTEC, Munich, Germany). NT-proBNP 및 트로포닌 I 수준의 분석은 예를 들어 화학발광 검정을 사용하여 상업적으로 가용한 진단 시험을 사용하여 임상 실험실에서 일상적으로 수행된다(참조: Roche Diagnostic Cobas, Indianapolis, IN, USA for NT-proBNP; Siemens Centaur XP, Camberley, Surrey, UK for troponin I). 유사하게, 임상 수행은 일상적으로 예를 들어 신장 질환 연구 공식의 변형을 사용하여 크레아티닌 수준을 기반으로 하는 크레아티닌 수준 및 추정 사구체 여과율(eGFR)의 측정을 포함한다.
- [0300] ATTR-CM에 대한 스크리닝 및 진단 방법을 제공하는 리뷰는 문헌(참조: Witteles et al., 2019(JACC: Heart Failure, 2019. 7:709-716))에 의해 최근에 발표되었고, 이는 ATTR-CM의 존재를 시사하는 "적신호(red flag)" 목록을 포함하는 진단 방법 및 심장초음파검사, 심전도, 심장 자기 공명, 말초 또는 자율 신경계와 관련된 전신 증상의 존재와 하지에서 시작하여 상행하는 패턴에 따르는 양측 감각 운동 다발신경병증을 포함한 심장 기능부전을 포함한 스크리닝 방법, 기립성 저혈압, 설사/변비 및 발기 부전의 형태의 자율신경이상증, 및 녹내장, 유리체내 침착 및 가리비 동공과 같은 눈 침범; 수근관 증후군, 특히 양측 수근관 증후군, 요추 척추관 협착증 및 이두박근 건 파열을 포함한 스크리닝 방법에 대한 정보를 제공한다. 다른 진단 방법은 알려지지 않은 이유로 TTR 심장 아밀로이드 침착물에 국소화되는 테크네튬(Tc) 표지 비스포스포네이트를 사용한 골 스inti그래피를 포함한다. 생검은 또한 심장에서 TTR 아밀로이드증의 존재를 확인하기 위해 사용된다.
- [0301] 상기 제공된 파라미터의 심장 기능의 평가 및 분류 방법은 당업계에 공지되어 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 심장 기능의 평가 또는 분류의 특정 방법은 치료 표준이 의학적 개입, 예를 들어 약리학적 제제의 투여, 수술을 포함하도록 충분히 감소된 심장 기능을 입증하기 위해 임의의 임상적으로 허용되는 표준일 수 있다.
- [0302] **신경 손상 및 TTR 아밀로이드증 진행의 지표로서 혈청 바이오마커**
- [0303] 상기에서 설명한 진단 및 모니터링 방법은 복잡하고 종종 주관적이다. 또한, TTR 아밀로이드증은 드물고 상기 징후와 증상이 다수의 다른 질환에 나타날 수 있으므로 임상적으로 검증된 비침습성 혈장 바이오마커는 조기 진단을 용이하게 하고 질환 진행 모니터링을 촉진시킬 수 있다. 티카우 등 (Ticau et al., 2019) (참조: www.medrxiv.org/content/10.1101/19011155v2.full.pdf)에 의한 연구에서, >1000의 단백질들의 혈장 수준은 다발신경병증과 함께 hATTR 아밀로이드증을 갖고 단계 3 APOLLO 연구(NCT01960348) 및 건강한 개체의 코호트에서 위약 또는 파티시란을 투여받은 환자에서 측정되었다. TTR의 간 발현을 억제하는 지질 제형화된 RNAi 제제인 파티시란을 사용한 치료가 각 단백질의 시간 프로필에 미치는 영향을 0, 9 및 18개월에 선형 혼합 모델에 의해 결정하였다. 신경필라멘트 경색(NfL) 단백질은 직교 정량적 접근을 사용하여 추가로 평가하였다. 66개 단백질 수준의 유의미한 변화는 위약 대비 파티시란에서 관찰되었고, 신경 손상의 지표인 NfL의 변화가 가장 두드러졌다. 단백질 수준의 변화 분석은 파티시란으로 치료받은 환자의 프로테오미 18개월에 건강한 개체를 향한 경향이 있음을 입증하였다. 건강한 대조군에서 혈장 NfL 수준은 다발신경병증과 함께 TTR 아밀로이드증을 갖는 환자에서

보다 4배 낮았다(16.3 [SD 12.0] pg/mL 대 69.4 [SD 42.1] pg/mL, $p < 10^{-16}$). 18개월에 NfL의 수준은 위약을 사용하면 증가하였고(99.5 [SD 60.1] pg/mL) 파티시란 처리를 사용하면 감소하였다(48.8 [SD 29.9] pg/mL). 18개월에, 파티시란 처리된 환자에서 변형된 신경병증 손상 스코어+7(mNIS+7)에서의 개선은 NfL 수준에서의 감소($R=0.43$, $p < 10^{-7}$)와 유의적으로 상관관계가 있다. mNIS+7에서 개선과 상관관계가 있는 파티시란 처리를 사용한 NfL 감소는 이것이 TTR 아밀로이드증에서 신경 손상 및 다발신경병증의 바이오마커로서 작용할 수 있음을 시사한다. 상기 바이오마커는 hATTR 아밀로이드증을 갖는 환자에서 다발신경병증의 조기 진단을 가능하게 하고 질환 진행의 모니터링을 용이하게 할 수 있다.

[0304] 다른 단백질, 특히 RSPO3, CCDC80, EDA2R 및 NT-proBNP 수준의 감소는 mNIS+7의 개선과 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌고, 이는 단독으로 또는 서로 또는 NfL과 조합하여 이들이 ATTR 아밀로이드증에서 신경 손상 및 다발신경병증의 바이오마커로서 작용할 수 있음을 시사한다. N-CDase 수준의 증가는 mNIS+7의 개선과 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌고, 이는 단독으로 또는 상기에 열거된 다른 마커와 조합하여 이들이 ATTR 아밀로이드증에서 신경 손상 및 다발신경병증의 바이오마커로서 작용할 수 있음을 시사한다.

[0305] 파티시란을 사용한 치료에 반응하여 변화하는 것으로 관찰된 추가 잠재적 바이오마커는 아래 표에 열거되어 있다. 대상체가 ATTR 아밀로이드증의 진행을 나타내는 참조 수준에 비해 양의 베타 계수를 갖는 단백질 수준이 증가하는 경우 및 대상체가 ATTR 아밀로이드증의 진행을 나타내는 참조 수준에 비해 음의 베타 계수를 갖는 단백질 수준이 감소한 경우. 이들 마커 중 하나 이상의 수준의 변화는 ATTR 아밀로이드증에서 진행 중인 신경 손상 및 다발신경병증 진행의 개선, 안정화 또는 감소를 나타낼 수 있다.

[0306] [표 1]

[0307] 파티시란 처리에 응답하는 변화된 수준을 갖는 바이오마커

단백질	베타 계수	$-\log_{10}(p\text{-값})$	단백질	베타 계수	$-\log_{10}(p\text{-값})$
NfL	0.55	20.40	LDLR	-0.20	5.85
RSPO3	0.53	18.43	NOV	0.19	5.83
CCDC80	0.40	17.28	CD160	0.16	5.69
EDA2R	0.25	17.10	PI3	0.19	5.61
N-CDase	-0.25	15.17	SMOC1	0.12	5.61
NT-proBNP	0.62	13.15	TFPI-2	0.22	5.54
	0.46	11.43	LEP	-0.38	5.49
WNT9A	0.20	10.78	TNFRSF19	0.16	5.47
SMOC2	0.14	10.33	ERBB3	-0.07	5.44
PTN	0.39	9.20	DUA	-0.14	5.43
HGF	0.17	9.02	IL-4RA	0.13	5.33
	0.14	6.13	REN	-0.24	5.31
NELL1	-0.16	8.98	CES2	-0.15	5.23
DCN	0.10	8.90	CR2	0.15	5.23
ARSA	-0.23	8.86	PSG1	0.21	5.20
KLK4	0.27	8.66	FGF-BP1	0.11	5.19
GPC1	0.18	8.57	OPN	0.18	5.18
SFRP	0.21	8.41	TFF3	0.17	5.08
DRAXIN	0.20	8.11	ANGPT2	0.15	5.05
IL-18R1	-0.15	7.82	CCL24	-0.17	5.05
BNP	0.48	7.81	LAYN	0.13	5.02
GFR-알파 1	0.17	7.69	FUCA1	-0.11	4.97
CXCL9	0.31	7.42	AXL	0.11	4.95
TIMD4	-0.21	7.02	TLR3	-0.10	4.94
RSPO1	0.16	6.94	SCARB2	0.12	4.90
MYOC	0.21	6.94	B4GAT1	-0.09	4.83
WFDC2	0.11	6.76	SORCS2	0.15	4.65
GUSB	-0.27	6.71	CD300E	0.18	4.63
HSPB6	0.19	6.70	CD27	0.10	4.62
MFGES	-0.21	6.68	SPON1	0.10	4.58
SMPD1	-0.15	6.59	IGFBP-2	0.15	4.58
FLT1	0.09	6.29	DNER	-0.07	4.57
CTSD	-0.13	6.06	RARRES1	0.09	4.57
CD209	-0.11	5.85	Dkk-4	0.15	4.49

[0308] 이들 바이오마커에 대한 서열은 서열번호 17-34로서 본원에 제공된다.

[0309]

[0310] 본 발명은 제한으로서 해석되지 말아야 하는 하기의 실시예로 추가로 설명된다. 본원에 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌, 공개된 특허 및 특허 출원의 내용과 서열 목록이 본원에 참조로 인용된다.

[0311] **실시예**

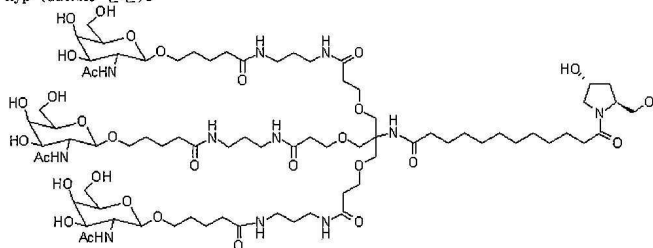
[0312] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 예시적인 이중 가닥 RNAi 제제는 하기 표 3에 제공되어 있다. 하기 표 2는 핵산 서열 제공에 사용되는 뉴클레오타이드 단량체 및 리간드의 약어를 제공한다. 올리고뉴클레오타이드에 존재하는 경우 이들 단량체는 달리 지적되지 않는 경우 5'-3'-포스포디에스테르 결합에 의해 상호 연결되어 있는 것으로 이해된다.

[0313] [표 2]

뉴클레오타이드 단량체 및 리간드의 약어

약어	뉴클레오타이드(들) 및 리간드
A	아데노신-3' -포스페이트
Af	2' -플루오로아데노신-3' -포스페이트
Afs	2' -플루오로아데노신-3' -포스포티오에이트
As	아데노신-3' -포스포티오에이트
C	시티딘-3' -포스페이트
Cf	2' -플루오로시티딘-3' -포스페이트
Cfs	2' -플루오로시티딘-3' -포스포티오에이트
Cs	시티딘-3' -포스포티오에이트
G	구아노신-3' -포스페이트
Gf	2' -플루오로구아노신-3' -포스페이트
Gfs	2' -플루오로구아노신-3' -포스포티오에이트
Gs	구아노신-3' -포스포티오에이트
T	5' -메틸우리딘-3' -포스페이트
Tf	2' -플루오로-5-메틸우리딘-3' -포스페이트
Tfs	2' -플루오로-5-메틸우리딘-3' -포스포티오에이트
Ts	5-메틸우리딘-3' -포스포티오에이트
U	우리딘-3' -포스페이트
Uf	2' -플루오로우리딘-3' -포스페이트
Ufs	2' -플루오로우리딘-3' -포스포티오에이트
Us	우리딘-3' -포스포티오에이트
N	임의의 뉴클레오타이드(G, A, C, T 또는 U)
a	2'-O-메틸아데노신-3' -포스페이트
as	2'-O-메틸아데노신-3' -포스포티오에이트
c	2'-O-메틸시티딘-3' -포스페이트
cs	2'-O-메틸시티딘-3' -포스포티오에이트
g	2'-O-메틸구아노신-3' -포스페이트
gs	2'-O-메틸구아노신-3' -포스포티오에이트
t	2' -O-메틸-5-메틸티민-3' -포스페이트
ts	2' -O-메틸-5-메틸티민-3' -포스포티오에이트
u	2'-O-메틸우리딘-3' -포스페이트
us	2'-O-메틸우리딘-3' -포스포티오에이트

[0314]

약어	뉴클레오타이드(들) 및 리간드
s	포스포티오에이트 연결
L96	N-[트리스(GalNAc-알킬)-아미도메카노일]-4-하이드록시프로릴놀 Hyp-(GalNAc-알킬)₃ 
(Agn)	아데노신-글리콜 핵산 (GNA)
(Cgn)	시티딘-글리콜 핵산 (GNA)
(Ggn)	구아노신-글리콜 핵산 (GNA)
(Tgn)	티민-글리콜 핵산 (GNA) S-이성체

[0315]

[0316] [표 3]

TTR로 표적화된 RNAi 제제의 센스 및 안티센스 가닥의 변형된 뉴클레오타이드 서열

듀플렉스 ID	가닥	변형된 올리고뉴클레오타이드 서열 (5' -3')	서열번호
AD-65492	센스	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
	안티센스	usCfsuugGfuAfcaugAfaAfucccasusc	11
AD-87400	센스	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
	안티센스	usCfs(Tgn)ugGfuAfcaugAfaAfucccasusc	12
AD-87401	센스	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
	안티센스	usCfsu(Tgn)gGfuAfcaugAfaAfucccasusc	13
AD-87402	센스	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
	안티센스	usCfsuu(Ggn)GfuAfcaugAfaAfucccasusc	14
AD-87403	센스	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
	안티센스	usCfsuug(Ggn)uuAfcaugAfaAfucccasusc	15
AD-87404	센스	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
	안티센스	usCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc	7
AD-87405	센스	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
	안티센스	usCfsuugGfu(Tgn)AfcaugAfaAfucccasusc	16

[0317]

[0318] 실시예 1: V30M 유전자전이 마우스에서 RNAi 제제에 의한 TTR 단백질 녹다운

[0319] V30M 돌연변이는 사람 TTR에서 흔한 아밀로이드 생성 돌연변이이다. 마우스 TTR이 없고 V30M 돌연변이를 갖는 사람 TTR을 발현하는 유전자전이 마우스가 연구에 사용되었다. 마우스(그룹당 n = 3)에게 이전에 W02018112320에 기재된 RNAi 제제 AD-65492, 또는 안티센스 가닥의 단일 위치에서 화학적 변형이 상기 표 2에 나타난 바와 같이 GNA 변형으로 변화된 AD-65942의 서열 및 화학을 기반으로 하는 다른 RNAi 제제의 단일 피하 1 mg/kg 용량을 투여하였다. 혈액 샘플은 0일 (투여 전), 3, 7, 10, 14, 21, 35, 및 49일에 수득하였다. 혈청을 준비하고 사람 TTR 수준을 ELISA 검정을 사용하여 결정하였다(문헌참조: 예를 들어, Coelho, et al.(2013)*N Engl J Med* 369:819). 0일째와 비교하여 상대적 TTR 수준은 도 1에 나타난다.

[0320] 안티센스 가닥 내 7번 또는 8번 위치에서 GNA의 혼입은 관용성이 양호하였다(AD-87404 및 AD-87405). 유사한 동력학 및 최대 단백질 녹다운은 모 RNAi 제제 AD-65492와 유사하였다. AD-87404에 의한 녹다운의 내구성은 AD-65492와 유사하였다. 안티센스 가닥 내 3번 내지 6번 위치에서 GNA의 혼입은 관용성이 덜 양호하였다.

[0321] 실시예 2: 비-사람 영장류에서 RNAi 제제에 의한 TTR 단백질 녹다운

[0322] 표 2의 iRNA 제제의 서열은 시노몰구스 몽키 TTR과 완전히 교차 반응성이다. AD-65492 (1 mg/kg) 또는 AD-87404 (1 mg/kg 또는 3 mg/kg)의 단일 피하 용량은 3개의 별도의 연구에서 0일에 시노몰구스 몽키 (그룹 당 n=3)에 투여하였다. 혈액 샘플은 도 2에 나타난 바와 같이 전체 119일에 걸쳐 -7일 (투여 전 7일)에 다양하게 수거하였다. 혈청을 준비하고 시노몰구스 몽키 TTR 수준을 ELISA 검정을 사용하여 결정하였다(문헌참조: 예를 들어, Coelho, et al.(2013)*N Engl J Med* 369:819). 0일째와 비교하여 상대적 TTR 수준은 도 2에 나타난다. TTR 녹다운은 1 mg/kg의 AD-65492 및 3 mg/kg의 AD-87404가 투여된 몽키에서 유사하였다.

[0323] 실시예 3: 건강한 사람 대상체에서 단일 용량의 AD-87404의 투여

[0324] 단계 I, 무작위 배정된, 단일 맹검, 위약 제어된 연구에서, AD-87404 (센스: 5' - usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3' (서열번호 6), 여기서, L96 리간드는 센스 가닥의 3' 가닥에 접합된다); 안티센스: 5' - usCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (서열번호 7))를 건강한 사람 지원자에게 25 mg, 75 mg, 100 mg, 200 mg, 또는 400 mg의 용량으로서 투여하고, 가능한 용량 그룹은 600 mg, 700 mg, 900 mg, 및 1000 mg이다. 연령, 성별, 체중과 같은 관련 인구통계학적 특징에 따라 그룹이 균형을 이룬다.

[0325] 인구통계학적으로 매칭된 대조군 대상체에게도 단일 용량의 위약을 투여한다.

[0326] 혈장 샘플을 수거하고 위약 그룹의 대상체 및 모든 치료 그룹의 대상체로부터 샘플 중의 TTR 단백질 수준은 ELISA 분석을 사용하여 (문헌참조: 예를 들어, Coelho, et al.(2013) *N Engl J Med* 369:819) 미리 결정된 간격에서, 예를 들어, 1, 2, 3, 8, 15, 22, 29, 43, 57, 90일에, 이어서 활성 치료 그룹 대상체의 경우 28일마다 TTR 수준이 치료 전 수준의 80%로 회복될때까지(최대 투여 후 약 1년까지) 결정한다. 녹다운의 수준과 지속 시간이 결정된다.

[0327] AD-87404 그룹 및 대조군 그룹 둘다에서 대상체는 또한 부작용에 대해 모니터링한다. 연구에서 모니터링된 예

시적인 부작용은 주사 부위 홍반, 주사 부위 통증, 소양증, 기침, 메스꺼움, 피로 및 복통 및 신체 검사, ECG, 활력 징후 또는 임상 실험실 파라미터, 예를 들어, 신장 기능, 혈액학적 매개변수, 및 간 기능(예를 들어, 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST))의 임상적으로 유의적인 변화를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0328] 상기 연구의 결과는 AD-87404의 단일 피하 용량이 용량 의존적 방식으로 TTR 단백질 수준을 강력하고 지속적으로 높여주는 것을 입증한다.

[0329] 혈청 및 부작용에서 TTR 단백질 농도의 모니터링과 함께 다중 용량 연구 및 다중 상승 용량 연구도 고려된다.

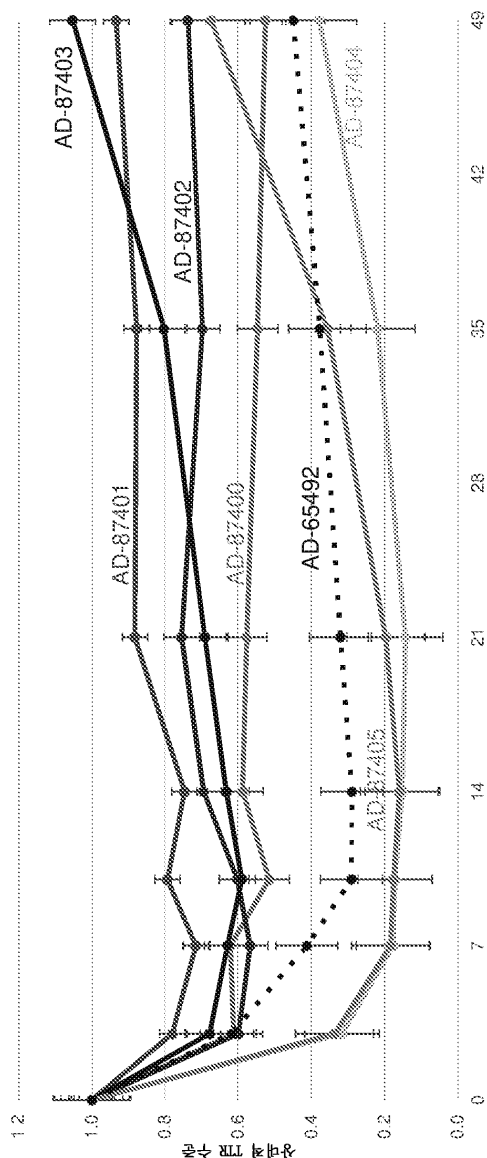
[0330] **등가물**

[0331] 당업자는 단지 통상의 실험, 본원에 기재된 개시내용의 특정 구현예 및 방법에 대한 많은 등가물을 인지하거나 이를 사용하여 확인할 수 있다. 이러한 균등물을 하기의 청구범위의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

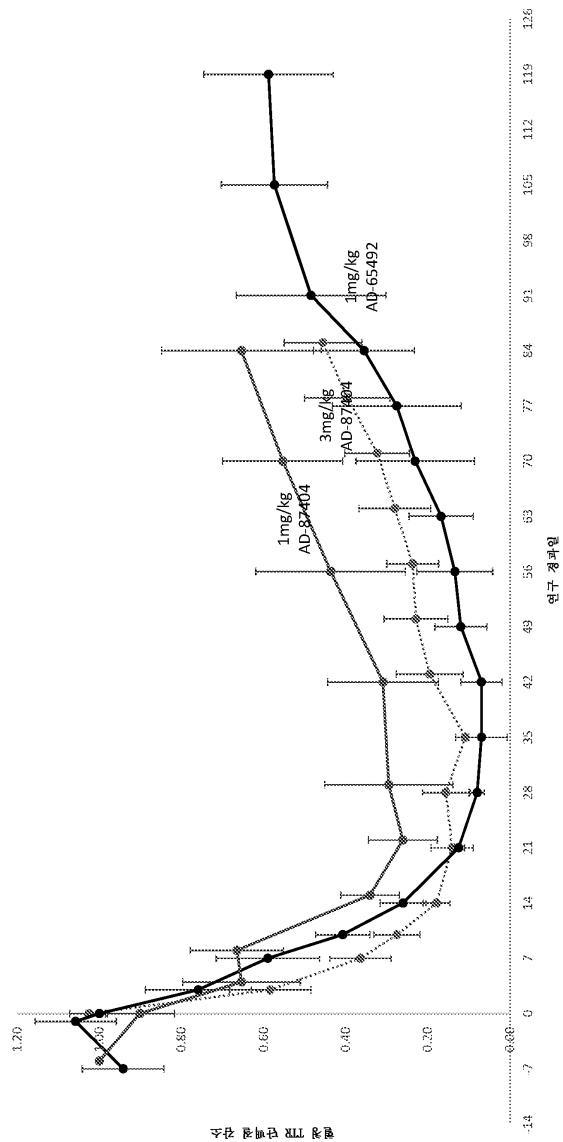
[0332]

도면

도면1



도면2



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR INHIBITING EXPRESSION OF
TRANSTHYRETIN (TTR)

<130> 121301-12320

<140><141><150> 62/985,950

<151> 2020-03-06

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

```

<400> 1
000
<210> 2
<400> 2
000
<210> 3
<400> 3
000
<210> 4
<400> 4
000
<210> 5
<400> 5
000
<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

        oligonucleotide"
<400> 6
ugggauuuc a ugaaccaag a
21
<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

        oligonucleotide"
<220><221> source
<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

        oligonucleotide"
<400> 7
ucuuggtuac augaaauccc auc
23

```

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 8

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 9

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 9

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 10

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 11

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 11

ucuugguuac augaaaauccc auc 23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 12

uctugguuac augaaaauccc auc 23

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 13

ucutgguuac augaaaauccc auc 23

<210> 14

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 14

ucuugguuac augaaaucce auc 23

<210> 15

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 15

ucuugguuac augaaaucce auc 23

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 16

ucuuggutac augaaaucce auc 23

<210> 17

<211> 543

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<

400> 17

Met Ser Ser Phe Ser Tyr Glu Pro Tyr Tyr Ser Thr Ser Tyr Lys Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ser Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Tyr Ser Ala Pro Val Ser
 35 40 45
 Ser Ser Leu Ser Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Ser Leu
 50 55 60

 Met Pro Ser Leu Glu Asn Leu Asp Leu Ser Gln Val Ala Ala Ile Ser
 65 70 75 80
 Asn Asp Leu Lys Ser Ile Arg Thr Gln Glu Lys Ala Gln Leu Gln Asp
 85 90 95
 Leu Asn Asp Arg Phe Ala Ser Phe Ile Glu Arg Val His Glu Leu Glu
 100 105 110
 Gln Gln Asn Lys Val Leu Glu Ala Glu Leu Leu Val Leu Arg Gln Lys
 115 120 125

 His Ser Glu Pro Ser Arg Phe Arg Ala Leu Tyr Glu Gln Glu Ile Arg
 130 135 140
 Asp Leu Arg Leu Ala Ala Glu Asp Ala Thr Asn Glu Lys Gln Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Gly Glu Arg Glu Gly Leu Glu Glu Thr Leu Arg Asn Leu Gln Ala
 165 170 175
 Arg Tyr Glu Glu Glu Val Leu Ser Arg Glu Asp Ala Glu Gly Arg Leu
 180 185 190

 Met Glu Ala Arg Lys Gly Ala Asp Glu Ala Ala Leu Ala Arg Ala Glu
 195 200 205
 Leu Glu Lys Arg Ile Asp Ser Leu Met Asp Glu Ile Ser Phe Leu Lys
 210 215 220
 Lys Val His Glu Glu Glu Ile Ala Glu Leu Gln Ala Gln Ile Gln Tyr
 225 230 235 240
 Ala Gln Ile Ser Val Glu Met Asp Val Thr Lys Pro Asp Leu Ser Ala
 245 250 255

 Ala Leu Lys Asp Ile Arg Ala Gln Tyr Glu Lys Leu Ala Ala Lys Asn
 260 265 270
 Met Gln Asn Ala Glu Glu Trp Phe Lys Ser Arg Phe Thr Val Leu Thr

275 280 285
 Glu Ser Ala Ala Lys Asn Thr Asp Ala Val Arg Ala Ala Lys Asp Glu
 290 295 300
 Val Ser Glu Ser Arg Arg Leu Leu Lys Ala Lys Thr Leu Glu Ile Glu
 305 310 315 320

 Ala Cys Arg Gly Met Asn Glu Ala Leu Glu Lys Gln Leu Gln Glu Leu
 325 330 335
 Glu Asp Lys Gln Asn Ala Asp Ile Ser Ala Met Gln Asp Thr Ile Asn
 340 345 350
 Lys Leu Glu Asn Glu Leu Arg Thr Thr Lys Ser Glu Met Ala Arg Tyr
 355 360 365
 Leu Lys Glu Tyr Gln Asp Leu Leu Asn Val Lys Met Ala Leu Asp Ile
 370 375 380

 Glu Ile Ala Ala Tyr Arg Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Thr Arg Leu
 385 390 395 400
 Ser Phe Thr Ser Val Gly Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Gln Ser Ser
 405 410 415
 Gln Val Phe Gly Arg Ser Ala Tyr Gly Gly Leu Gln Thr Ser Ser Tyr
 420 425 430
 Leu Met Ser Thr Arg Ser Phe Pro Ser Tyr Tyr Thr Ser His Val Gln
 435 440 445

 Glu Glu Gln Ile Glu Val Glu Glu Thr Ile Glu Ala Ala Lys Ala Glu
 450 455 460
 Glu Ala Lys Asp Glu Pro Pro Ser Glu Gly Glu Ala Glu Glu Glu Glu
 465 470 475 480
 Lys Asp Lys Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Ala Ala Glu Glu Glu Glu
 485 490 495
 Ala Ala Lys Glu Glu Ser Glu Glu Ala Lys Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 500 505 510

 Glu Gly Glu Glu Gly Glu Glu Thr Lys Glu Ala Glu Glu Glu Glu Lys
 515 520 525

Lys Val Glu Gly Ala Gly Glu Glu Gln Ala Ala Lys Lys Lys Asp
530 535 540

<210> 18
<211> 284
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18

Met Ser Ser Phe Ser Tyr Glu Pro Tyr Tyr Ser Thr Ser Tyr Lys Arg
1 5 10 15
Arg Tyr Val Glu Thr Pro Arg Val His Ile Ser Ser Val Arg Ser Gly
20 25 30
Tyr Ser Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Tyr Ser Ala Pro Val Ser
35 40 45
Ser Ser Leu Ser Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Ser Leu
50 55 60
Met Pro Ser Leu Glu Asn Leu Asp Leu Ser Gln Val Ala Ala Ile Ser
65 70 75 80
Asn Asp Leu Lys Ser Ile Arg Thr Gln Glu Lys Ala Gln Leu Gln Asp
85 90 95
Leu Asn Asp Arg Phe Ala Ser Phe Ile Glu Arg Val His Glu Leu Glu
100 105 110
Gln Gln Asn Lys Val Leu Glu Ala Glu Leu Leu Val Leu Arg Gln Lys
115 120 125
His Ser Glu Pro Ser Arg Phe Arg Ala Leu Tyr Glu Gln Glu Ile Arg
130 135 140
Asp Leu Arg Leu Ala Ala Glu Asp Ala Thr Asn Glu Lys Gln Ala Leu
145 150 155 160
Gln Gly Glu Arg Glu Gly Leu Glu Glu Thr Leu Arg Asn Leu Gln Ala
165 170 175
Arg Tyr Glu Glu Glu Val Leu Ser Arg Glu Asp Ala Glu Gly Arg Leu
180 185 190
Met Glu Ala Arg Lys Gly Ala Lys Asn Thr Asp Ala Val Arg Ala Ala

195 200 205
Lys Asp Glu Val Ser Glu Ser Arg Arg Leu Leu Lys Ala Lys Thr Leu

210 215 220
Glu Ile Glu Ala Cys Arg Gly Met Asn Glu Ala Leu Glu Lys Gln Leu
225 230 235 240
Gln Glu Leu Glu Asp Lys Gln Asn Ala Asp Ile Ser Val Met Gln Asp
245 250 255
Thr Ile Asn Lys Leu Glu Asn Glu Leu Arg Thr Thr Lys Ser Glu Met
260 265 270
Ala Arg Tyr Leu Lys Glu Tyr Gln Asp Leu Leu Thr

275 280
<210> 19
<211> 272
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 19
Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met
1 5 10 15
Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg
20 25 30
Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys
35 40 45

Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala
50 55 60
Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys
65 70 75 80
Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr
85 90 95
Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr
100 105 110

Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn

115 120 125
 Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser
 130 135 140
 Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr
 145 150 155 160
 Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val
 165 170 175

 Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro
 180 185 190
 Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys
 195 200 205
 Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn
 210 215 220
 Lys Gly Glu Ser Lys Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser
 225 230 235 240

 Ser Lys Glu Ile Pro Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Gln Lys Lys
 245 250 255
 Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His
 260 265 270

 <210> 20
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr Lys Cys Lys Ala Asp

 20 25 30
 Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Ser Gly
 35 40 45
 Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn Cys Pro Glu Gly Leu
 50 55 60

Glu	Ala	Asn	Asn	His	Thr	Met	Glu	Cys	Val	Ser	Ile	Val	His	Cys	Glu
65				70				75				80			
Val	Ser	Glu	Trp	Asn	Pro	Trp	Ser	Pro	Cys	Thr	Lys	Lys	Gly	Lys	Thr
				85				90				95			
Cys	Gly	Phe	Lys	Arg	Gly	Thr	Glu	Thr	Arg	Val	Arg	Glu	Ile	Ile	Gln
100								105				110			
His	Pro	Ser	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Cys	Pro	Pro	Thr	Asn	Glu	Thr	Arg
115								120				125			
Lys	Cys	Thr	Val	Gln	Arg	Lys	Lys	Cys	Gln	Lys	Gly	Glu	Arg	Gly	Lys
130								135				140			
Lys	Gly	Arg	Glu	Arg	Lys	Arg	Lys	Lys	Pro	Asn	Lys	Gly	Glu	Ser	Lys
145				150				155				160			
Glu	Ala	Ile	Pro	Asp	Ser	Lys	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser	Lys	Glu	Ile	Pro
				165				170				175			
Glu	Gln	Arg	Glu	Asn	Lys	Gln	Gln	Gln	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Gln	Asp
180								185				190			
Lys	Gln	Lys	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Thr	Val	His					
195								200							
<210> 21															
<211> 224															
<212> PRT															
<213> Homo sapiens															
<400> 21															
Met	His	Leu	Arg	Leu	Ile	Ser	Trp	Leu	Phe	Ile	Ile	Leu	Asn	Phe	Met
1				5				10				15			
Glu	Tyr	Ile	Gly	Ser	Gln	Asn	Ala	Ser	Arg	Gly	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg
				20				25				30			
Met	His	Pro	Asn	Val	Ser	Gln	Gly	Cys	Gln	Gly	Gly	Cys	Ala	Thr	Cys
35								40				45			
Ser	Asp	Tyr	Asn	Gly	Cys	Leu	Ser	Cys	Lys	Pro	Arg	Leu	Phe	Phe	Ala
50								55				60			

Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys

65 70 75 80

Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr

85 90 95

Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr

100 105 110

Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn

115 120 125

Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser

130 135 140

Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr

145 150 155 160

Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val

165 170 175

Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro

180 185 190

Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys

195 200 205

Gly Glu Arg Gly Arg Thr Ser Arg Gly Asp Glu Arg Cys Phe Asn His

210 215 220

<210> 22

<211> 553

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Thr Trp Arg Met Gly Pro Arg Phe Thr Met Leu Leu Ala Met Trp

1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Ser Glu Pro His Pro His Ala Thr Ile Arg Gly Ser

20 25 30

His Gly Gly Arg Lys Val Pro Leu Val Ser Pro Asp Ser Ser Arg Pro

35 40 45

Ala Arg Phe Leu Arg His Thr Gly Arg Ser Arg Gly Ile Glu Arg Ser
50 55 60

Thr Leu Glu Glu Pro Asn Leu Gln Pro Leu Gln Arg Arg Arg Ser Val
65 70 75 80

Pro Val Leu Arg Leu Ala Arg Pro Thr Glu Pro Pro Ala Arg Ser Asp
85 90 95

Ile Asn Gly Ala Ala Val Arg Pro Glu Gln Arg Pro Ala Ala Arg Gly
100 105 110

Ser Pro Arg Glu Met Ile Arg Asp Glu Gly Ser Ser Ala Arg Ser Arg
115 120 125

Met Leu Arg Phe Pro Ser Gly Ser Ser Ser Pro Asn Ile Leu Ala Ser
130 135 140

Phe Ala Gly Lys Asn Arg Val Trp Val Ile Ser Ala Pro His Ala Ser
145 150 155 160

Glu Gly Tyr Tyr Arg Leu Met Met Ser Leu Leu Lys Asp Asp Val Tyr
165 170 175

Cys Glu Leu Ala Glu Arg His Ile Gln Gln Ile Val Leu Phe His Gln
180 185 190

Ala Gly Glu Glu Gly Gly Lys Val Arg Arg Ile Thr Ser Glu Gly Gln
195 200 205

Ile Leu Glu Gln Pro Leu Asp Pro Ser Leu Ile Pro Lys Leu Met Ser
210 215 220

Phe Leu Lys Leu Glu Lys Gly Lys Phe Gly Met Val Leu Leu Lys Lys
225 230 235 240

Thr Leu Gln Val Glu Glu Arg Tyr Pro Tyr Pro Val Arg Leu Glu Ala
245 250 255

Met Tyr Glu Val Ile Asp Gln Gly Pro Ile Arg Arg Ile Glu Lys Ile
260 265 270

Arg Gln Lys Gly Phe Val Gln Lys Cys Lys Ala Ser Gly Val Glu Gly
275 280 285

Gln Val Val Ala Glu Gly Asn Asp Gly Gly Gly Gly Ala Gly Arg Pro

290 295 300
 Ser Leu Gly Ser Glu Lys Lys Lys Glu Asp Pro Arg Arg Ala Gln Val
 305 310 315 320
 Pro Pro Thr Arg Glu Ser Arg Val Lys Val Leu Arg Lys Leu Ala Ala
 325 330 335
 Thr Ala Pro Ala Leu Pro Gln Pro Pro Ser Thr Pro Arg Ala Thr Thr
 340 345 350

 Leu Pro Pro Ala Pro Ala Thr Thr Val Thr Arg Ser Thr Ser Arg Ala
 355 360 365
 Val Thr Val Ala Ala Arg Pro Met Thr Thr Thr Ala Phe Pro Thr Thr
 370 375 380
 Gln Arg Pro Trp Thr Pro Ser Pro Ser His Arg Pro Pro Thr Thr Thr
 385 390 395 400
 Glu Val Ile Thr Ala Arg Arg Pro Ser Val Ser Glu Asn Leu Tyr Pro
 405 410 415

 Pro Ser Arg Lys Asp Gln His Arg Glu Arg Pro Gln Thr Thr Arg Arg
 420 425 430
 Pro Ser Lys Ala Thr Ser Leu Glu Ser Phe Thr Asn Ala Pro Pro Thr
 435 440 445
 Thr Ile Ser Glu Pro Ser Thr Arg Ala Ala Gly Pro Gly Arg Phe Arg
 450 455 460
 Asp Asn Arg Met Asp Arg Arg Glu His Gly His Arg Asp Pro Asn Val
 465 470 475 480

 Val Pro Gly Pro Pro Lys Pro Ala Lys Glu Lys Pro Pro Lys Lys Lys
 485 490 495
 Ala Gln Asp Lys Ile Leu Ser Asn Glu Tyr Glu Glu Lys Tyr Asp Leu
 500 505 510
 Ser Arg Pro Thr Ala Ser Gln Leu Glu Asp Glu Leu Gln Val Gly Asn
 515 520 525
 Val Pro Leu Lys Lys Ala Lys Glu Ser Lys Lys His Glu Lys Leu Glu
 530 535 540

Lys Pro Glu Lys Lys Lys Glu Lys Lys

545 550

<210> 23

<211> 331

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Glu Gly Lys Arg Arg Leu Leu Leu Ile Thr Ala Pro Lys Ala Glu Asn

1 5 10 15

Asn Met Tyr Val Gln Gln Arg Asp Glu Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Lys

20 25 30

Met Ala Thr Arg Lys Ile Ser Val Ile Thr Ile Phe Gly Pro Val Asn

35 40 45

Asn Ser Thr Met Lys Ile Asp His Phe Gln Leu Asp Asn Glu Lys Pro

50 55 60

Met Arg Val Val Asp Asp Glu Asp Leu Val Asp Gln Arg Leu Ile Ser

65 70 75 80

Glu Leu Arg Lys Glu Tyr Gly Met Thr Tyr Asn Asp Phe Phe Met Val

85 90 95

Leu Thr Asp Val Asp Leu Arg Val Lys Gln Tyr Tyr Glu Val Pro Ile

100 105 110

Thr Met Lys Ser Val Phe Asp Leu Ile Asp Thr Phe Gln Ser Arg Ile

115 120 125

Lys Asp Met Glu Lys Gln Lys Lys Glu Gly Ile Val Cys Lys Glu Asp

130 135 140

Lys Lys Gln Ser Leu Glu Asn Phe Leu Ser Arg Phe Arg Trp Arg Arg

145 150 155 160

Arg Leu Leu Val Ile Ser Ala Pro Asn Asp Glu Asp Trp Ala Tyr Ser

165 170 175

Gln Gln Leu Ser Ala Leu Ser Gly Gln Ala Cys Asn Phe Gly Leu Arg

180 185 190

His Ile Thr Ile Leu Lys Leu Leu Gly Val Gly Glu Glu Val Gly Gly

195 200 205
 Val Leu Glu Leu Phe Pro Ile Asn Gly Gly Ser Val Val Glu Arg Glu
 210 215 220
 Asp Val Pro Ala His Leu Val Lys Asp Ile Arg Asn Tyr Phe Gln Val
 225 230 235 240

 Ser Pro Glu Tyr Phe Ser Met Leu Leu Val Gly Lys Asp Gly Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Trp Tyr Pro Ser Pro Met Trp Ser Met Val Ile Val Tyr Asp
 260 265 270
 Leu Ile Asp Ser Met Gln Leu Arg Arg Gln Glu Met Ala Ile Gln Gln
 275 280 285
 Ser Leu Gly Met Arg Cys Pro Glu Asp Glu Tyr Ala Gly Tyr Gly Tyr
 290 295 300

 His Ser Tyr His Gln Gly Tyr Gln Asp Gly Tyr Gln Asp Asp Tyr Arg
 305 310 315 320
 His His Glu Ser Tyr His His Gly Tyr Pro Tyr
 325 330

 <210> 24
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Met Leu Leu Val Gly Lys Asp Gly Asn Val Lys Ser Trp Tyr Pro Ser
 1 5 10 15
 Pro Met Trp Ser Met Val Ile Val Tyr Asp Leu Ile Asp Ser Met Gln
 20 25 30

 Leu Arg Arg Gln Glu Met Ala Ile Gln Gln Ser Leu Gly Met Arg Cys
 35 40 45
 Pro Glu Asp Glu Tyr Ala Gly Tyr Gly Tyr His Ser Tyr His Gln Gly
 50 55 60
 Tyr Gln Asp Gly Tyr Gln Asp Asp Tyr Arg His His Glu Ser Tyr His
 65 70 75 80

His Gly Tyr Pro Tyr

85

<210> 25

<211> 297

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Asp Cys Gln Glu Asn Glu Tyr Trp Asp Gln Trp Gly Arg Cys Val

1 5 10 15
Thr Cys Gln Arg Cys Gly Pro Gly Gln Glu Leu Ser Lys Asp Cys Gly
20 25 30
Tyr Gly Glu Gly Gly Asp Ala Tyr Cys Thr Ala Cys Pro Pro Arg Arg
35 40 45
Tyr Lys Ser Ser Trp Gly His His Arg Cys Gln Ser Cys Ile Thr Cys
50 55 60
Ala Val Ile Asn Arg Val Gln Lys Val Asn Cys Thr Ala Thr Ser Asn

65 70 75 80
Ala Val Cys Gly Asp Cys Leu Pro Arg Phe Tyr Arg Lys Thr Arg Ile
85 90 95
Gly Gly Leu Gln Asp Gln Glu Cys Ile Pro Cys Thr Lys Gln Thr Pro
100 105 110
Thr Ser Glu Val Gln Cys Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp
115 120 125
Ala Pro Thr Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser

130 135 140
Ser Leu Leu Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu
145 150 155 160
Tyr Cys Lys Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Gly Gly Leu Leu
165 170 175
Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser Leu Phe Pro Val
180 185 190

Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val Ser Glu Asn Ile

195 200 205
Phe Gln Thr Gln Pro Leu Asn Pro Ile Leu Glu Asp Asp Cys Ser Ser
210 215 220
Thr Ser Gly Phe Pro Thr Gln Glu Ser Phe Thr Met Ala Ser Cys Thr
225 230 235 240
Ser Glu Ser His Ser His Trp Val His Ser Pro Ile Glu Cys Thr Glu
245 250 255
Leu Asp Leu Gln Lys Phe Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Thr Gly Ala Glu

260 265 270
Thr Leu Gly Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Gly Asp Arg Leu Glu Leu
275 280 285
Asn Val Pro Phe Glu Val Pro Ser Pro
290 295

<210> 26

<211> 318

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Asp Cys Gln Glu Asn Glu Tyr Trp Asp Gln Trp Gly Arg Cys Val
1 5 10 15
Thr Cys Gln Arg Cys Gly Pro Gly Gln Glu Leu Ser Lys Asp Cys Gly

20 25 30
Tyr Gly Glu Gly Gly Asp Ala Tyr Cys Thr Ala Cys Pro Pro Arg Arg
35 40 45
Tyr Lys Ser Ser Trp Gly His His Arg Cys Gln Ser Cys Ile Thr Cys
50 55 60
Ala Val Ile Asn Arg Val Gln Lys Val Asn Cys Thr Ala Thr Ser Asn
65 70 75 80
Ala Val Cys Gly Asp Cys Leu Pro Arg Phe Tyr Arg Lys Thr Arg Ile

85 90 95

Gly Gly Leu Gln Asp Gln Glu Cys Ile Pro Cys Thr Lys Gln Thr Pro
 100 105 110
 Thr Ser Glu Val Gln Cys Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp
 115 120 125
 Ala Pro Thr Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser
 130 135 140
 Ser Leu Leu Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu

 145 150 155 160
 Tyr Cys Lys Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Glu Lys Leu Ile
 165 170 175
 Ile Phe Ser Asp Pro Val Pro Ala Ser Leu Asn Leu Ile Pro Glu Phe
 180 185 190
 Ala Gly Gly Leu Leu Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu
 195 200 205
 Ser Leu Phe Pro Val Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln

 210 215 220
 Val Ser Glu Asn Ile Phe Gln Thr Gln Pro Leu Asn Pro Ile Leu Glu
 225 230 235 240
 Asp Asp Cys Ser Ser Thr Ser Gly Phe Pro Thr Gln Glu Ser Phe Thr
 245 250 255
 Met Ala Ser Cys Thr Ser Glu Ser His Ser His Trp Val His Ser Pro
 260 265 270
 Ile Glu Cys Thr Glu Leu Asp Leu Gln Lys Phe Ser Ser Ser Ala Ser

 275 280 285
 Tyr Thr Gly Ala Glu Thr Leu Gly Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Gly
 290 295 300
 Asp Arg Leu Glu Leu Asn Val Pro Phe Glu Val Pro Ser Pro
 305 310 315
 <210> 27
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Met Ser Thr Gly Thr Asn Gly Asp Gly Val Ser Pro Ala Asn Gly Val
1 5 10 15

Val Leu Asp Arg Ser Tyr Pro Arg Cys Leu Pro Val Glu Leu Ser Gly
20 25 30
Gly Arg Tyr Thr His Ser Ala Pro Ser Gly Gly His Thr Cys Cys Thr
35 40 45
Gly Gly Leu Leu Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser
50 55 60
Leu Phe Pro Val Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val
65 70 75 80

Ser Glu Asn Ile Phe Gln Thr Gln Pro Leu Asn Pro Ile Leu Glu Asp
85 90 95
Asp Cys Ser Ser Thr Ser Gly Phe Pro Thr Gln Glu Ser Phe Thr Met
100 105 110
Ala Ser Cys Thr Ser Glu Ser His Ser His Trp Val His Ser Pro Ile
115 120 125
Glu Cys Thr Glu Leu Asp Leu Gln Lys Phe Ser Ser Ser Ala Ser Tyr
130 135 140

Thr Gly Ala Glu Thr Leu Gly Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Gly Asp
145 150 155 160
Arg Leu Glu Leu Asn Val Pro Phe Glu Val Pro Ser Pro
165 170

<210> 28

<211> 265

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Ser Thr Gly Thr Asn Gly Asp Gly Val Ser Pro Ala Asn Gly Val
1 5 10 15
Val Leu Asp Arg Ser Tyr Pro Arg Ile Val Val Met Glu Arg Val Glu

20	25	30
Met Pro Thr Ala Gln Pro Ala Leu Leu Ala Gly Thr Lys Ala Ala Gly		
35	40	45
Ala Thr Thr Asp Val Arg Val Ala Ser Pro Val Leu Ser Ser Ile Val		
50	55	60
Phe Arg Arg Ser Thr Ala Gln Leu Pro Leu Met Leu Ser Val Gly Thr		
65	70	75
80		
Val Cys Pro Gly Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp Thr Pro		
85	90	95
Thr Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser Ser Leu		
100	105	110
Leu Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu Tyr Cys		
115	120	125
Lys Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Val Ala Gly Gly Leu Leu		
130	135	140
Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser Leu Phe Pro Val		
145	150	155
160		
Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val Ser Glu Asn Ile		
165	170	175
Phe Gln Thr Gln Pro Leu Asn Pro Ile Leu Glu Asp Asp Cys Ser Ser		
180	185	190
Thr Ser Gly Phe Pro Thr Gln Glu Ser Phe Thr Met Ala Ser Cys Thr		
195	200	205
Ser Glu Ser His Ser His Trp Val His Ser Pro Ile Glu Cys Thr Glu		
210	215	220
Leu Asp Leu Gln Lys Phe Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Thr Gly Ala Glu		
225	230	235
240		
Thr Leu Gly Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Gly Asp Arg Leu Glu Leu		
245	250	255
Asn Val Pro Phe Glu Val Pro Ser Pro		
260	265	

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Ser Thr Gly Thr Asn Gly Asp Gly Val Ser Pro Ala Asn Gly Val

1 5 10 15

Val Leu Asp Arg Ser Tyr Pro Arg Cys Leu Pro Val Glu Leu Ser Gly

20 25 30

Gly Arg Tyr Thr His Ser Ala Pro Ser Gly Gly His Thr Cys Cys Thr

35 40 45

Gly Gly Leu Leu Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser

50 55 60

Leu Phe Pro Val Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val

65 70 75 80

Ser Trp Ala Pro Gly Ser Leu Ala Gln Leu Phe Ser Leu Asp Ser Val

85 90 95

Pro Ile Pro Gln Gln Gln Gln Gly Pro Glu Met

100 105

<210> 30

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Gly Thr Val Cys His Leu Pro Thr Val Trp Ser Trp Thr Gly Ala

1 5 10 15

Ile Gln Gly Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp Thr Pro Thr

20 25 30

Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser Ser Leu Leu

35 40 45

Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu Tyr Cys Lys

50 55 60

Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Val Ala Gly Gly Leu Leu Gln
 65 70 75 80
 Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser Leu Phe Pro Val Pro
 85 90 95

Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val Ser Trp Ala Pro Gly
 100 105 110
 Ser Leu Ala Gln Leu Phe Ser Leu Asp Ser Val Pro Ile Pro Gln Gln
 115 120 125

Gln Gln Gly Pro Glu Met

130

<210> 31

<211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Gly Thr Val Cys His Leu Pro Thr Val Trp Ser Trp Thr Gly Ala
 1 5 10 15

Ile Gln Gly Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp Thr Pro Thr
 20 25 30

Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser Ser Leu Leu
 35 40 45

Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu Tyr Cys Lys
 50 55 60

Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Gly Gly Leu Leu Gln Phe Glu
 65 70 75 80

Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser Leu Phe Pro Val Pro Pro Ser
 85 90 95

Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val Ser Trp Ala Pro Gly Ser Leu
 100 105 110

Ala Gln Leu Phe Ser Leu Asp Ser Val Pro Ile Pro Gln Gln Gln Gln
 115 120 125

Gly Pro Glu Met

130

<210> 32

<211> 299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Met Asp Cys Gln Glu Asn Glu Tyr Trp Asp Gln Trp Gly Arg Cys Val

1	5	10	15
Thr	Cys	Gln	Arg
Cys	Gly	Pro	Gly
Gln	Glu	Leu	Ser
Lys	Asp	Cys	Gly
20	25	30	
Tyr	Gly	Glu	Gly
Gly	Asp	Ala	Tyr
Cys	Thr	Ala	Cys
Pro	Pro	Arg	Arg
35	40	45	
Tyr	Lys	Ser	Ser
Trp	Gly	His	His
Arg	Cys	Gln	Ser
Cys	Ile	Thr	Cys
50	55	60	
Ala	Val	Ile	Asn
Arg	Val	Gln	Lys
Val	Asn	Cys	Thr
Ala	Thr	Ser	Asn

65	70	75	80
Ala	Val	Cys	Gly
Asp	Cys	Leu	Pro
Arg	Phe	Tyr	Arg
Lys	Thr	Arg	Ile
85	90	95	
Gly	Gly	Leu	Gln
Asp	Gln	Glu	Cys
Ile	Pro	Cys	Thr
Lys	Gln	Thr	Pro
100	105	110	
Thr	Ser	Glu	Val
Gln	Cys	Ala	Phe
Gln	Leu	Ser	Leu
Val	Glu	Ala	Asp
115	120	125	
Thr	Pro	Thr	Val
Pro	Gln	Glu	Ala
Thr	Leu	Val	Ala
Leu	Val	Ser	

130	135	140
Ser	Leu	Leu
Val	Val	Phe
Thr	Leu	Ala
Phe	Leu	Gly
Leu	Phe	Phe
Leu		
145	150	155
Tyr	Cys	Lys
Gln	Phe	Phe
Asn	Arg	His
Cys	Gln	Arg
Val	Ala	Gly
Gly		
165	170	175
Leu	Leu	Gln
Phe	Glu	Ala
Asp	Lys	Thr
Ala	Lys	Glu
Glu	Ser	Leu
Phe		
180	185	190
Pro	Val	Pro
Pro	Ser	Lys
Glu	Thr	Ser
Ala	Glu	Ser
Gln	Val	Ser
Glu		

195 200 205
 Asn Ile Phe Gln Thr Gln Pro Leu Asn Pro Ile Leu Glu Asp Asp Cys
 210 215 220
 Ser Ser Thr Ser Gly Phe Pro Thr Gln Glu Ser Phe Thr Met Ala Ser
 225 230 235 240
 Cys Thr Ser Glu Ser His Ser His Trp Val His Ser Pro Ile Glu Cys
 245 250 255
 Thr Glu Leu Asp Leu Gln Lys Phe Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Thr Gly

260 265 270
 Ala Glu Thr Leu Gly Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Gly Asp Arg Leu
 275 280 285

Glu Leu Asn Val Pro Phe Glu Val Pro Ser Pro

290 295

<210> 33

<211> 297

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Asp Cys Gln Glu Asn Glu Tyr Trp Asp Gln Trp Gly Arg Cys Val

1 5 10 15

Thr Cys Gln Arg Cys Gly Pro Gly Gln Glu Leu Ser Lys Asp Cys Gly

20 25 30
 Tyr Gly Glu Gly Gly Asp Ala Tyr Cys Thr Ala Cys Pro Pro Arg Arg

35 40 45

Tyr Lys Ser Ser Trp Gly His His Arg Cys Gln Ser Cys Ile Thr Cys

50 55 60

Ala Val Ile Asn Arg Val Gln Lys Val Asn Cys Thr Ala Thr Ser Asn

65 70 75 80

Ala Val Cys Gly Asp Cys Leu Pro Arg Phe Tyr Arg Lys Thr Arg Ile

85 90 95

Gly Gly Leu Gln Asp Gln Glu Cys Ile Pro Cys Thr Lys Gln Thr Pro

100 105 110

Thr Ser Glu Val Gln Cys Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp
115 120 125

Thr Pro Thr Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser
130 135 140

Ser Leu Leu Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu

145 150 155 160

Tyr Cys Lys Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Gly Gly Leu Leu
165 170 175

Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser Leu Phe Pro Val
180 185 190

Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val Ser Glu Asn Ile
195 200 205

Phe Gln Thr Gln Pro Leu Asn Pro Ile Leu Glu Asp Asp Cys Ser Ser

210 215 220

Thr Ser Gly Phe Pro Thr Gln Glu Ser Phe Thr Met Ala Ser Cys Thr
225 230 235 240

Ser Glu Ser His Ser His Trp Val His Ser Pro Ile Glu Cys Thr Glu
245 250 255

Leu Asp Leu Gln Lys Phe Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Thr Gly Ala Glu
260 265 270

Thr Leu Gly Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Gly Asp Arg Leu Glu Leu

275 280 285

Asn Val Pro Phe Glu Val Pro Ser Pro

290 295

<210> 34

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Leu His Leu Ala Phe Leu Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Ser Pro

20 25 30
 Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn

 35 40 45
 His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu
 50 55 60
 Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg
 65 70 75 80
 Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr
 85 90 95
 Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys

 100 105 110
 Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys
 115 120 125
 Lys Val Leu Arg Arg His
 130