



공개특허 10-2024-0074895

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0074895  
(43) 공개일자 2024년05월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/113* (2010.01) *A61K 31/713* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/113* (2013.01)  
*A61K 31/713* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7015927(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2016년07월28일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2018-7005958  
원출원일자(국제) 2016년07월28일  
심사청구일자 2021년07월27일
- (85) 번역문제출일자 2024년05월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/044359
- (87) 국제공개번호 WO 2017/023660  
국제공개일자 2017년02월09일
- (30) 우선권주장  
62/199,563 2015년07월31일 미국(US)  
62/287,518 2016년01월27일 미국(US)

- (71) 출원인  
알닐립 파마슈티칼스 인코포레이티드  
미국 매사추세츠주 02142 캠브릿지 헨리 에이. 테  
르미어 스퀘어 웨스트 켄달 스트리트 675
- (72) 발명자  
짐마만 트레이시  
미국 매사추세츠주 02142 캠브릿지 써드 플로어  
써드 스트리트 300  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
장훈

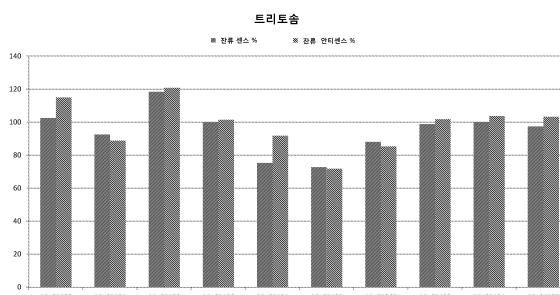
전체 청구항 수 : 총 108 항

(54) 발명의 명칭 트랜스티레틴(TTR) iRNA 조성물 및 TTR-관련 질병을 치료하거나, 예방하기 위한 그의 사용 방법

### (57) 요약

본 발명은 트랜스티레틴(TTR) 유전자를 표적화하는 iRNA 작용제, 예를 들어, 이중 가닥 iRNA 작용제, 및 TTR-관련 질병을 치료하거나 예방하기 위해 이러한 iRNA 작용제를 사용하는 방법을 제공한다.

### 대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 48/00** (2024.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/322 (2013.01)

C12N 2310/344 (2013.01)

C12N 2310/351 (2013.01)

C12N 2310/3515 (2013.01)

C12N 2310/3533 (2013.01)

C12N 2320/30 (2013.01)

(72) 발명자

**자다브 바산트**

미국 매사추세츠주 02142 캠브릿지 써드 플로어 써드 스트리트 300

**마이어 마틴**

미국 매사추세츠주 02142 캠브릿지 써드 플로어 써드 스트리트 300

---

**라지브 칼란토타틸 지.**

미국 매사추세츠주 02142 캠브릿지 써드 플로어 써드 스트리트 300

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

세포에서 트랜스티레틴(TTR)의 발현을 억제하기 위한 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제로서, 상기 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2에 상보성인 영역을 포함하고,

각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고,

실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고,

센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며;

센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된, 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 작용제는 화학식 (IIIe)에 의해 제시되는 이중 가닥 RNAi 작용제:

센스: 5' - N<sub>a</sub> - Y Y Y - N<sub>b</sub> - 3'

안티센스: 3' - n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'- Y'Y'Y'- N<sub>b</sub>'- 5' (IIIe)

(상기 식에서:

n<sub>p</sub>'는 2개의 뉴클레오타이드 오버행이며, n<sub>p</sub>' 내의 각각의 뉴클레오타이드는 이웃 뉴클레오타이드에 포스포로티오에이트 연결을 통해 연결되고;

각각의 N<sub>a</sub>, N<sub>b</sub>, N<sub>a</sub>' 및 N<sub>b</sub>'는 독립적으로, 변형되거나, 비변형된 0 내지 25개의 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;

YYY 및 Y'Y'Y' 각각은 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나의 모티프를 나타냄).

#### 청구항 3

제2항에 있어서, YYY 모티프는 센스 가닥의 절단 부위 또는 그 주위에 발생하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, Y'Y'Y' 모티프는 5' 말단으로부터 안티센스 가닥의 11, 12 및 13 위치에서 발생하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

#### 청구항 5

제2항에 있어서, Y 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 변형을 함유하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

#### 청구항 6

제2항에 있어서, Y' 뉴클레오타이드는 2'-0-메틸 변형을 함유하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 이중 가닥 영역은 15 내지 30개의 뉴클레오타이드 쌍 길이인, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 이중 가닥 영역은 17 내지 23개의 뉴클레오타이드 쌍 길이인, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 9**

제7항에 있어서, 이중 가닥 영역은 17 내지 25개의 뉴클레오타이드 쌍 길이인, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 이중 가닥 영역은 23 내지 27개의 뉴클레오타이드 쌍 길이인, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 11**

제9항에 있어서, 이중 가닥 영역은 19 내지 21개의 뉴클레오타이드 쌍 길이인, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 이중 가닥 영역은 21 내지 23개의 뉴클레오타이드 쌍 길이인, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 각각의 가닥은 15 내지 30개의 뉴클레오타이드를 갖는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 각각의 가닥은 19 내지 30개의 뉴클레오타이드를 갖는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 뉴클레오타이드의 변형은 데옥시-뉴클레오타이드, 3'-말단 데옥시-티민(dT) 뉴클레오타이드, 2'-0-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 2'-데옥시-변형된 뉴클레오타이드, 잠금 뉴클레오타이드(locked nucleotide), 비잠금 뉴클레오타이드(unlocked nucleotide), 입체형태적으로 제한된 뉴클레오타이드, 결속성 에틸 뉴클레오타이드(constrained ethyl nucleotide), 무염기 뉴클레오타이드(abasic nucleotide), 2'-아미노-변형된 뉴클레오타이드, 2'-0-알릴-변형된 뉴클레오타이드, 2'-C-알킬-변형된 뉴클레오타이드, 2'-하이드록실-변형된 뉴클레오타이드, 2'-메톡시에틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-0-알킬-변형된 뉴클레오타이드, 모르폴리노 뉴클레오타이드, 포스포라미데이트, 뉴클레오타이드를 포함하는 비천연 염기, 테트라하이드로페란 변형된 뉴클레오타이드, 1,5-안하이드로헥시톨 변형된 뉴클레오타이드, 사이클로헥세닐 변형된 뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트기를 포함하는 뉴클레오타이드, 메틸포스포네이트기를 포함하는 뉴클레오타이드, 5'-포스페이트를 포함하는 뉴클레오타이드, 및 5'-포스페이트 모방체를 포함하는 뉴클레오타이드, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 뉴클레오타이드의 변형은 2'-0-메틸 또는 2'-플루오로 변형인, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 센스 가닥은 5개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 센스 가닥은 4개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 20**

제1항에 있어서, 안티센스 가닥은 5개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 21**

제1항에 있어서, 안티센스 가닥은 4개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 22**

제1항에 있어서, 안티센스 가닥은 3개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 23**

제1항에 있어서, 안티센스 가닥은 2개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 안티센스 가닥의 5' 뉴클레오타이드에 5'-포스페이트 또는 5'-포스페이트 모방체를 추가로 포함하는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 25**

제1항에 있어서, 안티센스 가닥의 5' 뉴클레오타이드에 5'-포스페이트 모방체를 추가로 포함하는 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 26**

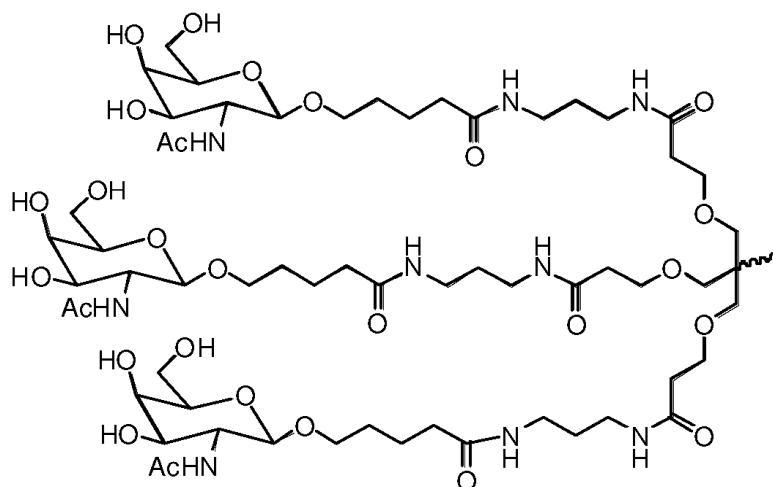
제25항에 있어서, 5'-포스페이트 모방체는 5'-비닐 포스페이트(5'-VP)인, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 27**

제1항에 있어서, 리간드는 2가 또는 3가 분지형 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체인, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 28**

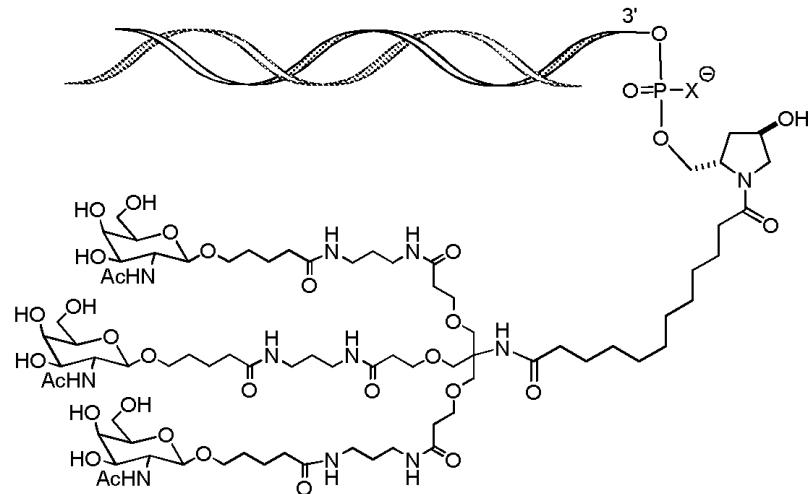
제1항에 있어서, 리간드는 하기인, 이중 가닥 RNAi 작용제:

**청구항 29**

제1항에 있어서, 리간드는 센스 가닥의 3' 말단에 부착되는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

**청구항 30**

제29항에 있어서, RNAi 작용제는 하기 도식에 도시된 바와 같은 리간드에 접합된 이중 가닥 RNAi 작용제:



(상기 식에서, X는 O 또는 S임).

### 청구항 31

제1항에 있어서, 안티센스 가닥은

5'- usCfsuugguuacauAfaaucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 6),

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7),

5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 8), 및

5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 9)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이고; VP는 5'-포스페이트 모방체인, 이중 가닥 RNAi 작용제.

### 청구항 32

제1항에 있어서, 센스 및 안티센스 가닥은

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- usCfsuugguuacauAfaaucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 6);

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7);

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 8); 및

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 9)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이고; VP는 5'-포스페이트 모방체인 이중 가닥 RNAi 작용제.

### 청구항 33

제32항에 있어서, 센스 및 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 7)을 포함하고,

a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결인 이중 가닥 RNAi 작용제.

#### 청구항 34

제1항에 있어서, 상기 RNAi 작용제는 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 또는 표 7 중 어느 하나에 열거된 RNAi 작용제의 그룹으로부터 선택되는, 이중 가닥 RNAi 작용제.

#### 청구항 35

세포에서 트랜스티레틴(TTR)의 발현을 억제하기 위한 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제로서, 상기 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2에 완전히 상보성인 영역을 포함하고,

각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고,

실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고,

센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하고;

센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합되고, 리간드는 2가 또는 3가 분지형 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GaINAc 유도체인, 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제.

#### 청구항 36

제35항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 작용제는 화학식 (IIIe)에 의해 제시되는 이중 가닥 RNAi 작용제:

센스: 5' - N<sub>a</sub> - Y Y Y - N<sub>b</sub> - 3'

안티센스: 3' - n<sub>p</sub>' - N<sub>a</sub>' - Y'Y'Y' - N<sub>b</sub>' - 5' (IIIe)

(상기 식에서:

n<sub>p</sub>'는 2개의 뉴클레오타이드 오버행이며, n<sub>p</sub>' 내의 각각의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 연결을 통해 이웃 뉴클레오타이드와 연결되고;

각각의 N<sub>a</sub>, N<sub>b</sub>, N<sub>a</sub>' 및 N<sub>b</sub>'는 독립적으로 변형되거나, 비변형된 8 내지 10개의 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;

YYY 및 Y'Y'Y' 각각은 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나의 모티프를 나타내고, 이러한 변형은 2'-0-메틸 또는 2'-플루오로 변형임).

#### 청구항 37

세포에서 트랜스티레틴(TTR)의 발현을 억제하기 위한 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제로서, 상기 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 센스 및 안티센스 가닥은 표 5의 뉴클레오타이드 서열 중 임의의 것으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제.

#### 청구항 38

세포에서 트랜스티레틴(TTR)의 발현을 억제하기 위한 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제로서, 상기 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 표 6의 안티센스 서열 중 어느 하나와 3

개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 상보성의 영역을 포함하고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이며;

센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된, 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제.

#### 청구항 39

제38항에 있어서, 센스 및 안티센스 가닥은 표 6의 뉴클레오타이드 서열 중 임의의 것으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이중 가닥 RNAi 작용제.

#### 청구항 40

제38항에 있어서, 센스 및 안티센스 가닥은 표 7의 뉴클레오타이드 서열 중 임의의 것으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이중 가닥 RNAi 작용제.

#### 청구항 41

제1항, 제35항, 제37항 및 제38항 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNAi 작용제를 함유하는 세포.

#### 청구항 42

제1항, 제35항, 제37항 및 제38항 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNAi 작용제를 함유하는 벡터.

#### 청구항 43

제42항의 벡터를 포함하는 세포.

#### 청구항 44

제1항, 제35항, 제37항 및 제38항 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNAi 작용제 또는 제42항의 벡터를 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 45

제44항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 비완충 용액 중에 투여되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 46

제45항에 있어서, 상기 비완충 용액은 염수 또는 물인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 47

제44항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 작용제는 완충 용액과 함께 투여되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 48

제47항에 있어서, 상기 완충 용액은 아세테이트, 시트레이트, 프롤라민, 카보네이트, 또는 포스페이트 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 49

제47항에 있어서, 상기 완충 용액은 포스페이트 완충 염수(PBS)인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 50

세포에서 트랜스티레틴(TTR) 발현을 억제하는 방법으로서,

제1항, 제35항, 제37항 및 제38항 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNAi 작용제, 제42항의 벡터, 또는 제44항 내지 제49항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물과 세포를 접촉시킴으로써, 세포에서 TTR 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 상기 세포는 대상체 내에 존재하는, 방법.

**청구항 52**

제51항에 있어서, 대상체는 인간인, 방법.

**청구항 53**

제52항에 있어서, 대상체는 TTR-관련 질병을 앓고 있는, 방법.

**청구항 54**

제50항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, TTR 발현은 적어도 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 98% 또는 약 100%만큼 억제되는, 방법.

**청구항 55**

TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체의 치료 방법으로서, 제1항, 제35항, 제37항 및 제38항 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNAi 작용제, 제42항의 벡터, 또는 제44항 내지 제49항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물의 치료적 유효량 또는 예방적 유효량을 대상체에 투여함으로써, 상기 대상체를 치료하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 56**

TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 이중 가닥 RNAi 작용제의 치료적 유효량 또는 예방적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,

이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2에 상보성인 영역을 포함하고,

각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고,

실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고,

센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며;

센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된, 방법.

**청구항 57**

TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체에서 신경병성 손상 점수(Neuropathy Impairment Score)(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나, 지연시키거나, 저지시키는 방법으로서, 제1항, 제35항, 제37항 및 제38항 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNAi 작용제, 제42항의 벡터, 또는 제44항 내지 제49항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물의 치료적 유효량 또는 예방적 유효량을 대상체에 투여함으로써, 상기 대상체에서 신경병성 손상 점수(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나, 지연시키거나, 저지시키는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 58**

TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체에서 신경병성 손상 점수(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나, 지연시키거나, 저지시키는 방법으로서, 이중 가닥 RNAi 작용제의 치료적 유효량 또는 예방적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,

이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2

에 상보성인 영역을 포함하고,

각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고,

실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고,

센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며;

센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된, 방법.

#### 청구항 59

TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체에서 6-분 보행 시험(6MWT)을 증가시키는 방법으로서, 제1항, 제35항, 제37항 및 제38항 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNAi 작용제, 제42항의 벡터, 또는 제44항 내지 제49항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물의 치료적 유효량 또는 예방적 유효량을 대상체에 투여함으로써, 상기 대상체에서 6-분 보행 시험(6MWT)을 증가시키는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 60

TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체에서 6-분 보행 시험(6MWT)을 증가시키는 방법으로서, 이중 가닥 RNAi 작용제의 치료적 유효량 또는 예방적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,

이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2에 상보성인 영역을 포함하고,

각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고,

실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고,

센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며;

센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된, 방법.

#### 청구항 61

제56항, 제58항 및 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 작용제는 화학식 (IIIe)에 의해 제시되는 방법:

센스: 5' - N<sub>a</sub> - Y Y Y - N<sub>b</sub> - 3'

안티센스: 3' - n<sub>p</sub>' - N<sub>a</sub>' - Y'Y'Y' - N<sub>b</sub>' - 5' (IIIe)

(상기 식에서:

n<sub>p</sub>'는 2개의 뉴클레오타이드 오버행이며, n<sub>p</sub>' 내의 각각의 뉴클레오타이드는 이웃 뉴클레오타이드에 포스포로티오에이트 연결을 통해 연결되고;

각각의 N<sub>a</sub>, N<sub>b</sub>, N<sub>b</sub>' 및 N<sub>b</sub>'는 독립적으로, 변형되거나, 비변형된 0 내지 25개의 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;

YYY 및 Y'Y'Y' 각각은 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나의 모티프를

나타냄).

#### 청구항 62

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간인, 방법.

#### 청구항 63

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 TTR-관련 질병을 앓고 있는 대상체인, 방법.

#### 청구항 64

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체인, 방법.

#### 청구항 65

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 TTR-관련 질병의 발병과 관련된 TTR 유전자 돌연변이를 보유하는, 방법.

#### 청구항 66

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TTR-관련 질병은 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA), 전신성 가족성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP), 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC), 연수막/중추신경계(CNS) 아밀로이드증, 및 과티록신혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 67

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 TTR-관련 아밀로이드증을 가지며, 상기 방법은 상기 대상체에서 아밀로이드 TTR 침착을 감소시키는, 방법.

#### 청구항 68

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 작용제는 피하, 정맥내, 근육내, 기관지내, 흉강내, 복강내, 동맥내, 림프, 뇌척수, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 투여 수단에 의해 상기 대상체에 투여되는, 방법.

#### 청구항 69

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 작용제는 피하, 근육내 또는 정맥내 투여를 통해 상기 대상체에 투여되는, 방법.

#### 청구항 70

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 작용제는 피하 투여를 통해 상기 대상체에 투여되는, 방법.

#### 청구항 71

제70항에 있어서, 피하 투여는 자가 투여인, 방법.

#### 청구항 72

제71항에 있어서, 자가 투여는 프리 필드 주사기(pre-filled syringe) 또는 자동-주입기 주사기를 통해 이루어지는, 방법.

#### 청구항 73

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터 유래한 샘플에서 TTR mRNA 발현 또는 TTR 단백질 발현의 수준을 평가하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 74**

제56항, 제58항 및 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥은

5'- usCfsuugguuacauAfaaucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 6),

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7),

5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 8), 및

5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 9)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이고; VP는 5'-포스페이트 모방체인, 방법.

**청구항 75**

제56항, 제58항 및 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 및 안티센스 가닥은

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- usCfsuugguuacauAfaaucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 6);

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7);

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 8); 및

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 9)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이고; VP는 5'-포스페이트 모방체인, 방법.

**청구항 76**

제75항에 있어서, 센스 및 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7)을 포함하고,

a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결인, 방법.

**청구항 77**

제70항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 4주마다, 5주마다, 또는 6주마다 만성적으로 투여되는, 방법.

**청구항 78**

TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 약 50 mg 내지 약 250 mg의 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제의 고정 투여량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,

이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2에 상보성인 영역을 포함하고,

각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고,

실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고,

센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며;

센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된, 방법.

#### 청구항 79

TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체에서 신경병성 손상 점수(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나, 지연시키거나, 저지시키는 방법으로서, 약 50 mg 내지 약 250 mg의 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제의 고정 투여량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,

이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2에 상보성인 영역을 포함하고,

각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고,

실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고,

센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며;

센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된, 방법.

#### 청구항 80

TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체에서 6-분 보행 시험(6MWT)을 증가시키는 방법으로서, 약 50 mg 내지 약 250 mg의 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제의 고정 투여량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,

이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2에 상보성인 영역을 포함하고,

각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고,

실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고,

센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고;

센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며;

센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된, 방법.

#### 청구항 81

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 작용제는 화학식 (IIIe)에 의해 제시되는 방법:

센스: 5' - N<sub>a</sub> - Y Y Y - N<sub>b</sub> - 3'

안티센스: 3' - n<sub>p</sub>' - N<sub>a</sub>' - Y'Y'Y' - N<sub>b</sub>' - 5' (IIIe)

(상기 식에서:

n<sub>p</sub>'는 2개의 뉴클레오타이드 오버행이며, n<sub>p</sub>' 내의 각각의 뉴클레오타이드는 이웃 뉴클레오타이드에 포스포로티

오에이트 연결을 통해 연결되고;

각각의 N<sub>a</sub>, N<sub>b</sub>, N<sub>b</sub>' 및 N<sub>b</sub>'는 독립적으로, 변형되거나, 비변형된 0 내지 25개의 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;

YYY 및 Y'Y'Y' 각각은 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나의 모티프를 나타냄).

### 청구항 82

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥은

5'- usCfsuugguuacauaugAfaaucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 6),

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7),

5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 8), 및

5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 9)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이고; VP는 5'-포스페이트 모방체인, 방법.

### 청구항 83

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 및 안티센스 가닥은

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- usCfsuugguuacauaugAfaaucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 6);

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7);

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 8); 및

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 9)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이고; VP는 5'-포스페이트 모방체인, 방법.

### 청구항 84

제83항에 있어서, 센스 및 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7)을 포함하고,

a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결인, 방법.

### 청구항 85

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 약 50 mg의 고정 투여량으로 투여되는, 방법.

### 청구항 86

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 약 75 mg의 고정 투여량으로

투여되는, 방법.

#### 청구항 87

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 약 100 mg의 고정 투여량으로 투여되는, 방법.

#### 청구항 88

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 약 125 mg의 고정 투여량으로 투여되는, 방법.

#### 청구항 89

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 약 150 mg의 고정 투여량으로 투여되는, 방법.

#### 청구항 90

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 약 175 mg의 고정 투여량으로 투여되는, 방법.

#### 청구항 91

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 약 200 mg의 고정 투여량으로 투여되는, 방법.

#### 청구항 92

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 약 225 mg의 고정 투여량으로 투여되는, 방법.

#### 청구항 93

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 약 250 mg의 고정 투여량으로 투여되는, 방법.

#### 청구항 94

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제의 고정 투여량은 대상체에 약 4주마다, 5주마다, 6주마다, 8주마다 또는 분기마다 1회 투여되는, 방법.

#### 청구항 95

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제의 고정 투여량은 대상체에 약 분기마다 1회 투여되는, 방법.

#### 청구항 96

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 만성적으로 투여되는, 방법.

#### 청구항 97

제78항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간인, 방법.

#### 청구항 98

제97항에 있어서, 상기 대상체는 TTR-관련 질병을 앓고 있는 대상체인, 방법.

#### 청구항 99

제97항에 있어서, 상기 대상체는 TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체인, 방법.

**청구항 100**

제78항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 TTR-관련 질병의 발병과 관련된 TTR 유전자 돌연변이를 보유하는, 방법.

**청구항 101**

제78항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TTR-관련 질병은 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA), 전신성 가족성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP), 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC), 연수막/중추신경계(CNS) 아밀로이드증, 및 과티록신혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 102**

제78항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 TTR-관련 아밀로이드증을 가지며, 상기 방법은 상기 대상체에서 아밀로이드 TTR 침착을 감소시키는, 방법.

**청구항 103**

제78항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 작용제는 피하, 정맥내, 근육내, 기관지내, 흉강내, 복강내, 동맥내, 림프, 뇌척수, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 투여 수단에 의해 상기 대상체에 투여되는, 방법.

**청구항 104**

제78항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 작용제는 상기 대상체에 피하, 근육내 또는 정맥내 투여를 통해 투여되는, 방법.

**청구항 105**

제78항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 가닥 RNAi 작용제는 상기 대상체에 피하 투여를 통해 투여되는, 방법.

**청구항 106**

제105항에 있어서, 피하 투여는 자가 투여인, 방법.

**청구항 107**

제106항에 있어서, 자가 투여는 프리 필드 주사기 또는 자동-주입기 주사기를 통해 이루어지는, 방법.

**청구항 108**

제78항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터 유래한 샘플에서 TTR mRNA 발현 또는 TTR 단백질 발현의 수준을 평가하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**발명의 설명****기술 분야****배경 기술****관련 출원**

본 출원은 2015년 7월 31일자로 출원된 미국 특허 출원 제 62/199,563호, 및 2016년 1월 27일자로 출원된 미국 특허 출원 제 62/287,518호에 대한 우선권의 이익을 주장한다. 전술된 출원의 각각의 전체 내용은 본 명세서에서 참조로 포함된다.

본 출원은, 각각의 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는, 2013년 9월 23일자로 출원된 미국 특허 출원 제 61/881,257호, 및 2014년 9월 23일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2014/056923과 관련된 것이다. 추가로, 본

출원은, 각각의 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는, 2011년 11월 18일자로 출원된 미국 가출원 제 61/561,710호, 2012년 11월 16일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2012/065601, 2012년 3월 26일자로 출원된 미국 가출원 제 61/615,618호, 2012년 8월 6일자로 출원된 미국 가출원 제 61/680,098호, 2014년 5월 16일자로 출원된 미국 출원 제 14/358,972호 및 2012년 11월 16일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2012/065691과 관련된 것이다.

#### 서열목록

본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되었으며, 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함되는 서열 목록을 포함한다. 2016년 7월 8일에 생성된 상기 ASCII 사본의 명칭은 121301-03020\_SL.txt이며, 크기는 68,289 바이트이다.

트랜스티레틴(TTR)(또한, 프리알부민으로 일컬어짐)은 혈청 및 뇌척수액(CSF)에서 발견된다. TTR은 레티놀-결합 단백질(RBP) 및 티록신(T4)을 수송하며, 또한, 혈액 및 CSF에서 RBP와의 그의 결합을 통해, 레티놀(비타민 A)의 담체로서 작용한다. 트랜스티레틴은 그의 티록신 및 레티놀의 수송에서 따른 명칭이다. TTR은 또한 프로테아제로서 기능하며, 아포A-I(주요 HDL 아포지질단백질), 아밀로이드  $\beta$ -펩타이드, 및 신경펩타이드 Y를 포함한 단백질을 절단할 수 있다. 문헌[Liz, M.A. et al. (2010) *IUBMB Life*, 62(6):429-435]을 참조한다.

TTR은, 베타 시트 구조에 풍부한 4개의 동일한 127-아미노산 하위단위(단량체)의 사량체이다. 각각의 단량체는 2개의 4-가닥 베타 시트 및 장축 타원체의 모양을 갖는다. 역평행 베타 시트 상호작용은 단량체로 이량체로 연결한다. 각각의 단량체로부터의 짧은 루프는 주요 이량체-이량체 상호작용을 형성한다. 이들 2쌍의 루프는 이량체의 반대 방향의 볼록한 베타 시트를 분리함으로써, 내부 채널을 형성시킨다.

간은 주요 TTR 발현 부위이다. 다른 중요한 발현 부위는 맥락총(choroid plexus), 망막(특히, 망막 색소 상피) 및 췌장을 포함한다.

트랜스티레틴은, 아밀로이드 피브릴의 형성시 전구체 단백질인 적어도 27종의 개별 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 조직에서의 아밀로이드 피브릴의 세포 외 침착은 아밀로이드증의 특징이다. 아밀로이드 피브릴은 잘못 접힌 단백질 응집체로 구성되며, 이는 전구체 단백질의 과량 생성 또는 그의 특정 돌연변이로부터 생성될 수 있다. TTR의 아밀로이드 형성 가능성은 그의 광범위한 베타 시트 구조와 관련될 수 있으며; X-선 결정학 연구는, 특정 아밀로이드성 돌연변이가 단백질의 사량체 구조를 불안정하게 한다는 것을 시사한다. 예를 들어, 문헌[Saraiva M.J.M. (2002) *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(12):1-11]을 참조한다.

아밀로이드증은, 아밀로이드 침착을 특징으로 하는 아밀로이드 질병의 그룹에 대한 일반 용어이다. 아밀로이드 질병은 그의 전구체 단백질을 기반으로 분류되고; 예를 들어, 그 명칭은 아밀로이드의 "A"로 시작하여, 전구체 단백질의 약자가 이어지며, 예를 들어 위의 문헌에서 아밀로이드성 트랜스티레틴의 경우 ATTR이다.

다수의 TTR-관련 질병이 존재하며, 대부분은 아밀로이드 질병이다. 정상-서열 TTR은, 노년층에서 심장 아밀로이드증과 관련되며, 이는 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA)(또한, 이른바 노인성 심장 아밀로이드증(SCA) 또는 심장 아밀로이드증)으로 일컬어진다. SSA는 종종, 많은 다른 기관에서 미세 침착이 수반된다. TTR 아밀로이드증은 다양한 형태로 명백해진다. 말초 신경계가 더 현저하게 영향을 받은 경우, 이 질병은 가족성 아밀로이드성 다발 신경병증(FAP)으로 일컬어진다. 심장이 주로 포함되나, 신경계는 그러하지 않은 경우, 이 질병은 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC)으로 일컬어진다. TTR 아밀로이드증의 제3 주요 유형은 또한 연수막 또는 뇌척수막혈관 아밀로이드증으로 인식되어 있는 연수막 아밀로이드증, 중추신경계(CNS) 아밀로이드증, 또는 아밀로이드증 VII 형이다. TTR의 돌연변이는 또한 아밀로이드성 유리체 혼탁, 수근관 증후군, 및 갑상선 기능 정상 과티록신혈증을 야기할 수 있으며, 이는, 티록신에 대한 친화도가 증가된 돌연변이 TTR 분자로 인한 TTR과 티록신의 증가된 결합에 부수하는 것으로 여겨지는 비-아밀로이드성 질병이다. 예를 들어, 문헌[Moses et al. (1982) *J. Clin. Invest.*, 86, 2025-2033]을 참조한다.

비정상적인 아밀로이드 단백질은 체세포 돌연변이를 통해 유전되거나, 획득될 수 있다. 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]. ATTR과 결합된 트랜스티레틴은 유전성 전신성 아밀로이드증의 가장 빈번한 형태이다. 문헌[Lobato, L. (2003) *J. Nephrol.*, 16:438-442]. TTR 돌연변이는 TTR 아밀로이드 형성 과정을 가속화시키고, ATTR의 발병의 가장 중요한 위험 인자이다. 85종 초과의 아밀로이드성 TTR 변이체는 전신성 가족성

아밀로이드증을 야기하는 것으로 인식되어 있다. TTR 돌연변이는 일반적으로, 위의 문헌에서 일부 돌연변이가 심근병증 또는 유리체 혼탁과 관련된다 할지라도, 특히 말초 신경계가 관여되는 전신성 아밀로이드 침착을 유발 한다.

[0013] V30M 돌연변이는 가장 일반적인 TTR 돌연변이이다. 예를 들어, 문헌[Lobato, L. (2003) *J Nephrol*, 16:438-442]을 참조한다. V122I 돌연변이는 아프리카계 미국인 인구의 3.9%가 가지며, FAC의 가장 흔한 원인이다. 문헌 [Jacobson, D.R. et al. (1997) *N. Engl. J. Med.* 336 (7): 466-73]. SSA는 80세 초과의 인구 중 25% 초과에 영향을 주는 것으로 예측된다. 문헌[Westermark, P. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (7): 2843-5].

[0014] 따라서, 당업계는 TTR-관련 질병을 위한 효과적인 치료가 필요한 실정이다.

### 발명의 내용

[0015] 본 발명은 트랜스티레틴(TTR) 유전자를 표적화하는 RNAi 작용제, 예를 들어, 이중 가닥 RNAi 작용제, 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 대상체에서 본 발명의 RNAi 작용제, 예를 들어, 이중 가닥 RNAi 작용제를 사용하여, TTR의 발현을 억제하는 방법 및 TTR-관련 질병을 치료하거나, 예방하는 방법을 또한 제공한다. 본 발명은 적어도 부분적으로는, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥에 8개 이하의 2'-플루오로 변형, 안티센스 가닥에 6개 이하의 2'-플루오로 변형, 센스 가닥의 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결, 안티센스 가닥의 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결, 및 리간드, 예를 들어, GalNAc3 리간드를 포함하는 RNAi 작용제가 TTR 유전자의 활성을 침묵화하기에 효과적이라는 본 명세서에서 제시된 발견을 기반으로 한다. 이러한 작용제는 놀랍게도 증진된 TTR 유전자 침묵화 활성을 나타낸다. 이론에 의해 제한하고자 하는 것은 아니나, 이러한 RNAi 작용제의 전술된 변형 및 특이적 표적 부위의 조합 또는 하위 조합이 본 발명의 RNAi 작용제에 개선된 효능, 안정성, 효력 및 지속기간을 부여하는 것으로 고려된다.

[0016] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 세포에서 트랜스티레틴(TTR)의 발현을 억제하기 위한 이중 가닥 리보핵산 (RNAi) 작용제를 제공하고, 여기서, RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'- UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0017] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 화학식 (IIIe)에 의해 제시된다:

[0018] 센스: 5' - N<sub>a</sub> -Y Y Y - N<sub>b</sub> - 3'

[0019] 안티센스: 3' - n<sub>p</sub>' -N<sub>a</sub>' - Y'Y'Y' - N<sub>b</sub>' - 5' (IIIe)

[0020] 상기 식에서:

[0021] n<sub>p</sub>'는 2개의 뉴클레오타이드 오버행(overhang)이며, n<sub>p</sub>' 내의 각각의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 연결을 통해 이웃 뉴클레오타이드에 연결되고;

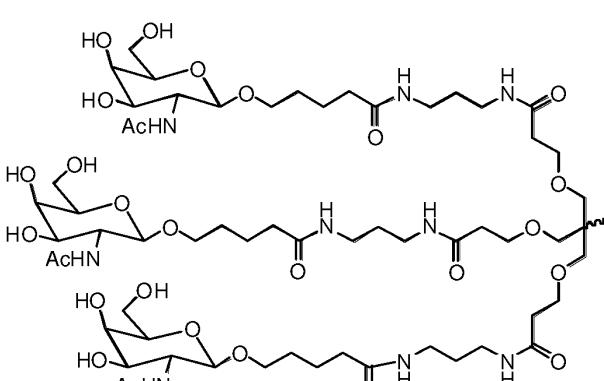
[0022] 각각의 N<sub>a</sub>, N<sub>b</sub>, N<sub>a</sub>' 및 N<sub>b</sub>'는 독립적으로, 변형되거나, 비변형된 0 내지 25개의 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;

[0023] YYY 및 Y'Y'Y' 각각은 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나의 모티프를 나타낸다.

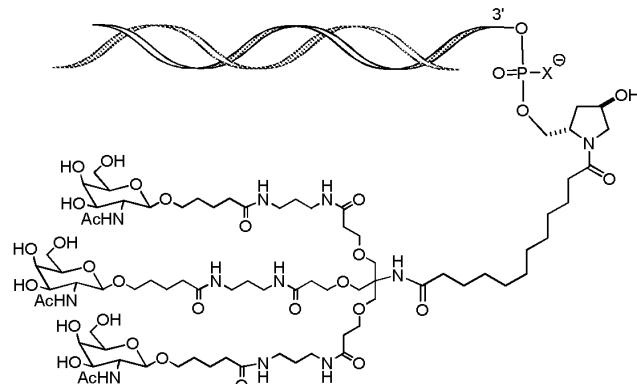
[0024] 일 구현예에서, YYY 모티프는 센스 가닥의 절단 부위 또는 그 주위에 발생한다. 일 구현예에서, Y'Y'Y' 모티프는 5' 말단으로부터 안티센스 가닥의 11, 12 및 13 위치에서 발생한다.

[0025] 일 구현예에서, Y 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 변형을 함유한다.

[0026] 일 구현예에서, Y' 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형을 함유한다.

- [0027] 이중 가닥 영역은 15 내지 30개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 17 내지 23개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 17 내지 25개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 23 내지 27개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 19 내지 21개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 또는 21 내지 23개의 뉴클레오타이드 쌍 길이일 수 있다.
- [0028] 이중 가닥 RNAi 작용제의 각각의 가닥은 15 내지 30개의 뉴클레오타이드 또는 19 내지 30개의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다.
- [0029] 일 구현예에서, 뉴클레오타이드의 변형은 테옥시-뉴클레오타이드, 3'-말단 테옥시-티민(dT) 뉴클레오타이드, 2'-0-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 2'-데옥시-변형된 뉴클레오타이드, 잠금 뉴클레오타이드(locked nucleotide), 비잠금 뉴클레오타이드(unlocked nucleotide), 입체형태적으로 제한된 뉴클레오타이드, 결속성 에틸 뉴클레오타이드(constrained ethyl nucleotide), 무염기 뉴클레오타이드(abasic nucleotide), 2'-아미노-변형된 뉴클레오타이드, 2'-0-알릴-변형된 뉴클레오타이드, 2'-C-알킬-변형된 뉴클레오타이드, 2'-하이드록실-변형된 뉴클레오타이드, 2'-메톡시에틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-0-알킬-변형된 뉴클레오타이드, 모르폴리노 뉴클레오타이드, 포스포라미데이트, 뉴클레오타이드를 포함하는 비천연 염기, 테트라하이드로페란 변형된 뉴클레오타이드, 1,5-안하이드로헥시톨 변형된 뉴클레오타이드, 사이클로헥세닐 변형된 뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트기를 포함하는 뉴클레오타이드, 메틸포스포네이트기를 포함하는 뉴클레오타이드, 5'-포스페이트를 포함하는 뉴클레오타이드, 및 5'-포스페이트 모방체를 포함하는 뉴클레오타이드, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0030] 일 구현예에서, 뉴클레오타이드의 변형은 2'-0-메틸 또는 2'-플루오로 변형이다.
- [0031] 센스 가닥은 7개 이하의 2'-플루오로 변형, 6개 이하의 2'-플루오로 변형, 5개 이하의 2'-플루오로 변형, 4개 이하의 2'-플루오로 변형, 3개 이하의 2'-플루오로 변형, 또는 2개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함할 수 있다.
- [0032] 안티센스 가닥은 5개 이하의 2'-플루오로 변형, 4개 이하의 2'-플루오로 변형, 3개 이하의 2'-플루오로 변형, 또는 2개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함할 수 있다.
- [0033] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥의 5' 뉴클레오타이드에 5'-포스페이트 또는 5'-포스페이트 모방체를 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥의 5' 뉴클레오타이드에 5'-포스페이트 모방체를 추가로 포함한다.
- [0034] 일 구현예에서, 5'-포스페이트 모방체는 5'-비닐 포스페이트(5'-VP)이다.
- [0035] 일 구현예에서, 리간드는 2가 또는 3가 분지형 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체이다. 또 다른 구현예에서, 리간드는 하기와 같다:
- 
- [0036]
- [0037] 일 구현예에서, 리간드는 센스 가닥의 3' 말단에 부착된다.

[0038] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용체는 하기 도식에 도시된 바와 같은 리간드에 접합된다:



[0039]

[0040] 상기 식에서, X는 O 또는 S임.

[0041] 일 구현예에서, 안티센스 가닥은

[0042] 5'- usCfsuugguuacaugAfaaucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 6),

[0043] 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO:7),

[0044] 5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 8), 및

[0045] 5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 9)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이고; VP는 5'-포스페이트 모방체이다.

[0046] 일 구현예에서, 센스 및 안티센스 가닥은

[0047] 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

[0048] 5'- usCfsuugguuacaugAfaaucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 6);

[0049] 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

[0050] 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7);

[0051] 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

[0052] 5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 8); 및

[0053] 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

[0054] 5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 9)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이고; VP는 5'-포스페이트 모방체이다. 또 다른 구현예에서, 센스 및 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및

[0055] 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7)을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용체는 표 1 및 3 중 어느 하나에 열거된 RNAi 작용체 중 어느 하나의 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용체는 AD-65492이다.

[0056] 일 양태에서, 본 발명은 세포에서 트랜스티레틴(TTR)의 발현을 억제하기 위한 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용체를 제공하고, 여기서, RNAi 작용체는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'- UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')에 완전히 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2

개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합되며, 리간드는 2가 또는 3가 분지형 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체이다.

[0057] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용체는 화학식 (IIIe)에 의해 제시된다:

[0058] 센스: 5' - N<sub>a</sub> -Y Y Y - N<sub>b</sub> - 3'

[0059] 앤티센스: 3' - n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'- Y'Y'Y'- N<sub>b</sub>'- 5' (IIIe)

[0060] 상기 식에서:

[0061] n<sub>p</sub>'는 2개의 뉴클레오타이드 오버행이며, n<sub>p</sub>' 내의 각각의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 연결을 통해 이웃 뉴클레오타이드에 연결되고;

[0062] 각각의 N<sub>a</sub>, N<sub>b</sub>, N<sub>a</sub>' 및 N<sub>b</sub>'는 독립적으로 변형되거나, 비변형된 8 내지 10개의 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;

[0063] YYY 및 Y'Y'Y' 각각은 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나의 모티프를 나타내고, 이러한 변형은 2'-0-메틸 또는 2'-플루오로 변형이다.

[0064] 본 발명은 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용체를 함유하는 세포, 본 발명의 벡터 및, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용체 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 약제학적 조성물을 포함하는 세포를 또한 제공한다.

[0065] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용체는 비완충 용액, 예를 들어, 염수 또는 물 중에 투여된다.

[0066] 또 다른 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용체는 완충 용액과 함께 투여된다. 일 구현예에서, 완충 용액은 아세테이트, 시트레이트, 프롤라민, 카보네이트, 또는 포스페이트 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 완충 용액은 포스페이트 완충 염수(PBS)이다.

[0067] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포에서 트랜스티레틴(TTR) 발현을 억제하는 방법을 제공한다. 방법은 (a) 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용체, 본 발명의 벡터 또는 본 발명의 약제학적 조성물과 세포를 접촉시키는 단계; 및 (b) TTR 유전자의 mRNA 전사체의 분해가 획득되기에 충분한 시간 동안 단계 (a)에서 생성된 세포를 유지시킴으로써, 세포에서 TTR 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함한다.

[0068] 일 구현예에서, 세포는 대상체 내에 존재한다.

[0069] 일 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[0070] 일 구현예에서, 대상체는 TTR-관련 질병을 앓고 있다.

[0071] 일 구현예에서, TTR 발현은 적어도 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 98% 또는 약 100%만큼 억제된다.

[0072] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에 치료적 유효량의 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용체, 또는 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하여, 대상체를 치료함으로써, 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0073] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에 예방적 유효량의 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용체, 또는 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하여, 대상체를 예방적으로 치료함으로써, 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애의 발병 위험이 있는 대상체를 예방적으로 치료하는 방법을 제공한다.

[0074] 추가의 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 치료적 유효량의 이중 가닥 RNAi 작용체를 투여하는 단계를 포함하고,

[0075] 여기서, 이중 가닥 RNAi 작용체는 앤티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 앤티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'- UGGGAUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 앤티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 앤티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 앤티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포

스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0076] 추가의 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애의 발병 위협이 있는 대상체를 예방적으로 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 예방적 유효량의 이중 가닥 RNAi 작용제를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'- UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0077] 일 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체에서 신경병성 손상 점수(Neuropathy Impairment Score)(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나, 지연시키거나, 저지시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 치료적 유효량의 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용제, 또는 본 발명의 백터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 투여함으로써, 대상체에서 신경병성 손상 점수(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나, 지연시키거나, 저지시키는 단계를 포함한다.

[0078] 추가의 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체에서 신경병성 손상 점수(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나, 지연시키거나, 저지시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 치료적 유효량의 이중 가닥 RNAi 작용제를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0079] 일 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체에서 6-분 보행 시험(6MWT)을 증가시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 치료적 유효량의 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용제, 또는 본 발명의 백터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 투여함으로써, 대상체에서 6-분 보행 시험(6MWT)을 증가시키는 단계를 포함한다.

[0080] 추가의 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체에서 6-분 보행 시험(6MWT)을 증가시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 치료적 유효량의 이중 가닥 RNAi 작용제를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0081] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 화학식 (IIIe)에 의해 제시된다:

[0082] 센스: 5' - N<sub>a</sub> - Y Y Y - N<sub>b</sub> - 3'

[0083] 안티센스: 3' - n<sub>p</sub>' - N<sub>a</sub>' - Y'Y'Y' - N<sub>b</sub>' - 5' (IIIe)

[0084] 상기 식에서:

[0085] n<sub>p</sub>'는 2개의 뉴클레오타이드 오버행이며, n<sub>p</sub>' 내의 각각의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 연결을 통해 이웃 뉴클레오타이드에 연결되고;

[0086] 각각의 N<sub>a</sub>, N<sub>b</sub>, N<sub>b</sub>'는 독립적으로, 변형되거나, 비변형된 0 내지 25개의 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;

[0087] YYY 및 Y'Y'Y' 각각은 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나의 모티프를 나타낸다.

다.

[0088] 일 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[0089] 일 구현예에서, 대상체는 TTR-관련 질병을 앓고 있는 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 대상체는 TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체이다. 일 구현예에서, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체 또는 TTR-관련 질병의 가족력이 있는 대상체 또는 TTR 아밀로이드증의 발병을 시사하는 징후 또는 증상을 가진 대상체는 TTR 관련 질병의 발병과 관련된 TTR 유전자 돌연변이를 보유한다.

[0090] 일 구현예에서, TTR-관련 질병은 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA), 전신성 가족성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP), 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC), 연수막/중추신경계(CNS) 아밀로이드증, 및 파티록신혈증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0091] 일 구현예에서, 대상체는 TTR-관련 아밀로이드증을 가지며, 이러한 방법은 대상체에서 아밀로이드 TTR 침착을 감소시킨다.

[0092] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 피하, 정맥내, 근육내, 기관지내, 흉강내, 복강내, 동맥내, 램프, 뇌척수, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 투여 수단에 의해 대상체에 투여된다. 또 다른 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 피하, 근육내 또는 정맥내 투여를 통해 투여된다. 또 다른 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 피하 투여를 통해 투여된다.

[0093] 일 구현예에서, 이러한 방법은 대상체로부터 유래한 샘플에서 TTR mRNA 발현 또는 TTR 단백질 발현의 수준을 평가하는 단계를 추가로 포함한다.

[0094] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제의 투여는 대상체에서 염증성 반응을 야기하지 않으며, 이는 대상체로부터의 샘플에서 G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12(p70), IL1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토카인 또는 케모카인의 수준을 기반으로 하여 평가되는 바와 같다.

[0095] 일 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 12.5 mg 내지 약 200 mg(예를 들어, 약 12.5 mg, 약 25 mg, 약 50 mg, 약 75 mg, 약 100 mg, 약 125 mg, 약 150 mg, 약 175 mg, 또는 약 200 mg)의 이중 가닥 RNAi 작용제의 고정 투여량을 투여하는 단계를 포함하고, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'- UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0096] 또 다른 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애의 발병 위험이 있는 대상체를 예방적으로 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 12.5 mg 내지 약 200 mg(예를 들어, 약 12.5 mg, 약 25 mg, 약 50 mg, 약 75 mg, 약 100 mg, 약 125 mg, 약 150 mg, 약 175 mg, 또는 약 200 mg)의 이중 가닥 RNAi 작용제의 고정 투여량을 투여하는 단계를 포함하고, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'- UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0097] 일 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 0.15 mg/kg 내지 약 2.5 mg/kg(예를 들어, 약 0.15 mg/kg, 약 0.3 mg/kg, 약 0.6 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 1.25 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg)의 이중 가닥 RNAi 작용제의 투여량을 투여하는 단계를 포함하고, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'- UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안

티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0098] 일 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애의 발병 위험이 있는 대상체를 예방적으로 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 0.15 mg/kg 내지 약 2.5 mg/kg(예를 들어, 약 0.15 mg/kg, 약 0.3 mg/kg, 약 0.6 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 1.25 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg)의 이중 가닥 RNAi 작용제의 투여량을 투여하는 단계를 포함하고, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'- UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0099] 또 다른 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체에서 신경병성 손상 점수(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나, 지연시키거나, 저지시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 0.15 mg/kg 내지 약 2.5 mg/kg(예를 들어, 약 0.15 mg/kg, 약 0.3 mg/kg, 약 0.6 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 1.25 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg)의 이중 가닥 RNAi 작용제의 투여량을 투여하는 단계를 포함하고, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'- UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0100] 또 다른 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체에서 6-분 보행 시험(6MWT)을 증가시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 0.15 mg/kg 내지 약 2.5 mg/kg(예를 들어, 약 0.15 mg/kg, 약 0.3 mg/kg, 약 0.6 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 1.25 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg) of a 이중 가닥 RNAi 작용제의 투여량을 투여하는 단계를 포함하고, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'- UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0101] 일 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 10 mg 내지 약 600 mg, 약 25 mg 내지 약 500 mg, 약 50 mg 내지 약 500 mg, 또는 약 80 mg 내지 약 500 mg, 약 25 mg 내지 약 300 mg, 약 50 mg 내지 약 300 mg, 또는 약 80 mg 내지 약 300 mg(예를 들어, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 75, 약 80, 약 90, 약 100, 약 110, 약 120, 약 125, 약 130, 약 140, 약 150, 약 160, 약 170, 약 175, 약 180, 약 190, 약 200, 약 210, 약 220, 약 225, 약 230, 약 240, 약 250 mg, 약 260, 약 270, 약 275, 약 280, 약 290, 약 300, 약 310, 약 320, 약 325, 약 330, 약 340, 약 350, 약 360, 약 370, 약 375, 약 380, 약 390, 약 400, 약 410, 약 420, 약 425, 약 430, 약 440, 약 450 mg, 약 460, 약 470, 약 475, 약 480, 약 490, 약 500, 약 510, 약 520, 약 525, 약 530, 약 540, 약 550, 약 560, 약 570, 약 575, 약 580, 약 590, 또는 약 600 mg)의 이중 가닥 RNAi 작용제의 고정 투여량을 투여하는 단계를 포함하고, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'- UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0102] 일 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애의 발병 위험이 있는 대상체를 예방적으로 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 10 mg 내지 약 600 mg, 약 25 mg 내지 약 500 mg, 약 50 mg 내지 약

500 mg, 또는 약 80 mg 내지 약 500 mg, 약 25 mg 내지 약 300 mg, 약 50 mg 내지 약 300 mg, 또는 약 80 mg 내지 약 300 mg(예를 들어, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 75, 약 80, 약 90, 약 100, 약 110, 약 120, 약 125, 약 130, 약 140, 약 150, 약 160, 약 170, 약 175, 약 180, 약 190, 약 200, 약 210, 약 220, 약 225, 약 230, 약 240, 약 250 mg, 약 260, 약 270, 약 275, 약 280, 약 290, 약 300, 약 310, 약 320, 약 325, 약 330, 약 340, 약 350, 약 360, 약 370, 약 375, 약 380, 약 390, 약 400, 약 410, 약 420, 약 425, 약 430, 약 440, 약 450 mg, 약 460, 약 470, 약 475, 약 480, 약 490, 약 500, 약 510, 약 520, 약 525, 약 530, 약 540, 약 550, 약 560, 약 570, 약 575, 약 580, 약 590, 또는 약 600 mg)의 이중 가닥 RNAi 작용제의 고정 투여량을 투여하는 단계를 포함하고, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'-UGGGAUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0103] 또 다른 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체에서 신경병성 손상 점수(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나, 지연시키거나, 저지시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 10 mg 내지 약 600 mg, 약 25 mg 내지 약 500 mg, 약 50 mg 내지 약 500 mg, 또는 약 80 mg 내지 약 500 mg, 약 25 mg 내지 약 300 mg, 약 50 mg 내지 약 300 mg, 또는 약 80 mg 내지 약 300 mg(예를 들어, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 75, 약 80, 약 90, 약 100, 약 110, 약 120, 약 125, 약 130, 약 140, 약 150, 약 160, 약 170, 약 175, 약 180, 약 190, 약 200, 약 210, 약 220, 약 225, 약 230, 약 240, 약 250, 약 260, 약 270, 약 275, 약 280, 약 290, 약 300, 약 310, 약 320, 약 325, 약 330, 약 340, 약 350, 약 360, 약 370, 약 375, 약 380, 약 390, 약 400, 약 410, 약 420, 약 425, 약 430, 약 440, 약 450, 약 460, 약 470, 약 475, 약 480, 약 490, 약 500, 약 510, 약 520, 약 525, 약 530, 약 540, 약 550, 약 560, 약 570, 약 575, 약 580, 약 590, 또는 약 600 mg)의 이중 가닥 RNAi 작용제의 고정 투여량을 투여하는 단계를 포함하고, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'-UGGGAUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0104] 또 다른 양태에서, 본 발명은 트랜스티레틴(TTR)-관련 장애를 가진 대상체에서 6-분 보행 시험(6MWT)을 증가시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 10 mg 내지 약 600 mg, 약 25 mg 내지 약 500 mg, 약 50 mg 내지 약 500 mg, 또는 약 80 mg 내지 약 500 mg(예를 들어, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 75, 약 80, 약 90, 약 100, 약 110, 약 120, 약 125, 약 130, 약 140, 약 150, 약 160, 약 170, 약 175, 약 180, 약 190, 약 200, 약 210, 약 220, 약 225, 약 230, 약 240, 약 250, 약 260, 약 270, 약 275, 약 280, 약 290, 약 300, 약 310, 약 320, 약 325, 약 330, 약 340, 약 350, 약 360, 약 370, 약 375, 약 380, 약 390, 약 400, 약 410, 약 420, 약 425, 약 430, 약 440, 약 450, 약 460, 약 470, 약 475, 약 480, 약 490, 약 500, 약 510, 약 520, 약 525, 약 530, 약 540, 약 550, 약 560, 약 570, 약 575, 약 580, 약 590, 또는 약 600 mg)의 이중 가닥 RNAi 작용제의 고정 투여량을 투여하는 단계를 포함하고, 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO:2(5'-UGGGAUUCAUGUAACCAAGA -3')에 상보성인 영역을 포함하고, 각각의 가닥은 약 14 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥은 8개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 안티센스 가닥은 6개 이하의 2'-플루오로 변형을 포함하고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥 각각은 독립적으로 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.

[0105] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 화학식 (IIIe)에 의해 제시된다:

센스: 5' - N<sub>a</sub> - Y Y Y - N<sub>b</sub> - 3'

- [0107] 안티센스: 3' - n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'- Y'Y'Y'- N<sub>b</sub>'- 5'(IIIe)
- [0108] 상기 식에서:
- [0109] n<sub>p</sub>'는 2개의 뉴클레오타이드 오버행이며, n<sub>p</sub>' 내의 각각의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 연결을 통해 이웃 뉴클레오타이드에 연결되고;
- [0110] 각각의 N<sub>a</sub>, N<sub>b</sub>, N<sub>b</sub>'는 독립적으로, 변형되거나, 비변형된 0 내지 25개의 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;
- [0111] YYY 및 Y'Y'Y' 각각은 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나의 모티프를 나타낸다.
- [0112] 일 구현예에서, 안티센스 가닥은
- [0113] 5'- usCfsuugguuacauagAfaaucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 6),
- [0114] 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7),
- [0115] 5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 8), 및
- [0116] 5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 9)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이고; VP는 5'-포스페이트 모방체이다.
- [0117] 일 구현예에서, 센스 및 안티센스 가닥은
- [0118] 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및
- [0119] 5'- usCfsuugguuacauagAfaaucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 6);
- [0120] 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및
- [0121] 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7);
- [0122] 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및
- [0123] 5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 8); 및
- [0124] 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및
- [0125] 5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 9)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이고; VP는 5'-포스페이트 모방체이다.
- [0126] 일 구현예에서, 센스 및 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열
- [0127] 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10) 및
- [0128] 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7)을 포함하고,
- [0129] 여기서, a, c, g, 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이고; s는 포스포로티오에이트 연결이다.
- [0130] 이중 가닥 RNAi 작용제의 고정 투여량은 대상체에 약 4주마다, 5주마다, 6주마다, 8주마다 또는 분기마다 1회 투여될 수 있다.
- [0131] 이중 가닥 RNAi 작용제의 투여량은 대상체에 약 4주마다, 5주마다, 6주마다, 8주마다 또는 분기마다 1회 투여될 수 있다.
- [0132] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 약 분기마다 1회 투여된다.
- [0133] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 만성적으로 투여된다.

- [0134] 일 구현예에서, 대상체는 인간이다.
- [0135] 일 구현예에서, 대상체는 TTR-관련 질병을 앓고 있는 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 대상체는 TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체이다. 일 구현예에서, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체 또는 TTR-관련 질병의 가족력이 있는 대상체 또는 TTR 아밀로이드증의 발병을 시사하는 징후 또는 증상을 가진 대상체는 TTR 관련 질병의 발병과 관련된 TTR 유전자 돌연변이를 보유한다.
- [0136] 일 구현예에서, TTR-관련 질병은 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA), 전신성 가족성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP), 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC), 연수막/중추신경계(CNS) 아밀로이드증, 및 과티록신혈증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0137] 일 구현예에서, 대상체는 TTR-관련 아밀로이드증을 가지며, 이러한 방법은 대상체에서 아밀로이드 TTR 침착을 감소시킨다.
- [0138] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 피하, 정맥내, 근육내, 기관지내, 흉강내, 복강내, 동맥내, 림프, 뇌척수, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 투여 수단에 의해 대상체에 투여된다. 또 다른 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 피하, 근육내 또는 정맥내 투여를 통해 투여된다. 또 다른 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에 피하 투여, 예를 들어, 자가 투여, 예를 들어, 프리 필드 주사기(pre-filled syringe) 또는 자동-주입기 주사기를 통해 투여된다.
- [0139] 일 구현예에서, 이러한 방법은 대상체로부터 유래한 샘플에서 TTR mRNA 발현 또는 TTR 단백질 발현의 수준을 평가하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0140] 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제의 투여는 대상체에서 염증성 반응을 야기하지 않으며, 이는 대상체로부터의 샘플에서 G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12(p70), IL1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토카인 또는 케모카인의 수준을 기반으로 하여 평가되는 바와 같다.
- [0141] 일 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 작용제는 AD-65492이다. AD-65492는 대상체에 4주마다, 5주마다, 또는 6주마다, 또는 분기마다 만성적으로 투여될 수 있다.
- [0142] 일 양태에서, 본 발명은 세포에서 트랜스티레틴(TTR)의 발현을 억제하기 위해 사용되는 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 제공한다. 이러한 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 센스 및 안티센스 가닥은 표 5의 뉴클레오타이드 서열 중 임의의 것으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0143] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포에서 트랜스티레틴(TTR)의 발현을 억제하기 위해 사용되는 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 제공한다. 이러한 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 표 6의 안티센스 서열 중 어느 하나와 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 상보성의 영역을 포함하고, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이며; 센스 가닥은 적어도 하나의 리간드에 접합된다.
- [0144] 센스 및 안티센스 가닥은 표 6 또는 표 7의 뉴클레오타이드 서열 중 임의의 것으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0145] 일 양태에서 본 발명은 세포에서 트랜스티레틴(TTR)의 발현을 억제하기 위해 사용되는 이중 가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 제공하고, 여기서, RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10)을 포함하고, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7)을 포함하고, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이며; s는 포스포로티오에이트 연결이다.
- [0146] 또 다른 양태에서, 본 발명은 TTR-관련 질병을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 50 mg 내지 약 300 mg의 이중 가닥 RNAi 작용제의 투여량을 투여함으로써, TTR-관련 질병을 앓고 있는 대상체를 치료하는 단계를 포함하고, 여기서, RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10)을 포함하고, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7)을 포함하고, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U

이며; s는 포스포로티오에이트 연결이다.

[0147] 또 다른 양태에서, 본 발명은 TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체를 예방적으로 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 50 mg 내지 약 300 mg의 이중 가닥 RNAi 작용제의 투여량을 투여함으로써, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체를 예방적으로 치료하는 단계를 포함하고, 여기서, RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10)을 포함하고, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7)을 포함하고, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이며; s는 포스포로티오에이트 연결이다.

[0148] 일 양태에서, 본 발명은 TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체에서 신경병성 손상 점수(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나, 지연시키거나, 저지시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 50 mg 내지 약 300 mg의 이중 가닥 RNAi 작용제의 투여량을 투여함으로써, 대상체에서 신경 병성 손상 점수(NIS) 또는 변형된 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나, 지연시키거나, 저지시키는 단계를 포함하고, 여기서, RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10)을 포함하고, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7)을 포함하고, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이며; s는 포스포로티오에이트 연결이다.

[0149] 또 다른 양태에서, 본 발명은 TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체에서 6-분 보행 시험(6MWT)을 증가시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 약 50 mg 내지 약 300 mg의 이중 가닥 RNAi 작용제의 투여량을 투여함으로써, TTR-관련 질병을 앓고 있거나, TTR-관련 질병의 발병 위험이 있는 대상체에서 6-분 보행 시험(6MWT)을 증가시키는 단계를 포함하고, 여기서, RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3'(SEQ ID NO: 10)을 포함하고, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3'(SEQ ID NO: 7)을 포함하고, a, c, g, 및 u는 2'-0-메틸(2'-OMe) A, C, G, 또는 U이고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 2'-플루오로 A, C, G, 또는 U이며; s는 포스포로티오에이트 연결이다.

[0150] 본 발명은 하기의 상세한 설명 및 도면에 의해 추가로 예시된다.

### 도면의 간단한 설명

[0151] 도 1은 24시간 트리스토솜 안정성 분석에서의 지정된 RNAi 작용제의 안정성을 도시하는 그래프이다.

도 2a는 24시간 랫트 시토졸 안정성 분석에서의 지정된 RNAi 작용제의 안정성을 도시하는 그래프이며, 도 2b는 24시간 트리스토솜 안정성 분석에서의 지정된 RNAi 작용제의 안정성을 도시하는 그래프이다.

도 3은 지정된 RNAi 작용제의 1 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여 후, 인간 TTR의 V30M 변이체(V30M hTTR)를 발현하는 트랜스제닉 마우스에서의 TTR 단백질 저해를 도시하는 그래프이다.

도 4는 지정된 RNAi 작용제의 2.5 mg/kg의 단일 투여의 피하 투여 후, hTTR V30M을 발현하는 트랜스제닉 마우스에서의 TTR 단백질 저해를 도시하는 그래프이다.

도 5는 3주 동안의 AD-65492의 2 mg/kg의 주별 투여량의 투여(QWx3) 후, hTTR V30M을 발현하는 트랜스제닉 마우스에서의 TTR 단백질 저해를 도시하는 그래프이다.

도 6a는 4개월 동안의 지정된 RNAi 작용제의 0.3 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx4 @ 0.3 mg/kg) 후, hTTR V30M을 발현하는 트랜스제닉 마우스에서의 TTR 단백질 저해를 도시하는 그래프이다. 도 6b는 4개월 동안의 지정된 RNAi 작용제의 1 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx4 @ 1 mg/kg) 후, hTTR V30M을 발현하는 트랜스제닉 마우스에서의 TTR 단백질 저해를 도시하는 그래프이다. 도 6c는 4개월 동안의 지정된 RNAi 작용제의 3 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx4 @ 3 mg/kg) 후, hTTR V30M을 발현하는 트랜스제닉 마우스에서의 TTR 단백질 저해를 도시하는 그래프이다.

도 7은 사이노몰거스 원숭이(cynomolgus monkey)에의 AD-65492 및 AD-66017 피하 투여의 연구 설계를 도시한다.

도 8a는 지정된 RNAi 작용제의 0.3 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여 후, 사이노몰거스 원숭이에서의 TTR 단백질 저해를 도시하는 그래프이다. 도 8b는 AD-65492의 1 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여, AD-66017의 1 mg/kg

의 단일 투여량의 피하 투여 또는 AD-51547의 2.5 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여 후, 사이노몰거스 원숭이에서의 TTR 단백질 저해를 도시하는 그래프이다. 도 8c는 AD-65492의 3 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여, AD-66017의 3 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여, 또는 AD-51547의 5 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여 후, 사이노몰거스 원숭이에서의 TTR 단백질 저해를 도시하는 그래프이다.

도 9a는 AD-65492의 4개월 동안의 1 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx4), AD-66017의 4개월 동안의 1 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx4), 또는 AD-51547의 5일 동안의 5 mg/kg의 일별 투여 후, 4주 동안의 5 mg/kg의 주별 투여량의 피하 투여(QDx5, QWx4) 후, 사이노몰거스 원숭이에서의 TTR 단백질 저해를 도시하는 그래프이다. 도 9b는 지정된 RNAi 작용제의 4개월 동안의 3 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx4) 후, 사이노몰거스 원숭이에서의 TTR 단백질 저해를 도시하는 그래프이다.

도 10a는 사이노몰거스 원숭이에서 AD-65492의 1 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여(과선) 후 TTR 저해와 비교하여, 4개월 동안 AD-65492의 1 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx4; 실선)에 의한 TTR 저해의 유지를 도시하는 그래프이다.

도 10b는 사이노몰거스 원숭이에서 AD-66017의 1 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여(과선)와 비교하여, 4개월 동안 AD-66017의 1 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx4; 실선)의 TTR 단백질 저해에 대한 추가적 효과를 도시하는 그래프이다.

도 11은 AD-65492의 1 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여 또는 AD-65492의 0.3 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여와 비교하여, 4개월 동안의 AD-65492의 1 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx4), 또는 4개월 동안의 AD-65492의 3 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx4) 후, 사이노몰거스 원숭이에서의 지속적인 혈청 TTR 저해를 도시하는 그래프이다.

도 12는 사이노몰거스 원숭이에의 AD-65492 피하 투여의 연구 설계를 도시한다.

도 13은 6개월 동안의 AD-65492의 0.3 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx6) 또는 6개월 동안의 AD-65492의 0.6 mg/kg의 월별 투여량의 피하 투여(QMx6) 또는 AD-65492의 1 mg/kg의 최초 단일 투여(QMx1) 후, 5개월 동안 최초 투여량 후 28일째에 개시하여, AD-65492의 0.3 mg/kg의 월별 투여량의 투여(QMx5) 후, 사이노몰거스 원숭이에서의 강력한 혈청 TTR 저해를 도시하는 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0152] 본 발명은 트랜스티레틴(TTR) 유전자를 표적화하는 RNAi 작용제, 예를 들어, 이중 가닥 RNAi 작용제, 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 대상체에서 본 발명의 RNAi 작용제, 예를 들어, 이중 가닥 RNAi 작용제를 사용하여, TTR의 발현을 억제하는 방법 및 TTR-관련 질병을 치료하거나, 예방하는 방법을 또한 제공한다. 본 발명은, 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드가 변형된 뉴클레오타이드이고, 센스 가닥에 8개 이하의 2'-플루오로 변형(예를 들어, 7개 이하의 2'-플루오로 변형, 6개 이하의 2'-플루오로 변형, 5개 이하의 2'-플루오로 변형, 4개 이하의 2'-플루오로 변형, 5개 이하의 2'-플루오로 변형, 4개 이하의 2'-플루오로 변형, 3개 이하의 2'-플루오로 변형, 또는 2개 이하의 2'-플루오로 변형), 안티센스 가닥에 6개 이하의 2'-플루오로 변형(예를 들어, 5개 이하의 2'-플루오로 변형, 4개 이하의 2'-플루오로 변형, 3개 이하의 2'-플루오로 변형, 또는 2개 이하의 2'-플루오로 변형), 센스 가닥의 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결, 안티센스 가닥의 5' 말단에 2개의 포스포로티오에이트 연결, 및 리간드, 예를 들어, GaINAc3 리간드를 포함하는 RNAi 작용제가 TTR 유전자의 활성을 선택적으로 침묵화하기에 효과적이라는 본 명세서에서 제시된 발견을 기반으로 한다. 이러한 작용제는 놀랍게도 증진된 TTR 유전자 침묵화 활성을 나타낸다. 이론에 의해 제한하고자 하는 것은 아니나, 이러한 RNAi 작용제의 전술된 변형 및 특이적 표적 부위의 조합 또는 하위 조합이 본 발명의 RNAi 작용제에 개선된 효능, 안정성, 효력 및 지속기간을 부여하는 것으로 고려된다.

[0153] 하기의 상세한 설명에는 TTR 유전자의 발현을 선택적으로 억제하기 위한 iRNA를 함유하는 조성물의 제조 및 이용 방법, 및 TTR 유전자의 발현의 억제 및/또는 감소로 효과를 얻을 질병 및 장애를 갖는 대상체를 치료하기 위한 조성물, 용도 및 방법이 개시되어 있다.

### I. 정의

[0155] 본 발명을 보다 용이하게 이해할 수 있도록, 소정의 용어가 먼저 정의된다. 또한, 매개변수의 값 또는 값의 범위가 언급될 때는 언제나, 언급된 값의 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도되는 것을 주목해야 한다.

- [0156] 관사("a" 및 "an")는 관사의 문법상 대상이 1개 또는 1개 초과(즉, 적어도 1개)인 것을 의미하기 위해 본 명세서에 사용된다. 예로서, "하나의 요소"는 하나의 요소 또는 1개 초과의 요소, 예를 들어, 복수의 요소를 의미한다.
- [0157] 용어 "포함하는"은 어구 "포함하나 그에 제한되지 않는"을 의미하는 것으로 본 명세서에 사용되며, 이와 상호교환가능하게 사용된다.
- [0158] 용어 "또는"은 문맥에서 명백하게 다르게 나타내지 않는 한, 용어 "및/또는"을 의미하는 것으로 본 명세서에 사용되며, 이와 상호교환가능하게 사용된다.
- [0159] 용어 "약(about)"은 본 명세서에서 당업계의 통상적인 허용 범위 내에서의 의미로 사용된다. 예를 들어, "약"은 평균으로부터 약 2의 표준 편차 내로 이해될 수 있다. 특정 구현예에서, 약은 +10%를 의미한다. 특정 구현예에서, 약은 +5%를 의미한다. 약이 일련의 수치 또는 범위에 선행하는 경우, "약"은 일련의 수치 또는 범위 각각을 수식할 수 있음이 이해된다.
- [0160] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "트랜스티레틴"("TTR")은 널리 인식되어 있는 유전자 및 단백질을 지칭한다. TTR은 또한 프리알부민, HsT2651, PALB, 및 TBPA로서 인식되어 있다. TTR은 레티놀-결합 단백질(RBP), 티록신(T4) 및 레티놀의 수송인자로서 기능하며, 이는 또한 프로테아제로서 작용한다. 간은 TTR을 혈액으로 분비하며, 맥락총은 TTR을 뇌척수액으로 분비한다. TTR은 또한 혀장 및 망막 색소 상피에서 발현된다. TTR의 최대 임상 관련성은, 정상 및 돌연변이 TTR 단백질 둘 모두가, 응집되어, 세포외에 침착됨으로써, 아밀로이드증을 야기하는 아밀로이드 퍼브릴을 형성할 수 있다는 것이다. 예를 들어, 검토를 위해, 문헌[Saraiva M.J.M. (2002) Expert Reviews in Molecular Medicine, 4(12):1-11]을 참조한다. 랫트 TTR 단백질의 분자 클로닝 및 뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라, mRNA 발현의 분포가 문헌[Dickson, P.W. et al.(1985) J. Biol. Chem. 260(13)8214-8219]에 기재된 바 있다. 인간 TTR의 X-선 결정 구조가 문헌[Blake, C.C. et al.(1974) J Mol Biol 88, 1-12]에 기재된 바 있다. 인간 TTR mRNA 전사체의 서열은 미국 국립생물공학정보센터(NCBI) RefSeq 수탁 번호 NM\_000371(예를 들어, SEQ ID NO:1 및 5)에서 찾아 볼 수 있다. 마우스 TTR mRNA의 서열은 RefSeq 수탁 번호 NM\_013697.2에서 찾아 볼 수 있으며, 랫트 TTR mRNA의 서열은 RefSeq 수탁 번호 NM\_012681.1에서 찾아 볼 수 있다. TTR mRNA 서열의 추가의 예는 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스, 예를 들어, GenBank, UniProt, 및 OMIM을 사용하여 용이하게 입수 가능하다.
- [0161] 본 명세서에 사용되는 "표적 서열"은 일차 전사 산물의 RNA 가공(processing)의 산물인 mRNA를 포함하는, TTR 유전자의 전사 동안 형성되는 mRNA 분자의 뉴클레오타이드 서열의 인접 부분을 지칭한다. 일 구현예에서, 서열의 표적 부분은 TTR 유전자의 전사 동안 형성되는 mRNA 분자의 뉴클레오타이드 서열의 그 부분에서 또는 그 근처에서, 적어도 tRNA-유도 절단을 위한 기질로서 소용되기에 충분히 길 것이다. 일 구현예에서, 표적 서열은 TTR 유전자의 단백질 코딩 영역 내에 존재한다. 또 다른 구현예에서, 표적 서열은 TTR 유전자의 3' UTR 내에 존재한다.
- [0162] 표적 서열은 약 9 내지 36개의 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어, 약 15 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 예를 들어, 표적 서열은 약 15 내지 30개의 뉴클레오타이드, 15 내지 29, 15 내지 28, 15 내지 27, 15 내지 26, 15 내지 25, 15 내지 24, 15 내지 23, 15 내지 22, 15 내지 21, 15 내지 20, 15 내지 19, 15 내지 18, 15 내지 17, 18 내지 30, 18 내지 29, 18 내지 28, 18 내지 27, 18 내지 26, 18 내지 25, 18 내지 24, 18 내지 23, 18 내지 22, 18 내지 21, 18 내지 20, 19 내지 30, 19 내지 29, 19 내지 28, 19 내지 27, 19 내지 26, 19 내지 25, 19 내지 24, 19 내지 23, 19 내지 22, 19 내지 21, 19 내지 20, 20 내지 30, 20 내지 29, 20 내지 28, 20 내지 27, 20 내지 26, 20 내지 25, 20 내지 24, 20 내지 23, 20 내지 22, 20 내지 21, 21 내지 30, 21 내지 29, 21 내지 28, 21 내지 27, 21 내지 26, 21 내지 25, 21 내지 24, 21 내지 23, 또는 21 내지 22개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 약 19 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이다. 다른 구현예에서, 표적 서열은 약 19 내지 약 25개의 뉴클레오타이드 길이이다. 또 다른 구현예에서, 표적 서열은 약 19 내지 약 23개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 약 21 내지 약 23개의 뉴클레오타이드 길이이다. 상기 언급된 범위 및 길이에 대한 중간의 범위 및 길이도 또한 본 발명의 일부인 것으로 여겨진다.
- [0163] 본 발명의 일부 구현예에서, TTR 유전자의 표적 서열은 SEQ ID NO:1의 뉴클레오타이드 615 내지 637 또는 SEQ ID NO:5의 뉴클레오타이드 505 내지 527(즉, 5'- GATGGGATTTCATGTAACCAAGA - 3'; SEQ ID NO:4)을 포함한다.
- [0164] 본 명세서에 사용되는 용어 "서열을 포함하는 가닥"은 표준 뉴클레오타이드 명명법을 사용하여 언급된 서열로

기술되는 뉴클레오타이드의 사슬을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 말한다.

[0165] 각각의 "G", "C", "A", "T" 및 "U"는 일반적으로 각각 염기로서 구아닌, 시토신, 아데닌, 티미딘 및 우라실을 포함하는 뉴클레오타이드를 나타낸다. 그러나 "리보뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드"라는 용어가 하기에서 더 상세히 다루어질 변형 뉴클레오타이드 또는 대용 대체 모이어티도 또한 나타낼 수 있다는 것이 이해될 것이다(예를 들어, 표 2 참조). 당업자는 구아닌, 시토신, 아데닌 및 우라실이 이러한 대체 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 염기쌍 형성 특성을 실질적으로 변이하지 않으면서 다른 부분으로 대체될 수 있다는 것을 잘 인식하고 있다. 비제한적으로 예를 들어, 그의 염기로서 이노신을 포함하는 뉴클레오타이드는 아데닌, 시토신 또는 우라실을 포함하는 뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 특성화된 dsRNA의 뉴클레오타이드 서열에서 우라실, 구아닌 또는 아데닌을 포함하는 뉴클레오타이드는 예를 들어 이노신을 포함하는 뉴클레오타이드에 의해 대체될 수 있다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오타이드 내의 어디든 아데닌 및 시토신은 각각 구아닌 및 우라실로 대체되어, 표적 mRNA와 G-U 동요(Wobble) 염기쌍을 형성할 수 있다. 이러한 대체 모이어티를 포함하는 서열은 본 발명에 특성화된 조성물 및 방법에 적절하다.

[0166] 본 명세서에 상호교환가능하게 사용되는 용어 "iRNA", "RNAi 작용제", "iRNA 작용제", "RNA 간섭 작용제"는 그 용어가 본 명세서에 정의된 바와 같은 RNA를 함유하며, RNA-유도 침묵화 복합체(RISC) 경로를 통한 RNA 전사체의 표적화된 절단을 매개하는 작용제를 말한다. iRNA는 RNA 간섭(RNAi)으로 공지된 과정을 통하여 mRNA의 서열-특이적 분해를 유도한다. iRNA는 세포, 예를 들어, 포유류 대상체와 같은 대상체 내의 세포에서의 TTR 유전자의 발현을 조절, 예를 들어, 억제한다.

[0167] 일 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 표적 RNA 서열, 예를 들어, TTR 표적 mRNA 서열과 상호작용하여, 표적 RNA의 절단을 유도하는 단일 가닥 RNA를 포함한다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니라, 세포로 도입된 긴 이중 가닥 RNA는, Dicer로 공지되어 있는 III형 엔도뉴클레아제에 의해, 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중 가닥의 짧은 간섭 RNA(siRNA)로 분해되는 것으로 여겨진다(문헌[Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485]). 리보뉴클레아제-III-유사 효소인 Dicer는 이러한 dsRNA를 특징적인 2개의 염기의 3' 오버행을 갖는 19 내지 23개의 염기쌍의 짧은 간섭 RNA로 처리한다(문헌[Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363]). 그 후, siRNA는 RNA-유도 침묵화 복합체(RISC)로 혼입되고, 여기서, 하나 이상의 헬리카제(helicase)는 siRNA 이중 가닥을 풀어서, 상보성 안티센스 가닥이 표적 인식을 가이드할 수 있도록 한다(문헌[Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309]). RISC 내의 하나 이상의 엔도뉴클레아제는 적절한 표적 mRNA와의 결합 시에, 표적을 절단하여, 침묵화를 유도한다(문헌[Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188]). 따라서, 일 양태에서, 본 발명은, 세포 내에서 생성되며, RISC 복합체의 형성을 촉진하여, 표적 유전자, 즉, TTR 유전자의 침묵화를 야기하는 단일 가닥 siRNA(ssRNA)(siRNA 이중가닥의 안티센스 가닥)에 관한 것이다. 따라서, 용어 "siRNA"는 또한 본 명세서에서, 전술된 바와 같은 RNAi를 지칭하기 위해 사용된다.

[0168] 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제는, 세포 또는 유기체로 도입되어, 표적 mRNA를 억제하는 단일 가닥 RNA일 수 있다. 단일 가닥 RNAi 작용제는 RISC 엔도뉴클레아제, Argonaute 2와 결합한 후, 표적 mRNA를 절단한다. 단일-가닥 siRNA는 일반적으로 15 내지 30개의 뉴클레오타이드이며, 화학적으로 변형된다. 단일-가닥 siRNA의 설계 및 시험은 미국 특허 제 8,101,348호 및 문헌[Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894]에 기재되어 있으며, 그의 각각의 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다. 본 명세서에 기재된 안티센스 뉴클레오타이드 서열 중 어느 하나는 본 명세서에 기재된 바와 같은 단일-가닥 RNA로서 사용되거나, 문헌[Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894]에 기재된 방법에 의해 화학적으로 변형될 수 있다.

[0169] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 조성물, 용도 및 방법에 사용하기 위한 "iRNA"는 이중 가닥 RNA이며, 본 명세서에 "이중 가닥 RNAi 작용제", "이중 가닥 RNA(dsRNA) 분자", "dsRNA 작용제" 또는 "dsRNA"로 지칭된다. 용어 "dsRNA"는 표적 RNA, 즉, TTR 유전자에 대하여 "센스" 및 "안티센스" 배향을 갖는 것으로 언급되는 2개의 역평행이며, 실질적으로 상보성인 핵산 가닥을 포함하는 이중가닥 구조를 갖는 리보핵산 분자의 복합체를 말한다. 본 발명의 일부 구현예에서, 이중 가닥 RNA(dsRNA)는 본 명세서에서 RNA 간섭 또는 RNAi로 지칭되는 전사후 유전자-침묵화 메커니즘을 통하여 표적 RNA, 예를 들어, mRNA의 분해를 촉발시킨다.

[0170] 일반적으로, dsRNA 분자의 각각의 가닥의 대부분의 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드이나, 본 명세서에 상세히 기재된 바와 같이, 각각의 가닥 또는 두 가닥 모두는 또한 하나 이상의 비-리보뉴클레오타이드, 예를 들어, 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 추가로, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "RNAi 작용제"는 화학적 변형을 갖는 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며; RNAi 작용제는 다수의 뉴클레오타이드에 실질적인 변형을 포함할 수 있다.

[0171]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "변형된 뉴클레오타이드"는 독립적으로, 변형된 당 모이어티, 변형된 뉴클레오타이드간 연결, 및/또는 변형된 핵염기를 가진 뉴클레오타이드를 지칭한다. 따라서, 용어 변형된 뉴클레오타이드는, 예를 들어, 작용기 또는 원자의 뉴클레오사이드간 연결, 당 모이어티, 또는 핵염기로의 치환, 첨가 또는 그의 제거를 포함한다. 본 발명의 작용제에 사용하기에 적합한 변형은 본 명세서에 개시되거나, 당업계에 공지된 모든 유형의 변형을 포함한다. siRNA 유형의 분자에 사용되는 바와 같이, 임의의 이러한 변형은 본 명세서 및 청구범위의 목적을 위해, "RNAi 작용제"에 의해 포함된다.

[0172]

이중가닥 영역은 RISC 경로를 통하여 요망되는 표적 RNA의 특이적 분해를 허용하는 임의의 길이의 것일 수 있으며, 약 9 내지 36개의 염기쌍 길이의 범위, 예를 들어, 약 15 내지 30개의 염기쌍 길이, 예를 들어, 약 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36개의 염기쌍 길이, 예를 들어, 약 15 내지 30, 15 내지 29, 15 내지 28, 15 내지 27, 15 내지 26, 15 내지 25, 15 내지 24, 15 내지 23, 15 내지 22, 15 내지 21, 15 내지 20, 15 내지 19, 15 내지 18, 15 내지 17, 18 내지 30, 18 내지 29, 18 내지 28, 18 내지 27, 18 내지 26, 18 내지 25, 18 내지 24, 18 내지 23, 18 내지 22, 18 내지 21, 18 내지 20, 19 내지 30, 19 내지 29, 19 내지 28, 19 내지 27, 19 내지 26, 19 내지 25, 19 내지 24, 19 내지 23, 19 내지 22, 19 내지 21, 19 내지 20, 20 내지 30, 20 내지 29, 20 내지 28, 20 내지 27, 20 내지 26, 20 내지 25, 20 내지 24, 20 내지 23, 20 내지 22, 20 내지 21, 21 내지 30, 21 내지 29, 21 내지 28, 21 내지 27, 21 내지 26, 21 내지 25, 21 내지 24, 21 내지 23 또는 21 내지 22개의 염기쌍 길이일 수 있다. 상기 언급된 범위 및 길이에 대한 중간의 범위 및 길이도 또한 본 발명의 일부인 것으로 여겨진다.

[0173]

이중가닥 구조를 형성하는 두 가닥은 하나의 보다 더 큰 RNA 분자의 상이한 부분일 수 있거나, 그들은 개별 RNA 분자일 수 있다. 두 가닥이 하나의 더 큰 분자의 일부이고 이에 따라 한 가닥의 3'-말단과 다른 가닥의 5'-말단 간의 뉴클레오타이드의 비단절(uninterrupted) 사슬에 의해 결합되어 이중가닥 구조를 형성하여, 연결 RNA 사슬은 "헤어핀 루프"로 지칭된다. 헤어핀 루프는 쌍을 형성하지 않은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 헤어핀 루프는 쌍을 형성하지 않은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 23개 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 헤어핀 루프는 10개 이하의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 헤어핀 루프는 8개 이하의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 헤어핀 루프는 4 내지 10개의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 헤어핀 루프는 4 내지 8개의 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0174]

dsRNA의 2개의 실질적으로 상보성인 가닥이 개별 RNA 분자에 포함되는 경우, 그들 분자는 공유 결합될 필요는 없지만, 공유 결합될 수 있다. 두 가닥이 한 가닥의 3'-말단과 각각의 다른 가닥의 5'-말단 간의 뉴클레오타이드의 비단절 사슬 이외의 수단에 의해 공유 결합되어, 이중가닥 구조를 형성하는 경우, 그 연결 구조는 "링커"로 지칭된다. RNA 가닥은 동일하거나 상이한 수의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 최대 염기쌍 개수는 dsRNA의 가장 짧은 가닥 내 뉴클레오타이드에서 이중가닥에 존재하는 임의의 오버행을 제한한 개수이다. RNAi는 이중가닥 구조에 더하여, 하나 이상의 뉴클레오타이드 오버행을 포함할 수 있다.

[0175]

일 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는, 각각의 가닥은 24 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 표적 RNA 서열, 예를 들어, TTR 표적 mRNA 서열과 상호작용하여, 표적 RNA의 절단을 유도하는 dsRNA이다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니라, 세포로 도입된 긴 이중 가닥 RNA는, Dicer로 공지되어 있는 III형 엔도뉴클레아제에 의해, siRNA로 분해된다(문헌[Sharp *et al.*(2001) *Genes Dev.* 15:485]). 리보뉴클레아제-III-유사 효소인 Dicer는 dsRNA를 특징적인 2개의 염기의 3' 오버행을 갖는 19 내지 23개의 염기쌍의 짧은 간섭 RNA로 처리한다(문헌[Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363]). 그 후, siRNA는 RNA-유도 침묵화 복합체(RISC)로 혼입되고, 여기서, 하나 이상의 헬리카제는 siRNA 이중가닥을 풀어서, 상보성 안티센스 가닥이 표적 인식을 가이드할 수 있도록 한다(문헌[Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309]). RISC 내의 하나 이상의 엔도뉴클레아제는 적절한 표적 mRNA와의 결합 시에, 표적을 절단하여, 침묵화를 유도한다(문헌[Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188]). RNAi 작용제의 일 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함한다. 다른 구현예에서, RNAi 작용제의 적어도 하나의 가닥은 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 5' 오버행을 포함한다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드의 5' 오버행을 포함한다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제의 하나의 가닥의 3' 및 5' 말단 둘 모두는 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 오버행을 포함한다.

[0176]

일 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는, 각각의 가닥은 19 내지 23개의 뉴클레오타이드를 포함하고, TTR RNA 서열과 상호작용하여, 표적 RNA의 절단을 유도하는 dsRNA 작용제이다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니라, 세포로 도입된 긴 이중 가닥 RNA는, Dicer로 공지되어 있는 III형 엔도뉴클레아제에 의해, siRNA로 분해된다(문헌[Sharp *et al.*(2001) *Genes Dev.* 15:485]). 리보뉴클레아제-III-유사 효소인 Dicer는 dsRNA를 특징적인 2개의 염기의 3' 오버행을 갖는 19 내지 23개의 염기쌍의 짧은 간섭 RNA로 처리한다(문헌[Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363]). 그 후, siRNA는 RNA-유도 침묵화 복합체(RISC)로 혼입되고, 여기서, 하나 이상의 헬리카제는 siRNA 이중가닥을 풀어서, 상보성 안티센스 가닥이 표적 인식을 가이드할 수 있도록 한다(문헌[Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309]). RISC 내의 하나 이상의 엔도뉴클레아제는 적절한 표적 mRNA와의 결합 시에, 표적을 절단하여, 침묵화를 유도한다(문헌[Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188]). 일 구현 예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는, TTR RNA 서열과 상호작용하여, 표적 RNA의 절단을 유도하는 24 내지 30개의 뉴클레오타이드의 dsRNA이다.

[0177]

본 명세서에서 사용되는 용어 "뉴클레오타이드 오버행"은 iRNA, 예를 들어, dsRNA의 이중가닥 구조로부터 돌출하는 적어도 하나의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드를 지칭한다. 예를 들어, dsRNA의 한 가닥의 3'-말단이 다른 가닥의 5'-말단을 넘어서서 연장되는 경우 또는 반대의 경우에, 뉴클레오타이드 오버행이 존재한다. dsRNA는 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 오버행을 포함할 수 있으며; 대안적으로 오버행은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 적어도 3개의 뉴클레오타이드, 적어도 4개의 뉴클레오타이드, 적어도 5개 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 오버행은 테옥시뉴클레오타이드/뉴클레오사이드를 포함하는 뉴클레오타이드/뉴클레오사이드 유사체를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 오버행(들)은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 그들의 임의의 조합 상에 존재할 수 있다. 또한, 오버행의 뉴클레오타이드(들)는 dsRNA의 안티센스 또는 센스 가닥 중 어느 하나의 5'-말단, 3'-말단 또는 둘 모두의 말단에 존재할 수 있다. dsRNA의 일 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함한다. 다른 구현예에서, RNAi 작용제의 적어도 하나의 가닥은 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 5' 오버행을 포함한다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드의 5' 오버행을 포함한다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제의 하나의 가닥의 3' 및 5' 말단 둘 모두는 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 오버행을 포함한다.

[0178]

일 구현예에서, dsRNA의 안티센스 가닥은 3'-말단 및/또는 5'-말단에서 1 내지 10개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 0 내지 3, 1 내지 3, 2 내지 4, 2 내지 5, 4 내지 10, 5 내지 10, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오타이드의 오버행을 갖는다. 일 구현예에서, dsRNA의 센스 가닥은 3'-말단 및/또는 5'-말단에서 1 내지 10개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오타이드의 오버행을 갖는다. 다른 구현예에서, 오버행 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드는 뉴클레오사이드 티오포스페이트로 대체된다.

[0179]

특정 구현예에서, 센스 가닥 또는 안티센스 가닥, 또는 두 가닥 모두의 오버행은 10개 초과의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 1 내지 30개의 뉴클레오타이드, 2 내지 30개의 뉴클레오타이드, 10 내지 30개의 뉴클레오타이드, 또는 10 내지 15개의 뉴클레오타이드의 연장된 길이를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 이중가닥의 센스 가닥에 존재한다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 이중가닥의 센스 가닥의 3' 말단에 존재한다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 이중가닥의 5' 말단에 존재한다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 이중가닥의 안티센스 가닥에 존재한다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 이중가닥의 안티센스 가닥의 3' 말단에 존재한다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 이중가닥의 안티센스 가닥의 5' 말단에 존재한다. 특정 구현예에서, 오버행의 하나 이상의 뉴클레오타이드는 뉴클레오사이드 티오포스페이트에 의해 대체된다. 특정 구현예에서, 오버행은 자체-상보성 부분을 포함함으로써, 오버행은, 생리적 조건하에서 안정한 헤어핀 구조를 형성할 수 있다.

[0180]

"평활(blunt)" 또는 "평활 말단"은 이중 가닥 RNAi 작용제의 말단에 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드가 존재하지 않는 것으로, 즉, 뉴클레오타이드 오버행이 존재하지 않음을 의미한다. "평활 말단의" RNAi 작용제는, 그 전장에 걸쳐 이중 가닥인 것으로, 즉, 분자의 말단에 뉴클레오타이드 오버행이 존재하지 않는 dsRNA이다. 본 발명의 RNAi 작용제는, 하나의 말단에 뉴클레오타이드 오버행을 갖는 RNAi 작용제(즉, 하나의 오버행 및 하나의 평활 말단을 갖는 작용제) 또는 두 말단 모두에 뉴클레오타이드 오버행을 갖는 RNAi 작용제를 포함한다.

[0181]

용어 "안티센스 가닥" 또는 "가이드 가닥"은, 표적 서열, 예를 들어, TTR mRNA에 실질적으로 상보성인 영역을

포함하는 iRNA, 예를 들어, dsRNA의 가닥을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "상보성 영역"은, 본 명세서에서 정의되는 바와 같이, 서열, 예를 들어 표적 서열, 예를 들어, TTR 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보성인 안티센스 가닥의 영역을 지칭한다. 상보성 영역이 표적 서열에 완전히 상보성이 아닌 경우, 문자의 내부 또는 말단 영역에 미스매치가 존재할 수 있다. 일반적으로, 대부분의 허용되는 미스매치는 iRNA의 말단 영역, 예를 들어 5'- 및/또는 3'-말단의 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 뉴클레오타이드 내에 존재한다. 일구현예에서, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 뉴클레오타이드 미스매치를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용제는 센스 가닥에 뉴클레오타이드 미스매치를 포함한다. 일구현예에서, 뉴클레오타이드 미스매치는, 예를 들어, iRNA의 3'-말단으로부터 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 뉴클레오타이드 내에 존재한다. 또 다른 구현예에서, 뉴클레오타이드 미스매치는, 예를 들어, iRNA의 3'-말단 뉴클레오타이드에 존재한다.

- [0182] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "센스 가닥" 또는 "패신저(passenger) 가닥"은, 그 용어가 본 명세서에 정의된 바와 같은 안티센스 가닥의 영역에 실질적으로 상보성인 영역을 포함하는 iRNA의 가닥을 지칭한다.
- [0183] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "절단 영역"은, 절단 부위에 바로 인접하여 위치한 영역을 지칭한다. 절단 부위는, 절단이 발생하는 표적 상의 부위이다. 일부 구현예에서, 절단 영역은 절단 부위에 바로 인접한 부분 및 어느 하나의 말단에 3개의 염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단 영역은 절단 부위에 바로 인접한 부분 및 어느 하나의 말단에 2개의 염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단 부위는 특이적으로, 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 10 및 11에 의해 결합되는 부위에서 발생하며, 절단 영역은 뉴클레오타이드 11, 12 및 13을 포함한다.
- [0184] 본 명세서에 사용되며 달리 나타내지 않는 한, 용어 "상보성인"은 제2 뉴클레오타이드 서열에 대해 제1 뉴클레오타이드 서열을 설명하기 위해 사용되는 경우에, 당업자가 이해하는 바와 같이, 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드가 특정 조건 하에서 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 혼성화하여 이중가닥 구조를 형성하는 능력을 말한다. 이러한 조건은, 예를 들어 염격한 조건일 수 있으며, 여기서, 염격한 조건은 다음을 포함할 수 있다: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA로 50°C 또는 70°C에서 12 내지 16시간 처리 후 세척(예를 들어, 문헌 ["Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press"] 참조). 유기체 내에서 겪을 수 있는 생리학적으로 적절한 조건과 같은 다른 조건도 적용할 수 있다. 당업자는 혼성화된 뉴클레오타이드의 궁극적인 응용에 따라 두 서열의 상보성 시험에 가장 적절한 조건 세트를 결정할 수 있을 것이다.
- [0185] iRNA 내의, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 dsRNA 내의 상보성 서열은 하나의 또는 둘 모두의 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드에 대한 염기쌍 형성을 포함한다. 이러한 서열은 본 명세서에서 서로에 대해 "완전 상보성인" 것으로 지칭될 수 있다. 그러나, 제1 서열이 본 명세서에서 제2 서열에 대해 "실질적으로 상보성인" 것으로 지칭되는 경우, 두 서열은 완전히 상보성일 수도 있고, 또는 그들은 최대 30개의 염기쌍의 이중가닥에 대하여, 혼성화 시에 1개 이상의, 그러나 일반적으로는 5, 4, 3 또는 2개 이하의 미스매치 염기쌍을 형성하면서 그들의 궁극적 응용에 가장 적절한 조건 하에서 혼성화하는 능력, 예를 들어, RISC 복합체를 통한 유전자 발현의 억제를 보유할 수 있다. 그러나, 2개의 올리고뉴클레오타이드가 혼성화 시에 1개 이상의 단일 사슬 오버행을 형성하도록 고안되는 경우, 이러한 오버행은 상보성 결정에 관해 미스매치로 간주되어서는 안된다. 예를 들어, 21개의 뉴클레오타이드 길이인 하나의 올리고뉴클레오타이드 및 23개의 뉴클레오타이드 길이인 또 다른 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 dsRNA에서, 더 긴 올리고뉴클레오타이드가 더 짧은 올리고뉴클레오타이드에 대해 완전히 상보성인 21개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 경우, 본 명세서에 기재된 목적을 위해 여전히 "완전히 상보성인" 것으로 부를 수 있다.
- [0186] 본 명세서에 사용되는 "상보성인" 서열은 또한 그들의 혼성화 능력에 대한 상기 요건이 충족되는 한, 비-왓슨-크릭(Watson-Crick)형 염기쌍 및/또는 비천연 및 변형 뉴클레오타이드로 형성되는 염기쌍을 포함하거나 또는 전체가 이것으로 형성될 수 있다. 이러한 비-왓슨-크릭형 염기쌍에는 비제한적으로 G:U 동요 또는 후그스테인(Hoogstein) 염기쌍 형성이 포함된다.
- [0187] 본 명세서에서 용어 "상보성인", "완전히 상보성인" 및 "실질적으로 상보성인"은 그들이 사용되는 문맥에서 이해되는 바와 같이, dsRNA의 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이, 또는 iRNA 작용제의 안티센스 가닥과 표적 서열 사이의 염기 매칭에 대해 사용할 수 있다.

- [0188] 본 명세서에서 사용되는 메신저 RNA(mRNA)의 "적어도 일부에 실질적으로 상보성인" 폴리뉴클레오타이드는 대상 mRNA(예를 들어, TTR 유전자를 인코딩하는 mRNA)의 인접 부분에 실질적으로 상보성인 폴리뉴클레오타이드를 말한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 서열이 TTR 유전자를 인코딩하는 mRNA의 비-단절 부분에 실질적으로 상보성이라면, TTR mRNA의 적어도 일부에 상보성이다.
- [0189] 따라서, 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 안티센스 폴리뉴클레오타이드는 표적 TTR 서열에 완전히 상보성이다. 다른 구현예에서, 본 명세서에 개시된 안티센스 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:2(5'-UGGGAUUCAUGUAACCAAGA -3')에 완전히 상보성이다. 일 구현예에서, 안티센스 폴리뉴클레오타이드 서열은 5'-UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC -3'(SEQ ID NO:3)이다.
- [0190] 다른 구현예에서, 본 명세서에 개시된 안티센스 폴리뉴클레오타이드는 표적 TTR 서열에 대해 실질적으로 상보성이며, SEQ ID NO:2(5'-UGGGAUUCAUGUAACCAAGA -3'), 또는 SEQ ID NO:1, 2, 및 5 중 어느 하나의 단편 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열의 동일한 영역에 대해 그 전장에 걸쳐 적어도 약 80% 상보성인 것으로, 예컨대 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 % 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99% 상보성인 인접 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0191] 일 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는, 안티센스 폴리뉴클레오타이드에 대해 실질적으로 상보성이며, 결과적으로 표적 TTR 서열에 상보성인 센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥 폴리뉴클레오타이드는, 표 1, 표 3, 표 5, 표 6 및 표 7의 서열 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열의 동일한 영역에 대해 그 전장에 걸쳐 적어도 약 80% 상보성인 것으로, 예컨대 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 % 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99% 상보성인 인접 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0192] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 표적 TTR 서열에 대해 실질적으로 상보성인 안티센스 가닥을 포함하며, 표 1 및 표 3의 서열 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열의 동일한 영역에 대해 그 전장에 걸쳐 적어도 약 80% 상보성인 것으로, 예컨대 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 % 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99% 상보성인 인접 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0193] 일부 구현예에서, 각 가닥의 대다수의 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드이나, 본 명세서에 상세히 기재되는 바와 같이, 각각의 또는 둘 모두의 가닥은 또한 하나 이상의 비-리보뉴클레오타이드, 예를 들어, 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 변형 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, "iRNA"는 화학적 변형이 있는 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 본 명세서에 개시되거나 당업계에 공지되어 있는 모든 유형의 변형을 포함할 수 있다. iRNA 문자에 사용되는 바와 같은 임의의 이러한 변형은 이러한 설명 및 특허청구범위의 목적을 위해 "iRNA"에 포함된다.
- [0194] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기 위한 작용제는, 안티센스 억제 메커니즘을 통해 표적 mRNA를 억제하는 단일 가닥 안티센스 핵산 분자이다. 단일 가닥 안티센스 RNA 분자는 표적 mRNA 내의 서열에 상보성이다. 단일 가닥 안티센스 올리고뉴클레오타이드는, mRNA에 대해 염기쌍을 형성하고, 번역 기작을 물리적으로 방해함으로써, 화학량론적 방식으로 번역을 억제할 수 있으며, 문헌[Dias, N. et al., (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355]을 참조한다. 단일 가닥 안티센스 RNA 분자는 약 15 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있으며, 표적 서열에 상보성인 서열을 갖는다. 예를 들어, 단일 가닥 안티센스 RNA 분자는, 본 명세서에 기재된 안티센스 서열 중 어느 하나로부터 적어도 약 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 인접 뉴클레오타이드인 서열을 포함할 수 있다.
- [0195] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "TTR-관련 질병"은 TTR 유전자 또는 단백질과 관련된 임의의 질병을 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 질병은, TTR 단백질의 과량의 생성, TTR 유전자 돌연변이, TTR 단백질의 비정상적인 절단, TTR과 다른 단백질 또는 다른 내인성 또는 외인성 물질 사이의 비정상적인 상호작용에 의해 야기될 수 있다. "TTR-관련 질병"은, TTR이 비정상적인 세포외 응집체 또는 아밀로이드 침착의 형성에 일정한 역할을 담당하는 임의의 유형의 TTR 아밀로이드증(ATTR)을 포함한다. TTR-관련 질병은 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 과티록신혈증을 포함한다. TTR 아밀로이드증의 증상은 감각 신경병증(예를 들어, 말초 사지 이상감각, 감각감퇴), 자율 신경병증(예를 들어, 위궤양 또는 기립성 저혈압과 같은 위장 기능장애), 운동 신경병증, 발작, 치매, 골수 병증, 다발신경병증, 수근관 증후군, 자율신경부전, 심근병증, 유리체 혼탁, 신부전, 신장병, 현저히 감소된 mBMI(변형된 체질량지수), 뇌신경 기능장애 및 각막 격자 이상증을 포함한다.

## II. 본 발명의 mRNA

[0196] 본 발명은 하나 이상의 TTR 유전자의 발현을 선택적으로 억제하는 mRNA를 제공한다. 일 구현예에서, mRNA 작용제는 세포, 예를 들어, 대상체, 예를 들어, 포유류, 예를 들어, TTR-관련 질병을 갖는 인간 내의 세포에서 TTR 유전자의 발현을 억제하기 위한 이중 가닥 리보핵산(dsRNA) 분자를 포함한다. dsRNA는 TTR 유전자의 발현에서 형성되는 mRNA의 적어도 일부에 상보성인 상보성 영역을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 상보성 영역은 약 30 개 이하의 뉴클레오타이드 길이(예를 들어, 약 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 또는 18개 이하의 뉴클레오타이드 길이)이다. mRNA는 TTR 유전자를 발현하는 세포와의 접촉시에, 예를 들어, PCR 또는 분지형 DNA(bDNA)-기반의 방법에 의해 또는 단백질-기반의 방법에 의해, 예를 들어, 웨스턴 블로팅 또는 유동세포계측 기술을 사용하는 면역형광 분석에 의해 검정시 TTR 유전자(예를 들어, 인간, 영장류, 비-영장류 또는 조류 TTR 유전자)의 발현을 적어도 약 10%만큼 선택적으로 억제한다.

[0197] dsRNA는, 상보성이며 혼성화되어, dsRNA가 사용될 조건 하에서 이중가닥 구조를 형성하는 2개의 RNA 가닥을 포함한다. dsRNA의 한 가닥(안티센스 가닥)은 표적 서열에 실질적으로 상보성이며, 일반적으로 완전히 상보성인 상보성 영역을 포함한다. 표적 서열은 TTR 유전자의 발현 동안 형성되는 mRNA의 서열로부터 유래될 수 있다. 다른 가닥(센스 가닥)은 안티센스 가닥에 상보성인 영역을 포함하여, 적절한 조건 하에서 조합되는 경우, 두 가닥이 혼성화하고 이중가닥 구조를 형성하게 한다. 본 명세서에서 다른 곳에 기재되고 당업계에 공지된 바와 같이, dsRNA의 상보성 서열은 또한 개별 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 것과 대조적으로 단일의 핵산 분자의 자가-상보성 영역으로서 포함될 수 있다.

[0198] 일반적으로, 이중가닥 구조는 15 내지 30개의 염기쌍 길이, 예를 들어, 15 내지 29, 15 내지 28, 15 내지 27, 15 내지 26, 15 내지 25, 15 내지 24, 15 내지 23, 15 내지 22, 15 내지 21, 15 내지 20, 15 내지 19, 15 내지 18, 15 내지 17, 18 내지 30, 18 내지 29, 18 내지 28, 18 내지 27, 18 내지 26, 18 내지 25, 18 내지 24, 18 내지 23, 18 내지 22, 18 내지 21, 18 내지 20, 19 내지 30, 19 내지 29, 19 내지 28, 19 내지 27, 19 내지 26, 19 내지 25, 19 내지 24, 19 내지 23, 19 내지 22, 19 내지 21, 19 내지 20, 20 내지 30, 20 내지 29, 20 내지 28, 20 내지 27, 20 내지 26, 20 내지 25, 20 내지 24, 20 내지 23, 20 내지 22, 20 내지 21, 21 내지 30, 21 내지 29, 21 내지 28, 21 내지 27, 21 내지 26, 21 내지 25, 21 내지 24, 21 내지 23 또는 21 내지 22 개의 염기쌍 길이이다. 상기 언급된 범위 및 길이에 대한 중간의 범위 및 길이도 또한 본 발명의 일부인 것으로 여겨진다.

[0199] 유사하게, 표적 서열의 상보성 영역은 15 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어, 15 내지 29, 15 내지 28, 15 내지 27, 15 내지 26, 15 내지 25, 15 내지 24, 15 내지 23, 15 내지 22, 15 내지 21, 15 내지 20, 15 내지 19, 15 내지 18, 15 내지 17, 18 내지 30, 18 내지 29, 18 내지 28, 18 내지 27, 18 내지 26, 18 내지 25, 18 내지 24, 18 내지 23, 18 내지 22, 18 내지 21, 18 내지 20, 19 내지 30, 19 내지 29, 19 내지 28, 19 내지 27, 19 내지 26, 19 내지 25, 19 내지 24, 19 내지 23, 19 내지 22, 19 내지 21, 19 내지 20, 20 내지 30, 20 내지 29, 20 내지 28, 20 내지 27, 20 내지 26, 20 내지 25, 20 내지 24, 20 내지 23, 20 내지 22, 20 내지 21, 21 내지 30, 21 내지 29, 21 내지 28, 21 내지 27, 21 내지 26, 21 내지 25, 21 내지 24, 21 내지 23 또는 21 내지 22개의 뉴클레오타이드 길이이다. 상기 언급된 범위 및 길이의 중간의 범위 및 길이도 또한 본 발명의 일부인 것으로 여겨진다.

[0200] 일부 구현예에서, dsRNA는 약 15 내지 약 20개의 뉴클레오타이드 길이, 또는 약 25 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일반적으로, dsRNA는 Dicer 효소를 위한 기질로 삼기에 충분히 길다. 예를 들어, 약 21 내지 23 개의 뉴클레오타이드 길이보다 더 긴 dsRNA가 Dicer를 위한 기질로 소용될 수 있음이 당업계에 널리 공지되어 있다. 또한, 당업자가 인식할 것처럼, 절단을 위해 표적화된 RNA의 영역은 흔하게는 보다 큰 RNA 분자, 종종 mRNA 분자의 부분일 것이다. 적절한 경우, mRNA 표적의 "부분"은 RNAi-유도 절단(즉, RISC 경로를 통한 절단)을 위한 기질이 되기에 충분한 길이의 mRNA 표적의 인접 서열이다.

[0201] 또한, 당업자는 이중가닥 영역이 dsRNA의 일차 기능성 부분, 예를 들어, 약 9 내지 36개의 염기쌍, 예를 들어, 약 10 내지 36, 11 내지 36, 12 내지 36, 13 내지 36, 14 내지 36, 15 내지 36, 9 내지 35, 10 내지 35, 11 내지 35, 12 내지 35, 13 내지 35, 14 내지 35, 15 내지 35, 9 내지 34, 10 내지 34, 11 내지 34, 12 내지 34, 13 내지 34, 14 내지 34, 15 내지 34, 9 내지 33, 10 내지 33, 11 내지 33, 12 내지 33, 13 내지 33, 14 내지 33, 15 내지 33, 9 내지 32, 10 내지 32, 11 내지 32, 12 내지 32, 13 내지 32, 14 내지 32, 15 내지 32, 9 내지 31, 10 내지 31, 11 내지 31, 12 내지 31, 13 내지 32, 14 내지 31, 15 내지 31, 15 내지 30, 15 내지 29, 15 내지 28, 15 내지 27, 15 내지 26, 15 내지 25, 15 내지 24, 15 내지 23, 15 내지 22, 15 내지 21, 15 내지

20, 15 내지 19, 15 내지 18, 15 내지 17, 18 내지 30, 18 내지 29, 18 내지 28, 18 내지 27, 18 내지 26, 18 내지 25, 18 내지 24, 18 내지 23, 18 내지 22, 18 내지 21, 18 내지 20, 19 내지 30, 19 내지 29, 19 내지 28, 19 내지 27, 19 내지 26, 19 내지 25, 19 내지 24, 19 내지 23, 19 내지 22, 19 내지 21, 19 내지 20, 20 내지 30, 20 내지 29, 20 내지 28, 20 내지 27, 20 내지 26, 20 내지 25, 20 내지 24, 20 내지 23, 20 내지 22, 20 내지 21, 21 내지 30, 21 내지 29, 21 내지 28, 21 내지 27, 21 내지 26, 21 내지 25, 21 내지 24, 21 내지 23 또는 21 내지 22개의 염기쌍의 이중가닥 영역임을 인식할 것이다. 따라서, 일 구현예에서, 예를 들어, 15 내지 30개의 염기쌍의 기능성 이중가닥으로 처리되고, 절단을 위해 요망되는 RNA를 표적으로 하는 한, 30개 초과의 염기쌍의 이중가닥 영역을 갖는 RNA 분자 또는 RNA 분자의 복합체는 dsRNA이다. 따라서, 당업자는 일 구현예에서, miRNA가 dsRNA임을 인식할 것이다. 다른 구현예에서, dsRNA는 천연 유래의 miRNA가 아니다. 다른 구현예에서, TTR 유전자 발현을 표적으로 하는데 유용한 iRNA 작용체는 더 큰 dsRNA의 절단에 의해 표적 세포에서 생성되지 않는다.

[0203]

본 명세서에 기재된 바와 같은 dsRNA는 하나 이상의 단일 가닥 뉴클레오타이드 오버행, 예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개의 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다. 적어도 하나의 뉴클레오타이드 오버행을 갖는 dsRNA는 그들의 평활-말단 대응부에 비하여 예상치 않게 뛰어난 억제 특성을 가질 수 있다. 뉴클레오타이드 오버행은 데옥시 뉴클레오타이드/뉴클레오사이드를 포함하는 뉴클레오타이드/뉴클레오사이드 유사체를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 오버행(들)은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 그들의 임의의 조합 상에 존재할 수 있다. 또한, 오버행의 뉴클레오타이드(들)는 dsRNA의 안티센스 또는 센스 가닥 중 어느 하나의 5'-말단, 3'-말단 또는 둘 모두의 말단에 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 더 길게 연장된 오버행이 가능하다.

[0204]

dsRNA는 하기에 추가로 논의된 바와 같이, 예를 들어, Biosearch, Applied Biosystems, Inc로부터 상업적으로 입수 가능한 자동화 DNA 합성기의 사용에 의해 당업계에 공지되어 있는 표준 방법에 의해 합성될 수 있다.

[0205]

본 발명의 iRNA 화합물은 2-단계 절차를 사용하여 제조될 수 있다. 먼저, 이중 가닥 RNA 분자의 개별 가닥을 따로 제조한다. 그 다음, 성분 가닥을 어닐링시킨다. siRNA 화합물의 개별 가닥은 용액-상 또는 고체-상 유기 합성 또는 둘 모두를 사용하여 제조될 수 있다. 유기 합성은 비천연 또는 변형 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 가닥이 용이하게 제조될 수 있는 이점을 제공한다. 본 발명의 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드는 용액-상 또는 고체-상 유기 합성 또는 둘 모두를 사용하여 제조될 수 있다.

[0206]

일 양태에서, 본 발명의 dsRNA는 적어도 2개의 뉴클레오타이드 서열, 센스 서열 및 안티-센스 서열을 포함한다. 센스 가닥은 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나에 제공되는 서열의 그룹으로부터 선택되며, 센스 가닥의 상응하는 안티센스 가닥은 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나의 서열의 군으로부터 선택된다. 이러한 양태에서, 두 서열 중 하나는 두 서열의 다른 서열에 상보성이며, 서열 중 하나는 TTR 유전자의 발현에서 생성되는 mRNA의 서열에 실질적으로 상보성이다. 이와 같이, 이러한 양태에서, dsRNA는 두 올리고뉴클레오타이드를 포함할 것이며, 여기서, 하나의 올리고뉴클레오타이드는 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나에서 센스 가닥으로 기재되며, 제2 올리고뉴클레오타이드는 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나에서 센스 가닥의 상응하는 안티센스 가닥으로 기재된다. 일 구현예에서, dsRNA의 실질적으로 상보성인 서열은 개별 올리고뉴클레오타이드에 포함된다. 다른 구현예에서, dsRNA의 실질적으로 상보성인 서열은 단일의 올리고뉴클레오타이드에 포함된다.

[0207]

표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7에서 서열의 일부가 변형 및/또는 접합된 서열로서 기재되지만, 본 발명의 iRNA의 RNA, 예를 들어, 본 발명의 dsRNA가 변형되지 않고/거나 접합되지 않고/거나 본 명세서에 기재된 것과 상이하게 변형되고/거나 접합된 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7에 기재된 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있는 것이 이해될 것이다.

[0208]

당업자는 약 20 내지 23개의 염기쌍, 예를 들어, 21개의 염기쌍의 이중가닥 구조를 갖는 dsRNA가 RNA 간섭을 유도하는데 특히 효율적인 것으로 설명되는 것을 잘 알고 있다(문헌[Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888]). 그러나, 다른 이들은 더 짧거나 더 긴 RNA 이중가닥 구조도 또한 효율적인 것을 발견하였다(문헌[Chu and Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226]). 전술된 구현예에서, 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나에 제공된 올리고뉴클레오타이드 서열의 성질 때문에, 본 명세서에 기재된 dsRNA는 최소 21개의 뉴클레오타이드의 길이의 적어도 하나의 가닥을 포함할 수 있다. 하나 또는 둘 모두의 말단 상의 소수의 뉴클레오타이드를 제한 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나의 서열 중 하나를 갖는 보다 짧은 이중가닥이 전술된 dsRNA와 비교하여 유사하게 효율적인 것이 타당하게 예상될 수 있다. 따라서, 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나의 서열 중 하나로부터 유래된 적어도 15, 16, 17, 18,

19, 20개 이상의 인접 뉴클레오타이드의 서열을 가지며, TTR 유전자의 발현을 억제하는 그들의 능력이 완전한 서열을 포함하는 dsRNA와 약 5, 10, 15, 20, 25 또는 30% 이하의 억제만큼 상이한 dsRNA가 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 고려된다.

[0209] 또한, 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나에 제공된 RNA에서 RISC-매개의 절단에 감수성인 TTR 전사체 내의 부위(들)를 확인한다. 이와 같이, 본 발명은 이들 부위 중 하나 내에서 표적화되는 iRNA를 추가로 특정으로 한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, iRNA는 iRNA가 특정 부위 내의 어디든 전사체의 절단을 조장한다면, RNA 전사체의 특정 부위 내에서 표적화되는 것으로 불린다. 이러한 iRNA는 일반적으로 TTR 유전자 내의 선택된 서열과 인접한 영역으로부터 취한 추가의 뉴클레오타이드 서열에 커플링된 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나에 제공되는 서열 중 하나로부터의 적어도 약 15개의 인접 뉴클레오타이드를 포함할 것이다.

[0210] 표적 서열은 일반적으로 약 15 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이이나, 임의의 제공된 표적 RNA의 절단을 유도하기 위한 상기 범위 내의 특정 서열의 적합성에서의 광범위한 변화가 존재한다. 본 명세서에 나열된 다양한 소프트웨어 패키지 및 지침이 임의의 제공된 유전자 표적에 대한 최적의 표적 서열의 확인을 위한 안내를 제공하나, 제공된 크기(비제한적인 예로, 21개의 뉴클레오타이드)의 "윈도우(window)" 또는 "마스크(mask)"를 표적 RNA 서열상에 글자 그대로 또는 상징적으로(예를 들어, 인 실리코(*in silico*)를 포함함) 위치시켜, 표적 서열로 작용할 수 있는 크기 범위 내의 서열을 확인하는 경험적 방법이 또한 수행될 수 있다. 서열 "윈도우"를 최초 표적 서열 위치에서 하나의 뉴클레오타이드만큼 상류 또는 하류로 점진적으로 이동시킴으로써, 선택된 임의의 제공된 표적 크기에 대해 가능한 서열의 완전한 세트가 확인될 때까지 다음의(next) 잠재적 표적 서열이 확인될 수 있다. 최적으로 작용하는 상기 서열을 확인하기 위한 확인된 서열(본 명세서에 기재되어 있거나 당 분야에 공지된 바와 같은 검정을 이용함)의 체계적 합성 및 시험과 커플링된 상기 과정은 iRNA 작용제로 표적화되는 경우 표적 유전자 발현의 최적 억제를 매개하는 RNA 서열을 확인할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나에서 확인된 서열이 효과적인 표적 서열이나, 동등하거나 더 나은 억제 특징을 갖는 서열을 확인하기 위해 하나의 뉴클레오타이드만큼 제공된 서열의 상류 또는 하류로 점진적으로 "윈도우를 이동(walking the window)"시킴으로써 억제 효능의 추가 최적화가 달성될 수 있음이 고려된다.

[0211] 추가로, 예를 들어, 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나에서 확인된 임의의 서열에 대해 더 길거나 더 짧은 서열을 생성시키기 위해 뉴클레오타이드를 체계적으로 추가하거나 제거하고, 상기 지점으로부터 표적 RNA 위 또는 아래로 상기보다 길거나 짧은 크기의 윈도우를 이동시킴으로써 생성된 서열을 시험함으로써 추가 최적화가 달성될 수 있음이 고려된다. 또한, 새로운 후보 표적을 생성시키기 위한 상기 방법과 당 분야에 공지되어 있고/거나 본 명세서에 기재된 바와 같은 억제 검정에서의 표적 서열을 기초로 한 iRNA의 효과에 대한 시험을 커플링시키는 것은 억제의 효율에서의 추가의 개선을 발생시킬 수 있다. 추가로 또한, 상기 최적화된 서열은, 예를 들어, 본 명세서에 기재되고/거나 당 분야에 공지된 바와 같은 변형된 뉴클레오타이드의 도입, 오버행 내의 추가 또는 변화, 또는 발현 억제제로서 분자를 추가로 최적화(예를 들어, 혈청 안정성 또는 순환 반감기 증가, 열 안정성 증가, 막횡단 전달 증진, 특정 위치 또는 세포 유형으로의 표적화, 침묵화 경로 효소와의 상호 작용 증가, 엔도솜으로부터의 방출 증가)시키기 위한 당 분야에 공지되고/되거나 본 명세서에 논의된 바와 같은 다른 변형에 의해 조정될 수 있다.

[0212] 본 명세서에 기재된 바와 같은 iRNA는 표적 서열에 대한 하나 이상의 미스매치를 함유할 수 있다. 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 iRNA는 3개 이하의 미스매치를 함유한다. iRNA의 안티센스 가닥이 표적 서열에 대한 미스매치를 함유하는 경우, 미스매치의 영역이 상보성 영역의 중심에 위치되지 않는 것이 바람직하다. iRNA의 안티센스 가닥이 표적 서열에 대한 미스매치를 함유하는 경우, 미스매치가 상보성 영역의 5' 또는 3' 말단으로부터 마지막 5개의 뉴클레오타이드 내에 존재하도록 제한되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 23개의 뉴클레오타이드 iRNA 작용제에 있어서, TTR 유전자의 영역에 상보성이 가닥은 일반적으로 중심 13개의 뉴클레오타이드 내에 어떠한 미스매치를 함유하지 않는다. 본 명세서에 기재된 방법 또는 당 분야에 공지된 방법은 표적 서열에 대한 미스매치를 함유하는 iRNA가 TTR 유전자의 발현을 억제시키는데 효과적인식의 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 특히, TTR 유전자 내의 특정 상보성 영역이 절단 내의 다형 서열 변화를 갖는 것으로 공지된 경우에 TTR 유전자의 발현을 억제하는데 있어서 미스매치를 갖는 iRNA의 효능의 고려가 중요하다.

### III. 본 발명의 변형된 iRNA

[0213] 일 구현예에서, 본 발명의 iRNA의 RNA, 예를 들어, dsRNA는 변형되지 않으며, 예를 들어, 당업계에 공지되어 있고 본 명세서에 기재되어 있는 화학적 변형 및/또는 접합을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 iRNA의 RNA, 예를 들어, dsRNA는 안정성 또는 다른 유익한 특징을 증진시키기 위해 화학적으로 변형된다. 본 발

명의 특정 구현예에서, 본 발명의 iRNA의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드가 변형된다. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명의 iRNA의 모든 뉴클레오타이드가 변형된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 iRNA의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드가 변형되며, iRNA는 센스 가닥에 8개 이하의 2'-플루오로 변형(예를 들어, 7개 이하의 2'-플루오로 변형, 6개 이하의 2'-플루오로 변형, 5개 이하의 2'-플루오로 변형, 4개 이하의 2'-플루오로 변형, 3개 이하의 2'-플루오로 변형, 또는 2개 이하의 2'-플루오로 변형) 및 안티센스 가닥에 6개 이하의 2'-플루오로 변형(예를 들어, 5개 이하의 2'-플루오로 변형, 4개 이하의 2'-플루오로 변형, 3개 이하의 2'-플루오로 변형, 또는 2개 이하의 2'-플루오로 변형)을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 iRNA의 모든 뉴클레오타이드가 변형되며, iRNA는 센스 가닥에 8개 이하의 2'-플루오로 변형(예를 들어, 7개 이하의 2'-플루오로 변형, 6개 이하의 2'-플루오로 변형, 5개 이하의 2'-플루오로 변형, 4개 이하의 2'-플루오로 변형, 3개 이하의 2'-플루오로 변형, 또는 2개 이하의 2'-플루오로 변형) 및 안티센스 가닥에 6개 이하의 2'-플루오로 변형(예를 들어, 5개 이하의 2'-플루오로 변형, 4개 이하의 2'-플루오로 변형, 3개 이하의 2'-플루오로 변형, 또는 2개 이하의 2'-플루오로 변형)을 포함한다. "실질적으로 모든 뉴클레오타이드가 변형된" 본 발명의 iRNA는 대체적으로 변형되었으나, 전체적으로 변형된 것은 아니며, 최대 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 비변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0215] 본 발명에서 특성화된 핵산은 참조로서 본 명세서에 포함되는 문헌["Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA]에 기재된 것과 같은 당 분야에서 널리 확립된 방법에 의해 합성되고/되거나 변형될 수 있다. 변형은, 예를 들어, 말단 변형, 예를 들어, 5' 말단 변형(인산화, 접합, 역위 연결 등), 3' 말단 변형(접합, DNA 뉴클레오타이드, 역위 연결 등); 염기 변형, 예를 들어, 안정화 염기, 불안정화 염기, 또는 파트너의 연장된 레퍼토리, 염기의 제거(무염기 뉴클레오타이드), 또는 접합된 염기와 염기쌍을 형성하는 염기를 이용한 대체; 당 변형(예를 들어, 2' 위치 또는 4' 위치에서의 변형) 또는 당의 대체; 및/또는 포스포디에스테르 결합의 변형 또는 대체를 포함하는 백본 변형을 포함한다. 본 명세서에 기재된 구현예에서 유용한 iRNA 화합물의 특이적 예는 변형된 백본 또는 비-천연 뉴클레오사이드간 연결을 함유하는 RNA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 변형된 백본을 갖는 RNA는 특히 백본 내에 인 원자를 갖지 않는 것을 포함한다. 본 명세서의 목적상, 당 분야에 때때로 언급되는 바와 같이, 뉴클레오사이드간 백본에서 인 원자를 갖지 않는 변형된 RNA가 또한 올리고뉴클레오사이드인 것으로 간주될 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 iRNA는 그의 뉴클레오사이드간 백본에서 인 원자를 가질 것이다.

[0216] 변형된 RNA 백본은, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 예를 들어, 3'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트, 포스피네이트, 포스포라미데이트, 예를 들어, 3'-아미노 포스포라미데이트 및 아미노알킬포스포라미데이트, 티오노포스포라미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상 3'-5' 결합을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 역전된 극성을 갖는 것을 포함하며, 여기서 뉴클레오사이드 단위의 인접한 쌍은 3'-5' 대 5'-3' 또는 2'-5' 대 5'-2'로 연결된다. 다양한 염, 혼합된 염 및 유리산 형태가 또한 포함된다.

[0217] 상기 인-함유 결합의 제조를 교시하는 대표적 미국 특허는 각각의 전문이 참조로서 본 명세서에 포함되는 미국 특허 제 3,687,808호; 제 4,469,863호; 제 4,476,301호; 제 5,023,243호; 제 5,177,195호; 제 5,188,897호; 제 5,264,423호; 제 5,276,019호; 제 5,278,302호; 제 5,286,717호; 제 5,321,131호; 제 5,399,676호; 제 5,405,939호; 제 5,453,496호; 제 5,455,233호; 제 5,466,677호; 제 5,476,925호; 제 5,519,126호; 제 5,536,821호; 제 5,541,316호; 제 5,550,111호; 제 5,563,253호; 제 5,571,799호; 제 5,587,361호; 제 5,625,050호; 제 6,028,188호; 제 6,124,445호; 제 6,160,109호; 제 6,169,170호; 제 6,172,209호; 제 6,239,265호; 제 6,277,603호; 제 6,326,199호; 제 6,346,614호; 제 6,444,423호; 제 6,531,590호; 제 6,534,639호; 제 6,608,035호; 제 6,683,167호; 제 6,858,715호; 제 6,867,294호; 제 6,878,805호; 제 7,015,315호; 제 7,041,816호; 제 7,273,933호; 제 7,321,029호; 및 미국 특허 RE39464호를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0218] 인 원자를 포함하지 않는 변형된 RNA 백본은 짧은 사슬 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오사이드간 연결, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오사이드간 연결, 또는 하나 이상의 짧은 사슬 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 뉴클레오사이드간 연결에 의해 형성되는 백본을 갖는다. 이들은 모르폴리노 결합(뉴클레오사이드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨)을 갖는 백본; 실록산 백본; 슬퍼드, 슬폭시드 및 술폰 백본; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 알켄 함유 백본; 술파메이트 백본; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 백본; 술포네이트 및 술폰아미드 백본; 아미드 백본; 및 혼합된 N, O, S 및 CH<sub>2</sub> 구성요소 부분을 갖는 다른 백본을 포함한다.

[0219]

상기 올리고뉴클레오사이드의 제조를 교시하는 대표적 미국 특허는 각각의 전문이 참조로서 본 명세서에 포함되는 미국 특허 제 5,034,506호; 제 5,166,315호; 제 5,185,444호; 제 5,214,134호; 제 5,216,141호; 제 5,235,033호; 제 5,64,562호; 제 5,264,564호; 제 5,405,938호; 제 5,434,257호; 제 5,466,677호; 제 5,470,967호; 제 5,489,677호; 제 5,541,307호; 제 5,561,225호; 제 5,596,086호; 제 5,602,240호; 제 5,608,046호; 제 5,610,289호; 제 5,618,704호; 제 5,623,070호; 제 5,663,312호; 제 5,633,360호; 제 5,677,437호; 및 제 5,677,439호를 포함하나, 이로 제한되지는 않는다.

[0220]

다른 구현예에서, iRNA에서 사용하는 것으로 고려되는 적절한 RNA 모방체에서, 당 및 뉴클레오사이드간 연결 둘 모두, 즉, 뉴클레오타이드 단위의 백본은 신규한 기로 대체된다. 염기 단위는 적절한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 이러한 하나의 올리고머 화합물인 우수한 혼성화 특성을 갖는 것으로 밝혀진 RNA 모방체는 펩타이드 핵산(PNA)으로 지칭된다. PNA 화합물에서, RNA의 당 백본은 아미드 함유 백본, 특히 아미노에틸글리신 백본으로 대체된다. 핵염기는 유지되고, 백본의 아미드 부분의 아자 질소 원자에 직접적 또는 간접적으로 결합된다. PNA 화합물의 제조를 교시하는 대표적 미국 특허는 각각의 전문이 참조로서 본 명세서에 포함되는 미국 특허 제 5,539,082호; 제 5,714,331호; 및 제 5,719,262호를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 iRNA에 사용하기에 적합한 추가의 PNA 화합물은, 예를 들어, 문헌[Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500]에 기재된다.

[0221]

본 발명에서 특정된 일부 구현예는 포스포로티오에이트 백본을 갖는 RNA 및 혼테로원자 백본, 특히 상기 언급된 미국 특허 제 5,489,677호의  $--\text{CH}_2--\text{NH}--\text{CH}_2-$ ,  $--\text{CH}_2--\text{N}(\text{CH}_3)--\text{O}--\text{CH}_2-$  [메틸렌(메틸아미노) 또는 MMI 백본으로 공지됨],  $--\text{CH}_2--\text{O}--\text{N}(\text{CH}_3)--\text{CH}_2-$ ,  $--\text{CH}_2--\text{N}(\text{CH}_3)--\text{N}(\text{CH}_3)--\text{CH}_2-$  및  $--\text{N}(\text{CH}_3)--\text{CH}_2--\text{CH}_2-$  [상기 식에서, 천연 포스포디에스테르 백본은  $--\text{O}--\text{P}--\text{O}--\text{CH}_2-$ 로 표시됨], 및 상기 언급된 미국 특허 제 5,602,240호의 아미드 백본을 갖는 올리고뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 특정된 RNA는 상기 언급된 미국 특허 제 5,034,506호의 모르폴리노 백본 구조를 갖는다.

[0222]

변형된 RNA는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다. 본 명세서에 특정된 iRNA, 예를 들어, dsRNA는 2' 위치에 OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알키닐; 또는 O-알킬-O-알킬 중 하나를 포함할 수 있고, 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 비치환된 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 알킬 또는 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>10</sub> 알케닐 및 알키닐일 수 있다. 예시적인 적합한 변형은 O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, 및 O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>를 포함하고, 여기서 n 및 m은 1 내지 약 10이다. 다른 구현 예에서, dsRNA는 2' 위치에 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알크아릴, 아르알킬, O-알크아릴 또는 O-아르알킬, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, 혼테로사이클로알킬, 혼테로사이클로알크아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단 기, 리포터 기, 인터캘레이터(intercalator), iRNA의 약동학적 특성을 개선시키기 위한 기, 또는 iRNA의 약력학적 특성을 개선시키기 위한 기, 및 유사한 특성을 갖는 다른 치환기 중 하나를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 2'-메톡시에톡시(2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로도 공지됨)(문헌[Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504]), 즉, 알콕시-알콕시기를 포함한다. 또 다른 예시적 변형은 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 즉, 하기 본 명세서의 실시예에 기재된 바와 같은 2'-DMAOE로도 공지된 O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 기, 및 2'-디메틸아미노에톡시에톡시(2'-O-디메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE로도 당 분야에 공지됨), 즉, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>이다.

[0223]

다른 변형은 2'-메톡시(2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-아미노프로록시(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) 및 2'-플루오로(2'-F)를 포함한다. 유사한 변형이 또한 iRNA의 RNA 상의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드 상 또는 2'-5' 연결된 dsRNA 내의 당의 3' 위치 및 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서 이루어질 수 있다. iRNA는 또한 펜토푸라노실 당 대신에 사이클로부틸 모이어티와 같은 당 모방체를 가질 수 있다. 상기 변형된 당 구조의 제조를 교시하는 대표적 미국 특허는 미국 특허 제 4,981,957호; 제 5,118,800호; 제 5,319,080호; 제 5,359,044호; 제 5,393,878호; 제 5,446,137호; 제 5,466,786호; 제 5,514,785호; 제 5,519,134호; 제 5,567,811호; 제 5,576,427호; 제 5,591,722호; 제 5,597,909호; 제 5,610,300호; 제 5,627,053호; 제 5,639,873호; 제 5,646,265호; 제 5,658,873호; 제 5,670,633호; 및 제 5,700,920호를 포함하나, 이에 제한되지는 않고, 상기 특허 중 특정 특허는 본 출원과 함께 공동으로 소유된다. 상기 특허 각각의 전문은 참조로서 본 명세서에 포함된다.

[0224]

본 발명의 RNA의 RNA는 또한 핵염기(종종, 당 분야에서 "염기"로 간단히 언급됨) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "변형되지 않은" 또는 "천연" 핵염기는 퓨린 염기 아데닌(A) 및 구아닌(G), 및 피리미딘 염기 티민(T), 시토신(C) 및 우라실(U)을 포함한다. 변형된 핵염기는 다른 합성 및 천연 핵염기, 예를 들어, 데옥시-티민(dT), 5-메틸시토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 6-메틸 및 아데닌 및 구아닌의 다른 알킬 유도체, 2-프로필 및 아데닌 및 구아닌의 다른 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-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5- 할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-다아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함한다. 추가 핵염기는 미국 특허 제 3,687,808호에 개시된 것, 문헌[Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008]에 개시된 것, 문헌[The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L. ed. John Wiley & Sons, 1990]에 개시된 것, 문헌[Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613]에 개시된 것, 및 문헌[Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993]에 개시된 것을 포함한다. 상기 핵염기 중 특정 핵염기가 본 발명에서 특정된 올리고머 화합물의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 이들은 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린, 예를 들어, 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은 핵산 이중가닥 안정성을 0.6 내지 1.2°C까지 증가시키는 것으로 밝혀졌고(문헌[Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278]), 이는 더욱더 특히 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합되는 경우에 예시적인 염기 치환이다.

[0225]

상기 언급된 변형된 핵염기뿐만 아니라 다른 변형된 핵염기 중 특정 핵염기의 제조를 교시하는 대표적 미국 특허는 각각의 전문이 참조로서 본 명세서에 포함되는 상기 언급된 미국 특허 제 3,687,808호; 제 5,750,692호; 제 4,845,205호; 제 5,130,30호; 제 5,134,066호; 제 5,175,273호; 제 5,367,066호; 제 5,432,272호; 제 5,457,187호; 제 5,459,255호; 제 5,484,908호; 제 5,502,177호; 제 5,525,711호; 제 5,552,540호; 제 5,587,469호; 제 5,594,121호, 5,596,091호; 제 5,614,617호; 제 5,681,941호; 제 6,015,886호; 제 6,147,200호; 제 6,166,197호; 제 6,222,025호; 제 6,235,887호; 제 6,380,368호; 제 6,528,640호; 제 6,639,062호; 제 6,617,438호; 제 7,045,610호; 제 7,427,672호; 및 제 7,495,088호를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0226]

또한, RNA의 RNA는 하나 이상의 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하도록 변형될 수 있다. "바이사이클릭 당"은 2개의 원자의 가교 연결에 의해 변형된 푸라노실 고리이다. "바이사이클릭 뉴클레오사이드"("BNA")는, 당 고리의 2개의 탄소 원자를 연결시킴으로써, 바이사이클릭 고리계가 형성되도록 하는 가교를 포함하는 당 모이어티를 갖는 뉴클레오사이드이다. 특정 구현예에서, 가교는 당 고리의 4'-탄소 및 2'-탄소를 연결한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 작용제는 하나 이상의 잠금 핵산(LNA)을 포함할 수 있다. 잠금 핵산은, 리보스 모이어티가 2' 및 4' 탄소를 연결하는 가외의 가교를 포함하는 변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드이다. 즉, LNA는 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' 가교를 포함하는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드이다. 이러한 구조는 3'-엔도 구조적 형태 내의 리보스를 효과적으로 "잠근다". siRNA에 대한 잠금 핵산의 추가는 혈청 내에서의 siRNA 안정성을 증가시키고, 표적의 효과를 감소시키는 것으로 밝혀졌다(문헌[Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193]). 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 사용하기 위한 바이사이클릭 뉴클레오사이드의 예는 제한없이, 4' 리보실 고리 원자와 2' 리보실 고리 원자 사이에 가교를 포함하는 뉴클레오사이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 안티센스 폴리뉴클레오타이드 작용제는 4'에서 2'의 가교를 포함하는 하나 이상의 바이사이클릭 뉴클레오사이드를 포함한다. 이렇게 4'에서 2'으로 가교 연결된 바이사이클릭 뉴클레오사이드는 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2'(LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'(ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'(또한, "결속성 에틸" 또는 "cEt"로 지칭됨) 및 4'-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-O-2'(및 그의 유사체; 예를 들어, 미국 특허 제 7,399,845호 참조); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2'(및 그의 유사체; 예를 들어, 미국 특허 제 8,278,283호 참조); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2'(및 그의 유사체; 예를 들어, 미국 특허 제 8,278,425호 참조); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2'(예를 들어, 미국 특허 공개 제 2004/0171570호 참조); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2'(R은 H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, 또는 보호기임)(예를 들어, 미국 특허 제 7,427,672호 참조); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2'(예를 들어, 문헌[Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134] 참조); 및 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2'(및 그의 유사체; 예를 들어, 미국 특허 제 8,278,426호 참조)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 상기 특허 각각의 전문은 참조로서 본 명세서에 포함

된다.

[0227] 잠금 핵산 뉴클레오타이드의 제조를 교시하는 미국 특허 및 미국 특허 공개의 추가의 대표 예는, 각각의 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는 하기의 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: 미국 특허 제 6,268,490호; 제 6,525,191호; 제 6,670,461호; 제 6,770,748호; 제 6,794,499호; 제 6,998,484호; 제 7,053,207호; 제 7,034,133; 7,084,125호; 제 7,399,845호; 제 7,427,672호; 제 7,569,686호; 제 7,741,457호; 제 8,022,193호; 제 8,030,467호; 제 8,278,425호; 제 8,278,426호; 제 8,278,283호; US 2008/0039618호; 및 US 2009/0012281호.

[0228] 예를 들어  $\alpha$ -L-리보푸라노스 및  $\beta$ -D-리보푸라노스를 포함하는 하나 이상의 입체화학적 당 입체배좌를 갖는, 전술된 임의의 바이사이클릭 뉴클레오사이드가 제조될 수 있다(WO 99/14226 참조).

[0229] iRNA의 RNA는 또한 하나 이상의 결속성 에틸 뉴클레오타이드를 포함하도록 변형될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "결속성 에틸 뉴클레오타이드" 또는 "cEt"는 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-0-2' 가교를 포함하는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 잠금 핵산이다. 일 구현예에서, 결속성 에틸 뉴클레오타이드는 S 입체형태로서, 본 명세서에서 "S-cEt"로 지칭된다.

[0230] 본 발명의 iRNA는 또한 하나 이상의 "입체형태적으로 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 고리를 안정한 입체형태로 잡그고, mRNA의 혼성화 친화도를 증가시킨다. 링커는, 안정성 및 친화도를 위해 최적의 위치에 산소를 배치시킴으로써, 더 적은 리보스 고리 퍼커링(puckering)을 야기하기에 충분한 길이이다.

[0231] 상기에서 언급된 특정 CRN의 제조를 교시하는 공보물의 대표 예는, 각각의 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는 미국 특허 공개 제 2013/0190383호; 및 PCT 공개 WO 2013/036868을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0232] 본 발명의 iRNA의 하나 이상의 뉴클레오타이드는 또한 하이드록시메틸 치환된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. "하이드록시메틸 치환된 뉴클레오타이드"는 비사이클릭 2'-3'-seco-뉴클레오타이드이며, 이는 또한 "비잠금 핵산"("UNA") 변형으로서 지칭된다.

[0233] UNA의 제조를 교시하는 미국 공보물의 대표 예는, 각각의 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는 미국 특허 제 8,314,227호; 및 미국 특허 공개 제 2013/0096289호; 제 2013/0011922호; 및 제 2011/0313020호를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0234] RNA 분자의 말단에 대한 잠재적인 안정화 변형은 N-(아세틸아미노카프로일)-4-하이드록시프롤리놀(Hyp-C6-NHAc), N-(카프로일-4-하이드록시프롤리놀(Hyp-C6), N-(아세틸-4-하이드록시프롤리놀(Hyp-NHAc), 티미딘-2'-0-데옥시티미딘(에테르), N-(아미노카프로일)-4-하이드록시프롤리놀(Hyp-C6-아미노), 2-도코사노일-우리딘-3"-포스페이트, 전환 엔지 dT(idT) 등을 포함할 수 있다. 이러한 변형의 개시내용은 PCT 공개 WO 2011/005861에서 찾을 수 있다.

[0235] 본 발명의 iRNA의 뉴클레오타이드의 다른 변형은 RNAi 작용제의 안티센스 가닥의 5' 포스페이트 또는 5' 포스페이트 모방체, 예를 들어, 5'-말단 포스페이트 또는 포스페이트 모방체를 포함한다. 적합한 포스페이트 모방체는, 예를 들어, 그 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는 미국 특허 공개 제 2012/0157511호에 개시되어 있다.

#### A. 본 발명의 모티프를 포함하는 변형된 iRNA

[0237] 본 발명의 특정 양태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용제는, 예를 들어, 각각의 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는 것으로, 2011년 11월 18일자로 출원된 미국 출원 제 61/561,710호 또는 2012년 11월 16일자로 출원된 PCT/US2012/065691에 개시된 바와 같은 화학적 변형을 포함한다.

[0238] 더욱 구체적으로, 놀랍게도, 이중 가닥 RNAi 작용제의 센스 가닥 및 안티센스 가닥이 RNAi 작용제의 적어도 하나의 가닥의 절단 부위 또는 그 주위에 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나 이상의 모티프를 갖도록 변형된 경우, RNAi 작용제의 유전자 침묵화 활성이 월등하게 증진된 것으로 밝혀졌다.

[0239] 따라서, 본 발명은, 생체내에서 표적 유전자(즉, TTR 유전자)의 발현을 억제할 수 있는 이중 가닥 RNAi 작용제를 제공한다. RNAi 작용제는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함한다. RNAi 작용제의 각각의 가닥은 12 내지 30

개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 예를 들어, 각각의 가닥은 14 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이, 17 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이, 25 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이, 27 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이, 17 내지 23개의 뉴클레오타이드 길이, 17 내지 21개의 뉴클레오타이드 길이, 17 내지 19개의 뉴클레오타이드 길이, 19 내지 25개의 뉴클레오타이드 길이, 19 내지 23개의 뉴클레오타이드 길이, 19 내지 21개의 뉴클레오타이드 길이, 21 내지 25개의 뉴클레오타이드 길이, 또는 21 내지 23개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0240] 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 통상적으로 이중가닥 이중 가닥 RNA("dsRNA")를 형성하며, 이는 또한 본 명세서에서 "RNAi 작용제"로서 지칭된다. RNAi 작용제의 이중가닥 영역은 12 내지 30개의 뉴클레오타이드 쌍 길이일 수 있다. 예를 들어, 이중가닥 영역은 14 내지 30개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 17 내지 30개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 27 내지 30개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 17 내지 23개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 17 내지 21개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 17 내지 19개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 19 내지 25개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 19 내지 23개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 19 내지 21개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 21 내지 25개의 뉴클레오타이드 쌍 길이, 또는 21 내지 23개의 뉴클레오타이드 쌍 길이일 수 있다. 또 다른 예에서, 이중가닥 영역은 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 및 27개의 뉴클레오타이드 길이로부터 선택된다.

[0241] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 하나의 가닥 또는 두 가닥 모두의 3'-말단, 5'-말단, 또는 두 말단 모두에 하나 이상의 오버행 영역 및/또는 캡 형성 기를 함유할 수 있다. 오버행은 1 내지 6개의 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어 2 내지 6개의 뉴클레오타이드 길이, 1 내지 5개의 뉴클레오타이드 길이, 2 내지 5개의 뉴클레오타이드 길이, 1 내지 4개의 뉴클레오타이드 길이, 2 내지 4개의 뉴클레오타이드 길이, 1 내지 3개의 뉴클레오타이드 길이, 2 내지 3개의 뉴클레오타이드 길이, 또는 1 내지 2개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 오버행은, 하나의 가닥이 다른 가닥보다 더 긴 결과 또는 동일한 길이의 2개의 가닥이 지그재그 형태를 이룬 결과일 수 있다. 오버행은 표적 mRNA와 미스매치를 형성할 수 있거나, 이는 표적화된 유전자 서열에 상보성일 수 있거나, 또 다른 서열일 수 있다. 제1 가닥 및 제2 가닥은 또한, 예를 들어 추가의 염기에 의해 헤어핀을 형성함에 의하거나, 다른 비염기 링커에 의해, 합류될 수 있다.

[0242] 일 구현예에서, RNAi 작용제의 오버행 영역의 뉴클레오타이드는 각각 독립적으로, 2'-당 변형된 것으로, 예컨대, 2-F, 2'-0-메틸, 티미딘(T), 2'-0-메톡시에틸-5-메틸우리딘(Tho), 2'-0-메톡시에틸아데노신(Aeo), 2'-0-메톡시에틸-5-메틸시티딘(m5Ceo), 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 변형된 또는 비변형된 뉴클레오타이드일 수 있다. 예를 들어, TT는 어느 하나의 가닥에 어느 하나의 말단의 오버행 서열일 수 있다. 오버행은 표적 mRNA와 미스매치를 형성할 수 있거나, 이는 표적화된 유전자 서열에 상보성일 수 있거나, 또 다른 서열일 수 있다.

[0243] RNAi 작용제의 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 두 가닥 모두의 5' 또는 3' 오버행은 인산화될 수 있다. 일부 구현예에서, 오버행 영역(들)은 2개의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트를 가진 2개의 뉴클레오타이드를 함유하며, 2개의 뉴클레오타이드는 동일하거나, 상이할 수 있다. 일 구현예에서, 오버행은 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 두 가닥 모두의 3'-말단에 존재한다. 일 구현예에서, 이러한 3'-오버행은 안티센스 가닥에 존재한다. 일 구현예에서, 이러한 3'-오버행은 센스 가닥에 존재한다.

[0244] RNAi 작용제는, 그의 전체적인 안정성에 영향을 줌이 없이, RNAi의 간접 활성을 강화할 수 있는 단일 오버행만을 함유할 수 있다. 예를 들어, 단일 가닥 오버행은 센스 가닥의 3'-말단에 또는 대안적으로 안티센스 가닥의 3'-말단에 위치할 수 있다. RNAi는 또한, 안티센스 가닥의 5' 말단에(또는, 센스 가닥의 3'-말단)에 위치하거나, 그 반대의 경우의 평활 말단을 가질 수 있다. 일반적으로, RNAi의 안티센스 가닥은 3'-말단에 뉴클레오타이드 오버행을 가지며, 5'-말단은 평활 말단이다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니나, 안티센스 가닥의 5' 말단 및 안티센스 가닥의 3'-말단 오버행의 비대칭 평활 말단은 RISC 과정으로의 가이드 가닥 로딩을 지원한다.

[0245] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 21개의 뉴클레오타이드 센스 가닥 및 23개의 뉴클레오타이드 안티센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 5' 말단으로부터 위치 9, 10, 11의 3개의 연속 뉴클레오타이드에 3개의 2'-F 변형의 적어도 하나의 모티프를 함유하고; 안티센스 가닥은 5' 말단으로부터 위치 11, 12, 13의 3개의 연속 뉴클레오타이드에 3개의 2'-0-메틸 변형의 적어도 하나의 모티프를 함유하고, RNAi 작용제의 하나의 말단은 평활 말단이며, 다른 말단은 2개의 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 바람직하게는, 2개의 뉴클레오타이드 오버행은 안티센스 가닥의 3'-말단에 존재한다.

[0246] 안티센스 가닥의 3'-말단에 2개의 뉴클레오타이드 오버행이 존재하는 경우, 말단의 3개의 뉴클레오타이드 사이에 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결이 존재할 수 있고, 3개의 뉴클레오타이드 중 2개는 오버행

뉴클레오타이드이며, 세 번째 뉴클레오타이드는 오버행 뉴클레오타이드 다음의 뉴클레오타이드 쌍이다. 일 구현 예에서, RNAi 작용제는 추가적으로, 센스 가닥의 5' 말단 및 안티센스 가닥의 5' 말단 둘 모두에 말단의 3개의 뉴클레오타이드 사이에 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 갖는다. 일 구현 예에서, 모티프의 일부인 뉴클레오타이드를 포함하는, RNAi 작용제의 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다. 일 구현 예에서, 예를 들어, 각각의 잔기는, 예를 들어 교대 모티프에서 2'-0-메틸 또는 3'-플루오로에 의해 독립적으로 변형된다. 일 구현 예에서, 본 발명의 iRNA의 모든 뉴클레오타이드가 변형되며, iRNA는 센스 가닥에 8개 이하의 2'-플루오로 변형(예를 들어, 7개 이하의 2'-플루오로 변형, 6개 이하의 2'-플루오로 변형, 5개 이하의 2'-플루오로 변형, 4개 이하의 2'-플루오로 변형, 3개 이하의 2'-플루오로 변형, 또는 2개 이하의 2'-플루오로 변형) 및 안티센스 가닥에 6개 이하의 2'-플루오로 변형(예를 들어, 5개 이하의 2'-플루오로 변형, 4개 이하의 2'-플루오로 변형, 3개 이하의 2'-플루오로 변형, 또는 2개 이하의 2'-플루오로 변형)을 포함한다. 선택적으로, RNAi 작용제는 리간드(바람직하게는 GalNAc3)를 추가로 포함한다.

- [0247] 일 구현 예에서, RNAi 작용제의 센스 가닥은 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형의 적어도 하나의 모티프를 함유하며, 모티프 중 하나는 센스 가닥의 절단 부위에 발생한다.
- [0248] 일 구현 예에서, RNAi 작용제의 안티센스 가닥은 또한 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형의 적어도 하나의 모티프를 함유할 수 있으며, 모티프 중 하나는 안티센스 가닥의 절단 부위 또는 그 주위에 발생한다.
- [0249] 17 내지 23개의 뉴클레오타이드 길이의 이중가닥 영역을 갖는 RNAi 작용제의 경우, 안티센스 가닥의 절단 부위는 통상적으로 5' 말단으로부터 대략 10, 11 및 12 위치에 존재한다. 따라서, 3개의 동일한 변형의 모티프는, 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 첫 번째 뉴클레오타이드로부터 시작하여 계수하거나, 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 이중가닥 영역 내의 첫 번째 뉴클레오타이드 쌍으로부터 시작하여 계수하여, 안티센스 가닥의 9, 10, 11 위치; 10, 11, 12 위치; 11, 12, 13 위치; 12, 13, 14 위치; 또는 13, 14, 15 위치에 발생할 수 있다. 안티센스 가닥의 절단 부위는 또한 5'-말단으로부터 RNAi의 이중가닥 영역의 길이에 따라 변화될 수 있다.
- [0250] RNAi 작용제의 센스 가닥은 센스 가닥의 절단 부위의 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형의 적어도 하나의 모티프를 함유할 수 있으며; 안티센스 가닥은 안티센스 가닥의 절단 부위 또는 그 주위의 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형의 적어도 하나의 모티프를 가질 수 있다. 센스 가닥 및 안티센스 가닥이 dsRNA 이중가닥을 형성하는 경우, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은, 센스 가닥의 3개의 뉴클레오타이드의 하나의 모티프 및 안티센스 가닥의 3개의 뉴클레오타이드의 하나의 모티프에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드가 중첩되도록, 즉, 센스 가닥의 모티프의 3개의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나가 안티센스 가닥의 모티프의 3개의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나와 염기쌍을 형성하도록 정렬될 수 있다. 대안적으로, 적어도 2개의 뉴클레오타이드가 중첩될 수 있거나, 3개의 뉴클레오타이드 모두가 중첩될 수 있다.
- [0251] 일 구현 예에서, 모티프의 일부인 뉴클레오타이드를 포함하는, RNAi 작용제의 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드가 변형될 수 있다. 각각의 뉴클레오타이드는, 하나 또는 둘 모두의 비연결 포스페이트 산소 및/또는 하나 이상의 연결 포스페이트 산소의 하나 이상의 변이; 예를 들어, 리보스 당의 2' 하이드록실의 리보스 당의 구성성분의 변이; "데포스포(dephospho)" 링커에 의한 포스페이트 모이어티의 대규모 대체; 천연 유래 염기의 변형 또는 대체; 및 리보스-포스페이트 백본의 대체 또는 변형을 포함할 수 있는 동일하거나, 상이한 변형에 의해 변형될 수 있다.
- [0252] 핵산이 하위단위의 중합체이므로, 다수의 변형, 예를 들어 염기 또는 포스페이트 모이어티 또는 포스페이트 모이어티의 비연결 0의 변형이, 핵산 내에서 반복되는 위치에 발생한다. 일부 경우, 핵산 내의 모든 대상 위치에서 변형이 발생할 것이나, 많은 경우, 그러하지 않을 것이다. 예로서, 변형은 단지 3' 또는 5' 말단 위치에서만 발생할 수 있으며, 하나의 가닥의 말단 영역, 예를 들어, 말단 뉴클레오타이드상의 위치 또는 마지막 2, 3, 4, 5, 또는 10개의 뉴클레오타이드에만 발생할 수 있다. 변형은 이중 가닥 영역, 단일 가닥 영역 또는 둘 모두에 발생할 수 있다. 변형은 RNA의 이중 가닥 영역에만 발생할 수 있거나, RNA의 단일 가닥 영역에만 발생할 수 있다. 예를 들어, 비연결 0 위치의 포스포로티오에이트 변형은 단지 하나의 말단에만 또는 두 말단 모두에 발생할 수 있거나, 하나의 가닥의 말단 영역, 예를 들어, 말단 뉴클레오타이드상의 위치 또는 마지막 2, 3, 4, 5, 또는 10개의 뉴클레오타이드에만 발생할 수 있거나, 이중 가닥 및 단일 가닥 영역에, 특히 말단에 발생할 수 있다. 5' 말단 또는 말단들이 인산화될 수 있다.
- [0253] 예를 들어, 안정성을 증진시키기 위해, 오버행에 특정 염기를 포함시키거나, 단일 가닥 오버행, 예를 들어, 5' 또는 3' 오버행, 또는 둘 모두에 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 대용물을 포함시키는 것이 가능할 수 있다. 예를 들어, 오버행에 퓨린계 뉴클레오타이드를 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구현 예에서,

3' 또는 5' 오버행의 모든 염기 또는 일부 염기가, 예를 들어 본 명세서에 기재된 변형에 의해 변형될 수 있다. 변형은, 당업계에 공지된 변형에 의한 리보스 당의 2' 위치에서의 변형의 사용, 예를 들어, 핵염기의 리보당 대신에 2'-데옥시-2'-플루오로(2'-F) 또는 2'-O-메틸 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드의 사용 및 포스페이트기의 변형, 예를 들어, 포스포로티오에이트 변형을 포함할 수 있다. 오버행은 표적 서열에 상동성일 필요는 없다.

[0254] 일 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 각각의 잔기는 LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-메톡시에틸, 2'-O-메틸, 2'-O-알릴, 2'-C-알릴, 2'-데옥시, 2'-하이드록실, 또는 2'-플루오로에 의해 독립적으로 변형된다. 이러한 가닥은 하나 초과의 변형을 함유할 수 있다. 일 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 각각의 잔기는 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로에 의해 독립적으로 변형된다.

[0255] 통상적으로, 적어도 2개의 상이한 변형이 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 존재한다. 이러한 2개의 변형은 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로 변형일 수 있거나, 다른 것일 수 있다.

[0256] 일 구현예에서, N<sub>a</sub> 및/또는 N<sub>b</sub>는 교대 패턴의 변형을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "교대 모티프"는 하나 이상의 변형을 갖는 모티프로서, 각각의 변형이 하나의 가닥의 교대 뉴클레오타이드에 발생하는 모티프를 지칭한다. 교대 뉴클레오타이드는 2개의 뉴클레오타이드당 하나 또는 3개의 뉴클레오타이드당 하나 또는 유사한 패턴을 지칭할 수 있다. 예를 들어, A, B 및 C가 각각 뉴클레오타이드에 대한 변형 중 하나의 유형을 나타내는 경우, 교대 모티프는 "ABABABABABAB...", "AABBAABBAABB...", "AABAABAABAAB...", "AAABAAABAAAB...", "AAABBBAABBB..." 또는 "ABCABCABCABC..." 등일 수 있다.

[0257] 교대 모티프에 함유된 변형의 유형은 동일하거나, 상이할 수 있다. 예를 들어, A, B, C, D가 각각 뉴클레오타이드의 변형 중 하나의 유형을 나타내는 경우, 교대 패턴, 즉, 2개의 뉴클레오타이드마다의 변형은 동일할 수 있거나, 각각의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 교대 모티프 내의 변형의 여러 가지 가능성, 예컨대 "ABABAB...", "ACACAC...", "BDBDBD..." 또는 "CDCDCD..." 등으로부터 선택될 수 있다.

[0258] 일 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는, 센스 가닥의 교대 모티프의 변형 패턴이 안티센스 가닥의 교대 모티프의 변형 패턴에 대해, 이동된 것을 포함한다. 이러한 이동은, 센스 가닥의 변형된 뉴클레오타이드 그룹이 안티센스 가닥의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드 그룹에 상응하도록 이루어질 수 있으며, 반대의 경우도 마찬가지이다. 예를 들어, dsRNA 이중가닥에서 센스 가닥이 안티센스 가닥과 쌍을 형성하는 경우, 센스 가닥의 교대 모티프는 센스 가닥의 5'에서 3' 방향으로 "ABABAB"로 시작될 수 있으며, 안티센스 가닥의 교대 모티프는 이중가닥 영역 내에서 안티센스 가닥의 5'에서 3' 방향으로 "BABABA"로 시작될 수 있다. 또 다른 예에서, 센스 가닥의 교대 모티프는 센스 가닥의 5'에서 3' 방향으로 "AABBAABB"로 시작될 수 있으며, 안티센스 가닥의 교대 모티프는 이중가닥 영역 내에서 안티센스 가닥의 5'에서 3' 방향으로 "BBAABBAA"로 시작됨으로써, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이의 변형 패턴의 완전한 이동 또는 부분적 이동이 이루어지게 된다.

[0259] 일 구현예에서, RNAi 작용제는, 첫 부분의 센스 가닥의 2'-O-메틸 변형 및 2'-F 변형의 교대 모티프의 패턴이 첫 부분의 안티센스 가닥의 2'-O-메틸 변형 및 2'-F 변형의 교대 모티프의 패턴에 대해, 이동이 이루어진 것을 포함하는 것으로, 즉, 센스 가닥의 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드가 안티센스 가닥의 2'-F 변형된 뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하며, 반대의 경우도 그러하다. 센스 가닥의 1 위치는 2'-F 변형으로 시작될 수 있으며, 안티센스 가닥의 1 위치는 2'-O-메틸 변형으로 시작될 수 있다.

[0260] 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥에 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나 이상의 모티프의 도입은 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥에 존재하는 최초의 변형 패턴을 단절시킨다. 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥에 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나 이상의 모티프의 도입에 의한 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 변형 패턴의 단절은 놀랍게도 표적 유전자에 대한 유전자 침묵화 활성을 증진시킨다.

[0261] 일 구현예에서, 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형의 모티프가 임의의 가닥에 도입되는 경우, 이 모티프 다음의 뉴클레오타이드의 변형은 이 모티프의 변형과 상이한 변형이다. 예를 들어, 모티프를 함유하는 서열 부분은 "...N<sub>a</sub>YYYN<sub>b</sub>..."이며, 여기서 "Y"는 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형의 모티프의 변형을 나타내고, "N<sub>a</sub>" 및 "N<sub>b</sub>"는 Y의 변형과 상이한 모티프 "YYY" 다음의 뉴클레오타이드에 대한 변형을 나타내며, N<sub>a</sub> 및 N<sub>b</sub>는 동일하거나, 상이한 변형일 수 있다. 대안적으로, N<sub>a</sub> 및/또는 N<sub>b</sub>는, 윙(wing) 변형이 존재하는 경우, 부재하거나, 존재할 수 있다.

[0262] RNAi 작용제는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결을 추가로 포함할 수 있다. 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결 변형은 센스 가닥 또는 안티센

스 가닥 또는 두 가닥 모두의 임의의 뉴클레오타이드에서 가닥의 임의의 위치에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드간 연결 변형이 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드에서 발생할 수 있거나; 각각의 뉴클레오타이드간 연결 변형이 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 교대 패턴에 발생할 수 있거나; 센스 가닥 또는 안티센스 가닥이 교대 패턴에 둘 모두의 뉴클레오타이드간 연결 변형을 함유할 수 있다. 센스 가닥의 뉴클레오타이드간 연결 변형의 교대 패턴은 안티센스 가닥과 동일하거나, 상이할 수 있으며, 센스 가닥의 뉴클레오타이드간 연결 변형의 교대 패턴은 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드간 연결 변형의 교대 패턴에 대해 이동이 이루어질 수 있다. 일 구현예에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 6 내지 8개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 일 구현예에서, 안티센스 가닥은 5'-말단에 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하고, 3'-말단에 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하며, 센스 가닥은 5'-말단 또는 3'-말단에 적어도 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다.

[0263]

일 구현예에서, RNAi는 오버행 영역에 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결 변형을 포함한다. 예를 들어, 오버행 영역은 2개의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 2개의 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 뉴클레오타이드간 연결 변형은 또한 이중가닥 영역 내의 말단의 뉴클레오타이드 쌍에 의해 오버행 뉴클레오타이드가 연결되도록 제조될 수 있다. 예를 들어, 적어도 2, 3, 4개, 또는 모든 오버행 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결을 통해 연결될 수 있으며, 선택적으로, 오버행 뉴클레오타이드 다음의 뉴클레오타이드 쌍에 의해 오버행 뉴클레오타이드를 연결하는 추가의 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결이 존재할 수 있다. 예를 들어, 말단의 3개의 뉴클레오타이드 사이에 적어도 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결이 존재할 수 있으며, 여기서, 3개의 뉴클레오타이드 중 2개는 오버행 뉴클레오타이드이고, 세 번째 뉴클레오타이드는 오버행 뉴클레오타이드 다음의 뉴클레오타이드 쌍이다. 이를 말단의 3개의 뉴클레오타이드는 안티센스 가닥의 3'-말단, 센스 가닥의 3'-말단, 안티센스 가닥의 5' 말단, 및/또는 안티센스 가닥의 5' 말단에 존재할 수 있다.

[0264]

일 구현예에서, 2개의 뉴클레오타이드 오버행은 안티센스 가닥의 3'-말단에 존재하고, 말단의 3개의 뉴클레오타이드 사이에 적어도 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결이 존재하며, 여기서, 3개의 뉴클레오타이드 중 2개는 오버행 뉴클레오타이드이고, 세 번째 뉴클레오타이드는 오버행 뉴클레오타이드 다음의 뉴클레오타이드 쌍이다. 선택적으로, RNAi 작용제는 센스 가닥의 5' 말단 및 안티센스 가닥의 5' 말단 둘 모두에 말단의 3개의 뉴클레오타이드 사이에 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 추가로 가질 수 있다.

[0265]

일 구현예에서, RNAi 작용제는 이중가닥 내에 표적과의 미스매치(들), 또는 이들의 조합을 포함한다. 미스매치가 오버행 영역 또는 이중가닥 영역에 발생할 수 있다. 염기쌍은, 해리 또는 용융을 촉진하는 그의 경향성을 기반으로 랭킹될 수 있다(예를 들어, 특정 쌍의 결합 또는 해리의 자유 에너지의 경우, 다음으로 근사하거나, 유사한 분석이 또한 사용될 수 있으나, 가장 간단한 접근법은 개개의 쌍 염기의 쌍을 조사하는 것임). 해리의 촉진이라는 관점에서: A:U가 G:C보다 바람직하고; G:U가 G:C보다 바람직하며; I:C가 G:C보다 바람직하다(I=이노신). 미스매치, 예를 들어, 비-정규 또는 정규 쌍 이외의 것(본 명세서의 다른 부분에 기재된 바와 같음)이 정규(A:T, A:U, G:C) 쌍보다 바람직하며; 보편적인 염기를 포함하는 쌍이 정규 쌍보다 바람직하다.

[0266]

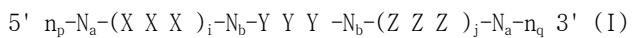
일 구현예에서, RNAi 작용제는, 이중가닥의 5' 말단에서 안티센스 가닥의 해리를 촉진하기 위해, A:U, G:U, I:C의 그룹으로부터 독립적으로 선택되는 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 이중가닥 영역 내의 처음 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 염기쌍 및 미스매칭된 쌍, 예를 들어, 비-정규 또는 정규 쌍 이외의 것 또는 보편적 염기를 포함하는 쌍 중 적어도 하나를 포함한다.

[0267]

일 구현예에서, 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 이중가닥 영역 내의 1 위치의 뉴클레오타이드는 A, dA, dU, U, 및 dT로 이루어진 군으로부터 선택된다. 대안적으로, 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 이중가닥 영역 내의 처음 1, 2 또는 3개의 염기쌍 중 적어도 하나는 AU 염기쌍이다. 예를 들어, 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 이중가닥 영역 내의 첫 번째 염기쌍은 AU 염기쌍이다.

[0268]

일 구현예에서, 센스 가닥 서열은 화학식 (I)에 의해 제시될 수 있다:



[0270]

상기 식에서:

- [0271] i 및 j 각각은 독립적으로 0 또는 1이고;
- [0272] p 및 q 각각은 독립적으로 0 내지 6이고;
- [0273] 각각의  $N_a$ 는 독립적으로, 0 내지 25개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열이 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;
- [0274] 각각의  $N_b$ 는 독립적으로, 0 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;
- [0275] 각각의  $n_p$  및  $n_q$ 는 독립적으로 오버행 뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0276] Nb 및 Y는 동일한 변형을 갖지 않으며;
- [0277] XXX, YYY 및 ZZZ 각각은 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나의 모티프를 나타낸다. 바람직하게는, YYY는 모두 2'-F 변형된 뉴클레오타이드이다.
- [0278] 일 구현예에서,  $N_a$  및/또는  $N_b$ 는 교대 패턴의 변형을 포함한다.
- [0279] 일 구현예에서, YYY 모티프는 센스 가닥의 절단 부위 또는 그 주위에 발생한다. 예를 들어, RNAi 작용제가 17 내지 23개의 뉴클레오타이드 길이의 이중가닥 영역을 갖는 경우, YYY 모티프는, 5' 말단으로부터 첫 번째 뉴클레오타이드로부터 시작하여 계수하거나; 선택적으로, 5' 말단으로부터 이중가닥 영역 내의 첫 번째 뉴클레오타이드 쌍에서 시작하여 계수하여, 센스 가닥의 절단 부위 또는 그 주위에 발생할 수 있다(예를 들어: 위치 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 또는 11, 12, 13에 발생할 수 있음).
- [0280] 일 구현예에서, i는 1이고, j는 0이거나, i는 0이고, j는 1이거나, i 및 j 둘 모두 1이다. 따라서, 센스 가닥은 하기 화학식에 의해 제시될 수 있다:
- [0281] 5'  $n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q$  3' (Ib);
- [0282] 5'  $n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q$  3' (Ic); 또는
- [0283] 5'  $n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q$  3' (Id).
- [0284] 센스 가닥이 화학식 (Ib)에 의해 제시되는 경우,  $N_b$ 는 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 2 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 각각의  $N_a$ 는 독립적으로, 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낼 수 있다.
- [0285] 센스 가닥이 화학식 (Ic)로서 제시되는 경우,  $N_b$ 는 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 2 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 각각의  $N_a$ 는 독립적으로, 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낼 수 있다.
- [0286] 센스 가닥이 화학식 (Id)로서 제시되는 경우, 각각의  $N_b$ 는 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 2 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 바람직하게는,  $N_b$ 는 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 각각의  $N_a$ 는 독립적으로, 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낼 수 있다. 각각의 X, Y 및 Z는 동일하거나, 서로 상이 할 수 있다.
- [0287] 다른 구현예에서, i는 0이고, j는 0이고, 센스 가닥은 화학식에 의해 제시될 수 있다:
- [0288] 5'  $n_p-N_a-YYY- N_a-n_q$  3' (Ia).
- [0289] 센스 가닥이 화학식 (Ia)에 의해 제시되는 경우, 각각의  $N_a$ 는 독립적으로, 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낼 수 있다.

- [0290] 일 구현예에서, RNAi의 안티센스 가닥 서열은 화학식 (II)에 의해 제시될 수 있다:
- [0291]  $5' - n_q - N_a - (Z'Z'Z')_k - N_b - Y'Y'Y' - N_b - (X'X'X')_l - N_a - n_p - 3'$  (II)
- [0292] 상기 식에서:
- [0293] k 및 l 각각은 독립적으로 0 또는 1이고;
- [0294] p 및 q 각각은 독립적으로 0 내지 6이고;
- [0295] 각각의  $N_a$ '는 독립적으로, 0 내지 25개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열이 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;
- [0296] 각각의  $N_b$ '는 독립적으로, 0 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;
- [0297] 각각의  $n_p$ ' 및  $n_q$ '는 독립적으로 오버행 뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0298]  $N_b$ ' 및 Y'은 동일한 변형을 갖지 않으며;
- [0299] X'X'X', Y'Y'Y' 및 Z'Z'Z' 각각은 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나의 모티프를 나타낸다.
- [0300] 일 구현예에서,  $N_a$ ' 및/또는  $N_b$ '는 교대 패턴의 변형을 포함한다.
- [0301] Y'Y'Y' 모티프는 안티센스 가닥의 절단 부위 또는 그 주위에 발생한다. 예를 들어, RNAi 작용제가 17 내지 23개의 뉴클레오타이드 길이의 이중가닥 영역을 갖는 경우, Y'Y'Y' 모티프는, 5' 말단으로부터 첫 번째 뉴클레오타이드로부터 시작하여 계수하거나; 선택적으로 5' 말단으로부터 이중가닥 영역 내에서 첫 번째 뉴클레오타이드 쌍에서 시작하여 계수하여, 안티센스 가닥의 위치 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; 또는 13, 14, 15에 발생할 수 있다. 바람직하게는, Y'Y'Y' 모티프는 위치 11, 12, 13에 발생한다.
- [0302] 일 구현예에서, Y'Y'Y' 모티프는 모두 2'-OMe 변형된 뉴클레오타이드이다.
- [0303] 일 구현예에서, k는 1이고, l은 0이거나, k는 0이고, l은 1이거나, k 및 l 둘 모두 1이다.
- [0304] 따라서, 안티센스 가닥은 하기 화학식일 수 있다:
- [0305]  $5' - n_q - N_a - Z'Z'Z' - N_b - Y'Y'Y' - N_a - n_p - 3'$  (IIb);
- [0306]  $5' - n_q - N_a - Y'Y'Y' - N_b - X'X'X' - n_p - 3'$  (IIc); 또는
- [0307]  $5' - n_q - N_a - Z'Z'Z' - N_b - Y'Y'Y' - N_b - X'X'X' - N_a - n_p - 3'$  (IId).
- [0308] 안티센스 가닥이 화학식 (IIb)에 의해 제시되는 경우,  $N_b$ '는 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 2 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 각각의  $N_a$ '는 독립적으로, 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0309] 안티센스 가닥이 화학식 (IIc)로서 제시되는 경우,  $N_b$ '는 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 2 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 각각의  $N_a$ '는 독립적으로, 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 바람직하게는,  $N_b$ '는 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.
- [0310] 안티센스 가닥이 화학식 (IId)로서 제시되는 경우, 각각의  $N_b$ '는 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 2 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 각각의  $N_a$ '는 독립적으로, 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 바람직하게는,  $N_b$ '는 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

- [0311] 다른 구현예에서, k는 0이고, l은 0이며, 안티센스 가닥은 하기 화학식에 의해 제시될 수 있다:
- [0312]  $5' - n_p - N_a - Y' Y' Y' - N_b - n_q - 3'$  (Ia).
- [0313] 안티센스 가닥이 화학식 (IIa)로서 제시되는 경우, 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0314] 각각의 X', Y' 및 Z'는 동일하거나, 서로 상이할 수 있다.
- [0315] 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 각각의 뉴클레오타이드는 독립적으로 LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-메톡시에틸, 2'-0-메틸, 2'-0-알릴, 2'-C-알릴, 2'-하이드록실, 또는 2'-플루오로에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 각각의 뉴클레오타이드는 독립적으로 2'-0-메틸 또는 2'-플루오로에 의해 변형된다. 각각의 X, Y, Z, X', Y' 및 Z'는 특히, 2'-0-메틸 변형 또는 2'-플루오로 변형을 나타낼 수 있다.
- [0316] 일 구현예에서, RNAi 작용제의 센스 가닥은, 5' 말단으로부터 첫 번째 뉴클레오타이드로부터 시작하여 계수하거나; 선택적으로, 5' 말단으로부터 이중가닥 영역 내의 첫 번째 뉴클레오타이드 쌍에서 시작하여 계수하여, 이중 가닥 영역이 21번째인 경우, 센스 가닥의 9, 10 및 11 위치에 발생한 YYY 모티프를 함유할 수 있으며; Y는 2'-F 변형을 나타낸다.
- [0317] 일 구현예에서, 안티센스 가닥은, 5' 말단으로부터 첫 번째 뉴클레오타이드로부터 시작하여 계수하거나; 선택적으로, 5' 말단으로부터 이중가닥 영역 내의 첫 번째 뉴클레오타이드 쌍에서 시작하여 계수하여, 안티센스 가닥의 위치 11, 12, 13에 발생한 Y'Y'Y' 모티프를 함유할 수 있으며; Y'는 2'-0-메틸 변형을 나타낸다.
- [0318] 상기 화학식 (Ia), (Ib), (Ic), 및 (Id) 중 어느 하나에 의해 제시되는 센스 가닥은, 각각 화학식 (IIa), (IIb), (IIc), 및 (IId) 중 어느 하나에 의해 제시되는 안티센스 가닥과 이중가닥을 형성한다.
- [0319] 따라서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 RNAi 작용제는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함할 수 있고, 각각의 가닥은 14 내지 30개의 뉴클레오타이드를 가지며, RNAi 이중가닥은 화학식 (III)에 의해 제시된다:
- [0320] 센스:  $5' - n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q - 3'$
- [0321] 안티센스:  $3' - n_p' - N_a' - (X' X' X')_k - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - (Z' Z' Z')_l - N_a' - n_q' - 5'$
- [0322] (III)
- [0323] 상기 식에서:
- [0324] i, j, k, 및 l 각각은 독립적으로 0 또는 1이고;
- [0325] p, p', q, 및 q' 각각은 독립적으로 0 내지 6이고;
- [0326] 각각의  $N_a$  및  $N_a'$ 는 독립적으로, 0 내지 25개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열이 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;
- [0327] 각각의  $N_b$  및  $N_b'$ 는 독립적으로, 0 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;
- [0328] 각각의  $n_p'$ ,  $n_p$ ,  $n_q'$ , 및  $n_q$ 는, 각각이 존재하거나, 존재하지 않을 수 있으며, 독립적으로 오버행 뉴클레오타이드를 나타내며;
- [0329] XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', 및 Z'Z'Z' 각각은 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드의 3개의 동일한 변형 중 하나의 모티프를 나타낸다.
- [0330] 일 구현예에서, i는 0이고, j는 0이거나; i는 1이고, j는 0이거나; i는 0이고, j는 1이거나; i 및 j 둘 모두 0이거나; i 및 j 둘 모두 1이다. 또 다른 구현예에서, k는 0이고, l은 0이거나; k는 1이고, l은 0이거나; k는 0이고, l은 1이거나; k 및 l 둘 모두 0이거나; k 및 l 둘 모두 1이다.
- [0331] RNAi 이중가닥을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 예시적 조합은 하기의 화학식을 포함한다:

- [0332]  $5' - n_p - N_a - Y \ Y \ Y - N_a - n_q \ 3'$
- [0333]  $3' - n_p - N_a - Y' Y' Y' - N_a - n_q \ 5'$
- [0334] (IIIa)
- [0335]  $5' - n_p - N_a - Y \ Y \ - N_b - Z \ Z \ - N_a - n_q \ 3'$
- [0336]  $3' - n_p - N_a - Y' Y' Y' - N_b - Z' Z' Z' - N_a - n_q \ 5'$
- [0337] (IIIb)
- [0338]  $5' - n_p - N_a - X \ X \ X - N_b - Y \ Y \ Y - N_a - n_q \ 3'$
- [0339]  $3' - n_p - N_a - X' X' X' - N_b - Y' Y' Y' - N_a - n_q \ 5'$
- [0340] (IIIc)
- [0341]  $5' - n_p - N_a - X \ X \ X - N_b - Y \ Y \ Y - N_b - Z \ Z \ Z - N_a - n_q \ 3'$
- [0342]  $3' - n_p - N_a - X' X' X' - N_b - Y' Y' Y' - N_b - Z' Z' Z' - N_a - n_q \ 5'$
- [0343] (IIId)
- [0344]  $5' - N_a - Y \ Y \ Y - N_b - 3'$
- [0345]  $3' - n_p - N_a - Y' Y' Y' - N_b \ 5'$
- [0346] (IIIf)
- [0347] RNAi 작용제가 화학식 (IIIa)에 의해 제시되는 경우, 각각의  $N_a$ 는 독립적으로 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0348] RNAi 작용제가 화학식 (IIIb)에 의해 제시되는 경우, 각각의  $N_b$ 는 독립적으로 1 내지 10, 1 내지 7, 1 내지 5 또는 1 내지 4개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 각각의  $N_a$ 는 독립적으로 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0349] RNAi 작용제가 화학식 (IIIf)로서 제시되는 경우, 각각의  $N_b$ ,  $N_b'$ 는 독립적으로 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 2 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 각각의  $N_a$ 는 독립적으로 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0350] RNAi 작용제가 화학식 (IIId)로서 제시되는 경우, 각각의  $N_b$ ,  $N_b'$ 는 독립적으로 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 10, 0 내지 7, 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 2 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 각각의  $N_a$ ,  $N_a'$ 는 독립적으로 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 각각의  $N_a$ ,  $N_a'$ ,  $N_b$  및  $N_b'$ 는 독립적으로 교대 패턴의 변형을 포함한다.
- [0351] RNAi 작용제가 화학식 (IIIf)로서 제시되는 경우, 각각의  $N_a$ ,  $N_a'$ ,  $N_b$ , 및  $N_b'$ 는 독립적으로, 변형되거나, 비변형된 0 내지 25개의 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열로서, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0352] 화학식 (III), (IIIa), (IIIb), (IIIf), (IIId), 및 (IIIf)의 X, Y 및 Z 각각은 동일하거나, 서로 상이할 수 있다.
- [0353] RNAi 작용제가 화학식 (III), (IIIa), (IIIb), (IIIf), (IIId), 및 (IIIf)에 의해 제시되는 경우, 적어도 하나

의 Y 뉴클레오타이드는 Y' 뉴클레오타이드 중 하나와 염기쌍을 형성할 수 있다. 대안적으로, 적어도 2개의 Y 뉴클레오타이드가 상응하는 Y' 뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하거나; 3개의 모든 Y 뉴클레오타이드가 모두, 상응하는 Y' 뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성한다.

[0354] RNAi 작용제가 화학식 (IIId) 또는 (IIIf)로서 제시되는 경우, 적어도 하나의 Z 뉴클레오타이드가 Z' 뉴클레오타이드 중 하나와 염기쌍을 형성할 수 있다. 대안적으로, 적어도 2개의 Z 뉴클레오타이드가 상응하는 Z' 뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하거나; 3개의 모든 Z 뉴클레오타이드가 모두, 상응하는 Z' 뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성한다.

[0355] RNAi 작용제가 화학식 (IIIf) 또는 (IIIf)로서 제시되는 경우, 적어도 하나의 X 뉴클레오타이드가 X' 뉴클레오타이드 중 하나와 염기쌍을 형성할 수 있다. 대안적으로, 적어도 2개의 X 뉴클레오타이드가 상응하는 X' 뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하거나; 3개의 모든 X 뉴클레오타이드가 모두, 상응하는 X' 뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성한다.

[0356] 일 구현예에서, Y 뉴클레오타이드의 변형은 Y' 뉴클레오타이드의 변형과 상이하고, Z 뉴클레오타이드의 변형은 Z' 뉴클레오타이드의 변형과 상이하고/거나, X 뉴클레오타이드의 변형은 X' 뉴클레오타이드의 변형과 상이하다.

[0357] 일 구현예에서, RNAi 작용제가 화학식 (IIIf)로서 제시되는 경우, N<sub>a</sub> 변형은 2'-0-메틸 또는 2'-플루오로 변형이다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제가 화학식 (IIIf)에 의해 제시되는 경우, N<sub>a</sub> 변형은 2'-0-메틸 또는 2'-플루오로 변형이고, n<sub>p</sub>'는 0을 초과하고, 적어도 하나의 n<sub>p</sub>'는 포스포로티오에이트 연결을 통해 이웃 뉴클레오타이드에 연결된다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제가 화학식 (IIIf)에 의해 제시되는 경우, N<sub>a</sub> 변형은 2'-0-메틸 또는 2'-플루오로 변형이고, n<sub>p</sub>'는 0을 초과하고, 적어도 하나의 n<sub>p</sub>'는 포스포로티오에이트 연결을 통해 이웃 뉴클레오타이드에 연결되고, 센스 가닥은 2가 또는 3가 분지형 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체와 접합된다(후술됨). 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제가 화학식 (IIIf)에 의해 제시되는 경우, N<sub>a</sub> 변형은 2'-0-메틸 또는 2'-플루오로 변형이고, n<sub>p</sub>'는 0을 초과하고, 적어도 하나의 n<sub>p</sub>'는 포스포로티오에이트 연결을 통해 이웃 뉴클레오타이드에 연결되고, 센스 가닥은 적어도 하나의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며, 센스 가닥은 2가 또는 3가 분지형 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체와 접합된다.

[0358] 일 구현예에서, RNAi 작용제가 화학식 (IIIfa)에 의해 제시되는 경우, N<sub>a</sub> 변형은 2'-0-메틸 또는 2'-플루오로 변형이고, n<sub>p</sub>'는 0을 초과하고, 적어도 하나의 n<sub>p</sub>'는 포스포로티오에이트 연결을 통해 이웃 뉴클레오타이드에 연결되고, 센스 가닥은 적어도 하나의 포스포로티오에이트 연결을 포함하며, 센스 가닥은 2가 또는 3가 분지형 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체와 접합된다.

[0359] 일 구현예에서, 화학식 (III), (IIIfa), (IIIfb), (IIIfc), (IIIfd), 및 (IIIfe)에 의해 제시되는 2개의 RNAi 작용제는 5' 말단 및 3' 말단 중 하나 또는 둘 모두에서 서로 연결되며, 선택적으로 리간드에 접합된다. 각각의 작용제가 동일한 유전자 또는 2개의 상이한 유전자를 표적화할 수 있거나; 각각의 작용제가 2개의 상이한 표적 부위의 동일한 유전자를 표적화할 수 있다.

[0360] 다수의 공보물에서, 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 다량체 RNAi 작용제를 기재하고 있다. 이러한 공보물은, 각각의 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는 WO2007/091269, 미국 특허 제 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 및 WO2011/031520을 포함한다.

[0361] 여기에서 더욱 상세히 기재되는 바와 같이, 하나 이상의 탄수화물 모이어티와 RNAi 작용제의 접합을 함유하는 RNAi 작용제는 RNAi 작용제의 하나 이상의 특성을 최적화할 수 있다. 많은 경우, 탄수화물 모이어티는 RNAi 작용제의 변형된 하위단위에 부착될 것이다. 예를 들어, dsRNA 작용제의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 하위단위의 리보스 당은, 탄수화물 리간드에 부착된 또 다른 모이어티, 예를 들어, 비-탄수화물(바람직하게는 사이클릭) 담체에 의해 대체될 수 있다. 하위단위의 리보스 당이 이와 같이 대체되는 리보뉴클레오타이드 하위단위는 본 명세서에서 리보스 대체 변형 하위단위(RRMS)로 지칭된다. 사이클릭 담체는 카보사이클릭 고리계일 수 있고, 즉, 모든 고리 원자는 탄소 원자 또는 헤테로사이클릭 고리계이며, 즉 하나 이상의 고리 원자는 헤테로원자, 예를 들어 질소, 산소, 황일 수 있다. 사이클릭 담체는 모노사이클릭 고리계일 수 있거나, 2개 이상의 고리, 예를 들어 융합된 고리를 함유할 수 있다. 사이클릭 담체는 완전 포화된 고리계일 수 있거나, 이는 하나 이상의 이중 가닥을 함유할 수 있다.

[0362]

리간드는 담체를 통해 폴리뉴클레오타이드에 부착될 수 있다. 담체는 (i) 적어도 하나의 "백본 부착 점", 바람직하게는 2개의 "백본 부착 점" 및 (ii) 적어도 하나의 "테더링 부착 점(tethering attachment point)"을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "백본 부착 점"은, 리보핵산의 백본, 예를 들어, 포스페이트, 또는 변형된 포스페이트, 예를 들어 황 함유 백본으로의 담체의 혼입에 적합한 작용기, 예를 들어 하이드록실기 또는 일반적으로 이용 가능한 결합을 지칭한다. 일부 구현예에서, "테더링 부착 점"(TAP)은, 선택된 모이어티를 연결하는 사이클릭 담체의 구성성분 고리 원자, 예를 들어 탄소 원자 또는 헤테로원자(백본 부착 점을 제공하는 원자와 별개임)를 지칭한다. 모이어티는, 예를 들어, 탄수화물, 예를 들어 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 올리고당류 및 다당류일 수 있다. 선택적으로, 선택된 모이어티는 개입 테더(intervening tether)에 의해 사이클릭 담체에 연결된다. 따라서, 사이클릭 담체는 종종 작용기, 예를 들어, 아미노기를 포함할 것이거나, 일반적으로 또 다른 화학적 물체, 예를 들어 리간드의 구성성분 고리로의 혼입 또는 테더링에 적합한 결합을 제공한다.

[0363]

RNAi 작용제는 담체를 통해 리간드에 접합될 수 있고, 담체는 사이클릭기 또는 비사이클릭기일 수 있고; 바람직하게는, 사이클릭기는 피롤리디닐, 피라졸리닐, 피라졸리디닐, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, [1,3]디옥솔란, 옥사졸리디닐, 이속사졸리디닐, 모르폴리닐, 티아졸리디닐, 이소티아졸리디닐, 퀴녹살리닐, 피리다지논일, 테트라하이드로푸릴 및 데칼린으로부터 선택되며; 바람직하게는, 비사이클릭기는 세리놀백본 또는 디에탄올아민 백본으로부터 선택된다.

[0364]

특정의 구체적인 구현예에서, 예를 들어 본 발명의 방법에 사용하기 위한 RNAi 작용제는 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 및 표 7 중 어느 하나에 열거된 작용제의 그룹으로부터 선택되는 작용제이다. 이들 작용제는 리간드를 추가로 포함할 수 있다.

[0365]

특정 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 AD-66016, AD-65492, AD-66017, 및 AD-66018로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용제이다.

[0366]

#### IV. 리간드에 접합된 iRNA

[0367]

본 발명의 iRNA의 RNA의 또 다른 변형은 RNA에 iRNA의 활성, 세포 분포, 또는 세포 흡수를 증진시키는 하나 이상의 리간드, 모이어티 또는 접합체를 화학적으로 연결시키는 것을 포함한다. 이러한 모이어티는 지질 모이어티, 예를 들어, 롤레스테롤 모이어티(문헌[Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556]), 콜산(문헌[Manoharan *et al.*, Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060]), 티오에테르, 예를 들어, 베릴-S-트리틸티올(문헌[Manoharan *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770]), 티오콜레스테롤(문헌[Oberhauser *et al.*, Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538]), 지방족 사슬, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운데실 잔기(문헌[Saison-Behmoaras *et al.*, EMBO J, 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(문헌[Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783]), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬(문헌[Manoharan *et al.*, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973]), 또는 아다만탄 아세트산(문헌[Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654]), 팔미틸 모이어티(문헌[Mishra *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237]), 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카보닐옥시콜레스테롤 모이어티(문헌[Crooke *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937])를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0368]

일 구현예에서, 리간드는 통합되는 iRNA 작용제의 분포, 표적화 또는 수명을 변이시킨다. 바람직한 구현예에서, 리간드는, 예를 들어, 이러한 리간드가 부재하는 종에 비해 선택된 표적, 예를 들어, 문자, 세포 또는 세포 유형, 구획, 예를 들어, 세포 또는 기관 구획, 조직, 기관 또는 신체의 영역에 대한 증진된 친화도를 제공한다. 바람직한 리간드는 이중가닥화된 핵산 내의 이중가닥 쌍 형성에 참여하지 않을 것이다.

[0369]

리간드는 천연 유래의 물질, 예를 들어, 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민(HSA), 저밀도 지질단백질(LDL), 또는 글로불린); 탄수화물(예를 들어, 텍스트란, 폴루란(pullulan), 키틴, 키토산, 이눌린, 사이클로텍스트란, N-아세틸갈اكت오사민 또는 히알루론산); 또는 지질을 포함할 수 있다. 리간드는 또한 재조합 또는 합성 문자, 예를 들어, 합성 중합체, 예를 들어, 합성 폴리아미노산일 수 있다. 폴리아미노산의 예는 폴리라이신(PLL), 폴리L-아스파르트산, 폴리 L-글루탐산, 스티렌-말레산 무수물 공중합체, 폴리(L-락타이드-코-글리콜리드) 공중합체, 디비닐 에테르-말레산 무수물 공중합체, N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드 공중합체(HMPA), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리비닐 알콜(PVA), 폴리우레탄, 폴리(2-에틸아크릴산), N-이소프로필아크릴아미드 중합체, 또는 폴리포스파진인 폴리아미노산을 포함한다. 폴리아민의 예는 폴리에틸렌이민, 폴리라이신(PLL), 스페르민, 스페

르미딘, 폴리아민, 슈도펩타이드-폴리아민, 펩타이드모방체(peptidomimetic) 폴리아민, 텐드리머 폴리아민, 아르기닌, 아미딘, 프로타민, 양이온성 지질, 양이온성 포르파린, 폴리아민의 4차염, 또는  $\alpha$  헬리칼 펩타이드를 포함한다.

[0370] 리간드는 또한 표적화 기, 예를 들어, 세포 또는 조직 표적화 작용제, 예를 들어, 렉틴, 당단백질, 지질 또는 단백질, 예를 들어, 신장 세포와 같은 특정 세포 유형에 결합하는 항체를 포함할 수 있다. 표적화 기는 갑상샘 자극호르몬, 멜라노트로핀, 렉틴, 당단백질, 계면활성제 단백질 A, 뮤신 탄수화물, 다가 락토스, 1가 갈락토스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민 다가 만노스, 다가 푸코스, 당화된 폴리아미노산, 다가 갈락토스, 트랜스페린, 비스포스포네이트, 폴리글루타메이트, 폴리아스파테이트, 지질, 콜레스테롤, 스테로이드, 담즙산, 폴레이트, 비타민 B12, 비타민 A, 비오틴, 또는 RGD 펩타이드 또는 RGD 펩타이드 모방체일 수 있다. 특정 구현 예에서, 리간드는 1가 또는 다가 갈락토스를 포함한다. 특정 구현 예에서, 리간드는 콜레스테롤을 포함한다.

[0371] 리간드의 다른 예는 염료, 중격제(예를 들어, 아크리딘), 가교제(예를 들어, 소랄렌(psoralene), 미토마이신 C), 포르파린(TPPC4, 텍사피린(texaphyrin), 사피린(sapphyrin)), 폴리사이클릭 방향족 탄화수소(예를 들어, 페나진(phenazine), 디하이드로페나진(dihydrophenazine)), 인공 엔도뉴클레아제(예를 들어, EDTA), 친유성 분자, 예를 들어, 콜레스테롤, 콜산, 아다만탄 아세트산, 1-페렌 부티르산, 디하이드로테스토스테론, 1,3-비스-0(헥사데실)글리세롤, 제라닐옥시헥실기, 헥사데실글리세롤, 보르네올, 멘톨, 1,3-프로판디올, 햅타데실기, 팔미트산, 미리스트산, 03-(올레오일)리토콜산, 03-(올레오일)콜렌산, 디메톡시트리틸, 또는 페녹사진) 및 펩타이드 접합체(예를 들어, 안테나페디아(antennapedia) 펩타이드, Tat 펩타이드), 알킬화제, 포스페이트, 아미노, 머캅토, PEG(예를 들어, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, 폴리아미노, 알킬, 치환된 알킬, 방사성 표지된 마커, 효소, 합텐(예를 들어, 비오틴), 운반/흡수 촉진제(예를 들어, 아스파린, 비타민 E, 폴산), 합성 리보뉴클레아제(예를 들어, 이미다졸, 비스이미다졸, 히스타민, 이미다졸 클러스터, 아크리딘-이미다졸 접합체, 테트라아자마크로사이클의 Eu3+ 복합체), 디니트로페닐, HRP, 또는 AP를 포함한다.

[0372] 리간드는 단백질, 예를 들어, 당단백질, 또는 펩타이드, 예를 들어, 공동-리간드에 대한 특이적 친화도를 갖는 분자, 또는 항체, 예를 들어, 간 세포와 같은 특정 세포 유형에 결합하는 항체일 수 있다. 리간드는 또한 호르몬 및 호르몬 수용체를 포함할 수 있다. 이들은 또한 비-펩타이드 종, 예를 들어, 지질, 렉틴, 탄수화물, 비타민, 보조인자, 다가 락토스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민 다가 만노스, 또는 다가 푸코스를 포함할 수 있다. 리간드는, 예를 들어, 지질다당류, p38 MAP 키나제의 활성제, 또는 NF- $\kappa$ B의 활성제일 수 있다.

[0373] 리간드는 물질, 예를 들어, 세포의 미세관, 미세섬유, 및/또는 중간세사를 붕괴시킴으로써 예를 들어, 세포의 세포골격을 붕괴시켜, 세포로의 mRNA 작용제의 흡수를 증가시킬 수 있는 약물일 수 있다. 약물은, 예를 들어, 탁손(taxon), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 사이토카라신(cytochalasin), 노코다졸(nocodazole), 자플라키놀리드(japlakinolide), 라트룬쿨린 A(latrunculin A), 팔로이딘(phalloidin), 스위홀리드 A(swinholide A), 인다노신(indanocine), 또는 미오서빈(myoservin)일 수 있다.

[0374] 일부 구현 예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNA에 부착된 리간드는 약동학 조절인자(PK 조절인자)로 작용한다. PK 조절인자는 리포파일(lipophile), 담즙산, 스테로이드, 인지질 유사체, 펩타이드, 단백질 결합 작용제, PEG, 비타민 등을 포함한다. 예시적 PK 조절인자는 콜레스테롤, 지방산, 콜산, 리토콜산, 디알킬글리세리드, 디아실글리세리드, 인지질, 스팽고지질, 나프록센, 이부프로펜, 비타민 E, 비오틴 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다수의 포스포로티오에이트 결합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 또한 혈청 단백질에 결합하는 것으로 공지되어 있고, 이에 따라 짧은 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, 백본 내에 다수의 포스포로티오에이트 결합을 포함하는 약 5개의 염기, 10개의 염기, 15개의 염기 또는 20개의 염기의 올리고뉴클레오타이드가 또한 리간드(예를 들어, PK 조절 리간드)로서 본 발명에 적용 가능하다. 또한, 혈청 성분(예를 들어, 혈청 단백질)에 결합하는 암타미가 또한 본 명세서에 기재된 구현 예에서 PK 조절 리간드로 사용하기에 적합하다.

[0375] 본 발명의 리간드-접합된 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드(하기 기재)로의 연결 분자의 부착으로부터 유래되는 것과 같은 웨던트 반응성 작용기를 지니는 올리고뉴클레오타이드의 사용에 의해 합성될 수 있다. 이러한 반응성 올리고뉴클레오타이드는 상업적으로 입수 가능한 리간드, 다양한 보호기 중 어느 하나를 갖는 합성된 리간드 또는 그에 부착된 연결 모이어티를 갖는 리간드와 직접 반응할 수 있다.

[0376] 본 발명의 접합체에 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 널리 공지되어 있는 고체상 합성 기술을 통하여 편리하게 그리고 통상적으로 제조될 수 있다. 이러한 합성을 위한 장비는 예를 들어, Applied Biosystems (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재)를 포함하는 몇몇 판매처에 의해 시판된다. 당업계에 공지되어 있는 이러한 합성을 위한

임의의 다른 수단이 추가로 또는 대안적으로 사용될 수 있다. 또한, 다른 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, 포스포로티오에이트 및 알킬화 유도체를 제조하기 위해 유사한 기술을 사용하는 것이 공지되어 있다.

[0377] 본 발명의 리간드-접합된 올리고뉴클레오타이드 및 서열-특이적 연결 뉴클레오타이드를 갖는 리간드-분자에서, 올리고뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오사이드는 표준 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드 전구체, 또는 연결 모이어티를 이미 갖고 있는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드 접합 전구체, 리간드 분자를 이미 갖고 있는 리간드-뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드-접합 전구체, 또는 비-뉴클레오사이드 리간드-함유 빌딩 블록 (building block)을 사용하여 적합한 DNA 합성기에서 조립될 수 있다.

[0378] 연결 모이어티를 이미 갖고 있는 뉴클레오타이드-접합 전구체를 사용하는 경우, 서열-특이적 연결 뉴클레오사이드의 합성이 전형적으로 완료된 다음, 리간드 분자는 연결 모이어티와 반응하여, 리간드-접합된 올리고뉴클레오타이드를 형성한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 또는 연결된 뉴클레오사이드는 표준 포스포르아미디트 및 상업적으로 입수가능하며 올리고뉴클레오타이드 합성에서 통상적으로 사용되는 비-표준 포스포르아미디트에 더하여, 리간드-뉴클레오사이드 접합체로부터 유래된 포스포르아미디트를 사용하여 자동화 합성기에 의해 합성된다.

#### A. 지질 접합체

[0380] 일 구현예에서, 리간드 또는 접합체는 지질 또는 지질-기반 분자이다. 이러한 지질 또는 지질-기반 분자는 바람직하게는 혈청 단백질, 예를 들어, 인간 혈청 알부민(HSA)에 결합한다. HSA 결합 리간드는 표적 조직, 예를 들어, 신체의 비-신장 표적 조직으로의 접합체의 분포를 가능케 한다. 예를 들어, 표적 조직은 간의 실질 세포를 포함하는 간일 수 있다. HSA에 결합할 수 있는 다른 분자가 또한 리간드로 사용될 수 있다. 예를 들어, 나프록센(naproxen) 또는 아스피린이 사용될 수 있다. 지질 또는 지질-기반 리간드는 (a) 접합체의 분해에 대한 내성을 증가시킬 수 있고/있거나, (b) 표적 세포 또는 세포막으로의 표적화 또는 운반을 증가시킬 수 있고/있거나, (c) 혈청 단백질, 예를 들어, HSA에 대한 결합을 조절하기 위해 사용될 수 있다.

[0381] 지질 기반 리간드는 표적 조직으로의 접합체의 결합을 억제, 예를 들어, 조절하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, HSA에 더욱 강하게 결합하는 지질 또는 지질-기반 리간드는 신장으로 표적화될 가능성이 적고, 따라서 신체로부터 청소될 가능성이 적을 것이다. HSA에 덜 강하게 결합하는 지질 또는 지질-기반 리간드는 신장으로 접합체를 표적화시키기 위해 사용될 수 있다.

[0382] 바람직한 일 구현예에서, 지질 기반 리간드는 HSA에 결합한다. 바람직하게는, 이는 접합체가 바람직하게는 비-신장 조직으로 분포되도록 하기에 충분한 친화도로 HSA에 결합한다. 그러나, 친화도는 HSA-리간드 결합이 역전될 수 없을 만큼 너무 강하지 않은 것이 바람직하다.

[0383] 또 다른 바람직한 구현예에서, 지질 기반 리간드는 HSA에 약하게 결합하거나 전혀 결합하지 않아, 접합체는 바람직하게는 신장에 분포될 것이다. 신장 세포로 표적화되는 다른 모이어티가 또한 지질 기반 리간드 대신 또는 지질 기반 리간드에 더하여 사용될 수 있다.

[0384] 또 다른 양태에서, 리간드는 표적 세포, 예를 들어, 증식하는 세포에 의해 흡수되는 모이어티, 예를 들어, 비타민이다. 이들은, 예를 들어, 악성 또는 비-악성 유형, 예를 들어, 암세포의 원치 않는 세포 증식을 특징으로 하는 장애를 치료하는데 특히 유용하다. 예시적 비타민은 비타민 A, E, 및 K를 포함한다. 다른 예시적 비타민은 비타민 B, 예를 들어, 엽산, B12, 리보플라빈, 비오틴, 피리독살 또는 표적 세포, 예를 들어, 간 세포에 의해 흡수되는 다른 비타민 또는 영양소를 포함한다. 또한, HSA 및 저밀도 지질단백질(LDL)이 포함된다.

#### B. 세포 투과 작용제

[0385] 또 다른 양태에서, 리간드는 세포-투과 작용제, 바람직하게는 헬리칼 세포-투과 작용제이다. 바람직하게는, 상기 작용제는 양친매성이다. 예시적 작용제는 웨პ타이드, 예를 들어, tat 또는 안테노페디아(antennopedia)이다. 상기 작용제가 웨პ타이드인 경우, 이는 웨პ타이드모방체(peptidylmimetic), 인버토머(invertomer), 비-웨პ타이드 또는 슈도-웨პ타이드 결합, 및 D-아미노산의 사용을 포함하는 바와 같이 변형될 수 있다. 바람직하게는, 헬리칼 작용제는 바람직하게는 친유성 및 소유성(lipophobic) 상을 갖는  $\alpha$ -헬리칼 작용제이다.

[0386] 리간드는 웨პ타이드 또는 웨პ타이드모방체일 수 있다. 웨პ타이드모방체(본 명세서에서 올리고웨პ타이드모방체로도 지칭)는 천연 웨პ타이드와 유사한 규정된 3-차원 구조로 폴딩될 수 있는 분자이다. iRNA 작용제로의 웨პ타이드 및 웨პ타이드모방체의 부착은, 예를 들어, 세포 인식 및 흡수를 증진시킴으로써 iRNA의 약동학 분포에 영향을 미칠 수 있다. 웨პ타이드 또는 웨პ타이드모방체 모이어티는 약 5 내지 50개의 아미노산 길이, 예를 들어, 약 5, 10,

15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50개의 아미노산 길이일 수 있다.

[0388] 웹타이드 또는 웹타이드모방체는, 예를 들어, 세포 투과 웹타이드, 양이온성 웹타이드, 양친매성 웹타이드, 또는 소수성 웹타이드(예를 들어, 주로 Tyr, Trp 또는 Phe로 구성됨)일 수 있다. 웹타이드 모이어티는 덴드리머 웹타이드, 결속성 웹타이드 또는 가교된 웹타이드일 수 있다. 또 다른 대안에서, 웹타이드 모이어티는 소수성 막 전위 서열(MTS)을 포함할 수 있다. 예시적 소수성 MTS-함유 웹타이드는 아미노산 서열 AAVALPAVLLALLAP(SEQ ID NO: 11)를 갖는 RFGF이다. 소수성 MTS를 함유하는 RFGF 유사체(예를 들어, 아미노산 서열 AALLPVLLAAP(SEQ ID NO: 12))가 또한 표적화 모이어티일 수 있다. 웹타이드 모이어티는 세포막을 가로지르는 웹타이드, 올리고뉴클레오타이드, 및 단백질을 포함하는 큰 극성 분자를 가질 수 있는 "전달" 웹타이드일 수 있다. 예를 들어, HIV Tat 단백질(GRKKRRQRRPPQ(SEQ ID NO: 13)) 및 드로소필라(Drosophila) 안테나페디아 단백질(RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO: 14))로부터의 서열은 전달 웹타이드로서 작용할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 파지-디스플레이 라이브러리, 또는 1-비드-1-화합물(OBOC) 조합 라이브러리로부터 확인된 웹타이드와 같은 웹타이드 또는 웹타이드모방체는 DNA의 무작위 서열에 의해 인코딩될 수 있다(문헌[Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991]). 세포 표적화 목적을 위해 통합된 단량체 단위를 통하여 dsRNA 작용제에 결속된 웹타이드 또는 웹타이드 모방체의 예는 아르기닌-글리신-아스파르트산(RGD)-웹타이드, 또는 RGD 모방체이다. 웹타이드 모이어티는 약 5 개의 아미노산 내지 약 40개의 아미노산 길이의 범위일 수 있다. 웹타이드 모이어티는, 예를 들어, 안정성을 증가시키거나 형태적 특성을 유도하기 위해 구조적 변형을 가질 수 있다. 하기 기재되는 구조적 변형 중 임의의 변형이 이용될 수 있다.

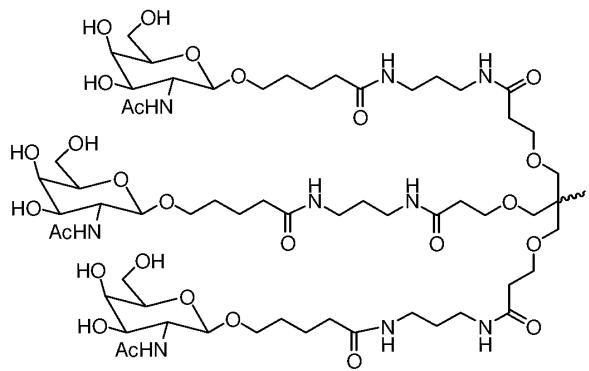
[0389] 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 RGD 웹타이드는 선형 또는 환형일 수 있으며, 예를 들어, 글리코실화 또는 메틸화되어, 특정 조직(들)으로의 표적화를 용이하게 할 수 있다. RGD-함유 웹타이드 및 웹타이드모방체는 D-아미노산 및 합성 RGD 모방체를 포함할 수 있다. RGD에 더하여, 인테그린 리간드를 표적으로 하는 다른 모이어티를 사용할 수 있다. 이러한 리간드의 바람직한 접합체는 PECAM-1 또는 VEGF를 표적으로 한다.

[0390] "세포 투과 웹타이드"는 세포, 예를 들어, 미생물 세포, 예를 들어, 박테리아 또는 진균 세포, 또는 포유류 세포, 예를 들어, 인간 세포를 투과할 수 있다. 미생물 세포-투과 웹타이드는, 예를 들어,  $\alpha$ -헬리칼 선형 웹타이드(예를 들어, LL-37 또는 세로핀 P1(Ceropin P1)), 이황화결합-함유 웹타이드(예를 들어,  $\alpha$ -디펜신( $\alpha$ -defensin),  $\beta$ -디펜신 또는 박테네신(bactenecin)), 또는 단지 1개 또는 2개의 우세 아미노산을 함유하는 웹타이드(예를 들어, PR-39 또는 인돌리시딘(indolicidin))일 수 있다. 세포 투과 웹타이드는 또한 핵 위치 신호(NLS)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 세포 투과 웹타이드는 HIV-1 gp41 및 SV40 큰 T 항원의 NLS의 융합 웹타이드 도메인으로부터 유래되는 MPG와 같은 양분된 양친매성 웹타이드일 수 있다(문헌[Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003]).

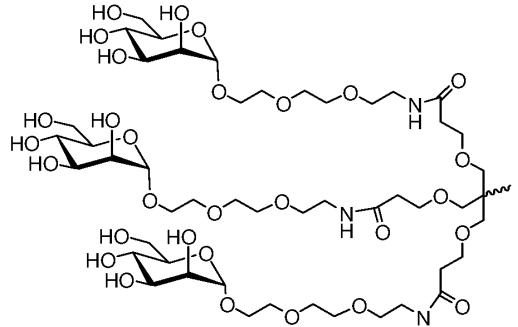
### C. 탄수화물 접합체

[0392] 본 발명의 조성물 및 방법의 일부 구현예에서, iRNA 올리고뉴클레오타이드는 탄수화물을 추가로 포함한다. 탄수화물 접합된 iRNA는 핵산 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 생체내 치료 용도에 적합한 조성물의 생체내 전달에 유리하다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "탄수화물"은 그 자체로 각각의 탄소 원자에 결합된 산소, 질소 또는 황 원자와 함께 적어도 6개의 탄소 원자(선형이거나, 분지형이거나, 고리형일 수 있음)를 갖는 하나 이상의 단당류 단위로 구성되는 탄수화물인 화합물, 또는 각각의 탄소 원자에 결합된 산소, 질소 또는 황 원자와 함께 적어도 6개의 탄소 원자(선형이거나, 분지형이거나, 고리형일 수 있음)를 각각 갖는 하나 이상의 단당류 단위로 구성되는 탄수화물 모이어티를 일부로서 갖는 화합물을 나타낸다. 대표적 탄수화물은 당(단당류, 이당류, 삼당류 및 약 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 단당류 단위를 함유하는 올리고당류), 및 다당류, 예를 들어, 전분, 글리코겐, 셀룰로스 및 다당류 검을 포함한다. 특이적 단당류는 TTR 및 그 이상(예를 들어, TTR, C6, C7 또는 C8)의 당을 포함하고; 이당류 및 삼당류는 2개 또는 3개의 단당류 단위(예를 들어, TTR, C6, C7 또는 C8)를 갖는 당을 포함한다.

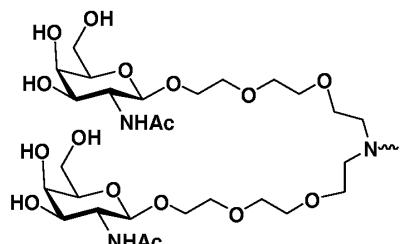
[0393] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 탄수화물 접합체는 단당류이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 탄수화물 접합체는 하기의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다:



화학식 II,

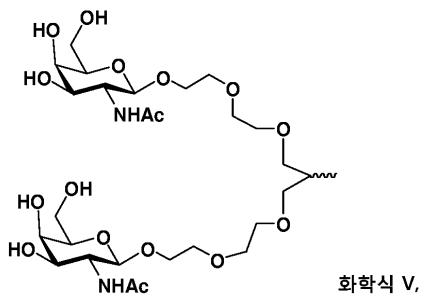


화학식 III,

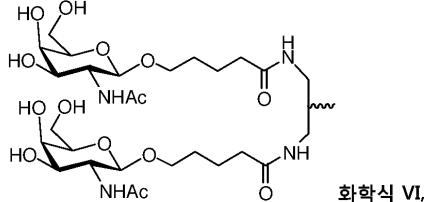


화학식 IV,

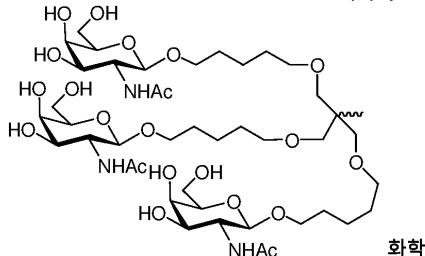
[0394]



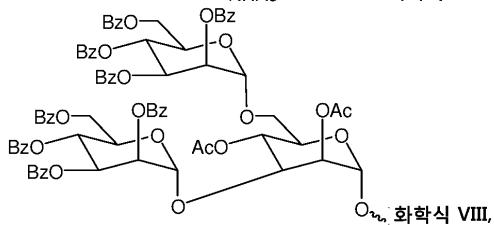
## 화학식 V.



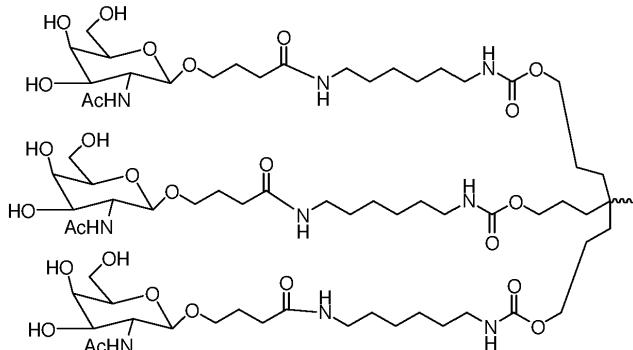
화학식 VI,



화학식 VII,

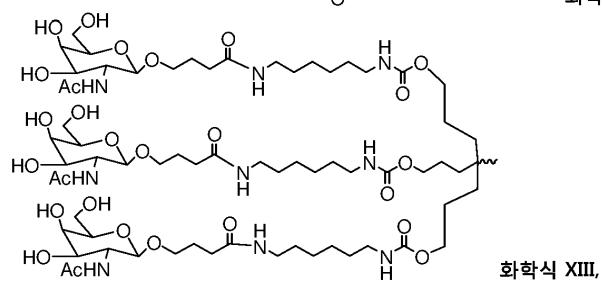
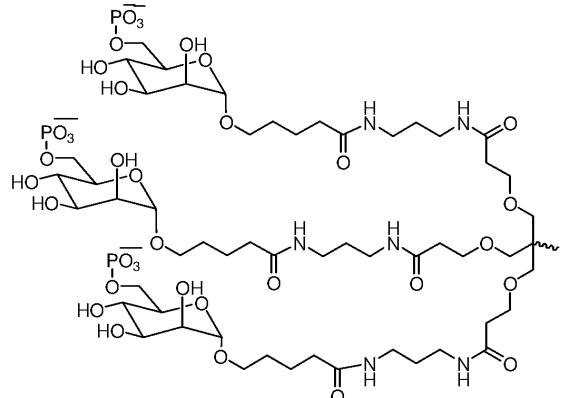
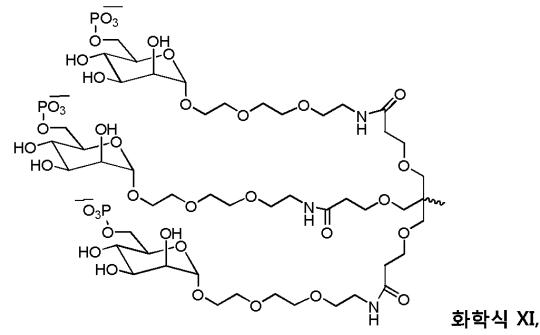
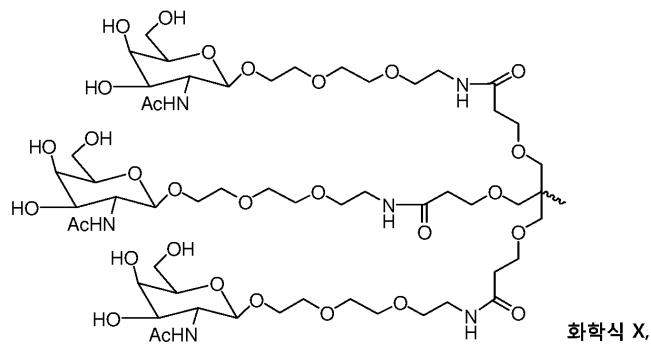


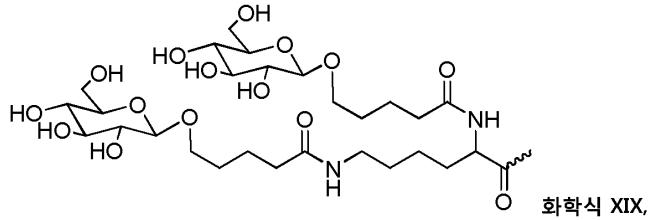
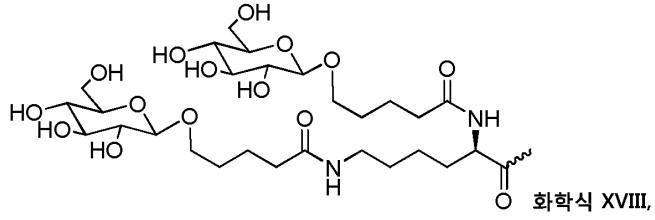
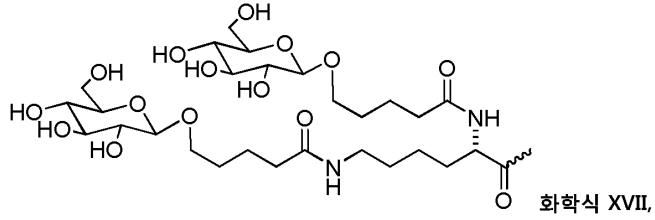
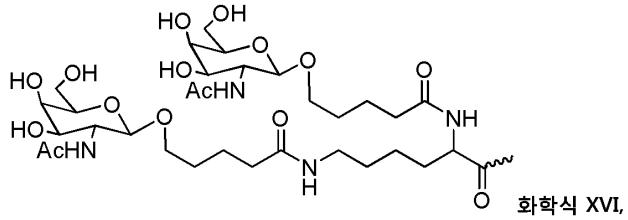
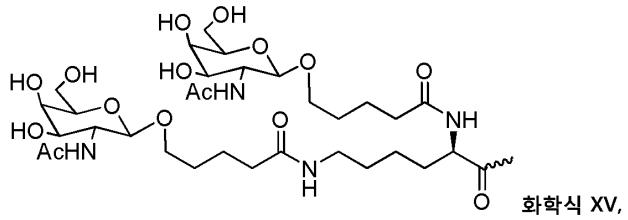
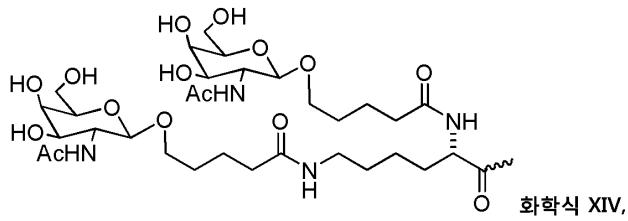
학식 VIII,

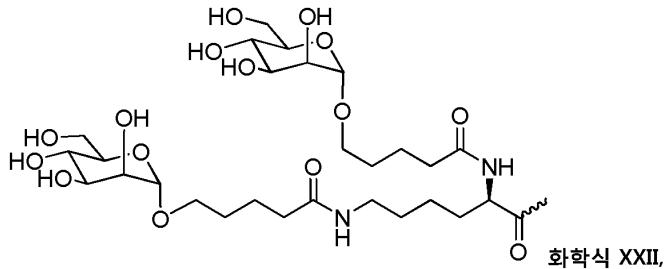
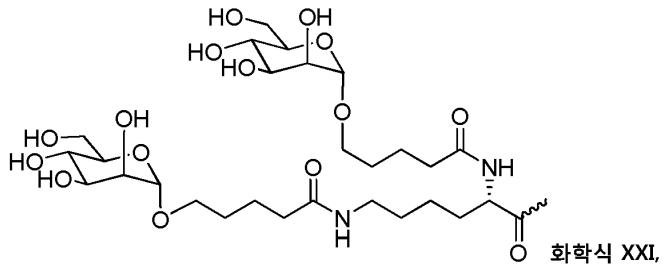
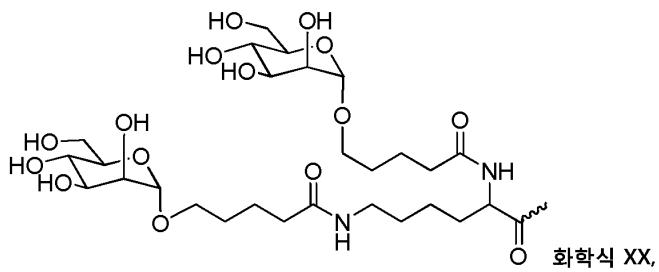


화학식 IX,

[0395]

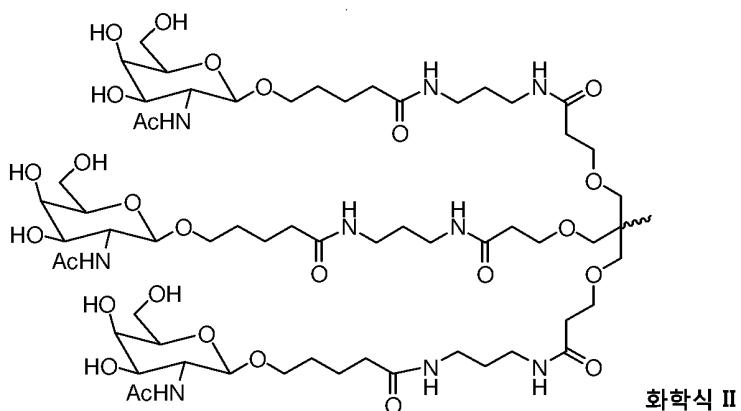






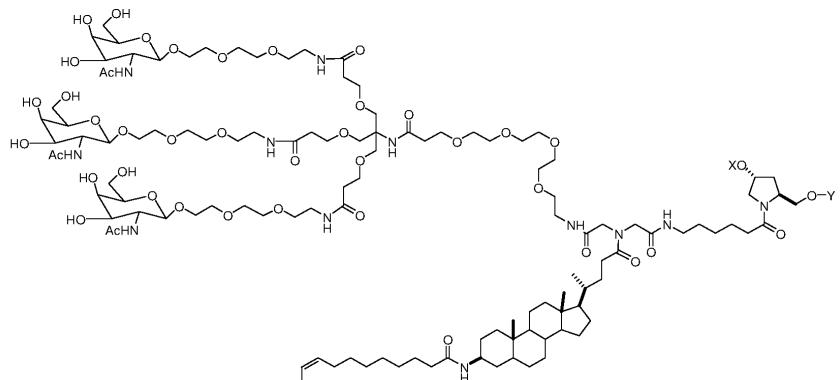
[0398]

일 구현예에서, 단당류는 하기와 같은 N-아세틸갈락토사민이다:



[0400]

본 명세서에 기재된 구현예에서 사용하기 위한 탄수화물 접합체의 또 다른 대표 예는 하기의 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다:



[0402]

(화학식 XXIII)



적으로, 절단 작용제는 혈청 또는 혈액 내에서보다 세포 내부에서 더욱 우세하거나, 더 높은 수준 또는 활성으로 발견된다. 이러한 분해성 작용제의 예는 환원에 의해 산화환원 절단 가능한 연결기를 분해시킬 수 있는, 세포 내에 존재하는, 예를 들어, 머캅탄과 같은 산화 또는 환원 효소 또는 환원제를 포함하는, 특정 기질에 대해 선택되거나 기질 특이성을 갖지 않는 산화환원 작용제; 에스테라제; 산성 환경을 발생시킬 수 있는 엔도솜 또는 작용제, 예를 들어, 5의 pH 또는 그 보다 낮은 pH를 발생시키는 엔도솜 또는 작용제; 일반적인 산으로 작용함으로써 산 절단 가능한 연결기를 가수분해시키거나 분해시킬 수 있는 효소인 펩티다제(기질 특이적일 수 있음), 및 포스파타제를 포함한다.

[0414] 절단 가능한 연결기, 예를 들어, 이황화결합은 pH에 민감할 수 있다. 인간 혈청의 pH는 7.4인 한편, 평균 세포 내 pH는 약 7.1 내지 7.3의 범위로 약간 낮다. 엔도솜은 5.5 내지 6.0의 범위의 더욱 산성인 pH를 갖고, 리소솜은 약 5.0으로 더욱 더 산성인 pH를 갖는다. 일부 링커는 바람직한 pH에서 절단됨으로써, 세포 내부의 리간드로부터, 또는 세포의 요망되는 구획으로 양이온성 지질을 방출시키는 절단 가능한 연결기를 가질 것이다.

[0415] 링커는 특정 효소에 의해 절단될 수 있는 절단 가능한 연결기를 포함할 수 있다. 링커로 통합된 절단 가능한 연결기의 유형은 표적화되는 세포에 좌우될 수 있다. 예를 들어, 간 표적화 리간드는 에스테르기를 포함하는 링커를 통해 양이온성 지질에 연결될 수 있다. 간 세포에는 에스테라제가 풍부하고, 이에 따라, 링커는 에스테라제가 풍부하지 않은 세포 유형보다 간 세포에서 더욱 효과적으로 절단될 것이다. 다른 에스테라제가 풍부한 세포-유형은 폐, 신장 피질, 및 고환의 세포를 포함한다.

[0416] 펩타이드 결합을 함유하는 링커는 펩티다제가 풍부한 세포 유형, 예를 들어, 간 세포 및 윤활막세포를 표적으로 하는 경우에 사용될 수 있다.

[0417] 일반적으로, 절단 가능한 후보 연결기의 적합도는 후보 연결기를 절단시키는 분해성 작용제(또는 조건)의 능력을 시험함으로써 평가될 수 있다. 또한, 혈액 내에서 또는 다른 비-표적 조직과 접촉시 절단에 저항하는 능력에 대해 절단 가능한 후보 연결기를 시험하는 것이 또한 요망될 것이다. 따라서, 제1 조건과 제2 조건 사이의 절단에 대한 상대 감수성을 결정할 수 있으며, 제1 조건은 표적 세포 내에서의 절단을 나타내도록 선택되고, 제2 조건은 다른 조직 또는 생물학적 유체, 예를 들어, 혈액 또는 혈청에서의 절단을 나타내도록 선택된다. 평가는 세포 무함유 시스템, 세포, 세포 배양물, 기관 또는 조직 배양물, 또는 전체 동물에서 수행될 수 있다. 세포 무함유 또는 배양물 조건에서 최초 평가를 수행하고, 전체 동물에서 추가 평가에 의해 확인하는 것이 유용할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 유용한 후보 화합물은 혈액 또는 혈청(또는 세포외 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건 하)에 비해 세포(또는 세포내 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건 하)에서 적어도 약 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 약 100배 더 신속히 절단된다.

#### i. 절단 가능한 산화환원 연결기

[0418] 일 구현예에서, 절단 가능한 연결기는 환원 또는 산화 시에 절단되는 산화환원 절단 가능한 연결기이다. 환원적 절단 가능한 연결기의 예는 디솔피드 연결기(-S-S-)이다. 절단 가능한 후보 연결기가 적합한 "환원적 절단 가능한 연결기"이거나, 예를 들어, 특정 iRNA 모이어티 또는 특정 표적화 작용제와 함께 사용하기에 적합한지 결정하기 위해, 본 명세서에 기재된 방법을 참조할 수 있다. 예를 들어, 후보자는 세포, 예를 들어, 표적 세포에서 관찰되는 절단 속도를 모방하는 당 분야에 공지된 시약을 이용하여 디티오트레이톨(DTT), 또는 다른 환원제와의 인큐베이션에 의해 평가될 수 있다. 후보자는 또한 혈액 또는 혈청 조건을 모방하도록 선택되는 조건하에서 평가될 수 있다. 일 구현예에서, 후보 화합물은 혈액 내에서 많아야 약 10%까지 절단된다. 다른 구현예에서, 유용한 후보 화합물은 혈액(또는 세포외 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건 하)에 비해 세포(또는 세포내 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건 하)에서 적어도 약 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 약 100배 더 신속히 분해된다. 후보 화합물의 절단 속도는 세포내 매질을 모방하도록 선택된 조건하에서 표준 효소 동역학 검정을 이용하여 결정될 수 있고, 세포외 매질을 모방하도록 선택된 조건과 비교될 수 있다.

#### ii. 포스페이트-기반의 절단 가능한 연결기

[0420] 다른 구현예에서, 절단 가능한 링커는 포스페이트-기반의 절단 가능한 연결기를 포함한다. 포스페이트-기반의 절단 가능한 연결기는 포스페이트기를 분해하거나 가수분해시키는 작용제에 의해 절단된다. 세포 내에서 포스페이트기를 절단시키는 작용제의 예는 세포 내의 포스파타제와 같은 효소이다. 포스페이트-기반 연결기의 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)-S-이다. 바람직한 구현예는 -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-,

$-S-P(O)(OH)-O-$ ,  $-O-P(O)(OH)-S-$ ,  $-S-P(O)(OH)-S-$ ,  $-O-P(S)(OH)-S-$ ,  $-S-P(S)(OH)-O-$ ,  $-O-P(O)(H)-O-$ ,  $-O-P(S)(H)-O-$ ,  $-S-P(O)(H)-O-$ ,  $-S-P(S)(H)-O-$ ,  $-S-P(O)(H)-S-$ ,  $-O-P(S)(H)-S-$ 이다. 바람직한 일 구현예는  $-O-P(O)(OH)-O-$ 이다. 이들 후보자는 전술된 것과 유사한 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

#### [0422] iii. 산 절단 가능한 연결기

다른 구현예에서, 절단 가능한 링커는 절단 가능한 연결기를 포함한다. 산 절단 가능한 연결기는 산성 조건하에서 절단되는 연결기이다. 바람직한 구현예에서, 산 절단 가능한 연결기는 약 6.5의 pH 또는 이보다 낮은 pH(예를 들어, 약 6.0, 5.75, 5.5, 5.25, 5.0, 또는 이보다 낮은 pH)를 갖는 산성 환경 내에서, 또는 일반적인 산으로 작용할 수 있는 효소와 같은 작용제에 의해 절단된다. 세포 내에서, 특이적인 낮은 pH 소기관, 예를 들어, 엔도솜 및 리소솜이 산 절단 가능한 연결기에 대한 절단 환경을 제공할 수 있다. 산 분해성 연결기의 예는 하이드라존, 에스테르, 및 아미노산의 에스테르를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 산 절단 가능한 기는 일반식  $-C=NN-$ ,  $C(O)O$ , 또는  $-OC(O)$ 를 가질 수 있다. 에스테르(알콕시기)의 산소에 부착된 탄소가 아릴기, 치환된 알킬기, 또는 3차 알킬기, 예를 들어, 디메틸 펜틸 또는 t-부틸인 경우가 바람직한 구현예이다. 이들 후보자는 전술된 것과 유사한 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

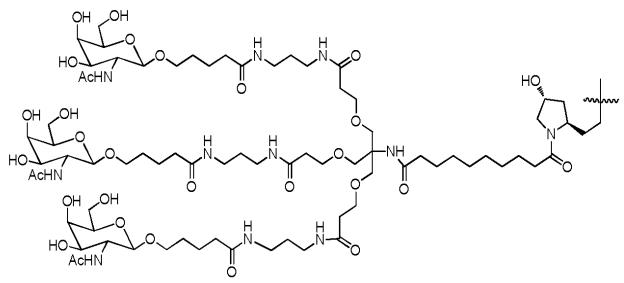
#### [0424] iv. 에스테르-기반 연결기

다른 구현예에서, 절단 가능한 링커는 에스테르-기반 절단 가능한 연결기를 포함한다. 에스테르-기반 절단 가능한 연결기는 세포 내의 에스테라제 및 아미다제와 같은 효소에 의해 절단된다. 에스테르-기반 절단 가능한 연결기의 예는 알킬렌, 알케닐렌 및 알키넬렌기의 에스테르를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 에스테르 절단 가능한 연결기는 일반식  $-C(O)O-$ , 또는  $-OC(O)-$ 를 갖는다. 이들 후보자는 전술된 것과 유사한 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

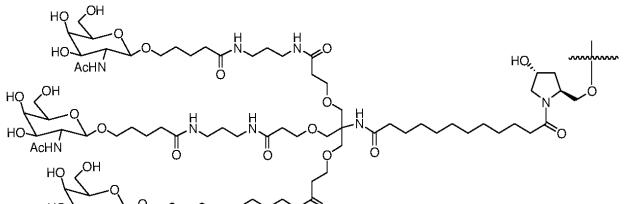
#### [0426] v. 웨타이드-기반 절단 가능한 기

또 다른 구현예에서, 절단 가능한 링커는 웨타이드-기반 절단 가능한 연결기를 포함한다. 웨타이드-기반 절단 가능한 연결기는 세포 내의 웨타이드 및 프로테아제와 같은 효소에 의해 절단된다. 웨타이드-기반 절단 가능한 연결기는 올리고웨타이드(예를 들어, 디웨타이드, 트리웨타이드 등) 및 폴리웨타이드를 생성시키기 위해 아미노산 사이에 형성되는 웨타이드 결합이다. 웨타이드-기반 절단 가능한 기는 아미드기( $-C(O)NH-$ )를 포함하지 않는다. 아미드기는 임의의 알킬렌, 알케닐렌 또는 알키넬렌 사이에 형성될 수 있다. 웨타이드 결합은 웨타이드 및 단백질을 생성시키기 위해 아미노산 사이에 형성되는 아미드 결합의 특별한 유형이다. 웨타이드 기반 절단 가능한 기는 일반적으로 웨타이드 및 단백질을 발생시키는 아미노산 사이에 형성된 웨타이드 결합(즉, 아미드 결합)으로 제한되고, 전체 아미드 작용기를 포함하지 않는다. 웨타이드-기반 절단 가능한 연결기는 일반식  $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ 를 가지며, 여기서 RA 및 RB는 2개의 인접한 아미노산의 R 기이다. 이들 후보자는 전술된 것과 유사한 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

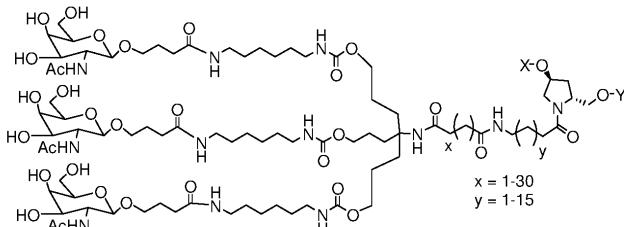
[0428] 일 구현예에서, 본 발명의 iRNA는 링커를 통해 탄수화물에 접합된다. 본 발명의 조성물 및 방법의 링커를 갖는 iRNA 탄수화물 접합의 비제한적인 예에는 하기 화학식이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다:



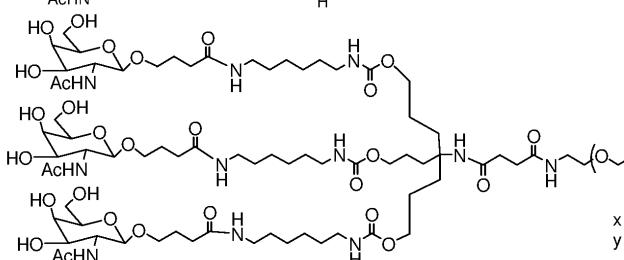
(화학식 XXIV),



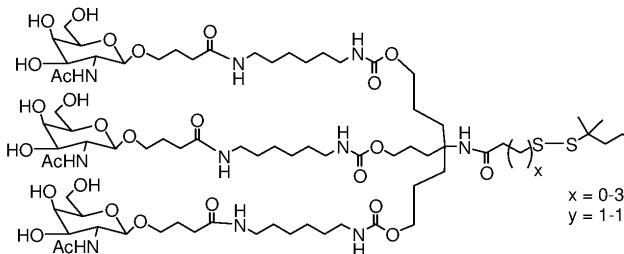
(화학식 XXV),



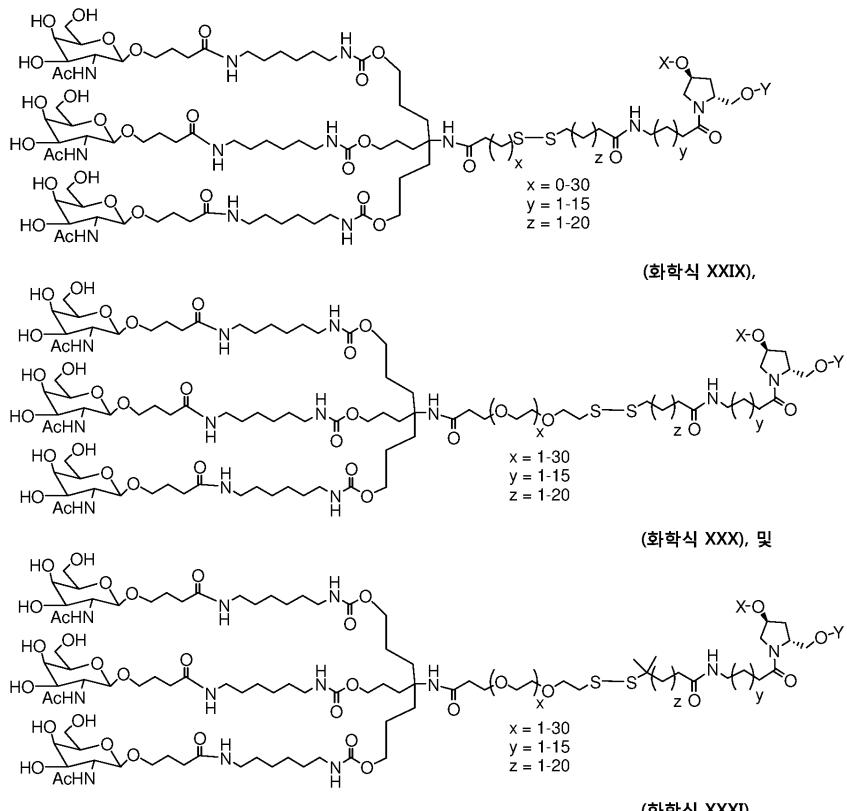
(화학식 XXVI),



(화학식 XXVII),



(화학식 XXVIII),



[0430]

상기 식에서,

[0431]

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

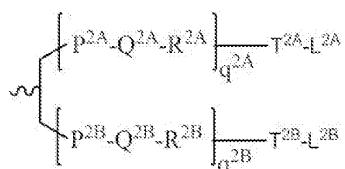
[0432]

본 발명의 조성물 및 방법의 특정 실시형태에서, 리간드는 2가 또는 3가 분지형 링커를 통하여 부착된 하나 이상의 "GalNAc"(N-아세틸갈락토사민) 유도체이다.

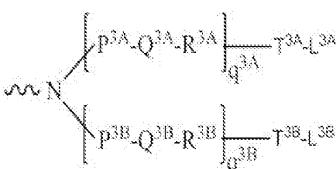
[0433]

일 구현예에서, 본 발명의 dsRNA는 화학식 (XXXII) 내지 (XXXV) 중 어느 하나에 나타낸 구조의 그룹으로부터 선택되는 2가 또는 3가 분지형 링커에 접합된다:

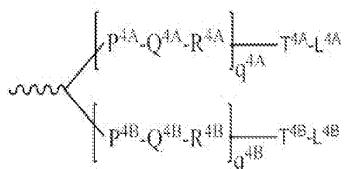
화학식 XXXII



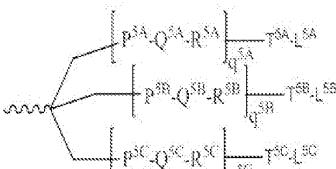
화학식 XXXIII



화학식 XXXIV



화학식 XXXV



[0434]

상기 식에서,

[0435]

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

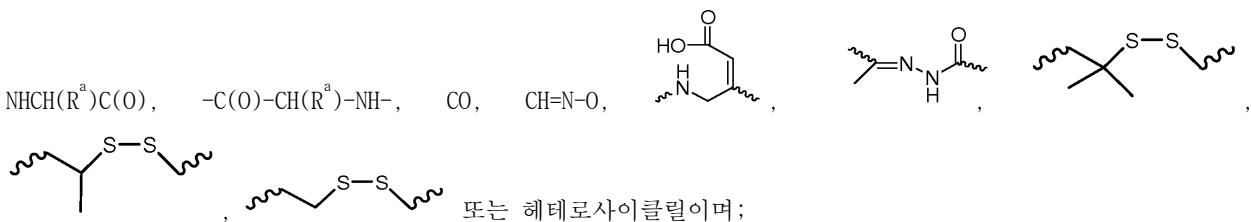
[0436]

 $P^{2A}$ ,  $P^{2B}$ ,  $P^{3A}$ ,  $P^{3B}$ ,  $P^{4A}$ ,  $P^{4B}$ ,  $P^{5A}$ ,  $P^{5B}$ ,  $P^{5C}$ ,  $T^{2A}$ ,  $T^{2B}$ ,  $T^{3A}$ ,  $T^{3B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{4B}$ ,  $T^{5A}$ ,  $T^{5B}$ ,  $T^{5C}$ 는 각각 서로 독립적으로, 부

재, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH 또는 CH<sub>2</sub>O이고;

[0439] Q<sup>2A</sup>, Q<sup>2B</sup>, Q<sup>3A</sup>, Q<sup>3B</sup>, Q<sup>4A</sup>, Q<sup>4B</sup>, Q<sup>5A</sup>, Q<sup>5B</sup>, Q<sup>5C</sup>는 서로 독립적으로, 부재, 알킬렌, 치환된 알킬렌이며, 여기서, 하나 이상의 메틸렌은 O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), C(R')=C(R''), C≡C 또는 C(O) 중 하나 이상에 의해 단절되거나, 종결될 수 있고;

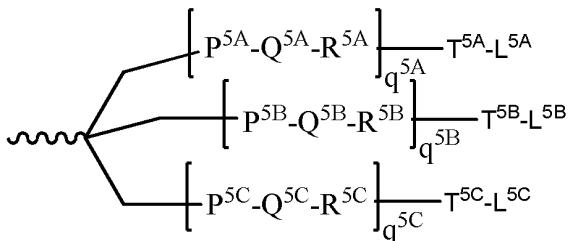
[0440] R<sup>2A</sup>, R<sup>2B</sup>, R<sup>3A</sup>, R<sup>3B</sup>, R<sup>4A</sup>, R<sup>4B</sup>, R<sup>5A</sup>, R<sup>5B</sup>, R<sup>5C</sup>는 각각 서로 독립적으로, 부재, NH, O, S, CH<sub>2</sub>, C(O)O, C(O)NH,



[0441] L<sup>2A</sup>, L<sup>2B</sup>, L<sup>3A</sup>, L<sup>3B</sup>, L<sup>4A</sup>, L<sup>4B</sup>, L<sup>5A</sup>, L<sup>5B</sup> 및 L<sup>5C</sup>는 리간드; 즉, 각각 서로 독립적으로, 단당류(예를 들어, GaINAc), 이당류, 삼당류, 사당류, 올리고당류 또는 다당류를 나타내고;

[0442] R<sup>a</sup>는 H 또는 아미노산 측쇄이다. 3가 접합 GaINAc 유도체, 예를 들어 화학식 (XXXVI)의 것들은 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 작용제와 함께 사용하기에 특히 유용하다:

### 화학식 XXXVI



[0443]

[0444] 상기 식에서,

[0445] L<sup>5A</sup>, L<sup>5B</sup> 및 L<sup>5C</sup>는 단당류, 예를 들어, GaINAc 유도체를 나타낸다.

[0446] GaINAc 유도체를 접합시키는 적합한 2가 및 3가 분자형 링커 기의 예에는 화학식 II, VII, XI, X 및 XIII로서 상기에 언급된 구조가 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0447] RNA 접합의 제조를 교시하는 대표적 미국 특허는 미국 특허 제 4,828,979호; 제 4,948,882호; 제 5,218,105호; 제 5,525,465호; 제 5,541,313호; 제 5,545,730호; 제 5,552,538호; 제 5,578,717호; 제 5,580,731호; 제 5,591,584호; 제 5,109,124호; 제 5,118,802호; 제 5,138,045호; 제 5,414,077호; 제 5,486,603호; 제 5,512,439호; 제 5,578,718호; 제 5,608,046호; 제 4,587,044호; 제 4,605,735호; 제 4,667,025호; 제 4,762,779호; 제 4,789,737호; 제 4,824,941호; 제 4,835,263호; 제 4,876,335호; 제 4,904,582호; 제 4,958,013호; 제 5,082,830호; 제 5,112,963호; 제 5,214,136호; 제 5,082,830호; 제 5,112,963호; 제 5,214,136호; 제 5,245,022호; 제 5,254,469호; 제 5,258,506호; 제 5,262,536호; 제 5,272,250호; 제 5,292,873호; 제 5,317,098호; 제 5,371,241호; 제 5,391,723호; 제 5,416,203호; 제 5,451,463호; 제 5,510,475호; 제 5,512,667호; 제 5,514,785호; 제 5,565,552호; 제 5,567,810호; 제 5,574,142호; 제 5,585,481호; 제 5,587,371호; 제 5,595,726호; 제 5,597,696호; 제 5,599,923호; 제 5,599,928호 및 5,688,941호; 제 6,294,664호; 제 6,320,017호; 제 6,576,752호; 제 6,783,931호; 제 6,900,297호; 제 7,037,646호; 제 8,106,022호를 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 각각의 전문은 참조로서 본 명세서에 포함된다.

[0448] 제공된 화합물 내의 모든 위치가 균일하게 변형될 필요는 없고, 사실, 상기 언급된 변형 중 하나보다 많은 변형은 단일 화합물 내 또는 심지어 tRNA 내의 단일한 뉴클레오사이드에 통합될 수 있다. 본 발명은 또한 키메라 화

합물인 iRNA 화합물을 포함한다.

[0449]

본 발명의 문맥에서 "키메라" iRNA 화합물 또는 "키메라"는 dsRNA 화합물의 경우에 뉴클레오타이드와 같은 적어도 하나의 단량체 단위로 각각 구성된 2개 이상의 화학적으로 별개의 영역을 함유하는 iRNA 화합물, 바람직하게는 dsRNA이다. 이들 iRNA는 통상적으로, 뉴클레아제 분해에 대한 증가된 내성, 증가된 세포 흡수, 및/또는 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화도를 iRNA에 부여하도록 RNA가 변형된 적어도 하나의 영역을 함유한다. iRNA의 추가 영역은 RNA:DNA 또는 RNA:RNA 혼성물을 절단시킬 수 있는 효소에 대한 기질로 작용할 수 있다. 예를 들어, RNase H는 RNA:DNA 이중가닥의 RNA 가닥을 절단시키는 세포 엔도뉴클레아제이다. 따라서, RNase H의 활성화는 RNA 표적의 절단을 발생시키고, 이에 의해 유전자 발현의 iRNA 억제의 효능을 크게 증진시킨다. 결과로서, 동일 표적 영역에 혼성화되는 포스포로티오에이트 데옥시 dsRNA에 비해 키메라 dsRNA가 사용되는 경우보다 짧은 iRNA를 이용하여 동등한 결과가 종종 수득될 수 있다. RNA 표적의 절단은 통상적으로 겔 전기영동 및, 필요시, 당분야에 공지된 관련된 핵산 혼성화 기술에 의해 검출될 수 있다.

[0450]

특정 예에서, iRNA의 RNA는 비-리간드 기에 의해 변형될 수 있다. iRNA의 활성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증진시키기 위해 다수의 비-리간드 분자가 iRNA에 접합되었고, 상기 접합을 수행하기 위한 절차는 과학 문헌에서 이용 가능하다. 상기 비-리간드 모이어티는 지질 모이어티, 예를 들어, 콜레스테롤(문헌[Kubo, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553]), 콜산(문헌[Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053]), 티오에테르, 예를 들어, 헥실-S-트리틸티오(문헌[Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765]), 티오콜레스테롤(문헌[Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533]), 지방족 사슬, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운데실 잔기(문헌[Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49]), 인지질, 예를 들어, 디-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-0-헥사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트(문헌[Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777]), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬(문헌[Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969]), 또는 아다만탄 아세트산(문헌[Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651]), 팔미틸 모이어티(문헌[Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229]), 또는 옥타데실 아민 또는 헥실아미노-카보닐-옥시콜레스테롤 모이어티(문헌[Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923])를 포함하였다. 상기 RNA 접합의 제조를 교시하는 대표적 미국 특허가 상기에 나열되어 있다. 통상적 접합 프로토콜은 서열의 하나 이상의 위치에 아미노 링커를 갖는 RNA의 합성을 포함한다. 이후, 아미노기는 적절한 커플링 또는 활성화 시약을 이용하여 접합된 분자와 반응한다. 접합 반응은 용액 상에서 고체 지지체에 여전히 고정된 RNA와 함께 수행될 수 있거나, RNA의 분해 후에 수행될 수 있다. HPLC에 의한 RNA 접합의 정제는 통상적으로 순수한 접합률을 발생시킨다.

[0451]

## V. 본 발명의 iRNA의 전달

[0452]

세포, 예를 들어, 인간 대상체(예를 들어, TTR과 관련된 질병, 장애 또는 질환을 갖는 대상체와 같이 본 발명의 iRNA의 전달을 필요로 하는 대상체)와 같은 대상체 내의 세포로의 본 발명의 iRNA의 전달은 다수의 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 전달은 시험관내 또는 생체내에서 세포를 본 발명의 iRNA와 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 또한, 생체내 전달은 iRNA, 예를 들어, dsRNA를 포함하는 조성물을 대상체에 투여함으로써 직접 수행될 수 있다. 대안적으로, iRNA를 인코딩하고 이의 발현을 유도하는 하나 이상의 벡터를 투여함으로써 생체내 전달은 간접적으로 수행될 수 있다. 이들 대안은 하기에 추가로 논의된다.

[0453]

일반적으로, 핵산 분자를 전달하는(시험관내 또는 생체내) 임의의 방법이 본 발명의 iRNA와의 사용을 위해 조정될 수 있다(예를 들어, 전체 내용이 참조로서 본 명세서에 포함되는, 문헌[Akhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144] 및 WO94/02595 참조). 생체내 전달을 위하여, iRNA 분자를 전달하기 위해 고려해야 할 요인에는 예를 들어, 전달된 분자의 생물학적 안정성, 비특이적 효과의 방지, 및 표적 조직 내의 전달된 분자의 축적이 포함된다. iRNA의 비특이적 효과는, 예를 들어, 조직으로의 직접적인 주사 또는 이식에 의한 또는 제제를 국소 투여함에 의한 국소 투여에 의해 최소화될 수 있다. 치료 부위로의 국소 투여는 작용제의 국소 농도를 최대화시키고, 작용제에 의해 달리 손상될 수 있거나, 작용제를 분해시킬 수 있는 전신 조직으로의 작용제의 노출을 제한하고, iRNA 분자의 보다 적은 전체 투여량이 투여되게 한다. 여러 연구에서 iRNA가 국소 투여되는 경우 유전자 생성물의 성공적인 넉다운이 밝혀졌다. 예를 들어, 사이노몰거스 원숭이에서의 유리체내 주사(문헌[Tolentino, MJ., et al (2004) Retina 24:132-138]) 및 마우스에서의 망막하 주사(문헌[Reich, SJ., et al (2003) Mol. Vis. 9:210-216])에 의한 VEGF dsRNA의 안구내 전달은 둘 모두가 연령-관련 황반변성

의 실험 모델에서 신생혈관증식을 방지하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 마우스에서의 dsRNA의 직접적 종양내 주사는 종양 용적을 감소시키고(문헌[Pille, J., et al (2005) Mol. Ther. 11 :267-274]), 종양을 갖는 마우스의 생존을 연장시킬 수 있다(문헌[Kim, WJ., et al (2006) Mol. Ther. 14:343-350; Li, S., et al (2007) Mol. Ther. 15:515-523]). RNA 간섭은 또한 직접 주사에 의한 CNS로의 국소 전달(문헌[Dorn, G., et al. (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH., et al (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H., et al (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT., et al (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER., et al (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya,Y., et al (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602]) 및 비내 투여에 의한 폐로의 국소 전달(문헌[Howard, KA., et al (2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X., et al (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V., et al (2005) Nat. Med. 11:50-55])을 이용하여 성공적인 것으로 밝혀졌다. 질병의 치료를 위해 iRNA를 전신 투여하기 위해, RNA는 변형되거나 약물 전달 시스템을 이용하여 대안적으로 전달될 수 있고, 이러한 둘 모두의 방법은 생체내에서 엔도뉴클레아제 및 엑소뉴클레아제에 의한 dsRNA의 신속한 분해를 방지하는 작용을 한다. RNA 또는 약제학적 담체의 변형은 또한 표적 조직으로의 iRNA 조성물의 표적화 및 요망되지 않는 표적의 효과의 회피를 가능케 할 수 있다. iRNA 분자는 세포 흡수를 증진시키고 분해를 방지하기 위해 콜레스테롤과 같은 친유성 기로의 화학적 접합에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, 친유성 콜레스테롤 모이어티에 접합된 ApoB에 대해 유도된 iRNA가 마우스에 전신 주사되었고, 간 및 공장 둘 모두에서 apoB mRNA의 낙다운을 발생시켰다(문헌[Soutschek, J., et al (2004) Nature 432:173-178]). 암타파로의 iRNA의 접합은 전립선암의 마우스 모델에서 종양 성장을 억제하고, 종양 퇴행을 매개하는 것으로 밝혀졌다(문헌[McNamara, JO., et al (2006) Nat. Biotechnol. 24: 1005-1015]). 한 대안적 구현예에서, iRNA는 약물 전달 시스템, 예를 들어, 나노입자, 덴드리머, 중합체, 리포솜, 또는 양이온성 전달 시스템을 이용하여 전달될 수 있다. 양성으로 하전된 양이온성 전달 시스템은 iRNA 분자(음성으로 하전됨)의 결합을 촉진시키고, 또한 음성으로 하전된 세포막에서의 상호작용을 증진시켜, 세포에 의한 iRNA의 효과적인 흡수를 가능케 한다. 양이온성 지질, 덴드리머, 또는 중합체는 iRNA에 결합될 수 있거나, 유도되어 iRNA를 둘러싸는 소낭 또는 미셀(micelle)을 형성할 수 있다(예를 들어, 문헌[Kim SH., et al (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116] 참조). 소낭 또는 미셀의 형성은 전신 투여되는 경우 iRNA의 분해를 추가로 방지한다. 양이온성-iRNA 복합체를 제조하고 투여하는 방법은 충분히 당업자의 능력 내이다(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본 명세서에 포함되는 문헌[Sorensen, DR., et al (2003) J. Mol. Biol 327:761-766; Verma, UN., et al (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold, AS et al (2007) J. Hypertens. 25:197-205] 참조). iRNA의 전신 전달에 유용한 약물 전달 시스템의 일부 비제한적인 예는 DOTAP(상기 문헌[Sorensen, DR., et al (2003)]; 상기 문헌[Verma, UN., et al (2003)]), Oligofectamine, "고체 핵산 지질 입자"(문헌[Zimmermann, TS., et al (2006) Nature 441:111-114]), 카디오리핀(문헌[Chien, PY., et al (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328; Pal, A., et al (2005) Int J. Oncol. 26:1087-1091]), 폴리에틸렌이민(문헌[Bonnet ME., et al (2008) Pharm. Res. Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659]), Arg-Gly-Asp(RGD) 웨타이드(문헌[Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3:472-487]), 및 폴리아미도아민(문헌[Tomalia, DA., et al (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67; Yoo, H., et al (1999) Pharm. Res. 16: 1799-1804])을 포함한다. 일부 구현예에서, iRNA는 전신 투여를 위해 사이클로덱스트린과 복합체를 형성한다. iRNA 및 사이클로덱스트린의 투여 방법 및 약제학적 조성물은 전체내용이 참조로서 본 명세서에 포함되는 미국 특허 제 7,427,605호에서 발견될 수 있다.

#### A. 벡터에 의해 인코딩된 본 발명의 iRNA

TTR 유전자를 표적으로 하는 iRNA는 DNA 또는 RNA 벡터로 삽입된 전사 단위로부터 발현될 수 있다(예를 들어, 문헌[Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10]; PCT 공개 WO 00/22113(Skillern, A. 등), PCT 공개 WO 00/22114(Conrad) 및 미국 특허 제 6,054,299호(Conrad) 참조). 발현은 사용되는 특정 작제물 및 표적 조직 또는 세포 유형에 따라 일시적(약 몇 시간 내지 몇 주)이거나 지속적(몇 주 내지 몇 개월 또는 그 이상의 기간)일 수 있다. 이를 전이유전자(transgene)는 선형 작제물, 원형 플라스미드, 또는 바이러스 벡터로 도입될 수 있고, 이는 통합 벡터 또는 통합되지 않는 벡터일 수 있다. 전이유전자는 또한 염색체외 플라스미드로서 유전되는 것을 가능케 하도록 작제될 수 있다(문헌[Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 1292]).

iRNA의 개별적 가닥 또는 가닥들은 발현 벡터 상의 프로모터로부터 전사될 수 있다. 2개의 별개의 가닥이, 예를 들어, dsRNA를 발생시키도록 발현되어야 하는 경우, 2개의 별개의 발현 벡터가 표적 세포로 공동 도입(예를 들어, 형질감염(transfection) 또는 감염에 의함)될 수 있다. 대안적으로, dsRNA의 각각의 개별적 가닥은 동일 발현 플라스미드에 위치되는 두 프로모터 모두에 의해 전사될 수 있다. 일 구현예에서, dsRNA는 링커 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 연결된 역위된 반복 폴리뉴클레오타이드로 발현되어, dsRNA는 스템 및 루프 구조를 갖는

다.

[0457] iRNA 발현 벡터는 일반적으로 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터이다. 진핵생물 세포와 상용성인 발현 벡터, 바람직하게는 척추동물 세포와 상용성인 발현 벡터가 본 명세서에 기재된 바와 같은 iRNA의 발현을 위한 재조합 작제물을 생성시키는데 사용될 수 있다. 진핵생물 세포 발현 벡터는 당 분야에 널리 공지되어 있고, 이는 다수의 상업적 공급원으로부터 이용 가능하다. 통상적으로, 요망되는 핵산 세그먼트의 삽입을 위한 편리한 제한 부위를 함유하는 상기 벡터가 제공된다. iRNA 발현 벡터의 전달은 정맥내 또는 근육내 투여, 환자로부터 체외이식된 표적 세포로의 투여 후 환자로의 재도입, 또는 요망되는 표적 세포로의 도입을 가능케 하는 임의의 다른 수단에 의한 전달과 같이 전신 전달일 수 있다.

[0458] iRNA 발현 플라스미드는 양이온성 지질 담체(예를 들어, Oligofectamine) 또는 비-양이온성 지질-기반 담체(예를 들어, Transit-TKO™)와의 복합체로서 표적 세포로 형질감염될 수 있다. 1주 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 표적 RNA의 다양한 영역을 표적으로 하는 iRNA-매개 낙다운을 위한 다수의 지질 형질감염이 또한 본 발명에 의해 고려된다. 숙주 세포로의 벡터의 성공적인 도입이 다양한 공지된 방법을 이용하여 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 일시적 형질감염은 리포터, 예를 들어, 형광 마커, 예를 들어, 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)을 이용하여 신호화될 수 있다. 생체외에서의 세포의 안정적 형질감염은 특정 환경적 요인(예를 들어, 항생제 및 약물)에 대한 내성, 예를 들어, 하이그로마이신 B 내성을 갖는 형질감염된 세포를 제공하는 마커를 이용하여 보장될 수 있다.

[0459] 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물과 함께 이용될 수 있는 바이러스 벡터 시스템은 (a) 아데노바이러스 벡터; (b) 렌티바이러스 벡터, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 레트로바이러스 벡터; (c) 아데노-관련 바이러스 벡터; (d) 단순헤르페스 바이러스 벡터; (e) SV40 벡터; (f) 폴리오마 바이러스 벡터; (g) 유두종 바이러스 벡터; (h) 피코나바이러스 벡터; (i) 폭스바이러스 벡터, 예를 들어, 오르토폭스, 예를 들어, 우두 바이러스 벡터 또는 조류폭스, 예를 들어, 카나리아 발진병 또는 수두; 및 (j) 보조-의존성 또는 무기력 아데노바이러스를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 복제-불능 바이러스가 또한 유리할 수 있다. 다양한 벡터가 세포의 계놈에 통합되거나 통합되지 않을 것이다. 작제물은 요망시 형질감염을 위한 바이러스 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 작제물은 에피솜 복제 가능한 벡터, 예를 들어, EPV 및 EBV 벡터로 통합될 수 있다. iRNA의 재조합 발현을 위한 작제물은 표적 세포에서의 iRNA의 발현을 보장하기 위해 일반적으로 조절 성분, 예를 들어, 프로모터, 인핸서 등이 필요할 것이다. 벡터 및 작제물을 고려하는 다른 양태가 하기에 추가로 기재된다.

[0460] iRNA의 전달에 유용한 벡터는 요망되는 표적 세포 또는 조직에서 iRNA의 발현에 충분한 조절 성분(프로모터, 인핸서 등)을 포함할 것이다. 조절 성분은 항시성 또는 조절/유도성 발현을 제공하도록 선택될 수 있다.

[0461] iRNA의 발현은, 예를 들어, 특정 생리학적 조절인자, 예를 들어, 순환계 글루코스 수준, 또는 호르몬에 민감한 유도성 조절 서열을 이용함으로써 정밀하게 조절될 수 있다(문헌[Docherty *et al.*, 1994, FASEB J. 8:20-24]). 세포 또는 포유류에서 dsRNA 발현의 조절에 적합한 상기 유도성 발현 시스템은, 예를 들어, 엑디손(ecdyson), 에스트로겐, 프로게스테론, 테트라사이클린, 이합체화의 화학적 유도인자, 및 이소프로필- $\beta$ -D1-티오갈락토파라노시드(IPTG)에 의한 조절을 포함한다. 당업자는 iRNA 전이유전자의 의도된 용도에 기초하여 적절한 조절/프로모터 서열을 선택할 수 있을 것이다.

[0462] iRNA를 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터가 사용될 수 있다(문헌[Miller *et al.*, Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)] 참조). 이들 레트로바이러스 벡터는 바이러스 계놈의 정확한 패키징 및 숙주 세포 DNA로의 통합에 필요한 성분을 함유한다. iRNA를 인코딩하는 핵산 서열이 환자로의 핵산의 전달을 용이하게 하는 하나 이상의 벡터로 클로닝된다. 레트로바이러스 벡터에 관한 더욱 세부사항은, 예를 들어, 화학요법에 더욱 내성인 줄기세포를 제조하기 위해 조혈 줄기세포로 mdr1 유전자를 전달하기 위한 레트로바이러스 벡터의 사용을 기재하는 문헌[Boesen *et al.*, Biotherapy 6:291-302 (1994)]에서 발견될 수 있다. 유전자 요법에서의 레트로바이러스 벡터의 사용을 예시하는 다른 참조문헌은 문헌[Clowes *et al.*, J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem *et al.*, Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); 및 Grossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993)]이다. 사용에 고려되는 렌티바이러스 벡터는, 예를 들어, 참조로서 본 명세서에 포함되는 미국 특허 제 6,143,520호; 제 5,665,557호; 및 제 5,981,276호에 기재된 HIV 기반 벡터를 포함한다.

[0463] 본 발명의 iRNA의 전달에서 사용하기 위해 아데노바이러스가 또한 고려된다. 아데노바이러스는, 예를 들어, 호흡기 상피로 유전자를 전달하기 위한 특히 매력적인 비히클이다. 아데노바이러스는 호흡기 상피를 자연적으로

감염시키고, 여기서 이들은 가벼운 질병을 야기시킨다. 아데노바이러스 기반 전달 시스템에 대한 다른 표적은 간, 중추신경계, 내피 세포, 및 근육이다. 아데노바이러스는 분열하지 않는 세포를 감염시킬 수 있는 장점을 갖는다. 문헌[Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993)]에서는 아데노바이러스-기반 유전자 요법의 개관이 제시되어 있다. 문헌[Bout *et al.*, Human Gene Therapy 5:3-10 (1994)]에서는 레수스 원숭이의 호흡기 상피로 유전자를 전달하기 위한 아데노바이러스 벡터의 사용이 설명되어 있다. 유전자 요법에서의 아데노바이러스의 사용의 다른 예는 문헌[Rosenfeld *et al.*, Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli *et al.*, J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993)]; PCT 공개 W094/12649호; 및 문헌[Wang, *et al.*, Gene Therapy 2:775-783 (1995)]에서 발견될 수 있다. 본 발명에서 특정된 iRNA를 발현시키기에 적합한 AV 벡터, 재조합 AV 벡터를 삭제하기 위한 방법, 및 표적 세포로 벡터를 전달하기 위한 방법은 문헌[Xia H *et al.* (2002), Nat. Biotech. 20:1006-1010]에 기재되어 있다.

[0464] 또한, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터가 본 발명의 iRNA를 전달하기 위해 사용될 수 있다(문헌[Walsh *et al.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993)]; 미국 특허 제 5,436,146호). 일 구현예에서, iRNA는, 예를 들어, U6 또는 H1 RNA 프로모터, 또는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터를 갖는 재조합 AAV 벡터로부터의 2 개의 별개의 상보성인 단일-가닥 RNA 문자로 발현될 수 있다. 본 발명에서 특정된 dsRNA를 발현시키기에 적합한 AAV 벡터, 재조합 AV 벡터를 삭제하기 위한 방법, 및 표적 세포로 벡터를 전달하기 위한 방법은, 전체 개시내용이 참조로서 본 명세서에 포함되는 문헌[Samulski R *et al.* (1987), J. Virol. 61:3096-3101; Fisher K J *et al.* (1996), J. Virol. 70: 520-532; Samulski R *et al.* (1989), J. Virol. 63:3822-3826]; 미국 특허 제 5,252,479호; 미국 특허 제 5,139,941호; 국제 특허 출원 WO 94/13788; 및 국제 특허 출원 WO 93/24641에 기재되어 있다.

[0465] 본 발명의 iRNA의 전달에 적합한 또 다른 바이러스 벡터는 폭스 바이러스, 예를 들어, 백시니아 바이러스, 예를 들어, 약독화된 백시니아, 예를 들어, 변형된 바이러스 앙카라(Modified Virus Ankara, MVA) 또는 NYVAC, 조류 폭스, 예를 들어, 수두 또는 카나리아 발진병이다.

[0466] 바이러스 벡터의 향성(tropism)은 다른 바이러스로부터의 외피 단백질 또는 다른 표면 항원으로 벡터를 슈도타이핑(pseudotyping)시키거나, 적절한 경우 다양한 바이러스 캡시드 단백질을 치환시킴으로써 변형될 수 있다. 예를 들어, 렌티바이러스 벡터는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 광견병, 에볼라, 모콜라(Mokola) 바이러스 등으로부터의 표면 단백질로 슈도타이핑될 수 있다. AAV 벡터는 다양한 캡시드 단백질 혈청형을 발현하도록 벡터를 조작함으로써 다양한 세포를 표적화하도록 제조될 수 있으며, 예를 들어, 전체 개시내용이 참조로서 본 명세서에 포함되는 문헌[Rabinowitz J E *et al.* (2002), J Virol 76:791-801]을 참조하라.

[0467] 벡터의 약제학적 제제는 허용되는 희석제 중의 벡터를 포함할 수 있거나, 유전자 전달 비히클이 포매되는 서방형 매트릭스를 포함할 수 있다. 대안적으로, 레트로바이러스 벡터와 같은 완전한 유전자 전달 벡터가 재조합 세포로부터 온전하게 생성될 수 있는 경우, 약제학적 제제는 유전자 전달 시스템을 생성하는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다.

## VI. 본 발명의 약제학적 조성물

[0468] 또한, 본 발명은 본 발명의 iRNA를 포함하는 약제학적 조성물 및 제형을 포함한다. 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된 iRNA 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하는 약제학적 조성물이 본 명세서에 제공된다. iRNA를 함유하는 약제학적 조성물은 TTR 유전자의 발현 또는 활성화 관련된 질병 또는 장애를 치료하는데 유용하다. 이러한 약제학적 조성물은 전달 방식을 기초로 하여 제형화된다. 한 예는 비경구 전달, 예를 들어, 피하(SC) 또는 정맥내(IV) 전달을 통한 전신 투여용으로 제형화되는 조성물이다. 또 다른 예는, 예를 들어, 연속 펌프 주입에 의해 서와 같이 뇌로의 주입에 의한 뇌 실질(brain parenchyma)로의 직접 전달용으로 제형화된 조성물이다. 본 발명의 약제학적 조성물은 TTR 유전자의 발현을 억제하기에 충분한 투여량으로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 iRNA 작용제, 예를 들어, dsRNA 작용제는 피하 투여를 위해, 약제학적으로 허용 가능한 담체 중에 제형화된다.

[0469] 약제학적 조성물은 일정한 기간에 걸쳐, 예컨대 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 및 21, 22, 23, 24, 또는 약 25분의 기간에 걸쳐 정맥내 주입에 의해 투여될 수 있다. 투여는, 예를 들어 정기적 기준으로, 예를 들어 1개월, 2개월, 3개월, 4개월 이상 동안 매주, 격주(즉, 2주마다) 반복 실시될 수 있다. 투여는 또한, 예를 들어 월별 기준으로 또는 분기별 기준으로, 예를 들어 대략 12주마다 반복 실시될 수 있다. 최초 처리 일정 후, 처리는 더 적은 빈도의 기준으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 3개월 동안 매주 또는 격주로

투여 후, 투여는 6개월 또는 1년 이상 동안 1개월에 1회 반복 실시될 수 있다.

[0471] 약제학적 조성물은 매일 1회 투여되거나, iRNA는 하루 전체에 걸쳐 적절한 간격으로 2, 3, 또는 이 이상의 하위-투여량으로 투여되거나, 조절 방출 제형을 통해 연속적 주입 또는 전달을 사용하여 투여될 수 있다. 상기 경우, 각각의 하위-투여량에 함유된 iRNA는 전체 일일 투여량을 달성하기 위해 상응하게 더 적어야 한다. 투여량 단위는 또한, 예를 들어, 수일의 기간에 걸친 iRNA의 지속 방출을 제공하는 통상적인 지속 방출 제형을 이용하여 수일에 걸친 전달용으로 조성될 수 있다. 지속 방출 제형은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 이는 특정 부위에서의 작용제의 전달에 특히 유용하고, 예를 들어, 본 발명의 작용제와 함께 사용될 수 있다. 이러한 구현예에서, 투여량 단위는 상응하는 다수의 일일 투여량을 함유한다.

[0472] 다른 구현예에서, 약제학적 조성물의 단일 투여량은 길게 지속될 수 있어, 이후의 투여량은 3, 4, 또는 5일 이하의 간격, 1, 2, 3, 또는 4주 이하의 간격 또는 9, 10, 11, 또는 12주 이하의 간격으로 투여된다. 본 발명의 일부 구현예에서, 단일 투여량의 본 발명의 약제학적 조성물은 주 1회 투여된다. 본 발명의 다른 구현예에서, 단일 투여량의 본 발명의 약제학적 조성물은 2개월마다 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 단일 투여량이 월별 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 단일 투여량이 분기별 투여된다.

[0473] 당업자는 질병 또는 장애의 중증도, 이전의 치료, 대상체의 전반적 건강 및/또는 연령, 및 존재하는 다른 질병을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 특정 요인이 대상체를 효과적으로 치료하는데 필요한 투여량 및 시기에 영향을 미칠 수 있음을 인식할 것이다. 또한, 치료적 유효량의 조성물을 이용한 대상체의 치료는 단일 치료 또는 일련의 치료를 포함할 수 있다. 본 발명에 의해 포함되는 개별적 iRNA에 대한 유효 투여량 및 생체내 반감기의 측정은 통상적인 방법을 이용하거나, 본 명세서 다른 곳에 기재된 바와 같은 적절한 동물 모델을 이용한 생체내 시험을 기초로 하여 이루어질 수 있다.

[0474] 본 발명의 약제학적 조성물은 국소 또는 전신 치료가 요망되는지의 여부 및 치료되는 영역에 따라 다수의 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 국소(예를 들어, 경피 패치에 의함), 예를 들어, 분무기에 의한 흡입 또는 통기를 포함하는 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 통기에 의한 폐내; 기관내, 비내, 표피 및 경피, 경구 또는 비경구 투여일 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 피하, 복막내 또는 근육내 주사 또는 주입; 예를 들어, 이식된 장치를 통한 피하; 또는, 예를 들어, 실질내, 수막강내 또는 뇌실내 투여에 의한 두개내 투여일 수 있다.

[0475] iRNA는 간(예를 들어, 간의 간세포)과 같은 특정 조직을 표적으로 하는 방식으로 전달될 수 있다.

[0476] 국소 투여를 위한 약제학적 조성물 및 제형은 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 점액, 좌약, 스프레이, 액체 및 분말을 포함할 수 있다. 통상적인 약제학적 담체, 수성, 분말, 또는 유성 베이스(base), 중점제 등이 필요하거나 요망될 수 있다. 코팅된 콘돔, 장갑 등이 또한 유용할 수 있다. 적합한 국소 제형은 본 발명에서 특정된 iRNA가 국소 전달제, 예를 들어, 지질, 리포솜, 지방산, 지방산 에스테르, 스테로이드, 킬레이트제 및 계면활성제와 혼합되어 있는 제형을 포함한다. 적합한 지질 및 리포솜은 중성(예를 들어, 디올레오일포스파티딜 DOPE 에탄올아민, 디미리스토일포스파티딜 콜린 DMPC, 디스테아로일포스파티딜 콜린), 음성(예를 들어, 디미리스토일포스파티딜 글리세롤 DMPG) 및 양이온성(예를 들어, 디올레오일테트라메틸아미노프로필 DOTAP 및 디올레오일포스파티딜 에탄올아민 DOTMA)을 포함한다. 본 발명에서 특정된 iRNA는 리포솜 내에서 피막화될 수 있거나, 리포솜, 특히 양이온성 리포솜에 대해 복합체를 형성할 수 있다. 대안적으로, iRNA는 지질, 특히, 양이온성 지질에 대해 복합체화될 수 있다. 적합한 지방산 및 에스테르는 아라키돈산, 올레산, 에이코산산, 라우르산, 카프릴산, 카프르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 디카프레이트, 트리카프레이트, 모노올레인, 디라우린, 글리세릴 1-모노카프레이트, 1-도데실아자사이클로헵탄-2-온, 아실카르니틴, 아실콜린, 또는 C<sub>1-20</sub> 알킬 에스테르(예를 들어, 이소프로필미리스테이트 IPM), 모노글리세리드, 디글리세리드 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 국소 제형은 참조로서 본 명세서에 포함되는 미국 특허 제 6,747,014호에 상세히 기재되어 있다.

#### A. 막성 분자 조립을 포함하는 iRNA 제형

[0477] 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 iRNA는 막성 분자 조립, 예를 들어, 리포솜 또는 미셀에서의 전달을 위해 제형화될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 용어 "리포솜"은 적어도 하나의 이중층, 예를 들어, 하나의 이중층 또는 복수의 이중층으로 배열된 양친매성 지질로 구성된 소낭을 말한다. 리포솜은 친유성 물질로부터 형성된 막 및 수성 내부를 갖는 단일층 및 다중층 소낭을 포함한다. 수성 부분은 iRNA 조성물을 포함한다. 친유성 물질은 전형적으로 iRNA 조성물을 포함하지 않지만 일부 예에서는 포함할 수 있는 수성 외부로부터 수성 내부를 분

리한다. 리포솜은 작용 부위로의 활성 성분의 운반 및 전달에 유용하다. 리포솜 막이 생물학적 막과 구조적으로 유사하기 때문에, 리포솜을 조직에 적용하는 경우, 리포솜 이중층은 세포막의 이중층과 융합한다. 리포솜 및 세포의 통합이 진행됨에 따라, iRNA를 포함하는 내부 수성 내용물을 세포로 전달되며, 여기서, iRNA는 표적 RNA에 특이적으로 결합할 수 있고, iRNA를 매개할 수 있다. 일부 경우에, 리포솜은 또한 예를 들어, 특정 세포 유형으로 iRNA를 지향시키기 위해 특이적으로 표적화된다.

[0479] iRNA 작용제를 포함하는 리포솜은 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 일 예에서, 리포솜의 지질 구성성분은 세제에 용해되어, 지질 구성성분과 함께 미셀이 형성되게 한다. 예를 들어, 지질 구성성분은 양친매성 양이온성 지질 또는 지질 접합일 수 있다. 세제는 높은 임계 미셀 농도를 가질 수 있으며, 비이온성일 수 있다. 예시적인 세제에는 콜레이트, CHAPS, 옥틸글루코시드, 데옥시콜레이트 및 라우로일 사르코신이 포함된다. 그 다음, iRNA 작용제 제제를 지질 구성성분을 포함하는 미셀에 첨가한다. 지질 상의 양이온성 기는 iRNA 작용제와 상호작용하며, iRNA 작용제 주위에 축합되어 리포솜을 형성한다. 축합 후에, 세제를 예를 들어, 투석에 의해 제거하여, iRNA 작용제의 리포솜 제제를 제공한다.

[0480] 필요에 따라, 축합을 보조하는 담체 화합물은 축합 반응 동안, 예를 들어, 조절된 첨가에 의해 첨가될 수 있다. 예를 들어, 담체 화합물은 핵산 이외의 중합체(예를 들어, 스페르민 또는 스페르미딘)일 수 있다. 또한, pH는 축합을 지지하도록 조정될 수 있다.

[0481] 전달 비히클의 구조적 구성성분으로서 폴리뉴클레오타이드/양이온 지질 복합체를 통합시킨 안정한 폴리뉴클레오타이드 전달 비히클의 생성 방법은 예를 들어, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 WO 96/37194에 추가로 기재되어 있다. 리포솜 제형은 또한 문헌[Felgner, P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413-7417, 1987]; 미국 특허 제 4,897,355호; 미국 특허 제 5,171,678호; 문헌[Bangham, et al. *M. Mol. Biol.* 23:238, 1965; Olson, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 557:9, 1979; Szoka, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194, 1978; Mayhew, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984; Kim, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 728:339, 1983; 및 Fukunaga, et al. *Endocrinol.* 115:757, 1984]에 기재된 예시적인 방법의 하나 이상의 양태를 포함할 수 있다. 전달 비히클로서 사용하기에 적절한 크기의 지질 응집물을 제조하기 위해 통상적으로 사용되는 기술은 초음파분해 및 동결-해동 플러스 압출을 포함한다(예를 들어, 문헌[Mayer, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986] 참조). 일관적으로 작고(50 내지 200 nm) 상대적으로 균일한 응집물이 요망되는 경우에 미세유동화가 사용될 수 있다(문헌[Mayhew, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984]). 이들 방법은 iRNA 작용제 제제를 리포솜으로 패키징하기 위해 용이하게 조정된다.

[0482] 리포솜은 2개의 광범위한 분류로 나뉜다. 양이온성 리포솜은 음성으로 하전된 핵산 분자와 상호작용하여 안정한 복합체를 형성하는 양성으로 하전된 리포솜이다. 양성으로 하전된 핵산/리포솜 복합체는 음성으로 하전된 세포 표면에 결합하여 엔도솜에 내재화된다. 엔도솜 내의 산성 pH로 인해 리포솜이 파열하여 이들의 내용물이 세포질 내로 방출된다(문헌[Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985]).

[0483] pH-민감성이거나 음성으로 하전된 리포솜은 핵산과 복합체를 형성하기보다는 핵산을 포획한다. 핵산 및 지질은 모두 유사하게 하전되어 있으므로, 복합체 형성보다는 반발이 일어난다. 그럼에도 불구하고 일부 핵산은 이를 리포솜의 수성 내부 내에 포획된다. pH-민감성 리포솜을 이용하여 티미딘 키나아제 유전자를 인코딩하는 핵산을 배양 중인 단층 세포로 전달하였다. 외인성 유전자의 발현이 표적 세포에서 관측되었다(문헌[Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274]).

[0484] 주요 유형 중 하나의 리포솜 조성물에는 천연-유래 포스파티딜콜린 이외의 인지질이 포함된다. 중성 리포솜 조성물은, 예를 들어 디미리스토일 포스파티딜콜린(DMPC) 또는 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC)으로부터 형성될 수 있다. 음이온성 리포솜 조성물은 일반적으로 디미리스토일 포스파티딜글리세롤로부터 형성되는 반면 음이온성 융합성 리포솜은 주로 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(DOPE)으로부터 형성된다. 또 다른 유형의 리포솜 조성물은 포스파티딜콜린(PC), 예를 들어 대두 PC, 및 난(egg) PC로부터 형성된다. 또 다른 유형은 인지질 및/또는 포스파티딜콜린 및/또는 콜레스테롤의 혼합물로부터 형성된다.

[0485] 리포솜을 시험관내 및 생체내에서 세포로 도입하기 위한 다른 방법의 예에는 미국 특허 제 5,283,185호; 미국 특허 제 5,171,678호; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; 문헌[Felgner, *J. Biol. Chem.* 269:2550, 1994; Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11307, 1993; Nabel, *Human Gene Ther.* 3:649, 1992; Gershon, *Biochem.* 32:7143, 1993; 및 Strauss *EMBO J.* 11:417, 1992]이 포함된다.

[0486] 피부에 대한 약물의 전달에서의 유용성을 결정하기 위해, 비-이온성 리포솜 시스템, 특히 비-이온성 계면활성제

및 콜레스테롤을 포함하는 시스템을 또한 시험하였다. 마우스 피부의 진피로 사이클로스포린-A를 전달하기 위해 Novasome™ I(글리세릴 디라우레이트/콜레스테롤/폴리옥시에틸렌-10-스테아릴 에테르) 및 Novasome™ II(글리세릴 디스테아레이트/콜레스테롤/폴리옥시에틸렌-10-스테아릴 에테르)를 포함하는 비이온성 리포솜 제형이 이용되었다. 결과는 상기 비이온성 리포솜 시스템이 피부의 다양한 층으로의 사이클로스포린 A의 침착을 촉진하는데 효과적인 것을 나타내었다(문헌[Hu et al., S.T.P.Pharma. Sci., 1994, 4(6) 466]).

[0487] 리포솜은 또한 "입체적으로 안정화된" 리포솜을 포함하고, 본 명세서에서 사용되는 상기 용어는 리포솜으로 통합되는 경우 특화된 지질이 결핍된 리포솜에 비해 증진된 순환 수명을 발생시키는 하나 이상의 특화된 지질을 포함하는 리포솜을 나타낸다. 입체적으로 안정화된 리포솜의 예는 리포솜의 소낭-형성 지질 부분의 일부가 (A) 하나 이상의 당지질, 예를 들어, 모노시알로강글리오시드 G<sub>M1</sub>을 포함하거나, (B) 하나 이상의 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티로 유도체화된 것이다. 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 적어도 강글리오시드, 스팽고미엘린, 또는 PEG-유도체화된 지질을 함유하는 입체적으로 안정화된 리포솜에 대해, 상기 입체적으로 안정화된 리포솜의 증진된 순환 반감기는 망상내피계(RES)의 세포로의 감소된 흡수로부터 유래되는 것으로 당 분야에서 생각된다(문헌[Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765]).

[0488] 하나 이상의 당지질을 포함하는 다양한 리포솜이 당 분야에 공지되어 있다. 문헌[Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64)]에는 리포솜의 혈중 반감기를 개선시키는 모노시알로강글리오시드 G<sub>M1</sub>, 갈락토세레브로시드 슬레이트 및 포스파티딜이노시톨의 능력이 보고되어 있다. 이러한 발견은 문헌[Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949)]에 해설되어 있다. 미국 특허 제 4,837,028호 및 WO 88/04924(둘 모두 Allen 등)에는 (1) 스팽고미엘린 및 (2) 강글리오시드 G<sub>M1</sub> 또는 갈락토세레브로시드 슬레이트 에스테르를 포함하는 리포솜이 개시되어 있다. 미국 특허 제 5,543,152호(Webb 등)에는 스팽고미엘린을 포함하는 리포솜이 개시되어 있다. 1,2-sn-디미리스토일포스파티딜콜린을 포함하는 리포솜이 WO 97/13499(Lim 등)에 개시되어 있다.

[0489] 일 구현예에서, 양이온성 리포솜이 사용된다. 양이온성 리포솜은 세포막에 융합할 수 있는 이점을 갖는다. 비-양이온성 리포솜은 원형질막과 효율적으로 융합할 수 없지만, 생체내에서 대식구에 의해 취해지고, iRNA 작용제를 대식구로 전달하는데 사용될 수 있다.

[0490] 리포솜의 추가의 이점에는 다음이 포함된다: 천연 인지질로부터 수득된 리포솜은 생체적합성이며 생분해성이고; 리포솜은 광범위한 수용성 및 지용성 약물을 통합시킬 수 있고; 리포솜은 그들의 내부 구획 내의 피막화된 iRNA 작용제를 대사 및 분해로부터 보호할 수 있다(문헌[Rosoff, in "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Bunker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245]). 리포솜 제형의 제조에서의 중요한 고려사항은 리포솜의 지질 표면 전하, 소낭 크기 및 수성 용적이다.

[0491] 양성으로 하전된 합성 양이온성 지질, N-[1-(2,3-디올레이트)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA)를 사용하여 작은 리포솜을 형성할 수 있으며, 이는 핵산과 자발적으로 상호작용하여 지질-핵산 복합체를 형성하며, 지질-핵산 복합체는 조직 배양 세포의 세포막의 음성으로 하전된 지질과 융합하여, iRNA 작용제의 전달을 야기할 수 있다(예를 들어, DOTMA 및 DNA와 함께 그의 이용의 설명에 대해서는 문헌[Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987] 및 미국 특허 제 4,897,355호 참조).

[0492] DOTMA 유사체, 1,2-비스(올레오일옥시)-3-(트리메틸암모니아)프로판(DOTAP)을 인지질과 병용하여 DNA-복합체화 소낭을 형성할 수 있다. Lipofectin™(Bethesda Research Laboratories, 미국 메릴랜드주 게이더스버그 소재)은 음성으로 하전된 폴리뉴클레오타이드와 자발적으로 상호작용하여 복합체를 형성하는 양성으로 하전된 DOTMA 리포솜을 포함하는, 생 조직 배양 세포로의 고도의 음이온성 핵산의 전달을 위한 효과적인 작용제이다. 충분히 양성으로 하전된 리포솜이 사용되는 경우, 얻어진 복합체의 순전하도 또한 양성이다. 이러한 방식으로 제조된 양성으로 하전된 복합체는 음성으로 하전된 세포 표면에 자발적으로 부착되며, 원형질막과 융합되고, 기능성 핵산을 예를 들어, 조직 배양 세포로 효율적으로 전달한다. 다른 상업적으로 입수 가능한 양이온성 지질, 1,2-비스(올레오일옥시)-3,3-(트리메틸암모니아)프로판("DOTAP")(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana)은 올레오일 모이어티가 에테르 결합보다는 에스테르에 의해 연결된다는 점에서 DOTMA와 상이하다.

[0493] 다른 보고된 양이온성 지질 화합물은 예를 들어, 2개 유형의 지질 중 하나에 접합된 카복시스페르민을 포함하는 다양한 모이어티에 접합된 것들을 포함하며, 화합물, 예를 들어, 5-카복시스페르밀글리신 디옥타올레오일아미드 ("DOGS") (Transfectam™, Promega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재sconsin) 및 디팔미토일포스파티딜에탄올아민

5-카복시스페르밀-아미드("DPPES")(*예를 들어, 미국 특허 제 5,171,678호 참조*)를 포함한다.

[0494] 또 다른 양이온성 지질 접합은 DOPE와 함께 리포솜으로 제형화되는 콜레스테롤("DC-Chol")을 사용한 지질의 유도체화를 포함한다(문헌[Gao, X. and Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991] 참조). 폴리라이신을 DOPE에 접합시킴으로써 제조되는 리포폴리라이신은 혈청의 존재하의 형질감염에 효과적인 것으로 보고되었다(문헌[Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991]). 특정 세포주에 있어서, 접합된 양이온성 지질을 함유하는 이들 리포솜은 보다 낮은 독성을 나타내며, DOTMA-함유 조성물보다 더 효율적인 형질감염을 제공하는 것으로 일컬어진다. 다른 상업적으로 입수 가능한 양이온성 지질 제품은 DMRIE 및 DMRIE-HP(Vical, La Jolla, California) 및 리포펙타민(DOSPA)(Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland)을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드의 전달에 적합한 다른 양이온성 지질은 WO 98/39359 및 WO 96/37194에 기재되어 있다.

[0495] 리포솜 제형은 국소 투여에 특히 적절하며, 리포솜은 다른 제형에 대하여 몇몇 이점을 제시한다. 이러한 이점은 투여되는 약물의 높은 전신 흡수와 관련된 부작용 감소, 요망되는 표적에서의 투여된 약물의 축적 증가, 및 mRNA 작용제를 피부에 투여하는 능력을 포함한다. 일부 구현예에서 상피 세포로 mRNA 작용제를 전달하고, 또한 피부 조직, 예를 들어, 피부로의 mRNA 작용제의 침투를 증진시키기 위해 리포솜이 사용된다. 예를 들어, 리포솜은 국소 적용될 수 있다. 리포솜으로 제형화된 약물의 피부로의 국소 전달이 문서로 기록되어 있다(예를 들어, 문헌[Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2,405-410 및 du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. et al. *Gene* 56:267-276. 1987; Nicolau, C. et al. *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987] 참조).

[0496] 또한, 비-이온성 리포솜 시스템, 특히, 비-이온성 계면활성제 및 콜레스테롤을 포함하는 시스템을 시험하여, 피부로의 약물의 전달에서의 그들의 유용성을 결정하였다. Novosome I(글리세릴 디라우레이트/콜레스테롤/폴리옥시에틸렌-10-스테아릴 에테르) 및 Novosome II(글리세릴 디스테아레이트/콜레스테롤/폴리옥시에틸렌-10-스테아릴 에테르)를 포함하는 비-이온성 리포솜 제형을 사용하여 약물을 마우스 피부의 진피로 전달하였다. mRNA 작용제가 있는 이러한 제형은 피부 장애를 치료하는데 유용하다.

[0497] mRNA를 포함하는 리포솜은 고도로 변형가능하게 만들 수 있다. 이러한 변형가능성은 리포솜의 평균 반경보다 더 작은 기공을 통하여 리포솜이 침투되게 할 수 있다. 예를 들어, 트랜스퍼솜(transfersome)은 한 유형의 변형 가능한 리포솜이다. 트랜스퍼솜은 표면 가장자리-활성제(edge-activator), 보통 계면활성제를 표준 리포솜 조성물에 첨가함으로써 제조될 수 있다. mRNA 작용제를 포함하는 트랜스퍼솜은 예를 들어, 피부 내의 각질세포로 mRNA 작용제를 전달하기 위해 감염에 의해 피하 전달될 수 있다. 온전한 포유류 피부를 통과하기 위해, 지질 소낭은 적합한 경피 구배의 영향하에서 각각 50 nm 미만의 직경을 갖는 일련의 미세 기공을 통해 통과해야 한다. 또한, 지질 특성 때문에, 이들 트랜스퍼솜은 자가-최적화(예를 들어, 피부 내의 모공의 형상에 적합화), 자가-복구될 수 있으며, 단편화 없이 빈번하게 그들의 표적에 도달하고, 종종 자가-로딩(self-loading)될 수 있다.

[0498] 본 발명에 따라 처리 가능한 다른 제형이, 그 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는 PCT 공개 WO 2008/042973에 기재되어 있다.

[0499] 트랜스퍼솜은 리포솜의 또 다른 유형이며, 약물 전달 비하كل에 대한 매력적인 후보자인 고도로 변형 가능한 지질 응집물이다. 트랜스퍼솜은 이들이 비말보다 작은 기공을 통해 용이하게 침투할 수 있는 매우 고도로 변형 가능한 지질 비말로 기재될 수 있다. 트랜스퍼솜은 이들이 사용되는 환경에 적합화될 수 있고, 예를 들어, 이들은 자가-최적화(피부 내의 모공의 형상에 적합화)되고, 자가-복구되고, 종종 단편화 없이 이들의 표적에 도달하고, 종종 자가-로딩된다. 트랜스퍼솜을 제조하기 위해, 표면 가장자리-활성제, 보통 계면활성제를 표준 리포솜 조성물에 첨가하는 것이 가능하다. 피부에 혈청 알부민을 전달하기 위해 트랜스퍼솜이 사용되어 왔다. 혈청 알부민의 트랜스퍼솜-매개 전달은 혈청 알부민을 함유하는 용액의 피하 주사만큼 효과적인 것으로 밝혀졌다.

[0500] 계면활성제는 제형, 예를 들어, 에멀젼(마이크로에멀젼을 포함함) 및 리포솜에서 널리 적용된다. 천연 및 합성 물 모두의 많은 상이한 유형의 계면활성제의 특성을 분류하고 등급화시키는 가장 흔한 방식은 친수성/친유성 균형(hydrophile/lipophile balance, HLB)의 사용에 의한 것이다. 친수성기("헤드"로도 공지됨)의 특성은 제형에서 사용되는 다양한 계면활성제를 분류하기에 가장 유용한 수단을 제공한다(문헌[Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285]).

[0501] 계면활성제 문자가 이온화되지 않는 경우, 이는 비이온성 계면활성제로 분류된다. 비이온성 계면활성제는 약제

학적 및 미용 제품에 광범위하게 적용되고, 광범위한 pH 값에 걸쳐 사용 가능하다. 일반적으로, 이들의 HLB 값은 이들의 구조에 따라 2 내지 약 18의 범위이다. 비이온성 계면활성제는 비이온성 에스테르, 예를 들어, 에틸렌 글리콜 에스테르, 프로필렌 글리콜 에스테르, 글리세릴 에스테르, 폴리글리세릴 에스테르, 소르비坦 에스테르, 수크로스 에스테르, 및 에톡실화된 에스테르를 포함한다. 비이온성 알칸올아미드 및 에테르, 예를 들어, 지방 알콜 에톡실레이트, 프로폭실화된 알콜, 및 에톡실화/프로폭실화 블록 중합체가 또한 상기 부류에 포함된다. 폴리옥시에틸렌 계면활성제가 비이온성 계면활성제 부류의 가장 대중적인 일원이다.

- [0502] 계면활성제 분자가 음성 전하를 갖고, 물에 용해되거나 분산되는 경우, 계면활성제는 음이온성으로 분류된다. 음이온성 계면활성제는 카복실레이트, 예를 들어, 비누, 아실 락틸레이트, 아미노산의 아실 아미드, 황산의 에스테르, 예를 들어, 알킬 술페이트 및 에톡실화된 알킬 술페이트, 술포네이트, 예를 들어, 알킬 벤젠 술포네이트, 아실 이세티오네이트, 아실 타우레이트 및 술포석시네이트, 및 포스페이트를 포함한다. 음이온성 계면활성제 부류의 가장 중요한 일원은 알킬 술페이트 및 비누이다.
- [0503] 계면활성제 분자가 양성 전하를 갖고, 물에 용해되거나 분산되는 경우, 계면활성제는 양이온성으로 분류된다. 양이온성 계면활성제는 4차 암모늄염 및 에톡실화된 아민을 포함한다. 4차 암모늄염이 상기 부류의 가장 많이 사용되는 일원이다.
- [0504] 계면활성제 분자가 양성 또는 음성 전하를 갖는 능력을 갖는 경우, 계면활성제는 양쪽성으로 분류된다. 양쪽성 계면활성제는 아크릴산 유도체, 치환된 알킬아미드, N-알킬베타인 및 포스파타이드를 포함한다.
- [0505] 약물 제품, 제형 및 애벌견에서의 계면활성제의 사용이 개관되어 있다(문헌[Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285]).
- [0506] 또한, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 siRNA는 미셀 제형으로 제공될 수 있다. "미셀"은 양친매성 분자가 구형 구조로 배열되어, 분자의 모든 소수성 부분이 안으로 향하게 하고, 친수성 부분이 주변의 수성상과 접촉하게 하는 특정 유형의 분자 조립으로서 본 명세서에 정의되어 있다. 환경이 소수성이라면 역의 배열이 존재한다.
- [0507] 경피막을 통한 전달에 적절한 혼합 미셀 제형은, siRNA 조성물, 알칼리 금속 C<sub>8</sub> 내지 C<sub>22</sub> 알킬 술페이트 및 미셀 형성 화합물을 혼합함으로써 제조될 수 있다. 예시적인 미셀 형성 화합물에는 레시틴, 히알루론산, 히알루론산의 약제학적으로 허용되는 염, 글리콜산, 락트산, 카모마일 추출물, 오이 추출물, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 모노올레인, 모노올레이트, 모노라우레이트, 유리지치 오일, 앵초 오일의 균일물(evening of primrose oil), 메탄올, 트리하이드록시 옥소 콜라닐 글리신 및 그의 약제학적으로 허용되는 염, 글리세린, 폴리글리세린, 라이신, 폴리라이신, 트리올레인, 폴리옥시에틸렌 에테르 및 그의 유사체, 폴리도카놀 알킬 에테르 및 그의 유사체, 케노데옥시콜레이트, 데옥시콜레이트 및 이들의 혼합물이 포함된다. 미셀 형성 화합물은 알칼리 금속 알킬 술페이트의 첨가와 동시에 또는 그 이후에 첨가될 수 있다. 혼합 미셀은 실질적으로 성분들의 임의의 종류의 혼합으로, 그러나, 더 작은 크기의 미셀을 제공하기 위해서는 격렬한 혼합으로 형성될 것이다.
- [0508] 한 방법에서, siRNA 조성물 및 적어도 알칼리 금속 알킬 술페이트를 함유하는 제1 미셀 조성물을 제조한다. 그 다음, 제1 미셀 조성물을 적어도 3개의 미셀 형성 화합물과 혼합하여, 혼합 미셀 조성물을 형성한다. 다른 방법에서, 미셀 조성물은 siRNA 조성물, 알칼리 금속 알킬 술페이트 및 적어도 하나의 미셀 형성 화합물을 혼합한 다음, 격렬하게 혼합하면서 남아 있는 미셀 형성 화합물을 첨가함으로써 제조된다.
- [0509] 페놀 및/또는 m-크레솔을 혼합 미셀 조성물에 첨가하여, 제형을 안정화시키고, 박테리아 성장에 대하여 보호할 수 있다. 대안적으로, 페놀 및/또는 m-크레솔은 미셀 형성 성분과 함께 첨가될 수 있다. 또한, 등장화제(isotonic agent), 예를 들어, 글리세린은 혼합 미셀 조성물의 형성 후에 첨가될 수 있다.
- [0510] 스프레이로서의 미셀 제형의 전달을 위하여, 제형을 에어로졸 디스펜서(aerosol dispenser)에 넣을 수 있으며, 디스펜서에 추진제(propellant)를 충전한다. 추진제는 가압 하에서 디스펜서 내에 액체 형태로 존재한다. 수성상 및 추진제 상이 하나가 되도록, 즉, 하나의 상이 존재하도록 성분의 비를 조정한다. 2개의 상이 존재한다면, 예를 들어, 계량형 밸브를 통하여 내용물의 일부를 분배하기 전에 디스펜서를 진탕시키는 것이 필요하다. 약제학적 제제의 분배된 투여량은 계량형 밸브로부터 미세한 스프레이로 추진된다.
- [0511] 추진제는 수소-함유 클로로플루오로카본, 수소-함유 플루오로카본, 디메틸 에테르 및 디에틸 에테르를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, HFA 134a(1,1,1,2 테트라플루오로에탄)가 사용될 수 있다.
- [0512] 필수 성분의 특정 농도는 상대적으로 간단한 실험에 의해 결정될 수 있다. 구강을 통한 흡수에 있어서, 주사 또는 위장관을 통한 투여를 통한 흡수를 위하여 투여량을 적어도 2배 또는 3배 증가시키는 것이 종종 바람직하다.

[0513]

## B. 지질 입자

[0514]

iRNA, 예를 들어, 본 발명의 dsRNA는 지질 제형, 예를 들어, LNP 또는 다른 핵산-지질 입자에 완전히 피막화될 수 있다.

[0515]

본 명세서에서 사용되는 용어 "LNP"는 안정적인 핵산-지질 입자를 지칭한다. LNP는 통상적으로 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, 및 입자의 응집을 방지하는 지질(예를 들어, PEG-지질 접합)을 함유한다. LNP는 전신 적용에 매우 유용한데, 이는 이들이 정맥내(i.v.) 주사 후에 연장된 순환 수명을 나타내고, 원위 부위(예를 들어, 투여 부위와 신체적으로 떨어진 부위)에 축적되기 때문이다. LNP는 PCT 공개 WO 00/03683에 기재된 바와 같은 피막화된 축합 작용제-핵산 복합체를 포함하는 "pSPLP"를 포함한다. 본 발명의 입자는 통상적으로 약 50 nm 내지 약 150 nm, 더욱 통상적으로 약 60 nm 내지 약 130 nm, 더욱 통상적으로 약 70 nm 내지 약 110 nm, 가장 통상적으로 약 70 nm 내지 약 90 nm의 평균 직경을 갖고, 실질적으로 비독성이다. 또한, 본 발명의 핵산-지질 입자에 존재시 핵산은 뉴클레아제를 이용한 분해에 대해 수용액에서 내성이 있다. 핵산-지질 입자 및 이의 제조 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제 5,976,567호; 제 5,981,501호; 제 6,534,484호; 제 6,586,410호; 제 6,815,432호; 미국 특허 출원 공개 제 2010/0324120호 및 PCT 공개 WO 96/40964에 개시되어 있다.

[0516]

일 구현예에서, 지질 대 약물 비(질량/질량 비)(예를 들어, 지질 대 dsRNA 비)는 약 1:1 내지 약 50:1, 약 1:1 내지 약 25:1, 약 3:1 내지 약 15:1, 약 4:1 내지 약 10:1, 약 5:1 내지 약 9:1, 또는 약 6:1 내지 약 9:1의 범위 내일 것이다. 상기 언급된 범위의 중간의 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 고려된다.

[0517]

양이온성 지질은, 예를 들어, N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드(DDAB), N-(I-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTAP), N-(I-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), N,N-디메틸-2,3-디올레일옥시)프로필아민(DODMA), 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLenDMA), 1,2-디리놀레일카바모일옥시-3-디메틸아미노프로판(DLin-C-DAP), 1,2-디리놀레이옥시-3-(디메틸아미노)아세톡시프로판(DLin-DAC), 1,2-디리놀레이옥시-3-모르폴리노프로판(DLin-MA), 1,2-디리놀레오일-3-디메틸아미노프로판(DLinDAP), 1,2-디리놀레일티오-3-디메틸아미노프로판(DLin-S-DMA), 1-리놀레오일-2-리놀레일옥시-3-디메틸아미노프로판(DLin-2-DMAP), 1,2-디리놀레일옥시-3-트리메틸아미노프로판 클로라이드 염(DLin-TMA.C1), 1,2-디리놀레오일-3-트리메틸아미노프로판 클로라이드 염(DLin-TAP.C1), 1,2-디리놀레일옥시-3-(N-메틸페페라지노)프로판(DLin-MPZ), 또는 3-(N,N-디리놀레일아미노)-1,2-프로판디올(DLinAP), 3-(N,N-디올레일아미노)-1,2-프로판디오(DOAP), 1,2-디리놀레일옥소-3-(2-N,N-디메틸아미노)에톡시프로판(DLin-EG-DMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLinDMA), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-K-DMA) 또는 이들의 유사체, (3aR,5s,6aS)-N,N-디메틸-2,2-디((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에닐)테트라하이드로-3aH-사이클로펜타[d][1,3]디옥솔-5-아민(ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트(MC3), 1,1'-(2-(4-(2-(비스(2-하이드록시도데실)아미노)에틸)(2-하이드록시도데실)아미노)에틸)페페라진-1-일)에틸아잔디일)디도데칸-2-올(Tech G1), 또는 이들의 혼합물을 수 있다. 양이온성 지질은 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 20 mol% 내지 약 50 mol% 또는 약 40 mol%로 포함될 수 있다.

[0518]

또 다른 구현예에서, 화합물 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란이 지질-siRNA 나노입자를 제조하는데 사용될 수 있다. 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란의 합성을 참조로서 본 명세서에 포함되는 2008년 10월 23일에 출원된 미국 가특허 출원 제 61/107,998호에 기재되어 있다.

[0519]

일 구현예에서, 지질-siRNA 입자는 63.0 ± 20 nm의 입자 크기 및 0.027 siRNA/지질 비와 함께, 40%의 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란: 10%의 DSPC: 40%의 콜레스테롤: 10%의 PEG-C-DOMG(몰 퍼센트)를 포함한다.

[0520]

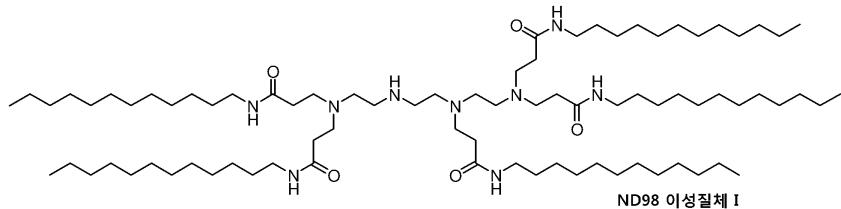
이온화가능/비-양이온성 지질은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민(POPE), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트(DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 16-0-모노메틸 PE, 16-0-디메틸 PE, 18-1-트랜스 PE, 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(SOPE), 콜레스테롤, 또는 이들의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 음이온성 지질 또는 중성 지질일 수 있다. 비-양이온성 지질은 콜레스테롤이 포함되는 경우 입자에 존재하는 전체 지질의 약 5 mol% 내지 약 90

mol%, 약 10 mol%, 또는 약 58 mol%로 존재할 수 있다.

[0521] 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질은, 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜(PEG)-지질, 비제한적인 예로, PEG-디아실글리세롤(DAG), PEG-디알킬옥시프로필(DAA), PEG-인지질, PEG-세라마이드(Cer), 또는 이들의 혼합물일 수 있다. PEG-DAA 접합은, 예를 들어, PEG-디라우릴옥시프로필( $C_{12}$ ), PEG-디미리스틸옥시프로필( $C_{14}$ ), PEG-디팔미틸옥시프로필( $C_{16}$ ), 또는 PEG-디스테아릴옥시프로필( $C_{18}$ )일 수 있다. 입자의 응집을 방지하는 접합된 지질은 입자에 존재하는 전체 지질의 0 mol% 내지 약 20 mol% 또는 약 2 mol%로 존재할 수 있다.

[0522] 일부 구현예에서, 핵산-지질 입자는, 예를 들어, 입자에 존재하는 전체 지질의 약 10 mol% 내지 약 60 mol% 또는 약 48 mol%의 콜레스테롤을 추가로 포함한다.

[0523] 일 구현예에서, 리피도이드(lipidoid) ND98 · 4HCl(MW 1487)(참조로서 본 명세서에 포함되는 2008년 3월 26일에 출원된 미국 특허 출원 제 12/056,230호 참조), 콜레스테롤(Sigma-Aldrich), 및 PEG-세라마이드 C16(Avant i Polar Lipids)이 지질-dsRNA 나노입자(즉, LNP01 입자)를 제조하는데 사용될 수 있다. 에탄올 중의 각각의 스톡 용액이 다음과 같이 제조될 수 있다: ND98, 133 mg/ml; 콜레스테롤, 25 mg/ml, PEG-세라마이드 C16, 100 mg/ml. ND98, 콜레스테롤, 및 PEG-세라마이드 C16 스톡 용액은 이후에, 예를 들어, 42:48:10의 몰 비로 조합될 수 있다. 조합된 지질 용액은, 최종 에탄올 농도가 약 35 내지 45%이고, 최종 소듐 아세테이트 농도가 약 100 내지 300 mM이 되도록 수성 dsRNA(예를 들어, 소듐 아세테이트 pH 5 중)와 혼합될 수 있다. 지질-dsRNA 나노입자는 통상적으로 혼합시에 자발적으로 형성된다. 요망되는 입자 크기 분포에 따라, 결과로서 생성된 나노입자 혼합물은, 예를 들어, 압출성형기(thermobarrel extruder), 예를 들어, Lipex Extruder(Northern Lipids, Inc.)를 이용하여 폴리카보네이트 막(예를 들어, 100 nm 컷-오프)을 통해 압출될 수 있다. 일부 경우에, 압출 단계는 생략될 수 있다. 에탄올 제거 및 동시의 완충제 교환은, 예를 들어, 투석 또는 접면 유동 여과에 의해 달성될 수 있다. 완충제는 약 pH 7, 예를 들어, 약 pH 6.9, 약 pH 7.0, 약 pH 7.1, 약 pH 7.2, 약 pH 7.3, 또는 약 pH 7.4에서, 예를 들어, 인산염 완충 염수(PBS)와 교환될 수 있다.



[0524]

[0525] LNP01 제형은 본 명세서에 참조로 포함되는 국제 특허 출원 공개 WO 2008/042973에 기재되어 있다.

[0526] 추가의 예시적인 지질-dsRNA 제형은 표 1에 기재되어 있다.

[0527]

[표 A]

| 이온화 가능한/양이온성 지질 |  | 양이온성 지질/ 비-양이온성 지질/<br>콜레스테롤/ PEG-지질 접합체 지질:siRNA<br>비               |
|-----------------|--|--|
| SNALP-1         | 1,2-덜리놀레닐옥시-N,N-<br>디메틸아미노프로판(DLinDMA)   | DLinDMA/DPPC/콜레스테롤/PEG-cDMA<br>(57.1/7.1/34.4/1.4)<br>지질:siRNA ~ 7:1 |
| 2-XTC           | 2,2-덜리놀레일-4-디메틸아미노에틸 -<br>[1,3]-디옥솔란(XTC)  | XTC/DPPC/콜레스테롤/PEG-cDMA<br>57.1/7.1/34.4/1.4<br>지질:siRNA ~ 7:1       |
| LNP05           | 2,2-덜리놀레일-4-디메틸아미노에틸 -<br>[1,3]-디옥솔란 (XTC)   | XTC/DSPC/콜레스테롤/PEG-DMG<br>57.5/7.5/31.5/3.5<br>지질:siRNA ~ 6:1        |
| LNP06           | 2,2-덜리놀레일-4-디메틸아미노에틸 -<br>[1,3]-디옥솔란 (XTC)   | XTC/DSPC/콜레스테롤/PEG-DMG<br>57.5/7.5/31.5/3.5<br>지질:siRNA ~ 11:1       |
| LNP07           | 2,2-덜리놀레일-4-디메틸아미노에틸 -<br>[1,3]- 디옥솔란 (XTC)  | XTC/DSPC/콜레스테롤/PEG-DMG<br>60/7.5/31/1.5,<br>지질:siRNA ~ 6:1           |
| LNP08           | 2,2-덜리놀레일-4-디메틸아미노에틸 -<br>[1,3]- 디옥솔란 (XTC)  | XTC/DSPC/콜레스테롤/PEG-DMG<br>60/7.5/31/1.5,<br>지질:siRNA ~ 11:1          |
| LNP09           | 2,2-덜리놀레일-4-디메틸아미노에틸 -<br>[1,3]- 디옥솔란 (XTC)  | XTC/DSPC/콜레스테롤/PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>지질:siRNA 10:1            |
| LNP10           | (3aR, 5s, 6aS)-N, N-디메틸-2, 2-디((9Z, 12<br>Z)-옥타데카-9, 12-디에닐)테트라하이드로<br>-3aH-사이클로펜타[d][1,3]디옥솔-5-아민<br>(ALN100) | ALN100/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>지질:siRNA 10:1       |
| LNP11           | (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-헵타트리아코다-6, 9, 28,<br>31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타<br>노에이트(MC3)                                 | MC-3/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>지질:siRNA 10:1         |
| LNP12           | 1, 1'-(2-(4-(2-((2-(비스(2-하이드록시도<br>페닐)아미노)에틸)(2-하이드록시도페닐)<br>아미노)에틸)페페라진-1-일)에틸아자네더<br>일)디도테칸-2-올 (Tech G1)    | Tech G1/DSPC/콜레스테롤/PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>지질:siRNA 10:1        |

[0528]

|       |         |   |
|-------|---------|---|
| LNP13 | XTC     | XTC/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>지질:siRNA: 33:1                  |
| LNP14 | MC3     | MC3/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DMG<br>40/15/40/5<br>지질:siRNA: 11:1                      |
| LNP15 | MC3     | MC3/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG<br>50/10/35/4.5/0.5<br>지질:siRNA: 11:1 |
| LNP16 | MC3     | MC3/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>지질:siRNA: 7:1                   |
| LNP17 | MC3     | MC3/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DSG<br>50/10/38.5/1.5<br>지질:siRNA: 10:1                  |
| LNP18 | MC3     | MC3/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>지질:siRNA: 12:1                  |
| LNP19 | MC3     | MC3/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DMG<br>50/10/35/5<br>Lipid:siRNA: 8:1                    |
| LNP20 | MC3     | MC3/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DPG<br>50/10/38.5/1.5<br>Lipid:siRNA: 10:1               |
| LNP21 | C12-200 | C12-200/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DSG<br>50/10/38.5/1.5<br>Lipid:siRNA: 7:1            |
| LNP22 | XTC     | XTC/DSPC/ 콜레스테롤 /PEG-DSG<br>50/10/38.5/1.5<br>Lipid:siRNA: 10:1               |

[0529]

[0530] DSPC: 디스테아로일포스파티딜콜린

[0531] DPPC: 디팔미토일포스파티딜콜린

[0532] PEG-DMG: PEG-디디미리스토일 글리세롤(C14-PEG, 또는 PEG-C14)(2000의 평균 분자량을 갖는 PEG)

[0533] PEG-DSG: PEG-디스티릴 글리세롤(C18-PEG, 또는 PEG-C18)(2000의 평균 분자량을 갖는 PEG)

[0534] PEG-cDMA: PEG-카바모일-1,2-디미리스틸옥시프로필아민(2000의 평균 분자량을 갖는 PEG)

[0535] SNALP(1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLinDMA))를 포함하는 제형이 참조로서 본 명세서에 포함되는 2009년 4월 15일에 출원된 국제 공개 WO2009/127060에 기재되어 있다.

[0536] XTC를 포함하는 제형은, 그 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는 PCT 공개 WO 2010/088537에 기재되어 있다.

[0537] MC3을 포함하는 제형은, 그 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는 것으로, 예를 들어, 2010년 6월 10일자로 출원된 미국 특허 공개 제 2010/0324120호에 기재되어 있다.

[0538] ALNY-100을 포함하는 제형은, 그 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는 PCT 공개 WO 2010/054406에 기재되어 있다.

[0539] C12-200을 포함하는 제형은, 그 전체 내용이 본 명세서에서 참조로 포함되는 PCT 공개 WO 2010/129709에 기재되어 있다.

[0540]

경구 투여를 위한 조성물 및 제형은 분말 또는 과립, 미립자, 나노입자, 물 또는 비수성 매질 중 혼탁액 또는 용액, 캡슐, 젤 캡슐, 샤ퟜ(sachet), 정제 또는 소형 정제(minitablet)를 포함한다. 중점제, 착향제, 희석제, 유화제, 분산 보조제 또는 결합체가 요망될 수 있다. 일부 구현예에서, 경구 제형은 본 발명에서 특정된 dsRNA가 하나 이상의 침투 증진제 계면활성제 및 퀄레이트제와 함께 투여되는 것이다. 적합한 계면활성제는 지방산 및/또는 이의 에스테르 또는 염, 담즙산 및/또는 이의 염을 포함한다. 적합한 담즙산/염은 케노데옥시콜산(CDCA) 및 우르소데옥시케노데옥시콜산(UDCA), 콜산, 데하이드로콜산, 데옥시콜산, 글루콜산(glucholic acid), 글리콜산(glycholic acid), 글리코데옥시콜산, 타우로콜산, 타우로데옥시콜산, 소듐 타우로-24,25-디하이드로-푸시테이트 및 소듐 글리코디하이드로푸시테이트를 포함한다. 적합한 지방산은 아라키돈산, 운데칸산, 올레산, 라우르산, 카프릴산, 카프르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 디카프레이트, 트리카프레이트, 모노올레인, 디라우린, 글리세릴 1-모노카프레이트, 1-도데실아자사이클로헵탄-2-온, 아실카르니틴, 아실콜린, 또는 모노글리세리드, 디글리세리드 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염(예를 들어, 나트륨)을 포함한다. 일부 구현예에서, 침투 증진제의 조합물, 예를 들어, 담즙산/염과 조합된 지방산/염이 사용된다. 한 예시적 조합물은 라우르산, 카프르산 및 UDCA의 소듐 염이다. 추가 침투 증진제는 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에테르를 포함한다. 본 발명에서 특정된 dsRNA는 분무되는 건조 입자를 포함하는 과립 형태로 경구 전달될 수 있거나, 복합체화되어 미립자 또는 나노입자를 형성할 수 있다. dsRNA 복합체화 작용제는 폴리-아미노산; 폴리이민; 폴리아크릴레이트; 폴리알킬아크릴레이트, 폴리옥세탄, 폴리알킬시아노아크릴레이트; 양이온화된 젤라틴, 알부민, 전분, 아크릴레이트, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 및 전분; 폴리알킬시아노아크릴레이트; DEAE-유도체화된 폴리이민, 폴리룰란(pollulan), 셀룰로스 및 전분을 포함한다. 적합한 복합체화 작용제는 키토산, N-트리메틸키토산, 폴리-L-라이신, 폴리히스티딘, 폴리오르니틴, 폴리스페르민, 프로타민, 폴리비닐피리딘, 폴리티오디에틸아미노메틸에틸렌 P(TDAE), 폴리아미노스티렌(예를 들어, p-아미노), 폴리(메틸시아노아크릴레이트), 폴리(에틸시아노아크릴레이트), 폴리(부틸시아노아크릴레이트), 폴리(이소부틸시아노아크릴레이트), 폴리(이소헥실시아노아크릴레이트), DEAE-메타크릴레이트, DEAE-헥실아크릴레이트, DEAE-아크릴아미드, DEAE-알부민 및 DEAE-덱스트란, 폴리메틸아크릴레이트, 폴리헥실아크릴레이트, 폴리(D,L-락트산), 폴리(DL-락틱-코-글리콜산(PLGA)), 알기네이트, 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 포함한다. dsRNA에 대한 경구 제형 및 이의 제조는 각각이 참조로서 본 명세서에 포함되는 미국 특허 제 6,887,906호, 미국 공개 제 20030027780호, 및 미국 특허 제 6,747,014호에 상세히 기재되어 있다.

[0541]

비경구, 실질내(뇌로의 투여), 수막강내, 뇌실내 또는 간내 투여를 위한 조성물 및 제형은 완충제, 희석제 및 다른 적합한 첨가제, 비제한적인 예로, 침투 증진제, 담체 화합물 및 다른 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 또한 함유할 수 있는 멸균 수용액을 포함할 수 있다.

[0542]

본 발명의 약제학적 조성물은, 비제한적인 예로, 용액, 에멀젼, 및 리포솜-함유 제형을 포함한다. 이들 조성물은 미리형성된 액체, 자가-유화 고체 및 자가-유화 반고체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 성분으로부터 생성될 수 있다. 간 장애, 예를 들어, 간 암종을 치료하는 경우 간을 표적으로 하는 제형이 특히 바람직하다.

[0543]

단위 투여 형태로 편리하게 제공될 수 있는 본 발명의 약제학적 제형은 제약 산업에서 널리 공지된 통상적인 기술에 따라 제조될 수 있다. 이러한 기술은 활성 성분과 약제학적 담체(들) 또는 부형제(들)를 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성 성분과 액체 담체 또는 미세하게 나누어진 고체 담체 또는 둘 모두를 균일하고 충분하게 회합시킨 후, 필요시 제품을 성형시킴으로써 제조된다.

[0544]

본 발명의 조성물은 많은 가능한 투여 형태, 비제한적인 예로, 정제, 캡슐, 젤 캡슐, 액체 시럽, 연성 젤, 좌약, 및 관장제 중 임의의 투여 형태로 제형화될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 수성, 비수성 또는 혼합된 매질의 혼탁액으로 제형화될 수 있다. 수성 혼탁액은, 예를 들어, 소듐 카복시메틸셀룰로스, 소르비톨 및/또는 덱스트란을 포함하는 혼탁액의 정도를 증가시키는 물질을 추가로 함유할 수 있다. 혼탁액은 또한 안정화제를 함유할 수 있다.

[0545]

C. 추가 제형

[0546]

i. 에멀젼

[0547]

본 발명의 조성물은 에멀젼으로 제조되고 제형화될 수 있다. 에멀젼은 통상적으로  $0.1 \mu\text{m}$  직경을 보통 초과하는 비밀 형태의 또 다른 액체에 분산된 한 액체의 이종성 시스템이다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger

and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi *et al.*, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301] 참조). 에멀젼은 종종 서로 충분히 혼합되고 분산된 2개의 비혼화성 액체 상을 포함하는 2상 시스템이다. 일반적으로, 에멀젼은 유중수(w/o) 또는 수중유(o/w) 종류일 수 있다. 수성상이 별크 유성상으로의 미세한 비밀로 미세하게 나누어지고 분산되는 경우, 생성된 조성물은 유중수(w/o) 에멀젼으로 언급된다. 대안적으로, 유성상이 별크 수성상으로의 미세한 비밀로 미세하게 나누어지고 분산되는 경우, 생성된 조성물은 수중유(o/w) 에멀젼으로 언급된다. 에멀젼은 분산된 상에 더하여 추가 성분, 및 수성상 또는 유성상 중 용액으로 제공되거나, 별개의 상으로 자체로 제공될 수 있는 활성 약물을 함유할 수 있다. 약제학적 부형제, 예를 들어, 유화제, 안정화제, 염료, 및 항산화제가 또한 필요시 에멀젼에 제공될 수 있다. 약제학적 에멀젼은 또한, 예를 들어, 유중수중유(o/w/o) 및 수중유중수(w/o/w) 에멀젼의 경우에서와 같이 2개보다 많은 상으로 구성되는 다중 에멀젼일 수 있다. 상기 복합체 제형은 종종 간단한 2원 에멀젼이 제공하지 않는 특정한 장점을 제공한다. o/w 에멀젼의 개별적 오일 비밀이 작은 물 비밀을 둘러싸는 다중 에멀젼이 w/o/w 에멀젼을 구성한다. 마찬가지로, 유성 연속 상 내에서 안정화된 물의 소구체 내에서 둘러싸인 오일 비밀의 시스템이 o/w/o 에멀젼을 제공한다.

[0548]

에멀젼은 열역학적 안정성이 거의 없거나 없는 것을 특징으로 한다. 종종, 에멀젼의 분산되거나 불연속적인 상이 외부 또는 연속 상으로 잘 분산되고, 유화제의 사용 또는 제형의 점도를 통해 상기 형태로 유지된다. 에멀젼의 상 중 어느 상이든 에멀젼-유형 연고 베이스 및 크림의 경우에서와 같이 반고체 또는 고체일 수 있다. 에멀젼을 안정화시키는 다른 수단은 에멀젼의 어느 상으로 통합될 수 있는 유화제의 사용을 수반한다. 유화제는 합성 계면활성제, 천연 유래의 유화제, 흡수 베이스, 및 미세하게 분산된 고체의 4개의 부류로 넓게 분류될 수 있다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199] 참조).

[0549]

표면활성제로도 공지된 합성 계면활성제는 에멀젼의 제형에서 광범위하게 적용되며, 이는 문헌에 개관되어 있다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199] 참조). 계면활성제는 통상적으로 양친매성이 있고, 친수성 및 소수성 부분을 포함한다. 계면활성제의 친수성 대 소수성 특성의 비는 친수성/친유성 균형(HLB)으로 명명되었으며, 이는 제형의 제조에서 계면활성제를 분류하고 선택하는데 있어서 가치있는 도구이다. 계면활성제는 친수성 기의 특성을 기초로 하여 비이온성, 음이온성, 양이온성 및 양쪽성으로 상이한 부류로 분류될 수 있다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285] 참조).

[0550]

에멀젼 제형에서 사용되는 천연 유래의 유화제는 라놀린, 밀랍, 포스파타이드, 레시틴 및 아카시아를 포함한다. 흡수 베이스는 무수 라놀린 및 친수성 페트로라툼(petrolatum)과 같이 이들이 이들의 반고체 경도를 유지하면서 w/o 에멀젼을 형성시키기 위해 물을 흡수할 수 있도록 하는 친수성 특성을 갖는다. 미세하게 나누어진 고체가 또한, 특히 계면활성제와 조합되고, 점성 제제 내에서 우수한 유화제로 사용되어 왔다. 이들은 극성 무기 고체, 예를 들어, 중금속 하이드록사이드, 비팽윤 점토, 예를 들어, 벤토나이트, 애타풀자이트(attapulgite), 헥토라이트, 카올린, 몬모릴로나이트, 콜로이드 알루미늄 실리케이트 및 콜로이드 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 안료 및 비극성 고체, 예를 들어, 탄소 또는 글리세릴 트리스테아레이트를 포함한다.

[0551]

매우 다양한 비-유화 물질이 또한 에멀젼 제형에 포함되며, 이들은 에멀젼의 특성에 기여한다. 이들은 지방, 오일, 왁스, 지방산, 지방 알콜, 지방 에스테르, 보습제, 친수성 콜로이드, 보존제 및 항산화제를 포함한다(문헌[Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and

Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199]).

[0552] 친수성 콜로이드 또는 하이드로콜로이드는 천연 유래의 검(gum) 및 합성 종합체, 예를 들어, 다당류(예를 들어, 아카시아, 아가, 알긴산, 카라기난(carrageenan), 구아 검, 카라야 검(karaya gum), 및 트래거캔쓰(tragacanth)), 셀룰로스 유도체(예를 들어, 카복시메틸셀룰로스 및 카복시프로필셀룰로스), 및 합성 종합체(예를 들어, 카보머, 셀룰로스 에테르, 및 카복시비닐 종합체)를 포함한다. 이들은 물 내에서 분산되거나 팽창하여, 분산된-상 비밀 주위에 강한 계면 필름을 형성시키고, 외부 상의 점도를 증가시킴으로써 애멸전을 안정화시키는 콜로이드 용액을 형성시킨다.

[0553] 애멸전은 종종 미생물의 성장을 용이하게 도울 수 있는 다수의 성분, 예를 들어, 탄수화물, 단백질, 스테롤 및 포스파타이드를 함유하므로, 이들 제형은 종종 보존제를 포함한다. 애멸전 제형에 포함되는 일반적으로 사용되는 보존제는 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 4차 암모늄 염, 벤즈알코늄 클로라이드, p-하이드록시벤조산의 에스테르, 및 봉산을 포함한다. 제형의 변폐를 방지하기 위해 항산화제가 또한 애멸전 제형에 일반적으로 첨가된다. 사용되는 항산화제는 자유 라디칼 제거제, 예를 들어, 토코페롤, 알킬 갈레이트, 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 또는 환원제, 예를 들어, 아스코르브산 및 소듐 메타비슬피트, 및 항산화제 상승작용제, 예를 들어, 시트르산, 타르타르산, 및 레시틴일 수 있다.

[0554] 피부, 경구 및 비경구 경로를 통한 애멸전 제형의 적용 및 이들의 제조 방법은 문헌에 개관되어 있다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199] 참조). 제형화의 용이성, 뿐만 아니라 흡수로부터의 효능 및 생체이용률의 입장으로 인해, 경구 전달을 위한 애멸전 제형이 매우 다양하게 사용되어 왔다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199] 참조). 광유 베이스 설사제, 지용성 비타민 및 고지방 영양 제제가 특히 o/w 애멸전으로서 일반적으로 경구로 투여되는 물질이다.

#### *ii. 마이크로애멸전*

[0556] 본 발명의 일 구현예에서, mRNA 및 핵산의 조성물은 마이크로애멸전으로 제형화된다. 마이크로애멸전은 단일 광학적으로 등방성이고, 열역학적으로 안정적인 액체 용액인 물, 오일 및 양친매성의 시스템으로 정의될 수 있다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245] 참조). 통상적으로, 마이크로애멸전은 먼저 계면활성제 수용액에 오일을 분산시킨 후, 충분한 양의 네 번째 성분, 일반적으로 중간 사슬-길이 알콜을 첨가하여 투명한 시스템을 형성시킴으로써 제조되는 시스템이다. 따라서, 마이크로애멸전은 또한 표면-활성 분자의 계면 필름에 의해 안정화되는 2개의 비혼화성 액체의 열역학적으로 안정적이고, 등방성의 투명한 분산액으로 기재되어 왔다(문헌[Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215]). 마이크로애멸전은 일반적으로 오일, 물, 계면활성제, 보조계면활성제 및 전해질을 포함하는 3 내지 5개의 성분의 조합을 통해 제조된다. 마이크로애멸전이 유중수(w/o) 또는 수중유(o/w) 유형인식의 여부는 사용되는 오일 및 계면활성제의 특성, 및 계면활성제 분자의 극성 헤드 및 탄화수소 꼬리의 구조 및 기하학적 패킹에 좌우된다(문헌[Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271]).

[0557] 상태도(phase diagram)를 이용한 현상학적 방법이 광범위하게 연구되었고, 마이크로애멸전을 제형화시키는 방법의 당업자에 대한 광범위한 지식을 발생시켰다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335]

참조). 통상적인 에멀젼에 비해, 마이크로에멀젼은 자발적으로 형성되는 열역학적으로 안정적인 비말의 형성에서 수-불용성 약물을 용해화시키는 장점을 제공한다.

[0558] 마이크로에멀젼의 제조에서 사용되는 계면활성제는 단독이거나 보조계면활성제와 조합된 이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, Brij 96, 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르, 폴리글리세롤 지방산 에스테르, 테트라글리세롤 모노라우레이트(ML310), 테트라글리세롤 모노올레이트(MO310), 헥사글리세롤 모노올레이트(P0310), 헥사글리세롤 펜타올레이트(P0500), 데카글리세롤 모노카프레이트(MCA750), 데카글리세롤 모노올레이트(MO750), 데카글리세롤 세퀴올레이트(S0750), 데카글리세롤 데카올레이트(DA0750)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 보조계면활성제, 보통 단쇄 알콜, 예를 들어, 에탄올, 1-프로판올, 및 1-부탄올은 계면활성제 필름으로 침투하고, 그 결과로서 계면활성제 분자 사이에서 생성된 빈 공간으로 인해 무질서한 필름을 생성시킴으로써 계면유동성을 증가시키는 작용을 한다. 그러나, 마이크로에멀젼은 보조계면활성제의 사용 없이 제조될 수 있고, 알콜을 함유하지 않는 자가-유화 마이크로에멀젼 시스템이 당 분야에 공지되어 있다. 수성상은 통상적으로 물, 약물의 수용액, 글리세롤, PEG300, PEG400, 폴리글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 에틸렌 글리콜의 유도체일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 오일상은 물질, 예를 들어, Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, 지방산 에스테르, 중간 사슬(C8-C12) 모노, 디, 및 트리-글리세리드, 폴리옥시에틸화된 글리세릴 지방산 에스테르, 지방 알콜, 폴리글리콜화된 글리세리드, 포화 폴리글리콜화된 C8-C10 글리세리드, 식물성 오일 및 실리콘 오일을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0559] 마이크로에멀젼은 약물 용해화 및 약물의 증진된 흡수의 관점으로부터 특히 흥미롭다. 웨타이드를 포함하는 약물의 경구 생체이용률을 증진시키기 위해 지질 기반 마이크로에멀젼(o/w 및 w/o 둘 모두)이 제안되었다(예를 들어, 미국 특허 제 6,191,105호; 제 7,063,860호; 제 7,070,802호; 제 7,157,099호; 문헌[Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205] 참조). 마이크로에멀젼은 개선된 약물 용해화, 효소 가수분해로부터 약물의 보호, 막 유동성 및 투과성에서의 계면활성제-유도 변화로 인한 약물 흡수의 가능한 증진, 제조의 용이성, 고체 투여 형태에 비한 경구 투여의 용이성, 개선된 임상 효능, 및 저하된 독성의 장점을 제공한다(예를 들어, 미국 특허 제 6,191,105호; 제 7,063,860호; 제 7,070,802호; 제 7,157,099호; 문헌[Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho *et al.*, J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143] 참조). 종종, 마이크로에멀젼은, 이들의 성분이 주위 온도에서 함께 모이는 경우에 자발적으로 형성될 수 있다. 이는 열불안정성 약물, 웨타이드 또는 iRNA를 제형화하는 경우에 특히 유리할 수 있다. 마이크로에멀젼은 미용 및 약제학적 적용 둘 모두에서 활성 성분의 경피 전달에서 효과적이다. 본 발명의 마이크로에멀젼 조성물 및 제형이 위장관으로부터의 iRNA 및 혼산의 증가된 전신 흡수를 촉진할 뿐만 아니라, iRNA 및 혼산의 국소 세포 흡수를 개선시킬 것이 예상된다.

[0560] 본 발명의 마이크로에멀젼은 또한 제형의 특성을 개선시키고, 본 발명의 iRNA 및 혼산의 흡수를 증진시키기 위해, 추가 성분 및 첨가제, 예를 들어, 소르비탄 모노스테아레이트(Grill 3), 라브라솔(Labrasol), 및 침투 증진제를 함유할 수 있다. 본 발명의 마이크로에멀젼에서 사용되는 침투 증진제는 5개의 광범위한 부류인 계면활성제, 지방산, 담즙산염, 퀼레이트제, 및 비-퀼레이트화 비-계면활성제 중 하나에 속하는 것으로 분류될 수 있다(문헌[Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92]). 상기 부류 각각은 하기에 논의된다.

### iii. 미립자

[0561] 본 발명의 iRNA 작용제는 입자, 예를 들어, 미립자는 분무-건조에 의해 생성될 수 있으나, 또한 동결건조, 증발, 유동층 건조, 진공 건조 또는 이를 기술의 조합을 포함하는 다른 방법에 의해 생성될 수도 있다.

### iv. 침투 증진제

[0562] 일 구현예에서, 본 발명은 동물의 피부로의 혼산, 특히 iRNA의 효과적인 전달을 달성하기 위해 다양한 침투 증진제를 이용한다. 대부분의 약물은 이온화된 형태 및 비이온화된 형태 둘 모두로 용액 중에 존재한다. 그러나, 보통 지질 용해성 또는 친유성 약물만이 세포막을 용이하게 가로지른다. 가로질러지는 막이 침투 증진제로 처리되는 경우 비-친유성 약물도 세포막을 가로지를 수 있는 것으로 밝혀졌다. 세포막을 가로지르는 비-친유성 약물의 혼산을 돋는 것에 더하여, 침투 증진제는 또한 친지질성 약물의 침투성을 증진시킨다.

[0563] 침투 증진제는 5개의 광범위한 부류, 즉, 계면활성제, 지방산, 담즙산염, 퀼레이트제, 및 비-퀼레이트화 비-계면활성제 중 하나에 속하는 것으로 분류될 수 있다(예를 들어, 문헌[Malmsten, M. Surfactants and polymers

in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92] 참조). 침투 증진제의 상기 언급된 부류 각각은 하기에 매우 상세히 기재된다.

[0566] 계면활성제(또는 "표면-활성제")는 수용액에 용해되는 경우, 점막을 통한 mRNA의 흡수가 증진되는 결과와 함께 용액의 표면 장력 또는 수용액과 또 다른 액체 사이의 계면 장력을 감소시키는 화학적 물체이다. 담즙산 염 및 지방산에 더하여, 상기 침투 증진제는, 예를 들어, 소듐 라우릴 숤페이트, 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르 및 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에테르(예를 들어, 문헌[Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92] 참조); 및 페플루오로계 에멀젼(perfluorochemical emulsions), 예를 들어, FC-43(문헌[Takahashi *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252] 참조)을 포함한다.

[0567] 침투 증진제로 작용하는 다양한 지방산 및 이들의 유도체는, 예를 들어, 올레산, 라우르산, 카프르산(n-데칸산), 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 디카프레이트, 트리카프레이트, 모노올레인 (1-모노올레오일-rac-글리세롤), 디라우린, 카프릴산, 아라키돈산, 글리세롤 1-모노카프레이트, 1-도데실아자사이클로헵坦-2-온, 아실카르니틴, 아실콜린, 이들의 C<sub>1-20</sub> 알킬 에스테르(예를 들어, 메틸, 이소프로필 및 t-부틸), 및 이들의 모노- 및 디-글리세리드(즉, 올레이트, 라우레이트, 카프레이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 리놀레이트 등)을 포함한다(예를 들어, 문헌[Touitou, E., et al. Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654] 참조).

[0568] 담즙의 생리학적 역할은 지질 및 지용성 비타민의 분산 및 흡수의 촉진을 포함한다(예를 들어, 문헌[Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935] 참조). 다양한 천연 담즙산 염, 및 이들의 합성 유도체가 침투 증진제로 작용한다. 따라서, 용어 "담즙산 염"은 담즙의 천연 유래의 성분 중 임의의 성분 뿐만 아니라 이들의 합성 유도체 중 임의의 유도체를 포함한다. 적합한 담즙산 염은, 예를 들어, 콜산(또는 이의 약제학적으로 허용되는 소듐 염, 소듐 콜레이트), 테하이드로콜산(소듐 테하이드로콜레이트), 테옥시콜산(소듐 테옥시콜레이트), 글루콜산(소듐 글루콜레이트), 글리콜산(소듐 글리코콜레이트), 글리코데옥시콜산(소듐 글리코데옥시콜레이트), 타우로콜산(소듐 타우로콜레이트), 타우로데옥시콜산(소듐 타우로데옥시콜레이트), 캐노데옥시콜산(소듐 캐노데옥시콜레이트), 우르소데옥시콜산(UDCA), 소듐 타우로-24,25-디하이드로-푸시테이트(STDHF), 소듐 글리코디하이드로푸시테이트 및 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르(POE)를 포함한다(예를 들어, 문헌[Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto *et al.*, J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita *et al.*, J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583] 참조).

[0569] 본 발명과 관련하여 사용되는 킬레이트제는 점막을 통한 mRNA의 흡수가 증진되는 결과와 함께, 용액으로부터의 금속 이온과 함께 복합체를 형성함으로써 용액으로부터의 금속 이온을 제거하는 화합물로 정의될 수 있다. 본 발명에서 침투 증진제로서의 용도와 관련하여, 킬레이트제는 대부분의 특성규명된 DNA 뉴클레이제가 촉매작용을 위해 2가 금속 이온을 필요로 하고, 이에 따라 킬레이트제에 의해 억제됨에 따라 DNase 억제제로서 또한 작용하는 추가 장점을 갖는다(문헌[Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339]). 적합한 킬레이트제는 디소듐 에틸렌디아민테트라아세테이트(EDTA), 시트르산, 살리실레이트(예를 들어, 소듐 살리실레이트, 5-메톡시살리실레이트 및 호모바닐레이트), 콜라겐의 N-아실 유도체, 라우레트-9 및 β-디케톤의 N-아미노 아실 유도체(에나민)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다(예를 들어, 문헌[Katdare, A. *et al.*, Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur *et al.*, J. Control Rel., 1990, 14, 43-51] 참조).

[0570] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 비-킬레이트화 비-계면활성제 침투 증진제 화합물은 킬레이트제 또는 계면

활성제로서 무의미한 활성을 나타내지만, 그럼에도 불구하고 소화관 점막(alimentary mucosa)을 통해 iRNA의 흡수를 증진시키는 화합물로 정의될 수 있다(예를 들어, 문헌[Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33] 참조). 이러한 부류의 침투 증진제는, 예를 들어, 불포화 사이클릭 우레아, 1-알킬- 및 1-알케닐아자사이클로-알카논 유도체(문헌[Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92]); 및 비-스테로이드 항-염증제, 예를 들어, 디클로페낙 소듐, 인도메타신 및 페닐부타존(문헌[Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626])을 포함한다.

[0571] 세포 수준에서 iRNA의 흡수를 증진시키는 작용제가 또한 본 발명의 약제학적 조성물 및 다른 조성물에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 양이온성 지질, 예를 들어, 리포펙틴(미국 특허 제 5,705,188호(Junichi 등)), 양이온성 글리세롤 유도체, 및 다가양이온성 분자, 예를 들어, 폴리라이신(PCT 출원 WO 97/30731(Lollo 등))이 또한 dsRNA의 세포 흡수를 증진시키는 것으로 공지되어 있다. 시판되는 형질감염 시약의 예는, 예를 들어, 특히 Lipofectamine™(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), Lipofectamine 2000™(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), 293fectin™(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), Cellfectin™(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), DMRIE-C™(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), FreeStyle™ MAX(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), Lipofectamine™ 2000 CD(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), Lipofectamine™(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), iRNAMAX(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), Oligofectamine™(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), Optifect™(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), X-tremeGENE Q2 형질감염 시약(Roche; 스위스 그렌차체르스트라세 소재), DOTAP 리포솜 형질감염 시약(스위스 그렌차체르스트라세 소재), DOSPER 리포솜 형질감염 시약(스위스 그렌차체르스트라세 소재), 또는 Fugene(스위스 그렌차체르스트라세 소재), Transfectam® 시약(Promega; 미국 위스콘신주 매디슨 소재), TransFast™ 형질감염 시약(Promega; 미국 위스콘신주 매디슨 소재), Tfx™-20 시약(Promega; 미국 위스콘신주 매디슨 소재), Tfx™-50 시약(Promega; 미국 위스콘신주 매디슨 소재), DreamFect™(OZ Biosciences; 프랑스 마르세유 소재), EcoTransfect(OZ Biosciences; 프랑스 마르세유 소재), TransPass<sup>a</sup> D1 형질감염 시약(New England Biolabs; 미국 매사추세츠주 임스워치 소재), LyoVec™/LipoGen™(Invivogen; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), PerFectin 형질감염 시약(Genlantis; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), NeuroPORTER 형질감염 시약(Genlantis; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), GenePORTER 형질감염 시약(Genlantis; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), GenePORTER 2 형질감염 시약(Genlantis; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), Cytofectin 형질감염 시약(Genlantis; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), BaculoPORTER 형질감염 시약(Genlantis; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), TrojanPORTER™ 형질감염 시약(Genlantis; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), RiboFect(Bioline; 미국 매사추세츠 톤턴 소재), PlasFect(Bioline; 미국 매사추세츠 톤턴 소재), UniFECTOR(B-Bridge International; 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재), SureFECTOR(B-Bridge International; 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재), 또는 HiFect™(B-Bridge International, 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재)을 포함한다.

[0572] 투여된 핵산의 침투를 증진시키기 위해 글리콜, 예를 들어, 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜, 피롤, 예를 들어, 2-피롤, 아존, 및 테르펜, 예를 들어, 리모넨 및 멘톤을 포함하는 다른 작용제가 사용될 수 있다.

#### v. 담체

[0573] 본 발명의 특정 조성물은 또한 제형 내에 담체 화합물을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 "담체 화합물" 또는 "담체"는 비활성(즉, 그 자체로 생물학적 활성을 갖지 않음)이지만, 예를 들어, 생물학적 활성 핵산을 분해시키거나, 순환계로부터 그의 제거를 촉진시킴으로써 생물학적 활성을 갖는 핵산의 생체이용률을 감소시키는 생체내 방법에 의해 핵산으로 인식되는 핵산 또는 이의 유사체를 나타낼 수 있다. 핵산 및 담체 화합물(통상적으로, 담체 화합물은 과량)의 공동투여는 추정상 공동의 수용체에 대한 담체 화합물과 핵산 사이의 경쟁으로 인해 간, 신장 또는 다른 순환계의 저장소에서 회수되는 핵산의 양의 실질적 감소를 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 간 조직에서의 부분적인 포스포로티오에이트 dsRNA의 회수는, 폴리이노신산, 텍스트란 술레이트, 폴리시타이드산(polycytidic acid) 또는 4-아세트아미도-4'이소티오시아노-스틸벤-2,2'-디솔폰산과 함께 공동투여되는 경우에 감소될 수 있다(문헌[Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183]).

#### vi. 부형제

[0576] 담체 화합물과 대조적으로, "약제학적 담체" 또는 "부형제"는 동물에게 하나 이상의 핵산을 전달하기 위한 약제학적으로 허용되는 용매, 혼탁제 또는 임의의 다른 약리학적으로 비활성인 비히클이다. 부형제는 액체이거나 고

체일 수 있고, 핵산 및 제공된 약제학적 조성물의 다른 성분과 조합되는 경우에 요망되는 벌크, 경도 등을 제공하기 위해 의도하는 계획된 투여 방식에 따라 선택된다. 통상적인 약제학적 담체는 결합제(예를 들어, 전호화 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 등); 충전제(예를 들어, 락토스 및 다른 당, 미정질 셀룰로스, 페틴, 젤라틴, 칼슘 슬레이트, 에틸 셀룰로스, 폴리아크릴레이트 또는 칼슘 하이드로겐 포스페이트 등); 윤활제(예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 활석, 실리카, 콜로이드 이산화규소, 스테아르산, 금속 스테아레이트, 수소처리된 식물성 오일, 옥수수 전분, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트 등); 봉해제(예를 들어, 전분, 소듐 전분 글리콜레이트 등); 및 습윤제(예를 들어, 소듐 라우릴 슬레이트 등)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0577] 핵산과 유해하게 반응하지 않는 비-비경구 투여에 적합한 약제학적으로 허용되는 유기 또는 무기 부형제가 또한 본 발명의 조성물을 제형화하기 위해 사용될 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체는 물, 염 용액, 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 락토스, 아밀로스, 마그네슘 스테아레이트, 활석, 규산, 점성 파라핀, 하이드록시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0578] 핵산의 국소 투여를 위한 제형은 멸균 및 비-멸균 수용액, 통상적인 용매, 예를 들어, 알콜 중 비-수성 용액, 또는 액체 또는 고체 오일 베이스 중 핵산의 용액을 포함할 수 있다. 용액은 또한 완충제, 희석제 및 다른 적합한 첨가제를 함유할 수 있다. 핵산과 유해하게 반응하지 않는 비-비경구 투여에 적합한 약제학적으로 허용되는 유기 또는 무기 부형제가 사용될 수 있다.

[0579] 적합한 약제학적으로 허용되는 부형제는 물, 염 용액, 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 락토스, 아밀로스, 마그네슘 스테아레이트, 활석, 규산, 점성 파라핀, 하이드록시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

#### vii. 기타 성분

[0581] 본 발명의 조성물은 당 분야에서 확립된 사용 수준으로 약제학적 조성물에서 통상적으로 발견되는 다른 보조 성분을 추가로 함유할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 조성물은 추가의 상용성인 약제학적으로 활성인 물질, 예를 들어, 항소양제, 수렴제, 국소 마취제 또는 항염증제를 함유할 수 있거나, 본 발명의 조성물의 다양한 투여 형태를 물리적으로 제형화시키는데 유용한 추가 물질, 예를 들어, 염료, 착향제, 보존제, 항산화제, 유백제, 증점제 및 안정화제를 함유할 수 있다. 그러나, 상기 물질은 첨가되는 경우 본 발명의 조성물의 성분의 생물학적 활성을 과도하게 방해하지 않아야 한다. 상기 제형은 멸균될 수 있고, 요망시, 제형의 핵산(들)과 유해하게 상호 작용하지 않는 보조제, 예를 들어, 윤활제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 미치는 염, 완충제, 착색제, 착향제 및/또는 방향성 물질 등과 혼합될 수 있다.

[0582] 수성 혼탁액은, 예를 들어, 소듐 카복시메틸셀룰로스, 소르비톨 및/또는 텍스트란을 포함하는 혼탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다. 혼탁액은 또한 안정화제를 함유할 수 있다.

[0583] 일부 구현예에서, 본 발명에서 특정된 약제학적 조성물은 (a) 하나 이상의 iRNA 화합물 및 (b) 비-iRNA 메커니즘에 의해 작용하며, 용혈성 장애를 치료하는데 유용한 하나 이상의 작용제를 포함한다. 상기 작용제의 예는 항염증제, 지방증 방지제(anti i-steatosis agent), 항바이러스제 및/또는 항섬유증제를 포함하나 이들에 제한되지 않는다.

[0584] 또한, 간을 보호하기 위해 통상적으로 사용되는 다른 물질, 예를 들어, 실리마린(silymarin)도 또한 본 명세서에 기재된 iRNA와 함께 사용될 수 있다. 간 질환을 치료하는데 유용한 다른 작용제에는 텔비부딘(telbivudine), 엔테카비르(entecavir) 및 프로테아제 억제제, 예를 들어, 텔라프레비르(telaprevir) 및 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 2005/0148548호, 제 2004/0167116호 및 제 2003/0144217호(Tung 등); 및 미국 특허 출원 공개 제 2004/0127488호(Hale 등)에 기재된 다른 것들이 포함된다.

[0585] 상기 화합물의 독성 및 치료 효능은, 예를 들어, LD50(집단의 50%에 치사성인 투여량) 및 ED50(집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 투여량)을 결정하기 위해 세포 배양물 또는 실험 동물에서의 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 투여량 비는 치료 지수이고, 이는 LD50/ED50 비로 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 화합물이 바람직하다.

[0586] 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 수득된 데이터가 인간에서 사용하기 위한 일정한 범위의 투여량을 제형화시키는데 사용될 수 있다. 본 명세서에 특정된 조성물의 투여량은 일반적으로 독성이 거의 없거나 없이 ED50을 포함하는 일정 범위의 순환계 농도 내에 속한다. 투여량은 이용되는 투여 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 상기 범위 내에서 다양할 수 있다. 본 발명에서 특정된 방법에서 사용되는 임의의 화합물에 대해, 치료적 유효 투

여량은 세포 배양 검정으로부터 먼저 평가될 수 있다. 투여량은 세포 배양물에서 결정되는 바와 같은 IC50(즉, 증상의 최대의 절반의 억제를 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 화합물 또는, 적절한 경우, 표적 서열의 폴리펩타이드 생성물의 순환계 혈장 농도 범위를 달성(예를 들어, 폴리펩타이드의 저하된 농도를 달성)시키도록 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 상기 정보는 인간에서 유용한 투여량을 더욱 정확히 결정하기 위해 이용될 수 있다. 혈장에서의 수준은, 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0587] 투여에 더하여, 상기 논의된 바와 같이, 본 발명에 특정된 mRNA는 TTR 발현에 의해 매개되는 병리학적 과정의 치료에 효과적인 다른 공지된 작용제와 병용 투여될 수 있다. 임의의 이벤트에서, 투여 의사는 당 분야에 공지되거나 본 명세서에 기재된 표준 효능 측정을 이용하여 관찰된 결과를 기초로 하여 mRNA 투여의 양 및 시기를 조정할 수 있다.

## VII. TTR 발현을 억제하기 위한 방법

[0589] 본 발명은 또한, 세포에서 트랜스티레틴(TTR)의 발현을 억제하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은, 세포에서 TTR의 발현을 억제하기 위한 유효량의 RNAi 작용제, 예를 들어, 이중 가닥 RNAi 작용제와 세포를 접촉시킴으로써, 세포에서 TTR의 발현을 억제하는 단계를 포함한다.

[0590] RNAi 작용제, 예를 들어, 이중 가닥 RNAi 작용제와 세포의 접촉은 시험관내 또는 생체내에서 수행될 수 있다. 생체내에서 RNAi 작용제와 세포의 접촉은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체 내의 세포 또는 세포의 그룹을 RNAi 작용제를 접촉시키는 단계를 포함한다. 세포 또는 세포의 그룹을 시험관내 및 생체내에서 접촉시키는 방법의 조합이 또한 가능하다. 세포 또는 세포의 그룹의 접촉은 전술된 바와 같이, 직접적이거나, 간접적일 수 있다. 추가로, 세포 또는 세포의 그룹의 접촉은, 본 명세서에 기재되거나, 당업계에 공지된 임의의 리간드를 포함하는 표적화 리간드를 통해 달성될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 표적화 리간드는, 대상체의 관심대상 부위, 예를 들어 간으로 RNAi 작용제를 유도하는 탄수화물 모이어티, 예를 들어, GaINAc3 리간드, 또는 임의의 다른 리간드이다.

[0591] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "억제하는"은 "감소하는", "침묵화되는", "하향조절되는", "저해되는" 및 다른 유의어와 상호 교환적으로 사용되며, 임의의 억제 수준을 포함한다. 바람직하게는, 억제는 통계적으로 유의하거나, 임상적으로 유의한 억제를 포함한다.

[0592] 어구 "TTR 발현의 억제"는 임의의 TTR 유전자(예컨대, 예를 들어, 마우스 TTR 유전자, 랫 TTR 유전자, 원숭이 TTR 유전자, 또는 인간 TTR 유전자)뿐만 아니라, TTR 유전자의 변이체 또는 돌연변이체의 발현의 억제를 지칭하는 것으로 의도된다. 따라서, TTR 유전자는, 유전적으로 조작된 세포, 세포의 그룹 또는 유기체의 맥락에서, 애생형 TTR 유전자, 돌연변이 TTR 유전자(예를 들어, 아밀로이드 침착을 유발하는 돌연변이 TTR 유전자) 또는 트랜스제닉 TTR 유전자일 수 있다.

[0593] "TTR 유전자의 발현의 억제"는 TTR 유전자의 임의의 억제 수준, 예를 들어 TTR 유전자의 발현의 적어도 부분적인 저해를 포함한다. TTR 유전자의 발현은 TTR 유전자 발현, 예를 들어, TTR mRNA 수준, TTR 단백질 수준, 또는 아밀로이드 침착의 횟수 또는 정도와 관련된 임의의 변수의 수준 또는 그 수준의 변화를 기반으로 하여 평가될 수 있다. 이러한 수준은, 예를 들어 대상체로부터 유래한 샘플을 포함하여, 개개의 세포 또는 세포의 그룹에서 평가될 수 있다.

[0594] 억제는, 대조군 수준과 비교하여, TTR 발현과 관련된 하나 이상의 변수의 절대 수준 또는 상대 수준의 저하에 의해 평가될 수 있다. 대조군 수준은, 당업계에서 사용되는 임의의 유형의 대조군 수준, 예를 들어 투여 이전의 기준치 수준 또는, 처리되지 않거나, (예를 들어, 완충액만의 대조군 또는 비활성 작용제의 대조군과 같은) 대조군에 의해 처리된 유사한 대상체, 세포 또는 샘플로부터 결정된 수준일 수 있다.

[0595] 본 발명의 방법의 일부 구현예에서, TTR 유전자의 발현은 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 분석의 검출 이하 수준만큼 억제된다. 일부 구현예에서, TTR 유전자의 발현의 억제는, 처리 전의 수준과 정상 대조군 수준 사이의 차이가 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%만큼 감소되도록 하는, TTR 유전자의 수준의 정규화를 야기한다. 일부 구현예에서, 억제는 임상적으로 적절한 억제이다.

[0596] TTR 유전자의 발현의 억제는, TTR 유전자가 전사되고, 최초 세포 또는 세포의 그룹과 실질적으로 동일하지만,

처리되지 않은 두 번째 세포 또는 세포의 그룹(대조군 세포(들))과 비교하여, TTR 유전자의 발현이 억제되도록 하기 위해, (예를 들어, 본 발명의 RNAi 작용제와 세포 또는 세포들을 접촉시킴으로써, 또는, 세포가 존재하거나, 존재하였던 대상체에 본 발명의 RNAi 작용제를 투여함으로써) 처리된 최초 세포 또는 세포의 그룹(이러한 세포는, 예를 들어 대상체로부터 유래한 샘플 중에 존재할 수 있음)에 의해 발현되는 mRNA의 양의 감소에 의해 명백해질 수 있다. 바람직한 구현예에서, 억제는 하기의 식을 사용하여, 대조군 세포에서의 mRNA의 수준의 백분율로서, 처리된 세포의 mRNA의 수준을 표시함으로써, 평가된다:

### (대조군 세포의 mRNA) - (처리된 세포의 mRNA)

• 100%

#### (대조군 세포의 mRNA)

[0597] 대안적으로, TTR 유전자의 발현의 억제는, TTR 유전자 발현, 예를 들어, TTR 단백질 발현, 레티놀 결합 단백질 수준, 비타민 A 수준, 또는 TTR을 포함한 아밀로이드 침착과 기능적으로 연계된 매개변수의 감소의 관점에서 평가될 수 있다. TTR 유전자 침묵화는 TTR을 발현하는 임의의 세포에서 구성성분에 의하거나, 게놈 엔지니어링에 의해, 그리고 당업계에 공지된 임의의 분석에 의해 결정될 수 있다. 간은 TTR 발현의 주요 부위이다. 다른 유의한 발현 부위는 맥락총, 망막 및 췌장을 포함한다.

[0598] TTR 단백질의 발현의 억제는, 세포 또는 세포의 그룹에 의해 발현되는 TTR 단백질의 수준(예를 들어, 대상체로부터 유래한 샘플 중에 발현된 단백질의 수준)의 감소에 의해 명백해질 수 있다. mRNA 저해의 평가에 대해 위에서 설명된 바와 같이, 처리된 세포 또는 세포의 그룹에서 단백질 발현 수준의 억제는 대조군 세포 또는 세포의 그룹에서 단백질 수준의 백분율로서 유사하게 표시될 수 있다.

[0599] TTR 유전자의 발현의 억제를 평가하기 위해 사용될 수 있는 대조군 세포 또는 세포의 그룹은, 본 발명의 RNAi 작용제와 아직 접촉되지 않은 세포 또는 세포의 그룹을 포함한다. 예를 들어, 대조군 세포 또는 세포의 그룹은, RNAi 작용제에 의한 대상체의 처리 이전의 개개의 대상체(예를 들어, 인간 또는 동물 대상체)로부터 유래될 수 있다.

[0600] 세포 또는 세포의 그룹에 의해 발현되는 TTR mRNA의 수준 또는 순환계의 TTR mRNA의 수준은 mRNA 발현을 평가하기 위해 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 일 구현예에서, 샘플 중 TTRDML 발현 수준은 TTR 유전자의 전사된 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 일부분, 예를 들어 mRNA를 검출함으로써, 결정된다. RNA는, 예를 들어, 폐놀산/구아닌 이소티오시아네이트 추출(RNAzol B; Biogenesis), RNeasy RNA 제조 키트(Qiagen) 또는 PAXgene(PreAnalytix, 스위스 소재)을 포함한 RNA 추출 기법을 사용하여 세포로부터 추출될 수 있다. 리보핵산 혼성화를 사용한 통상의 분석 포맷은 핵 진행 분석, RT-PCR, RNase 보호 분석(문헌[Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035]), 웨스턴 블롯, 인 시류 혼성화 및 마이크로어레이 분석을 포함한다. 순환계의 TTR mRNA는, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 PCT/US2012/043584에 기재된 방법을 사용하여 검출될 수 있다.

[0601] 일 구현예에서, TTR의 발현 수준은 핵산 프로브를 사용하여 결정된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "프로브"는, 특정 TTR과 선택적으로 결합할 수 있는 임의의 문자를 지칭한다. 프로브는 당업자에 의해 합성되거나, 적절한 생물학적 제제로부터 유래될 수 있다. 프로브는 표지되도록 특이적으로 설계될 수 있다. 프로브로서 사용될 수 있는 문자의 예는 RNA, DNA, 단백질, 항체 및 유기 문자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0602] 단리된 mRNA는, 서던 또는 노던 분석, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 분석 및 프로브 어레이를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 혼성화 또는 증폭 분석에 사용될 수 있다. mRNA 수준의 결정을 위한 한 가지 방법은, TTR mRNA와 혼성화할 수 있는 핵산 문자(프로브)와 단리된 mRNA를 접촉시키는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, mRNA는 고체 표면에 고정되고, 예를 들어 단리된 mRNA를 아가로스 겔에서 진행시키고, mRNA를 겔로부터 니트로셀룰로스와 같은 막으로 전달함으로써, 프로브와 접촉된다. 대안적 구현예에서, 프로브(들)는 고체 표면에 고정되고, mRNA는, 예를 들어, Affymetrix 유전자 칩 어레이에서 프로브(들)와 접촉된다. 당업자는 TTR mRNA의 수준의 결정에 사용하기 위한 공지된 mRNA 검출 방법을 용이하게 채용할 수 있다.

[0603] 샘플 중의 TTRDML 발현 수준을 결정하기 위한 대안적 방법은 (cDNA를 제조하기 위해) 예를 들어, RT-PCR(1987년 Mullis에 의한 미국 특허 제 4,683,202호에 제시된 실험 구현예), 리가제 연쇄 반응(문헌[Barany(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193]), 자가 지속 서열 복제(문헌[Guatelli et al.(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878]), 전사 증폭 시스템(문헌[Kwoh et al.(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177]), Q-베타 레플리카제(문헌[Lizardi et al.(1988) Bio/Technology 6:1197]), 회전 환형 복제(rolling

circle replication)(Lizardi 등의 미국 특허 제 5,854,033호) 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법 후, 당업자에 널리 공지된 기법을 사용한 증폭된 분자의 검출에 의해, 예를 들어 샘플 중의 mRNA의 핵산 증폭 및/또는 역전사 효소의 과정을 포함한다. 이러한 검출 도식은 이러한 분자가 매우 소수로 존재하는 경우의 핵산 분자의 검출에 특히 유용하다. 본 발명의 특정 양태에서, TTR의 발현 수준은 정량적 형광 RT-PCR(즉, TaqManTM System)에 의해 결정된다.

- [0605] TTR mRNA의 발현 수준은 (예를 들어, 노던, 서던, 젬 블롯 등과 같이 혼성화 분석에 사용되는) 막 블롯 또는 마이크로웰, 샘플 투브, 겔, 비드 또는 섬유(또는, 결합 핵산을 포함하는 임의의 고체 지지체)를 사용하여 모니터링할 수 있다. 본 명세서에서 참조로 포함되는 미국 특허 제 5,770,722호, 제 5,874,219호, 제 5,744,305호, 제 5,677,195호 및 제 5,445,934호를 참조한다. TTR 발현 수준의 결정은 또한 용액 중의 핵산 프로브를 사용하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0606] 바람직한 구현예에서, mRNA 발현의 수준은 분지형 DNA(bDNA) 분석 또는 실시간 PCR(qPCR)을 사용하여 평가된다. 이러한 방법의 사용은 본 명세서에 제시된 실시예에 기재되고, 예시되어 있다.
- [0607] TTR 단백질 발현의 수준은 단백질 수준의 측정을 위해 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 전기영동법, 모세관 전기영동법, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC), 과학산 크로마토그래피, 유체 또는 겔 침전 반응, 흡수 분광법, 비색 분석법, 분광 광도 분석법, 유동 세포계측법, 면역학산(단일 또는 이종), 면역전기영동법, 웨스턴 블롯, 방사성면역측정법(RIA), 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA), 면역 형광 분석법, 전기화학발광분석법 등을 포함한다.
- [0608] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법의 효능은 아밀로이드 TTR 침착에서의 감소의 검출 또는 모니터링에 의해, 모니터링할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 아밀로이드 TTR 침착의 감소는 TTR 침착의 크기, 횟수 또는 중증도의 임의의 저하 또는 대상체의 기관 또는 영역 내에 TTR 침착 형성의 예방 또는 감소를 포함하며, 이는 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여, 시험관내 또는 생체내에서 평가될 수 있는 바와 같다. 예를 들어, 아밀로이드 침착의 평가 방법 중 일부가 문헌[Gertz, M.A. & Rajukumar, S.V. (Editors) (2010), *Amyloidosis: Diagnosis and Treatment*, New York: Humana Press]에 기재되어 있다. 아밀로이드 침착의 평가 방법은 생화학적 분석뿐만 아니라, 아밀로이드 침착의 시각화 또는 컴퓨터에 의한 평가를 포함할 수 있으며, 이는, 예를 들어, 면역조직화학적 염색, 형광 표지, 광현미경, 전자현미경, 형광현미경 또는 다른 유형의 현미경을 사용하여 시각화되도록 조작되는 바와 같다. 예를 들어, CT, PET, 또는 NMR/MRI 영상화를 포함하는 침습적 또는 비침습적 영상화 방식이 아밀로이드 침착을 평가하기 위해, 사용될 수 있다.
- [0609] 본 발명의 방법은, 심장, 간, 비장, 식도, 위, 장(회장, 십이지장 및 결장), 뇌, 좌골 신경, 후근 신경절, 신장 및 망막을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 임의의 수의 조직 또는 영역에서 TTR 침착을 감소시킬 수 있다.
- [0610] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "샘플"은 대상체 내에 존재하는 유체, 세포 또는 조직뿐만 아니라, 대상체로부터 단리된 유사한 유체, 세포 또는 조직의 수집을 지칭한다. 생물학적 유체의 예는 혈액, 혈청 및 장막액, 혈장, 림프액, 소변, 뇌척수액, 타액, 눈액 등을 포함한다. 조직 샘플은 조직, 기관 또는 국소 영역으로부터의 샘플을 포함할 수 있다. 예를 들어, 샘플은 특정 기관, 기관의 일부분 또는 이들 기관 내의 유체 또는 세포로부터 유래할 수 있다. 특정 구현예에서, 샘플은 간(예를 들어, 전체 간 또는 간의 특정 절편 또는 간의 특정 유형의 세포예를 들어, 간세포), 망막 또는 망막의 일부분(예를 들어, 망막 색소 상피), 중추신경계 또는 중추신경계의 일부분(예를 들어, 뇌실 또는 맥락총), 또는 체장 또는 체장의 특정 세포 또는 일부분으로부터 유래할 수 있다. 바람직한 구현예에서, "대상체로부터 유래한 샘플"은 대상체로부터 채혈된 혈액 또는 그로부터 유래한 혈장을 지칭한다. 추가의 구현예에서, "대상체로부터 유래한 샘플"은 대상체로부터 유래한 간 조직 또는 망막 조직을 지칭한다.
- [0611] 본 발명의 방법의 일부 구현예에서, RNAi 작용제는, 이러한 RNAi 작용제가 대상체 내의 특정 부위에 전달되도록 대상체에 투여된다. TTR의 발현의 억제는 대상체 내의 특정 부위로부터의 유체 또는 조직으로부터 유래한 샘플 중의 TTR mRNA 또는 TTR 단백질 수준 또는 그 수준의 변화의 측정을 사용하여 평가될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 이러한 부위는 간, 맥락총, 망막, 및 체장으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이러한 부위는 또한 전술된 부위(예를 들어, 간세포 또는 망막 색소 상피) 중 어느 하나로부터의 세포의 하위박편 또는 하위그룹일 수 있다. 이러한 부위는 또한 특정 유형의 수용체를 발현하는 세포(예를 들어, 아시알로당단백질 수용체를 발현하는 간세포)를 포함할 수 있다.
- [0612] VIII. TTR-관련 질병을 치료하거나, 예방하기 위한 방법

- [0613] 본 발명은 대상체에서 TTR-관련 질병을 치료하거나, 예방하기 위한 방법을 또한 제공한다. 이러한 방법은 대상체에 치료적 유효량 또는 예방적 유효량의 본 발명의 RNAi 작용제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0614] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "대상체"는 동물, 예컨대 영장류(예컨대, 인간, 비인간 영장류, 예를 들어, 원숭이, 및 침팬지), 비영장류(예컨대, 소, 돼지, 낙타, 라마, 말, 염소, 토끼, 양, 햄스터, 기니피그, 고양이, 개, 랫트, 마우스, 말 및 고래) 또는 조류(예를 들어, 오리 또는 거위)를 포함하는 포유류이다. 대상체는 트랜스제닉 유기체를 포함할 수 있다.
- [0615] 일 구현예에서, 대상체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 인간, 예컨대 TTR 유전자 발현의 감소가 유리한 질병, 장애 또는 질환을 위해 치료되거나, 평가되는 인간; TTR 유전자 발현의 감소가 유리한 질병, 장애 또는 질환을 가진 인간; 및/또는 TTR 유전자 발현의 감소가 유리한 질병, 장애 또는 질환을 위해 치료되는 인간이다.
- [0616] 일부 구현예에서, 대상체는 TTR-관련 질병을 앓고 있다. 다른 구현예에서, 대상체는 TTR-관련 질병 위험이 있는 대상체, 예를 들어, TTR 관련 질병의 발병과 관련된 TTR 유전자 돌연변이를 가진 대상체(예를 들어, TTR 아밀로이드증의 발병을 시사하는 징후 또는 증상의 발생 전), TTR-관련 질병의 가족력이 있는 대상체(예를 들어, TTR 아밀로이드증의 발병을 시사하는 징후 또는 증상의 발생 전), 또는 TTR 아밀로이드증의 발병을 시사하는 징후 또는 증상을 가진 대상체이다.
- [0617] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "TTR-관련 질병"은, 피브릴 전구체가 변이체 또는 야생형 TTR 단백질로 이루어진 아밀로이드 침착의 형성에 의해 야기되거나, 그와 관련된 임의의 질병을 포함한다. 돌연변이체 및 야생형 TTR은 다양한 형태의 아밀로이드 침착(아밀로이드증)을 유발시킨다. 아밀로이드증은, 기관의 기능을 손상시키는 세포외 침착을 야기하는 잘못 접힌 단백질의 형성 및 응집을 포함한다. TTR 응집과 관련된 임상 증후군은, 예를 들어, 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA); 전신성 가족성 아밀로이드증; 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP); 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC); 및 또한 연수막 또는 뇌척수막혈관 아밀로이드증으로 인식되어 있는 연수막 아밀로이드증, 중추신경계(CNS) 아밀로이드증, 또는 아밀로이드증 VII 형을 포함한다.
- [0618] 일 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC)을 앓고 있는 대상체에 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 혼합 표현형을 갖는 FAC를 앓고 있는 대상체, 즉 심장 및 신경 손상 둘 모두를 가진 대상체에 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 혼합 표현형을 갖는 FAP를 앓고 있는 대상체, 즉 신경 및 심장 손상 둘 모두를 가진 대상체에 투여된다. 일 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는, 정위 간 이식(orthotopic liver transplantation)(OLT)에 의해 치료된 적이 있는, FAP를 앓고 있는 대상체에 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA)을 앓고 있는 대상체에 투여된다. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 가족성 아밀로이드성 심근병증(FAC) 및 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA)을 앓고 있는 대상체에 투여된다. 정상-서열 TTR은 노년층에서 심장 아밀로이드증을 야기하며, 노인성 전신성 아밀로이드증(SSA)(또한 이른바 노인성 심장 아밀로이드증(SCA) 또는 심장 아밀로이드증)으로 일컬어짐. SSA는 종종 많은 다른 기관에서 미세 침착을 수반한다. TTR 돌연변이는 TTR 아밀로이드 형성 과정을 가속화시키고, 임상적으로 유의한 TTR 아밀로이드증(또한, 이른바 ATTR(아밀로이드증-트랜스티레틴 유형))의 발병의 가장 중요한 위험 인자이다. 85개 초과의 아밀로이드성 TTR 변이체가 전신성 가족성 아밀로이드증을 야기하는 것으로 인식되어 있다.
- [0619] 본 발명의 일부 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 트랜스티레틴(TTR)-관련 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP)을 앓고 있는 대상체에 투여된다. 이러한 대상체는 안구 발현(ocular manifestation), 예컨대 유리체 혼탁 및 녹내장을 앓고 있을 수 있다. 망막 색소 상피(RPE)에 의해 합성되는 아밀로이드성 트랜스티레틴(ATR)이 안구 아밀로이드증의 진행에 중요한 역할을 한다는 것이 당업자에 인식되어 있다. 종래의 연구에 의해, RPE 세포를 감소시키는 범 망막 레이저 광응고술이 유리체에서 아밀로이드 침착의 진행을 예방하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 RPE에서의 ATTR 발현의 효과적인 저해가 안구 아밀로이드증의 신규한 치료가 될 수 있다는 것을 시사한다(예를 들어, 문헌[Kawaiji, T., et al., Ophthalmology.(2010) 117: 552-555] 참조). 본 발명의 방법은 TTR 관련 FAP, 예를 들어, 안구 아밀로이드증의 안구 발현의 치료에 유용하다. RNAi 작용제는 눈과 같은 특정 조직의 표적화에 적합한 방식으로 전달될 수 있다. 안구 전달 방식은 안구 후, 눈꺼풀 피하, 결막하, 테논 낭하(subtenon), 전방(anterior chamber) 또는 유리체내 주사(또는, 내부 주사 또는 주입)를 포함한다. 안구 전달을 위한 특정 제형은 만약 또는 연고를 포함한다.
- [0620] 또 다른 TTR-관련 질병은 또한 "이상트랜스티레틴 과티록신혈증" 또는 "이상프리알부민 과티록신혈증"으로 일컬어지는 과티록신혈증이다. 이러한 유형의 과티록신혈증은, 티록신에 대한 친화도가 증가된 돌연변이 TTR 분자로 인한 티록신과 TTR의 증가된 결합에 부수할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Moses et al.(1982) J. Clin. Invest.,

86, 2025-2033]을 참조한다.

[0621] 발명의 RNAi 작용제는 피하, 정맥내, 근육내, 안구내, 기관지내, 흉강내, 복강내, 동맥내, 림프, 뇌척수, 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 투여 방식을 사용하여 대상체에 투여될 수 있다.

[0622] 바람직한 구현예에서, 작용제는 대상체에 피하로 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체는 피하 주사, 예를 들어, 복부, 대퇴부, 또는 상박 주사를 통해 RNAi 작용제의 단일 투여량이 투여된다. 다른 구현예에서, 대상체는 피하 주사를 통해 RNAi 작용제의 분할 투여량이 투여된다. 일 구현예에서, RNAi 작용제의 분할 투여량은 대상체의 2 개의 상이한 해부학적 위치에 피하 주사를 통해 대상체에 투여된다. 예를 들어, 대상체는 우측 팔에 약 250 mg (예를 들어, 약 500 mg 투여량의 절반) 및 좌측 팔에 약 250 mg의 분할 투여량에 의해 피하 주사될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 피하 투여는, 예를 들어, 프리 필드 주사기 또는 자동-주입기 주사기를 통한 자가 투여이다. 일부 구현예에서, 피하 투여를 위한 RNAi 작용제의 투여량은, 예를 들어 1 ml 미만 또는 그와 동일한 용적의 약제학적으로 허용 가능한 담체 중에 함유된다.

[0623] 일부 구현예에서, 투여는 데포(depot) 주사를 통해 이루어진다. 데포 주사는 연장된 기간에 걸쳐 일관적인 방식으로 RNAi 작용제를 방출할 수 있다. 따라서, 데포 주사는 요망되는 효과, 예를 들어, 요망되는 TTR의 억제 또는 치료 또는 예방 효과를 얻는데 필요한 투여의 빈도를 감소시킬 수 있다. 또한, 데포 주사는 보다 일관적인 혈청 농도를 제공할 수 있다. 데포 주사는 피하 주사 또는 근육내 주사를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 데포 주사는 피하 주사이다.

[0624] 일부 구현예에서, 투여는 펌프를 통해 이루어진다. 펌프는 외부 펌프 또는 외과 이식 펌프일 수 있다. 특정 구현예에서, 펌프는 피하 이식된 삼투 펌프이다. 다른 구현예에서, 펌프는 주입 펌프이다. 주입 펌프는 정맥내, 피하, 동맥 또는 경막외 주입을 위해 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 주입 펌프는 피하 주입 펌프이다. 다른 구현예에서, 펌프는 RNAi 작용제를 간에 전달하는 외과 이식 펌프이다.

[0625] RNAi 작용제가 피하 주입 펌프를 통해 투여되는 구현예에서, RNAi 작용제의 단일 투여량은 약 45분 내지 약 5분, 예를 들어, 약 45분, 약 40분, 약 35분, 약 30분, 약 25분, 약 20분, 약 15분, 약 10분, 또는 약 5분의 기간에 걸쳐 대상체에 투여될 수 있다.

[0626] 다른 투여 방식은 경막외, 뇌내, 뇌실내, 비강 투여, 동맥내, 심장내, 뇌척수내 주입, 척추강내 및 유리체내 및 폐를 포함한다. 투여 방식은 국소 치료 또는 전신 치료가 바람직한지를 기반으로 하고, 치료할 영역을 기반으로 하여 선택될 수 있다. 투여 경로와 부위는 표적화를 증진하기 위해 선택될 수 있다.

[0627] 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 대상체 내의 세포에서 TTR 발현을 억제하기 위한 유효량으로 대상체에 투여된다. 대상체 내의 세포에서 TTR 발현을 억제하기 위한 유효량은 TTR mRNA, TTR 단백질, 또는 관련 변수, 예컨대 아밀로이드 침착의 억제의 평가를 포함하는 방법을 포함하여, 상기에서 논의된 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0628] 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 치료적 또는 예방적 유효량으로 대상체에 투여된다.

[0629] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "치료적 유효량"은, TTR 관련 질병을 치료하기 위해, 환자에 투여되는 경우, (예를 들어, 혈관 질병 또는 이러한 질병의 하나 이상의 증상을 감소시키거나, 완화하거나, 유지시킴으로써) 질병의 치료를 야기하기에 충분한 RNAi 작용제의 양을 포함하는 것으로 의도된다. "치료적 유효량"은 RNAi 작용제, 작용제의 투여 방법, 질병 및 그의 중증도 및 병력, 연령, 체중, 가족력, 유전적 구성, TTR 발현에 의해 매개되는 병리학적 과정의 단계, 존재하는 경우, 선행되었거나, 병행중인 치료의 유형, 및 치료할 환자의 다른 개별적인 특성에 따라 달라질 수 있다.

[0630] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "예방적 유효량"은 TTR 관련 질병의 증상을 경험하거나, 나타내지는 않았으나, 이러한 질병에 걸리기 쉬운 대상체에 투여되는 경우, 이러한 질병 또는 이러한 질병의 하나 이상의 증상을 예방하거나 완화하기에 충분한 RNAi 작용제의 양을 포함하도록 의도된다. 완화될 수 있는 증상은 감각 신경병증(예를 들어, 말초 사지 이상감각, 감각감퇴), 자율 신경병증(예를 들어, 위장 기능장애, 예컨대 위궤양, 또는 기립성 저혈압), 운동 신경병증, 발작, 치매, 골수 병증, 다발신경병증, 수근관 증후군, 자율신경 부전, 심근병증, 유리체 혼탁, 신부전, 신장병, 현저히 감소된 mBMI(변형된 체질량지수), 뇌신경 기능장애, 및 각막 격자 이상증을 포함한다. 질병의 완화는 이러한 질병의 과정의 지연 또는 후기에 발병하는 질병의 중증도의 감소를 포함한다. "예방적 유효량"은 RNAi 작용제, 작용제의 투여 방법, 질병 위험의 정도 및 병력, 연령, 체중, 가족력, 유전적 구성, 존재하는 경우, 선행되었거나, 병행중인 치료의 유형, 및 치료할 환자의 다른 개별

적인 특성에 따라 달라질 수 있다.

[0631] "치료적 유효량" 또는 "예방적 유효량"은 또한, 임의의 치료에 적용할 수 있는 합리적인 이익/위험 비로 일부 요망되는 국소 또는 전신 효과를 생성하는 RNAi 작용제의 양을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용되는 RNAi 작용제는 이러한 치료에 적용 가능한 합리적인 이익/위험 비를 생성하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다.

[0632] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "치료적 유효량" 및 "예방적 유효량"은 또한 TTR 발현에 의해 매개되는 병리학적 과정 또는 이러한 병리학적 과정의 증상(들)의 치료, 예방 또는 관리에서의 이익을 제공하는 양을 포함한다. TTR 아밀로이드증의 증상은 감각 신경병증(예를 들어, 말초 사지 이상감각, 감각감퇴), 자율 신경병증(예를 들어, 위장 기능장애, 예컨대 위궤양, 또는 기립성 저혈압), 운동 신경병증, 발작, 치매, 골수 병증, 다발신경병증, 수근관 증후군, 자율신경부전, 심근병증, 유리체 혼탁, 신부전, 신장병, 현저히 감소된 mBMI(변형된 체질량지수), 뇌신경 기능장애, 및 각막 격자 이상증을 포함한다.

[0633] 일 구현예에서, 예를 들어, 대상체가 FAP, 혼합 표현형을 갖는 FAP, 혼합 표현형을 갖는 FAC 또는 FAP를 가지며, OLT를 갖는 경우, 본 발명의 dsRNA 작용제에 의한 대상체의 치료는 신경병증의 진행을 지연시킨다. 또 다른 구현예에서, 예를 들어, 대상체가 has FAP, 혼합 표현형을 갖는 FAP, 혼합 표현형을 갖는 FAC, SSA, 또는 FAP를 가지고, OLT를 갖는 경우, 본 발명의 dsRNA 작용제에 의한 대상체의 치료는 신경병증 및 심근병증의 진행을 지연시킨다.

[0634] 예를 들어, 일 구현예에서, 본 발명은 신경 손상을 지연시키거나, 감소시키거나, 저지시킨다. 신경 손상의 임의의 적합한 측정법은, 대상체가 감소되거나, 저연되거나, 저지된 신경 손상을 갖는지를 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0635] 하나의 적합한 측정법은 신경병성 손상 점수(NIS)이다. NIS는, 특히 말초 신경병증과 관련된 약화, 감각 및 반사작용을 측정하는 점수화 시스템을 지칭한다. NIS 점수는 약화의 경우 근육의 표준 그룹(1은 25% 약화이고, 2는 50% 약화이며, 3은 75% 약화이고, 3.25는 중력 반대 운동이고, 3.5는 중력 제거 운동이고, 3.75는 비운동시 근육 실룩거림이며, 4는 마비임), 근육 스트레칭 반사작용의 표준 그룹(0은 정상이고, 1은 저하이며, 2는 부재임) 및 촉각-압력, 진동, 관절 위치 및 움직임 및 핀 긁기(pinprick)(모두 검지 및 엄지 발가락에서 등급화됨: 0은 정상이고, 1은 저하이며, 2는 부재임)를 평가한다. 평가는 연령, 성별 및 체력에 대해 보정된다.

[0636] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 NIS를 적어도 10%만큼 감소시킨다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 또는 적어도 50%만큼의 NIS의 감소를 야기한다. 다른 구현예에서, 이러한 방법은 NIS 점수의 증가를 저지하며, 예를 들어, 이러한 방법은 NIS 점수의 0% 증가를 야기한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 NIS 점수가 증가하는 비율, 예를 들어, 본 발명의 RNAi 작용제에 의해 치료되지 않은 대상체에서의 NIS 점수의 증가율과 비교하여, 본 발명의 RNAi 작용제에 의해 치료된 대상체에서의 NIS 점수의 증가율을 지연시킨다.

[0637] 인간 대상체에서 NIS의 결정 방법은 당업자에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌[Dyck, PJ et al., (1997) Neurology 1997. 49(1): pgs. 229-239]; Dyck PJ.(1988) Muscle Nerve. Jan; 11(1):21-32]에서 찾아볼 수 있다.

[0638] 신경 손상의 또 다른 적합한 측정법은 변형된 신경병성 손상 점수(mNIS+7)이다. 당업자에 공지된 바와 같이, mNIS+7은 작고 큰 신경 섬유 기능(NCS 및 QST)의 전기생리학적 측정 및 자율 기능(자세에 따른 혈압)의 측정과 조합된 신경 손상(NIS)의 임상 시험 기반 평가를 지칭한다. mNIS+7 점수는 NIS+7 점수(NIS와 7가지 시험을 나타냄)의 변형이다. NIS+7은 약화 및 근육 스트레칭 반사작용을 분석한다. 7가지 시험 중 5가지 시험은 신경 전도의 특성을 포함한다. 이러한 특성은 비골 신경 복합 근육 활동 전위 진폭(peroneal nerve compound muscle action potential amplitude), 운동 신경 전도 속도 및 운동 신경 원위 잠복(MNDL), 경골 MNDL 및 비복 감각 신경 활동 전위 진폭(sural sensory nerve action potential amplitude)이다. 이 값은 연령, 성별, 신장 및 체중의 변수에 대해 보정된다. 7가지 검사 중 나머지 2가지 시험은 깊은 호흡에 대한 진동감각 역치와 심박수 저하를 포함한다.

[0639] mNIS+7 점수는 신규한 자율 평가인 스마트 체성감각 정량적 감각 시험(Smart Somatosensory Quantitative Sensation Testing)의 사용 및 척골 신경, 비골 신경 및 경골 신경의 진폭의 복합 근육 활동 전위 및 척골 신경 및 비복 신경의 감각 신경 활동 전위의 사용을 고려하여, NIS+7를 변형시킨다(문헌[Suanprasert, N. et al., (2014) J. Neurol. Sci., 344(1-2): pgs. 121-128]).

[0640] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 mNIS+7를 적어도 10%만큼 감소시킨다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 적

어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 또는 적어도 50%만큼의 mNIS+7 점수의 감소를 야기한다. 다른 구현예에서, 이러한 방법은 mNIS+7의 증가를 저지하며, 예를 들어, 이러한 방법은 mNIS+7의 0% 증가를 야기한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 NIS+7 점수가 증가하는 비율, 예를 들어, 본 발명의 RNAi 작용제에 의해 치료되지 않은 대상체에서의 NIS+7 점수의 증가율과 비교하여, 본 발명의 RNAi 작용제에 의해 치료된 대상체에서의 NIS+7 점수의 증가율을 지연시킨다.

[0641] 본 발명의 치료적 방법 및 예방적 방법은 또한, 치료되는 대상체에서 보행 능력과 같은 다른 임상적 매개변수를 개선시킬 수 있다. 예를 들어, 치료 기간 동안 또는 그 후에, 대상체는 증가된 운동 능력 또는 활성을 가질 수 있다.

[0642] 대상체가 증가된 운동 능력 또는 활성을 가지는지를 결정하기 위해, 운동 능력의 임의의 적합한 측정법이 사용될 수 있다. 하나의 적합한 측정법은, 대상체가 6분 동안 얼마나 보행할 수 있는지, 즉 6-분 보행 거리(6MWD)를 측정하는 6-분 보행 시험(6MWT)이다. 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 6MWD에서 기준치로부터 적어도 약 10분, 예를 들어, 약 10, 15, 20, 또는 약 30분만큼의 증가를 대상체에 제공한다.

[0643] 본 발명의 RNAi 작용제의 치료적 유효량 및 예방적 유효량은 또한, 기준치 대비 하나 이상의 삶의 질 매개변수, 예를 들어 SF-36® 건강상태 조사 기능성 척도 중 적어도 하나의 점수의 증가; 및/또는 증가된 수명; 및/또는 입원 기간의 저하를 개선시키는 양을 포함한다.

[0644] 삶의 질의 임의의 적합한 측정법이 사용될 수 있다. 예를 들어, SF-36® 건강상태 조사는 자체 보고, 8종의 건강상 매개변수를 측정하는 다항목 척도를 제공한다: 신체 기능, 신체 건강상 문제로 인한 역할 제한, 신체 통증, 일반적 건강 상태, 활력(에너지 및 피로), 사회적 기능, 감정상 문제로 인한 역할 제한 및 정신 건강(심리적 고통 및 심리적 안녕). 이러한 조사는 또한 신체적 성분 요약 및 정신적 성분 요약 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 적어도 하나의 SF-36 신체적 건강상태 관련 매개변수(신체적 건강상태, 역할-신체적, 신체 통증 및/또는 일반적 건강상태) 및/또는 적어도 하나의 SF-36 정신적 건강상태 관련 매개변수(활력, 사회적 기능, 역할-감정상 및/또는 정신적 건강상태)에서 기준치에 대비한 개선을 대상체에 제공한다. 이러한 개선은 어느 하나 이상의 매개변수에 대한 점수에서 적어도 1, 예를 들어 적어도 2 또는 적어도 3 포인트의 증가의 형태를 취할 수 있다.

[0645] 본 발명의 방법은 치료되는 대상체의 예후를 개선할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 치료 기간 동안 임상적 악화 이벤트의 가능성의 감소를 대상체에 제공할 수 있다.

[0646] 대상체에 투여되는 RNAi 작용제의 투여량은, 예를 들어 요망되는 수준의 TTR 유전자 저해(예를 들어, 상기에서 정의된 바와 같은 TTR mRNA 저해, TTR 단백질 발현, 또는 아밀로이드 침착의 감소를 기반으로 평가되는 바와 같음) 또는 요망되는 치료적 또는 예방적 효과를 달성하고, 동시에 바람직하지 않은 유해 효과를 피하기 위해, 특정 투여량의 위험과 이익의 균형이 유지되도록, 조정될 수 있다.

[0647] 일 구현예에서, 본 발명의 iRNA 작용제는 중량-기반 투여량으로서 대상체에 투여된다. "중량-기반 투여량"(예를 들어, mg/kg 단위의 투여량)은, 대상체의 중량에 따라 변화될 것인 iRNA 작용제의 투여량이다. 또 다른 구현예에서, iRNA 작용제는 고정 투여량으로서 대상체에 투여된다. "고정 투여량"(예를 들어, mg 단위의 투여량)은, 임의의 특정 대상체-관련 인자, 예를 들어 중량에 상관없이, 모든 대상체에 사용되는 iRNA 작용제의 하나의 투여량을 의미한다. 특정의 일 구현예에서, 본 발명의 iRNA 작용제의 고정 투여량은 소정의 중량 또는 연령을 기반으로 한다.

[0648] 대상체는 iRNA의 치료량, 예컨대 약 0.01 mg/kg, 0.02 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.04 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.15 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.35 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.45 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.55 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.65 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.75 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.85 mg/kg, 0.9 mg/kg, 0.95 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.25 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.6 mg/kg, 1.7 mg/kg, 1.8 mg/kg, 1.9 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.1 mg/kg, 2.2 mg/kg, 2.3 mg/kg, 2.4 mg/kg, 2.5 mg/kg dsRNA, 2.6 mg/kg dsRNA, 2.7 mg/kg dsRNA, 2.8 mg/kg dsRNA, 2.9 mg/kg dsRNA, 3.0 mg/kg dsRNA, 3.1 mg/kg dsRNA, 3.2 mg/kg dsRNA, 3.3 mg/kg dsRNA, 3.4 mg/kg dsRNA, 3.5 mg/kg dsRNA, 3.6 mg/kg dsRNA, 3.7 mg/kg dsRNA, 3.8 mg/kg dsRNA, 3.9 mg/kg dsRNA, 4.0 mg/kg dsRNA, 4.1 mg/kg dsRNA, 4.2 mg/kg dsRNA, 4.3 mg/kg dsRNA, 4.4 mg/kg dsRNA, 4.5 mg/kg dsRNA, 4.6 mg/kg dsRNA, 4.7 mg/kg dsRNA, 4.8 mg/kg dsRNA, 4.9 mg/kg dsRNA, 5.0 mg/kg dsRNA, 5.1 mg/kg dsRNA, 5.2 mg/kg dsRNA, 5.3 mg/kg dsRNA, 5.4 mg/kg dsRNA, 5.5 mg/kg dsRNA, 5.6 mg/kg dsRNA, 5.7 mg/kg dsRNA, 5.8 mg/kg dsRNA, 5.9 mg/kg dsRNA, 6.0 mg/kg dsRNA, 6.1 mg/kg dsRNA,

6.2 mg/kg dsRNA, 6.3 mg/kg dsRNA, 6.4 mg/kg dsRNA, 6.5 mg/kg dsRNA, 6.6 mg/kg dsRNA, 6.7 mg/kg dsRNA, 6.8 mg/kg dsRNA, 6.9 mg/kg dsRNA, 7.0 mg/kg dsRNA, 7.1 mg/kg dsRNA, 7.2 mg/kg dsRNA, 7.3 mg/kg dsRNA, 7.4 mg/kg dsRNA, 7.5 mg/kg dsRNA, 7.6 mg/kg dsRNA, 7.7 mg/kg dsRNA, 7.8 mg/kg dsRNA, 7.9 mg/kg dsRNA, 8.0 mg/kg dsRNA, 8.1 mg/kg dsRNA, 8.2 mg/kg dsRNA, 8.3 mg/kg dsRNA, 8.4 mg/kg dsRNA, 8.5 mg/kg dsRNA, 8.6 mg/kg dsRNA, 8.7 mg/kg dsRNA, 8.8 mg/kg dsRNA, 8.9 mg/kg dsRNA, 9.0 mg/kg dsRNA, 9.1 mg/kg dsRNA, 9.2 mg/kg dsRNA, 9.3 mg/kg dsRNA, 9.4 mg/kg dsRNA, 9.5 mg/kg dsRNA, 9.6 mg/kg dsRNA, 9.7 mg/kg dsRNA, 9.8 mg/kg dsRNA, 9.9 mg/kg dsRNA, 9.0 mg/kg dsRNA, 10 mg/kg dsRNA, 15 mg/kg dsRNA, 20 mg/kg dsRNA, 25 mg/kg dsRNA, 30 mg/kg dsRNA, 35 mg/kg dsRNA, 40 mg/kg dsRNA, 45 mg/kg dsRNA, 또는 약 50 mg/kg dsRNA가 투여될 수 있다. 열거된 값에 대한 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.

[0649] 특정 구현예에서, 예를 들어, 본 발명의 조성물이 본 명세서에 기재된 바와 같은 dsRNA 및 지질을 포함하는 경우, 대상체는 mRNA의 치료량, 예컨대 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.05 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.2 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.2 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.4 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.4 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 1.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 3.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 3.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 4 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 4 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 4.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 4.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 5.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 6.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 7 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 7.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 8 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 8.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 9 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 9.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg이 투여될 수 있다. 열거된 값에 대한 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.

[0650] 예를 들어, dsRNA는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 또는 약 10 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있다. 열거된 값에 대한 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.

[0651] 일부 구현예에서, 예를 들어, 본 발명의 조성물이 본 명세서에 기재된 바와 같은 dsRNA 및 N-아세틸갈락토사민을 포함하는 경우, 대상체는 mRNA의 치료량, 예컨대 약 0.01 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.05 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.15 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.2 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.2 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.4 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.4 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.6 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1.25 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 1.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 1.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 2.5 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 3.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 4 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 4.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 5.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 6.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 7 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 7.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 8 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 8.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 9 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 9.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg이 투여될 수 있다. 열거된 값에 대한 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.

[0652] 예를 들어, dsRNA는 약 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.25, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6,

5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 또는 약 10 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있다. 열거된 값에 대한 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.

[0653]

다른 구현예에서, 예를 들어, 본 발명의 조성물이 본 명세서에 기재된 바와 같은 dsRNA 및 N-아세틸갈락토사민을 포함하는 경우, 대상체는 iRNA의 치료량, 예컨대 약 0.1 내지 약 50 mg/kg, 약 0.25 내지 약 50 mg/kg, 약 0.5 내지 약 50 mg/kg, 약 0.75 내지 약 50 mg/kg, 약 1 내지 약 50 mg/kg, 약 1.5 내지 약 50 mg/kg, 약 2 내지 약 50 mg/kg, 약 2.5 내지 약 50 mg/kg, 약 3 내지 약 50 mg/kg, 약 3.5 내지 약 50 mg/kg, 약 4 내지 약 50 mg/kg, 약 4.5 내지 약 50 mg/kg, 약 5 내지 약 50 mg/kg, 약 7.5 내지 약 50 mg/kg, 약 10 내지 약 50 mg/kg, 약 15 내지 약 50 mg/kg, 약 20 내지 약 50 mg/kg, 약 20 내지 약 50 mg/kg, 약 25 내지 약 50 mg/kg, 약 30 내지 약 50 mg/kg, 약 35 내지 약 50 mg/kg, 약 40 내지 약 50 mg/kg, 약 45 내지 약 50 mg/kg, 약 0.1 내지 약 45 mg/kg, 약 0.25 내지 약 45 mg/kg, 약 0.5 내지 약 45 mg/kg, 약 0.75 내지 약 45 mg/kg, 약 1 내지 약 45 mg/kg, 약 1.5 내지 약 45 mg/kg, 약 2 내지 약 45 mg/kg, 약 2.5 내지 약 45 mg/kg, 약 3 내지 약 45 mg/kg, 약 3.5 내지 약 45 mg/kg, 약 4 내지 약 45 mg/kg, 약 4.5 내지 약 45 mg/kg, 약 5 내지 약 45 mg/kg, 약 7.5 내지 약 45 mg/kg, 약 10 내지 약 45 mg/kg, 약 15 내지 약 45 mg/kg, 약 20 내지 약 45 mg/kg, 약 20 내지 약 45 mg/kg, 약 25 내지 약 45 mg/kg, 약 30 내지 약 45 mg/kg, 약 35 내지 약 45 mg/kg, 약 40 내지 약 45 mg/kg, 약 0.1 내지 약 40 mg/kg, 약 0.25 내지 약 40 mg/kg, 약 0.5 내지 약 40 mg/kg, 약 0.75 내지 약 40 mg/kg, 약 1 내지 약 40 mg/kg, 약 1.5 내지 약 40 mg/kg, 약 2 내지 약 40 mg/kg, 약 2.5 내지 약 40 mg/kg, 약 3 내지 약 40 mg/kg, 약 3.5 내지 약 40 mg/kg, 약 4 내지 약 40 mg/kg, 약 4.5 내지 약 40 mg/kg, 약 5 내지 약 40 mg/kg, 약 7.5 내지 약 40 mg/kg, 약 10 내지 약 40 mg/kg, 약 15 내지 약 40 mg/kg, 약 20 내지 약 40 mg/kg, 약 20 내지 약 40 mg/kg, 약 25 내지 약 40 mg/kg, 약 30 내지 약 40 mg/kg, 약 35 내지 약 40 mg/kg, 약 0.1 내지 약 30 mg/kg, 약 0.25 내지 약 30 mg/kg, 약 0.5 내지 약 30 mg/kg, 약 0.75 내지 약 30 mg/kg, 약 1 내지 약 30 mg/kg, 약 1.5 내지 약 30 mg/kg, 약 2 내지 약 30 mg/kg, 약 2.5 내지 약 30 mg/kg, 약 3 내지 약 30 mg/kg, 약 3.5 내지 약 30 mg/kg, 약 4 내지 약 30 mg/kg, 약 4.5 내지 약 30 mg/kg, 약 5 내지 약 30 mg/kg, 약 7.5 내지 약 30 mg/kg, 약 10 내지 약 30 mg/kg, 약 15 내지 약 30 mg/kg, 약 20 내지 약 30 mg/kg, 약 20 내지 약 30 mg/kg, 약 25 내지 약 30 mg/kg, 약 30 내지 약 30 mg/kg, 약 35 내지 약 30 mg/kg, 약 0.1 내지 약 20 mg/kg, 약 0.25 내지 약 20 mg/kg, 약 0.5 내지 약 20 mg/kg, 약 0.75 내지 약 20 mg/kg, 약 1 내지 약 20 mg/kg, 약 1.5 내지 약 20 mg/kg, 약 2 내지 약 20 mg/kg, 약 2.5 내지 약 20 mg/kg, 약 3 내지 약 20 mg/kg, 약 3.5 내지 약 20 mg/kg, 약 4 내지 약 20 mg/kg, 약 4.5 내지 약 20 mg/kg, 약 5 내지 약 20 mg/kg, 약 7.5 내지 약 20 mg/kg, 약 10 내지 약 20 mg/kg, 또는 약 15 내지 약 20 mg/kg의 투여량이 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 조성물이 본 명세서에 기재된 바와 같은 dsRNA 및 N-아세틸갈락토사민을 포함하는 경우, 대상체는 약 10 내지 약 30 mg/kg의 dsRNA의 치료량이 투여될 수 있다. 열거된 값에 대한 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.

[0654]

예를 들어, 대상체는 iRNA의 치료량, 예컨대 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.25, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 27, 27.5, 28, 28.5, 29, 29.5, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 약 50 mg/kg의 투여될 수 있다. 열거된 값에 대한 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.

[0655]

일부 구현예에서, RNAi 작용제는 약 25 mg 내지 약 900 mg, 예를 들어, 약 25 mg 내지 약 850 mg, 약 25 mg 내지 약 800 mg, 약 25 mg 내지 약 750 mg, 약 25 mg 내지 약 700 mg, 약 25 mg 내지 약 650 mg, 약 25 mg 내지 약 600 mg, 약 25 mg 내지 약 550 mg, 약 25 mg 내지 약 500 mg, 약 100 mg 내지 약 850 mg, 약 100 mg 내지 약 800 mg, 약 100 mg 내지 약 750 mg, 약 100 mg 내지 약 700 mg, 약 100 mg 내지 약 650 mg, 약 100 mg 내지 약 600 mg, 약 100 mg 내지 약 550 mg, 약 100 mg 내지 약 500 mg, 약 200 mg 내지 약 850 mg, 약 200 mg 내지 약 800 mg, 약 200 mg 내지 약 750 mg, 약 200 mg 내지 약 700 mg, 약 200 mg 내지 약 650 mg, 약 200 mg 내지 약 600 mg, 약 200 mg 내지 약 550 mg, 약 200 mg 내지 약 500 mg, 약 300 mg 내지 약 850 mg, 약 300 mg 내지

약 800 mg, 약 300 mg 내지 약 750 mg, 약 300 mg 내지 약 700 mg, 약 300 mg 내지 약 650 mg, 약 300 mg 내지 약 600 mg, 약 300 mg 내지 약 550 mg, 약 300 mg 내지 약 500 mg, 약 400 mg 내지 약 850 mg, 약 400 mg 내지 약 800 mg, 약 400 mg 내지 약 750 mg, 약 400 mg 내지 약 700 mg, 약 400 mg 내지 약 650 mg, 약 400 mg 내지 약 600 mg, 약 400 mg 내지 약 550 mg, 또는 약 400 mg 내지 약 500 mg의 고정 투여량으로 투여된다.

[0656] 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 약 12.5 mg, 약 15 mg, 약 20 mg, 약 25 mg, 약 30 mg, 약 35 mg, 약 40 mg, 약 45 mg, 약 50 mg, 약 55 mg, 약 60 mg, 약 65 mg, 약 70 mg, 약 75 mg, 약 80 mg, 약 85 mg, 약 90 mg, 약 95 mg, 약 100 mg, 약 110 mg, 약 120 mg, 약 125 mg, 약 130 mg, 약 140 mg, 약 150 mg, 약 160 mg, 약 170 mg, 약 175 mg, 약 180 mg, 약 190 mg, 200 mg, 약 225 mg, 약 250 mg, 약 275 mg, 약 300 mg, 약 325 mg, 약 350 mg, 약 375 mg, 약 400 mg, 약 425 mg, 약 450 mg, 약 475 mg, 약 500 mg, 약 525 mg, 약 550 mg, 약 575 mg, 약 600 mg, 약 625 mg, 약 650 mg, 약 675 mg, 약 700 mg, 약 725 mg, 약 750 mg, 약 775 mg, 약 800 mg, 약 825 mg, 약 850 mg, 약 875 mg, 또는 약 900 mg의 고정 투여량으로 투여된다.

[0657] 특정 구현예에서, RNAi 작용제는 약 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 또는 약 600 mg의 고정 투여량으로 3개월마다 1회(즉, 분기마다 1회) 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 투여는, 예를 들어 프리 필드 주사기 또는 자동-주입기 주사기를 통한 피하 투여, 예를 들어, 자가 투여이다. 일부 구현예에서, 피하 투여를 위한 RNAi 작용제의 투여량은, 예를 들어 1 ml 미만 또는 그와 동일한 용적의 약제학적으로 허용 가능한 담체 중에 함유된다.

[0658] 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 2회 이상의 투여량으로 투여된다. 반복 주입 또는 다회 주입을 용이하기 위해 요망되는 경우, 전달 장치, 예를 들어 펌프, 반영구적 스텐트(예를 들어, 정맥내, 복강내, 낭내(intracisternal) 또는 캡슐내), 또는 저장소의 이식이 권장될 수 있다. 일부 구현예에서, 후속 투여량의 횟수 또는 양은 요망되는 효과의 달성을, 예를 들어 TTR 유전자의 저해 또는 치료적 또는 예방적 효과의 달성을, 예를 들어 아밀로이드 침착의 감소 또는 TTR-관련 질병의 증상의 감소에 의존적이다.

[0659] 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 일정에 따라 투여된다. 예를 들어, RNAi 작용제는 주당 2회, 주당 3회, 주당 4회 또는 주당 5회 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 일정은 정기 투여, 예를 들어 매시간, 4시간마다, 6시간마다, 8시간마다, 12시간마다, 매일, 격일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 매주, 격주마다, 매월 또는 분기별 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 0.3 mg/kg, 0.6 mg/kg, 1 mg/kg, 1.25 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2, . 2.5 mg/kg, 또는 3 mg/kg의 투여량이 매월 투여된다. 또 다른 구현예에서, 0.3 mg/kg, 0.6 mg/kg, 1 mg/kg, 1.25 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2, 2.5 mg/kg, 또는 3 mg/kg의 투여량이 분기별 투여된다.

[0660] 다른 구현예에서, 이러한 일정은 밀접한 간격의 투여 후, 작용제가 투여되지 않는 동안의 더 장기의 기간을 포함한다. 예를 들어, 이러한 일정은, 비교적 단기간의 투여(예를 들어, 약 6시간마다, 약 12시간마다, 약 24시간마다, 약 48시간마다, 또는 약 72시간마다) 후, RNAi 작용제가 투여되지 않는 동안의 더 장기의 기간(예를 들어, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 11주, 또는 약 12주)의 최초 투여량 세트를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 처음에는 매시간 투여되며, 후기에는 더 장기의 간격(예를 들어, 매일, 매주, 격주, 매월 또는 분기별)으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제는 처음에는 매일 투여되며, 후기에는 더 장기의 간격(예를 들어, 매주, 격주, 매월 또는 분기별)으로 투여된다. 특정 구현예에서, 더 장기의 간격은 시간에 따라 증가하며, 요망되는 효과의 달성을 기반으로 하여 결정된다.

[0661] 특정 구현예에서, RNAi 작용제는 첫 주 동안은 매일 1회 투여되며, 투여 8일째에 시작하여, 격주, 매월 또는 분기별 투여된다. 또 다른 특정 구현예에서, RNAi 작용제는 첫 주 동안은 격일마다 1회 투여되며, 투여 8일째에 시작하여, 격주, 매월 또는 분기별 투여된다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제는 첫 주 동안은 5일 동안 매일 1회 투여되며, 격주, 매월 또는 분기별 투여로 투여된다.

[0662] 이를 일정 중 임의의 일정은 선택적으로 하나 이상의 반복을 위해 반복될 수 있다. 반복 회수는 요망되는 효과의 달성, 예를 들어 TTR 유전자, 레티놀 결합 단백질 수준, 비타민 A 수준의 저해 및/또는 치료적 또는 예방적 효과의 달성, 예를 들어 아밀로이드 침착의 감소 또는 TTR 관련 질병의 증상의 감소에 의존적일 수 있다.

[0663] 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 다른 치료적 작용제 또는 다른 치료적 요법에 의해 투여된다. 예를 들어, TTR-관련 질병의 치료에 적합한 다른 작용제 또는 다른 치료적 요법은, 체내에서 돌연변이 TTR 수준을 감소시킬 수 있는 간 이식체; TTR 4량체를 동역학적으로 안정화시킴으로써, TTR 아밀로이드 생성에 요구되는 4량체 해리를 예방하는 Tafamidis(Vyndaqel); 및 예를 들어, 심장 침범에 의한 TTR 아밀로이드증의 부종을 감소시키기 위해,

사용될 수 있는 이뇨제를 포함할 수 있다.

[0664] 일 구현예에서, 대상체는 RNAi 작용제의 최초 투여량 및 하나 이상의 유지 투여량이 투여된다. 유지 투여량 또는 투여량들은 최초 투여량과 동일하거나, 더 적을 수 있으며, 예를 들어 최초 투여량의 절반일 수 있다. 유지 요법은 0.01 μg 내지 15 mg/kg/체중/일의 범위, 예를 들어, 1 mg/kg, 1.25 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.15 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.01 mg/kg, 0.001 mg/kg, 또는 0.00001 mg/kg/체중/일의 투여량 또는 투여량들, 또는 약 12.5 mg 내지 약 900 mg, 예를 들어, 약 25 mg, 약 30 mg 약 35 mg, 약 40 mg, 약 45 mg, 약 50 mg, 약 55 mg, 약 60 mg, 약 65 mg, 약 70 mg, 약 75 mg, 약 80 mg, 약 85 mg, 약 90 mg, 약 95 mg, 약 100 mg, 약 125 mg, 약 150 mg, 약 175 mg, 200 mg, 약 225 mg, 약 250 mg, 약 275 mg, 약 300 mg, 약 325 mg, 약 350 mg, 약 375 mg, 약 400 mg, 약 425 mg, 약 450 mg, 약 475 mg, 약 500 mg, 약 525 mg, 약 550 mg, 약 575 mg, 약 600 mg, 약 625 mg, 약 650 mg, 약 675 mg, 약 700 mg, 약 725 mg, 약 750 mg, 약 775 mg, 약 800 mg, 약 825 mg, 약 850 mg, 약 875 mg, 또는 약 900 mg/주의 투여량 또는 투여량들에 의해 대상체를 치료하는 단계를 포함할 수 있다. 유지 투여량은, 예를 들어 격 일마다 1회, 5일마다 1회, 7일마다 1회, 10일마다 1회, 14일마다 1회, 21일마다 1회, 30일마다 1회 또는 90일마다 1회 이하로 투여된다. 추가로, 치료 요법은 일정한 기간 동안 지속될 수 있으며, 이는 특정 질병의 특성, 그의 중증도 및 환자의 전체적 상태에 따라 달라질 것이다. 특정 구현예에서, 투여량은 1일마다 1회 이하, 예를 들어 24, 36, 48시간 이상마다 1회, 예를 들어, 5 또는 8일마다 1회 이하로 전달될 수 있다. 치료 이후, 환자는 그의 상태의 변화에 대해 모니터링될 수 있다. 환자가 현재의 투여량 수준에 대해 유의하게 반응하지 않는 경우, RNAi 작용제의 투여량은 증가되거나, 질병 상태의 증상의 경감이 관찰되거나, 질병 상태가 제거되거나, 바람직하지 않은 유해 효과가 관찰된 경우, 이러한 투여량은 저하될 수 있다.

## VII. 키트

[0666] 본 발명은 또한 본 발명의 방법 중 임의의 것을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 하나 이상의 RNAi 작용제(들) 및 사용 설명서, 예를 들어 TTR의 발현을 억제하기 위한 유효량으로 RNAi 작용제(들)와 세포를 접촉시킴으로써, 세포에서 TTR의 발현을 억제하기 위한 설명서를 포함한다. 이러한 키트는 선택적으로, RNAi 작용제와 세포를 접촉시키기 위한 수단(예를 들어, 주사 장치 또는 주입 펌프), 또는 TTR의 억제를 측정하기 위한 수단(예를 들어, TTR mRNA 또는 TTR 단백질의 억제를 측정하기 위한 수단)을 추가로 포함할 수 있다. TTR의 억제를 측정하기 위한 이러한 수단은, 예를 들어 혈장 샘플과 같은 대상체로부터의 샘플을 얻기 위한 수단을 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 선택적으로 RNAi 작용제(들)를 대상체에 투여하기 위한 수단 또는 치료적 유효량 또는 예방적 유효량을 결정하기 위한 수단을 추가로 포함할 수 있다.

[0667] 본 발명의 키트에 포함시키기에 적합한 RNAi 작용제는 표 1, 표 3, 표 5, 표 6, 또는 표 7 중 어느 하나에 열거된 RNAi 작용제 중 어느 하나를 포함한다. 일 구현예에서, RNAi 작용제는 AD-66016, AD-65492, AD-66017, 및 AD-66018로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0668] RNAi 작용제는 임의의 편의상 형태, 예를 들어 주사용 멀균수 중 용액으로 제공될 수 있다. 예를 들어, RNAi 작용제는 주사용 멀균수 중 500 mg/ml, 450 mg/ml, 400 mg/ml, 350 mg/ml, 300 mg/ml, 250 mg/ml, 200 mg/ml, 150 mg/ml, 100 mg/ml, 또는 50 mg/ml 용액으로서 제공될 수 있다.

[0669] 본 발명은 하기의 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 제한되는 것으로 이해되어서는 안된다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참조문헌 및 공개 특허 및 특허 출원의 내용은 본 명세서에서 참조로 포함된다.

## 실시예

### 0671) 실시예 1: TTR을 표적화하는 화학적으로 변형된 RNAi 작용제의 시험관내 안정성 및 침묵화 활성

[0672] 하기의 실시예는, 센스 가닥에 8개 이하의 2'-플루오로 변형, 안티센스 가닥에 6개 이하의 2'-플루오로 변형, 6개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드 연결, 및 리간드, 예를 들어, GaINAc3 리간드를 포함하는 특정의 화학적 변형의, TTR을 표적화하는 RNAi 작용제의 침묵화 활성에 대한 유리한 효과를 입증하는 것이다. 연구된 작용제의 서열은 하기의 표 1에 제공된다.

[0673] TTR siRNA 서열은 고체 지지체 매개 포스포라미데이트 화학을 사용하여 Mermade 192 합성기(BioAutomation)에서 1 μmol 규모로 합성하였다. 고체 지지체는 주문 제작 GaINAc 리간드 또는 보편적 고체 지지체(AM biochemica 1)가 로딩된 제어된 다공질 유리(500 Å)이었다. 보조 합성 시약인 2'-F 및 2'-O-메틸 RNA 및 데옥시 포스포라미데이트를 Thermo-Fisher(미국 위스콘신주 밀워키 소재) 및 Hongene(중국 소재)으로부터 입수하였다. 2'F, 2'-O-메틸, GNA(글리콜 핵산), 5'포스페이트 및 무염기 변형을 상응하는 포스포라미데이트를 사용하여 도입시켰다.

3' GaINAc 접합 단일 가닥의 합성을 GaINAc 변형된 CPG 지지체에서 수행하였다. 주문제작 CPG 보편적 고체 지지체를 사용하여, 안티센스 단일 가닥을 합성하였다. 활성화제(아세토니트릴 중 0.6 M)로서 5-에틸티오-1H-테트라졸(ETT)을 사용한 모든 포스포라미데이트(아세토니트릴 중 100 mM)의 커플링 시간은 5분이었다. 무수 아세토니트릴/피리딘(1:1 v/v) 중 3-((디메틸아미노-메틸리덴) 아미노)-3H-1,2,4-디티아졸-3-티온(DDTT, Chemgenes(미국 메스추세츠 월밍턴 소재)로부터 입수함)의 50 mM 용액을 사용하여 포스포로티오에이트 연결을 생성시켰다. 산화 시간은 3분이었다. 모든 서열은 DMT기의 최종 제거("DMT 오프(DMT off)")에 의해 합성하였다.

[0674] 고체상 합성의 완료시, 올리고리보뉴클레오타이드를 60°C에서 20분 동안 200 μL의 수성 메틸아민 시약을 사용하여, 밀봉된 깊은 96 웰 플레이트에서 고체 지지체로부터 절단하고, 탈보호시켰다. 절단 및 탈보호 단계의 마지막에서, 합성 플레이트를 실온이 되도록 하고, 1 mL의 아세토니트릴:에탄올 혼합물(9:1)의 첨가에 의해 침전시켰다. 플레이트를 -80°C에서 2시간 동안 냉각시키고, 다수의 채널 피펫의 보조하에 상청액을 주의 깊게 따라내었다. 올리고리보뉴클레오타이드 펠렛을 20 mM NaOAc 완충액 중에 재현탁하고, A905 오토샘플러 및 Frac 950 분획 수집기가 장착된 AKTA 정제기 시스템에서 5 mL HiTrap 크기 배제 칼럼(GE Healthcare)을 사용하여 틸염시켰다. 탈염된 샘플을 96-웰 플레이트에 수집하였다. 각 서열로부터의 샘플을 LC-MS로 분석하여, 동일성을 확인하고, UV(260 nm)에 의해 정량화하고, 선택된 샘플 세트를 IEX 크로마토그래피에 의해 분석하여, 순도를 결정하였다.

[0675] TTR 단일 가닥의 어닐링을 Tecan 액체 처리 로봇에서 수행하였다. 센스 및 안티센스 단일 가닥의 등몰량 혼합물을 96 웰 플레이트에서 조합하고, 어닐링시켰다. 상보성 단일 가닥의 조합 후, 96-웰 플레이트를 단단히 밀봉하고, 100°C의 오븐에서 10분 동안 가열하고, 2 내지 3시간 동안 서서히 실온이 되도록 하였다. 각 이중가닥의 농도를 1X PBS에서 10 μM로 정규화하였다.

[0676] 이를 이중가닥을 랫트 시토졸 안정 분석을 사용하여 시험관내 대사 안정성에 대해 분석하였다. 이러한 분석을 위해, 암컷 랫트의 간 시토졸(Xenotech Cat. # R1500.C)을 실온으로 해동하고, 50 mM Tris 완충액: HCl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>에서 1 mg/mL로 희석하였다. 미량 원심분리 퓨브에서 100 mL의 1 mg/mL 시토졸과 25 μL의 0.4 mg/mL siRNA 샘플을 혼합하고, 37°C, 300 rpm으로 설정된 eppendorf Thermomixer에서 24시간 동안 인큐베이션 함으로써, 24시간 샘플을 제조하였다. 24시간 동안 인큐베이션한 후, 300 μL의 Phenomenex 용해 로딩 완충액 (카탈로그 번호 ALO-8498) 및 12.5 μL의 0.4 mg/mL 내부 기준 siRNA를 각 샘플에 첨가하였다. 25 μL의 0.4 mg/mL siRNA를 갖는 100 μL의 1 mg/mL 시토졸, 300 μL의 Phenomenex 용해 로딩 완충액, 및 12.5 μL의 0.4 mg/mL 내부 기준 siRNA를 혼합함으로써, 0시간 샘플을 제조하였다. Phenomenex Clarity OTX 스타터 키트(카탈로그 번호 KSO-8494)를 사용하여 24시간 샘플 및 0시간 샘플로부터 siRNA를 추출하였다. 샘플을 추출한 후, 이를 미량 원심분리 퓨브로 옮기고, Labconco CentriVap 농축기(카탈로그 번호 7810010)를 사용하여 건조시켰다. 그 후, 샘플을 500 μL의 뉴클레아제 무함유 물에 의해 재현탁하였다. 50 μL의 각각의 샘플을 Agilent Technologies 6130 Quadrupole LC/MS가 장착된 Agilent Technologies 1260 Infinity Binary LC에서 진행시켰다. 분석은 재생 방식으로 이중 칼럼 설정을 사용하여 진행하였다. 사중 펌프 방법을 12.20분 동안 0.400 mL/분으로 다음의 시간표에 의해 진행하였다:

| 시간<br>함수 | 배기변수   |
|----------|--|
| 0.20     | 5% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP), 95% 완충액 B(100% 에탄올) |
| 2.50     | 5% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP), 95% 완충액 B(100% 에탄올) |
| 3.00     | 100% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP)                    |

[0677] 종 펌프 방법을 12.20분 동안 0.700 mL/분으로 다음의 시간표에 의해 진행하였다:

[0679]

시간 함수 매개변수

| 시간<br>함수 | 매개변수  |
|----------|---|
| 0.00     | 100% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP)                     |
| 0.40     | 100% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP)                     |
| 10.00    | 60% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP), 40% 완충액 B(100% ACN) |
| 10.10    | 100% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP)                     |
| 12.20    | 100% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP)                     |

[0680]

좌측 및 우측 칼럼 모두 75.00°C로 설정하였다. UV 신호를 260 nm 파장에서 측정하였다. 각 가닥의 잔류 퍼센트를 다음 방정식을 사용하여 계산하였다:

[0682]

$$\text{잔류 가닥 \%} = 100 * (\frac{\text{피크 영역}_{\text{가닥 } 24\text{h}}}{\text{피크 영역}_{\text{가닥 } 0\text{h}}} * \frac{\text{피크 영역}_{\text{기준 } 24\text{h}}}{\text{피크 영역}_{\text{기준 } 0\text{h}}})$$

[0683]

이러한 24시간 시토졸 안정성 분석의 결과는, 모든 이중가닥이 매우 안정하다는 것을 입증한다.

[0684]

이들 작용제의 서브세트를 또한 트리토솜(tritosome) 안정성 분석을 사용하여 시험관내 대사 안정성에 대해 평가하였다. 트리토솜 안정성 분석을 위해, 랫트 간의 트리토솜(Xenotech 주문제작 제품 PR14044)을 실온에서 해동하고, 20 mM 시트르산나트륨 pH 5.0 완충액에서 0.5 단위/mL 산 포스파타제로 희석하였다. 미량 원심분리 투브에서 100 μL의 0.5 단위/mL 산 포스파타제 트리토솜과 25 μL의 0.4 mg/mL siRNA 샘플을 혼합하고, 37°C, 300 rpm으로 설정된 eppendorf Thermomixer에서 24시간 동안 인큐베이션함으로써, 24시간 샘플을 제조하였다. 24시간 동안 인큐베이션한 후, 300 μL의 Phenomenex 용해 로딩 완충액(카탈로그 번호 ALO-8498) 및 12.5 μL의 0.4 mg/mL 내부 기준 siRNA를 각 샘플에 첨가하였다. 25 μL의 0.4 mg/mL siRNA를 갖는 100 μL의 0.5 단위/mL 산 포스파타제 트리토솜, 300 μL의 Phenomenex 용해 로딩 완충액, 및 12.5 μL의 0.4 mg/mL 내부 기준 siRNA를 혼합함으로써, 0시간 샘플을 제조하였다. Phenomenex Clarity OTX 스타터 키트(카탈로그 번호 KSO-8494)를 사용하여 24시간 샘플 및 0시간 샘플로부터 siRNA를 추출하였다. 샘플을 추출한 후, 이를 미량 원심분리 투브로 옮기고, Labconco CentriVap 농축기(카탈로그 번호 7810010)를 사용하여 건조시켰다. 그 후, 샘플을 500 μL의 뉴클레아제 무함유 물에 의해 재현탁하였다. 50 μL의 각각의 샘플을 Agilent Technologies 6130 Quadrupole LC/MS가 장착된 Agilent Technologies 1260 Infinity Binary LC에서 진행시켰다. 분석은 재생 방식으로 이중 칼럼 설정을 사용하여 진행하였다. 사중 펌프 방법을 12.20분 동안 0.400 mL/분으로 다음의 시간표에 의해 진행하였다:

| 시간<br>함수 | 매개변수   |
|----------|--|
| 0.20     | 5% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP), 95% 완충액 B(100% 베탄올) |
| 2.50     | 5% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP), 95% 완충액 B(100% 베탄올) |
| 3.00     | 100% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP)                    |

[0685]

[0686]

이중 펌프 방법을 12.20분 동안 0.700 mL/분으로 다음의 시간표에 의해 진행하였다:

| 시간<br>함수 | 매개변수  |
|----------|---|
| 0.00     | 100% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP)                     |
| 0.40     | 100% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP)                     |
| 10.00    | 60% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP), 40% 완충액 B(100% ACN) |
| 10.10    | 100% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP)                     |
| 12.20    | 100% 완충액 A(16mM TEA 200mM HFIP)                     |

[0687]

좌측 및 우측 칼럼 모두 75.00°C로 설정하였다. UV 신호를 260 nm 파장에서 측정하였다. 각 가닥의 잔류 퍼센트를 다음 방정식을 사용하여 계산하였다:

[0689]

잔류 가닥 % =  $100 * (\text{피크 영역}_{\text{가닥 } 24h} / \text{피크 영역}_{\text{가닥 } 0h}) * (\text{피크 영역}_{\text{기준 } 24h} / \text{피크 영역}_{\text{기준 } 0h})$ .

[0690]

도 1에 제공된 24시간 트리토솜 안정성 분석의 결과는, 모든 이중가닥이 트리토솜에서 매우 안정하다는 것을 입증한다.

## 표 1

| 이중체 ID   | 센스 ID    | 센스 서열 5' - 3'                           | SEQ ID<br>NO | 안티센스 ID  | 안티센스 서열 5' - 3'                    | SEQ ID<br>NO |
|----------|----------|---|--------------|----------|------------------------------------|--------------|
| AD-51547 | A-106305 | UfgGfgAfUfUfUfCfAfuUfUfacCfaAfgaAfL96   | 15           | A-102978 | uCfuUfugGIUfUfUfagAfafuCfcCfasUfsc | 29           |
| AD-58142 | A-117240 | UfsgsGfgAfUfUfUfCfAfuUfUfacCfaAfgaAfL96 | 16           | A-117241 | usCfsuUfugGfUfUfUfagAfafuCfcCfasUc | 30           |
| AD-64527 | A-128512 | usgggaauucadTgnaacaagaL96               | 17           | A-128525 | usdCsungguuadCaugdAaauccaususc     | 31           |
| AD-65367 | A-128499 | usggggAfUfUfCfAfuUfUfaccaagaAfL96       | 18           | A-128520 | usCfsuugguuacangAfaaucuccasusc     | 32           |
| AD-65489 | A-131365 | usgggaauucadTgnaacaagaL96               | 19           | A-128520 | usCfsuugguuacangAfaaucuccasusc     | 33           |
| AD-65481 | A-131354 | usggggauUfuCfAfUfUgnaaccagaL96          | 20           | A-131364 | UfsCfsuugGfuuuacauAgAfucccasusc    | 34           |
| AD-65488 | A-131354 | usggggauUfuCfAfUfUgnaaccagaL96          | 21           | A-131358 | PusCfsuugGfuuuacauAgAfucccasusc    | 35           |
| AD-65496 | A-131354 | usggggauUfuCfAfUfUgnaaccagaL96          | 22           | A-131360 | PusCfsuugGfuuuAfcaugAfafucccasusc  | 36           |
| AD-65491 | A-128557 | usgggaauucadTgnaacY34aagL96             | 23           | A-128525 | usdCsungguuadCaugdAaaucuccasusc    | 37           |
| AD-65495 | A-131353 | usggggauUfuCfAfUfUgnaacCfcaagaL96       | 24           | A-128516 | usCfsuugGfuuUfAfcaugAfafucccasusc  | 38           |
| AD-65367 | A-128499 | usggggAfUfUfCfAfUfUfaccaagaAfL96        | 25           | A-128520 | usCfsuugguuacangAfaaucuccasusc     | 39           |
| AD-65493 | A-128512 | usgggaauucadTgnaacaagaL96               | 26           | A-131366 | PusCfsuugguuacangAfaaucuccasusc    | 40           |
| AD-65494 | A-128512 | usgggaauucadTgnaacaagaL96               | 27           | A-128526 | PusdCsungguuadCaugdAaaucuccasusc   | 41           |
| AD-64527 | A-128512 | usgggaauucadTgnaacaagaL96               | 28           | A-128525 | usdCsungguuadCaugdAaaucuccasusc    | 42           |

## TTR dsRNA의 변형된 센스 및 안티센스 가닥 서열

**표 2**

핵산 서열 표시에 사용된 뉴클레오타이드 단량체의 약칭. 이들 단량체는,  
올리고뉴클레오타이드에 존재하는 경우, 5' -3' -포스포디에스테르 결합에 의해  
상호 연결됨이 이해될 것이다.

| 약자  | 뉴클레오타이드(들)                   |
|-----|------------------------------|
| A   | 아데노신-3'-포스페이트                |
| Af  | 2'-플루오로아데노신-3'-포스페이트         |
| Afs | 2'-플루오로아데노신-3'-포스포로티오에이트     |
| As  | 아데노신-3'-포스포로티오에이트            |
| C   | 시티딘-3'-포스페이트                 |
| Cf  | 2'-플루오로시티딘-3'-포스페이트          |
| Cfs | 2'-플루오로시티딘-3'-포스포로티오에이트      |
| Cs  | 시티딘-3'-포스포로티오에이트             |
| G   | 구아노신-3'-포스페이트                |
| Gf  | 2'-플루오로구아노신-3'-포스페이트         |
| Gfs | 2'-플루오로구아노신-3'-포스포로티오에이트     |
| Gs  | 구아노신-3'-포스포로티오에이트            |
| T   | 5'-메틸우리딘-3'-포스페이트            |
| Tf  | 2'-플루오로-5-메틸우리딘-3'-포스페이트     |
| Tfs | 2'-플루오로-5-메틸우리딘-3'-포스포로티오에이트 |
| Ts  | 5-메틸우리딘-3'-포스포로티오에이트         |
| U   | 우리딘-3'-포스페이트                 |
| Uf  | 2'-플루오로우리딘-3'-포스페이트          |
| Ufs | 2'-플루오로우리딘-3'-포스포로티오에이트      |
| Us  | 우리딘-3'-포스포로티오에이트             |
| N   | 임의의 뉴클레오타이드(G, A, C, T 또는 U) |
| a   | 2'-O-메틸아데노신-3'-포스페이트         |
| as  | 2'-O-메틸아데노신-3'-포스포로티오에이트     |

[0692]

|       |  |
|-------|--|
| c     | 2'-O-메틸시티딘-3'-포스페이트                                      |
| cs    | 2'-O-메틸시티딘-3'-포스포로티오에이트                                  |
| g     | 2'-O-메틸구아노신-3'-포스페이트                                     |
| gs    | 2'-O-메틸구아노신-3'-포스포로티오에이트                                 |
| t     | 2'-O-메틸-5-메틸티민-3'-포스페이트                                  |
| ts    | 2'-O-메틸-5-메틸티민-3'-포스포로티오에이트                              |
| u     | 2'-O-메틸우리딘-3'-포스페이트                                      |
| us    | 2'-O-메틸우리딘-3'-포스포로티오에이트                                  |
| s     | 포스포로티오에이트 연결   |
| L96   | N-[tris(GalNAc-알킬)-아미도데카노일]-4-하이드록시프롤리놀 Hyp-(GalNAc-알킬)3 |
| dA    | 데옥시-아데노신   |
| dC    | 데옥시-시토딘  |
| dG    | 데옥시-구아노신   |
| (dT)  | 2'-데옥시티미딘-3'-포스페이트                                       |
| Y34   | 2-하이드록시메틸-테트라하이드로푸란-4-메톡시-3-포스페이트(무염기 2'-OMe 푸라노스)       |
| Y44   | 2-하이드록시메틸-테트라하이드로푸란-5-포스페이트                              |
| (Cgn) | 시티딘-글리콜 혼산(GNA)  |
| P     | 포스페이트  |
| VP    | 비닐-포스페이트   |

[0693]

[0694] TTR을 표적화하는 작용제의 추가 세트를 설계하고, 합성하였다. 이들 작용제의 서열이 하기의 표 3에 제공된다.

[0695]

이러한 추가적 작용제를 시험관내 분석에서 평가하였다. 특히, 각각의 siRNA 작용제에 대한 IC<sub>50</sub>을 Lipofectamine RNAiMAX를 사용하여 표준 역핵내 형질감염(Reverse transfection)에 의해 Hep3B 세포(인간 간암 세포주) 또는 일차 사이노몰거스 간세포(Life Technologies)에서 결정하였다. Hep3b 세포를 10% FBS가 함유된 EMEM에서 배양하고, 일차 사이노몰거스 간세포를 사용 직전에 해동하고, 10% FBS가 함유된 WMEM에서 배양하였다. 웰당 4.9 μL의 Opti-MEM과 0.1 μL의 Lipofectamine RNAiMax(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼즈베드 소재, 카탈로그 번호 13778-150)와 함께, 384 웰 플레이트에 웰당 5 μL의 RNA 이중가닥을 첨가하고, 실온에서 15 내지 20분 동안 인큐베이션함으로써, 역핵내 형질감염을 수행하였다. 인큐베이션 후, 5,000개의 Hep3B 세포 또는 일차 사이노몰거스 간세포를 함유하는, 항생제가 부재하는 완전 성장 배지 40 μL를 그 후 각 웰에 첨가하였다. 콜라겐-코팅 플레이트를 일차 간세포에 사용하였다. 세포를, RT-qPCR에 의한 TTR 및 GAPDH mRNA의 용해 및 분석 전에, 5% CO<sub>2</sub>의 대기 중에서 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 10 nM 내지 0.38 fM 범위의 8종의 상이한 siRNA 농도를 IC<sub>50</sub> 결정에 대해 평가하고, siRNA 형질감염된 세포에 대한 TTR/GAPDH를 10 nM 루시퍼라제 siRNA로 형질감염된 세포에 대해 정규화하였다.

[0696]

일차 사이노몰거스 간세포에서의 자유 흡수 침목화를 24시간 동안 TTR siRNA와 함께 인큐베이션한 후 평가하였다. 이 방법은, 완전 성장 배지 5 μL를 Lipofectamine RNAiMax와 Optimem을 함유하는 5 μL로 대체한 것을 제외하고는 전술된 것과 유사하였다. TTR 및 GAPDH mRNA에 대한 하류 분석을 전술된 바와 같이 수행하였다. 전형적인 투여 반응 곡선의 경우, siRNA를 8-포인트 6배 연속 희석에 의해 500 nM로부터 0.1-8 pM으로 적정하였다.

[0697]

이들 분석 결과(표 4에 제공됨)는 모든 이중가닥이 TTR mRNA 발현을 강력하게 억제한다는 것을 입증한다.

[0698]

이들 추가적인 작용제의 시험관내 안정성을 또한 전술된 시토졸 및 트리토솜 안정성 분석을 사용하여 평가하였다.

[0699]

24시간 시토졸 안정성 분석의 결과는 도 2a에 제공되고, 24시간 트리토솜 안정성 분석의 결과는 도 2b에 제공되며, 이는, 모든 이중가닥이 트리토솜 및 랫트 시토졸에서 매우 안정하다는 것을 입증한다.

### 표 3

TTR dsRNA의 변형된 센스 및 안티센스 가닥 서열

| 이중체 ID   | 센스 ID    | 센스 서열 5' - 3'                | SEQ ID NO | 안티센스 ID  | 안티센스 서열 5' - 3'                    | SEQ ID NO |
|----------|----------|------------------------------|-----------|----------|------------------------------------|-----------|
| AD-66016 | A-131354 | usggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96 | 43 또는 10  | A-128520 | usCfsuugguacaugAfaaucccasusc       | 47 또는 6   |
| AD-65492 | A-131354 | usggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96 | 44 또는 10  | A-131359 | usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc   | 48 또는 7   |
| AD-66017 | A-131354 | usggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96 | 45 또는 10  | A-131903 | UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc  | 49 또는 8   |
| AD-66018 | A-131354 | usggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96 | 46 또는 10  | A-131902 | VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc | 50 또는 9   |

[0700]

### 표 4

추가의 TTR RNAi 작용제의 시험관내 활성

| IC50 (nM) | AD-66016 (65367 AS) |       | AD-65492 (u) |       | AD-66017 (Uf) |       | AD-66018 (VPu) |       |
|-----------|---------------------|-------|--------------|-------|---------------|-------|----------------|-------|
|           | 형질감염                | 자유 흡수 | 형질감염         | 자유 흡수 | 형질감염          | 자유 흡수 | 형질감염           | 자유 흡수 |
| Hep3b     | 0.931               | N/A   | 0.722        | N/A   | 0.108         | N/A   | 0.053          | N/A   |
| Cyno 간세포  | 0.235               | 5.157 | 0.21         | 3.629 | 0.026         | 0.284 | 0.015          | 0.191 |

[0701]

## 실시예 2. 생체내 TTR 침묵화

[0702]

전술된 추가적 작용제의 생체내 효능을 인간 TTR의 발현 30 메티오닌 변이체(V30M hTTR)를 발현하는 트랜스제닉 마우스에서 평가하였다(예를 들어, 문헌[Nagata, et al. (1995) *J Biochem.* 117:169-175; Kohno, et al. (1997) *Am J Pathol.* 150(4):1497-508] 참조). TTR의 V30M 변이체는 인간에서 가족성 아밀로이드 다발신경병증 I형을 유발하는 것으로 인식되어 있다. 예를 들어, 문헌[Lobato, L. (2003) *J Nephrol.*, 16(3):438-42]을 참조한다.

[0703]

11 내지 13개월된 TTR V30m 마우스에 1 mg/kg 또는 2.5 mg/kg의 단일 투여량의 작용제를 피하 투여하고, 투여 전 및 투여 후 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 70 및 84일째에 동물의 혈청에서 TTR의 수준을 결정하였다. 간략하면, TTR 수준을 검증된 TTR 효소-연결 면역흡착 분석(ELISA)을 사용하여 분석 하였다(예를 들어, 문헌[Coelho, et al. (2013) *N Engl J Med* 369:819] 참조). 96 웰 면역-마이크로플레이트를 TTR 혈청 단백질 ELISA 분석 개시 24시간 전에 토끼 항-인간 TTR pAb(Abcam)에 의해 4°에서 코팅하였다. 분석 당일에, 플레이트를 TBS-T에서 세척하고, 실온에서 2시간 동안 1x Powerblock(Biogenex)에서 차단하였다. 혈청 샘플을 1X Powerblock에서 15,000배 희석하였다. 인간 TTR 단백질 표준(Sigma-Aldrich, P1742)을 사용한 12-포인트 인간 TTR 표준 곡선을 250 내지 0 ng/mL 범위의 1.6x 연속 희석액을 사용하여 생성하였다. 차단 후, 100 μL 용적의 기준 및 샘플을 플레이트에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 TBS-T에서 세척하고, 1X Powerblock 중에 1:2500으로 희석된 양 항-hTTR 일차 항체(AbCam)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. TBS-T 세척 후, 플레이트를 1X Powerblock 중에 3:10000으로 희석된 당나귀 항-양-알칼리 포스파타제 이차 항체(AbCam)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 TBS-T에서 세척하고, 100 μL 용적의 제조된 기질(SIGMAFAST™ p-니트로페닐 포스페이트 정제)을 웰마다 첨가하고, 암소에서 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 웰당 0.05 mL의 1 M NaOH에 의해 반응을 퀸칭시켰다. 405 nm의 흡광도를 SpectraMax 플레이트 판독기에서 판독하고, 데이터를 4-매개변수 곡선으로 조정하여, 혈청 TTR 단백질 수준을 μg/mL 단위로 결정하였다. 개개의 동물의 단백질 수준을 그의 개별적인 개개의 투여 전 혈장 단백질 값으로 정규화함으로써, 투여 전과 비교하여 잔류하는 TTR 분율을 결정하였다.

[0704]

1 mg/kg 단일 투여량 실험의 결과가 도 3에 제공되며, 2.5 mg/kg 단일 투여량 실험의 결과는 도 4에 제공된다. 이들 결과는 모든 작용제가 강력하고 지속적으로 TTR 발현을 억제하며, 이는 투여 후 약 7일째에 최저치에 도달함을 입증한다. 이들 결과는 또한, 1 mg/kg의 단일 투여량의 AD-65492, AD-66017, 또는 AD-66018 후 42일째에, 40% 초과의 혈청 TTR 저해가 잔류하고, 2.5 mg/kg의 단일 투여량의 AD-65492 또는 AD-66018 후 42일째에, 60% 초과의 혈청 TTR 저해가 잔류함을 입증한다. 기준치 혈청 TTR 농도로의 회복은 1 mg/kg의 단일 투여량 후 56일 내지 84일째에 발생하며, 2.5 mg/kg의 단일 투여량 후에는 70일 내지 84일째에 발생한다.

[0705]

동물에서 80% 침묵화를 위한 유효 투여량( $ED_{50}$ )은 1 mg/kg으로 계산되었다. 따라서, 이들 데이터는 AD-65492,

AD-66016, AD-66017, 및 AD-66018이 낮은 투여량 및/또는 매월 투여량 요법에서 TTR-관련 장애를 갖는 대상을 치료하는데 효과적이라는 것을 시사한다.

### [0707] 실시예 3. 랫트 조사 독성 연구

AD-66016, AD-65492, AD-66017, 및 AD-66018의 전임상 독성 연구를 또한 랫트에서 수행하였다. 간략하면, 1, 8 및 15일째에, 그룹당 5마리의 수컷 랫트를 30 mg/kg 또는 100 mg/kg의 투여량의 AD-66016, AD-65492, AD-66017, 또는 AD-66018을 피하 투여하였다. 대조군 동물에 1, 8 및 15일째에 위약을 투여하였다. 16일째에, 모든 동물을 회생시켰다. 회생시키기 전에, 모든 임상 증상에 대해 동물을 매일 모니터링하고, 체중을 매주 측정하였다. 회생시킨 후, 동물을 부검하고, 완전 혈청 화학, 혈액학 및 응집 패널, 간 및 신장의 조직병리학 및 간 트랜스아미나제 농도에 의해 샘플을 분석하였다.

[0709] 이러한 분석의 결과는 AD-66016, AD-65492, AD-66017, 및 AD-66018이 유해한 임상적 징후나, 체중 변화없이 임상적으로 양호한 내성을 나타냄을 입증한다.

### [0710] 실시예 4. AD-65492 및 AD-66017의 다회 투여량 투여의 효능

[0711] hTTR V30M 트랜스제닉(Tg) 마우스에서의 TTR 단백질 발현에 대한 AD-65492 및 AD-66017의 다회 투여 요법의 효과를 평가하였다.

[0712] 일 세트의 실험에서, 11 내지 13개월된 hTTR V30M 마우스에 2 mg/kg의 투여량의 AD-65492를 3주 동안 매주 피하 투여하였고(QWx3), TTR 단백질의 수준을 전술된 바와 같이, 투여 전 및 투여 후 7, 14, 17, 및 21일째에 동물의 혈청에서 결정하였다.

[0713] 도 5는 hTTR V30M Tg 마우스에 대한 QWx3 투여 요법에서 AD-65492의 투여가 혈청 TTR 단백질 발현의 90% 초과의 저해를 달성하고 유지함을 입증한다.

[0714] 또 다른 세트의 실험에서, AD-65492 및 AD-66017을 11 내지 13개월된 hTTR V30M Tg 마우스에 0.3 mg/kg 투여량으로 4개월 동안 1개월에 1회 피하 투여하거나(QMx4 @ 0.3 mg/kg), 1 mg/kg 투여량으로 4개월 동안 1개월에 1회 피하 투여하거나(QM4 @ 1 mg/kg), 3 mg/kg 투여량으로 4개월 동안 1개월에 1회 피하 투여하였다(QM4 @ 3 mg/kg). 혈청 TTR 단백질 수준을 투여 전 및 투여 후 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 84, 91, 98, 및 185일째에 전술된 바와 같이 결정하였다.

[0715] 도 6a 내지 도 6c에 도시된 바와 같이, 투여 후 7일째의 TTR 낙다운 수준은 제2 투여량, 제3 투여량 및 제4 투여량 후 유사하였고, 3 mg/kg, 1 mg/kg 및 0.3 mg/kg 투여량에 달성된 TTR 발현의 최저치는 각각 80% 초과, 약 70 내지 85%, 및 약 25 내지 35%이다. 이 그래프는 또한, AD-65492가 AD-66017보다 최종 투여량 후 100일 초과 시까지 더 지속적인 수준의 TTR 침묵화를 제공하며, 3 mg/kg, 1 mg/kg, 및 0.3 mg/kg에서 각각 약 60%, 40%, 및 약 35% TTR 저해가 잔류함을 입증한다. 추가로, AD-65492의 경우, 다회 투여(QMx4)가 0.3 mg/kg 투여량으로 추가됨으로써, 약 25 내지 35%의 낙다운을 갖는 제1 투여량과 비교하여, 4개월째의 투여량 후, 약 40%의 TTR 낙다운이 유발된다. 추가로, 각각의 작용제의 모든 투여량 수준에 걸쳐 각각의 개월째의 투여량 전에 TTR 단백질 수준의 일부 회복이 존재한다 할지라도, 단일 피하 투여와 같이, 다회 투여량 요법에서 80% 낙다운(ED<sub>80</sub>)을 달성하기 위한 유효 투여량은 약 1 mg/kg으로 계산되었다. 따라서, 3가지 투여 요법 모두에서의 두 화합물 모두의 약력학적 활성 및 동역학은, 단일 투여량으로서 투여된 경우, 동일한 화합물의 약력학적 활성 및 동역학에 필적하였다.

### [0716] 실시예 5. 비-인간 영장류에서의 TTR 침묵화

[0717] 상기의 실시예에서 입증된 바와 같이, AD-65492 및 AD-66017은 양호한 내성을 나타내며, 생체내에서 TTR 단백질 수준을 강력하고, 지속적으로 저해한다.

[0718] 따라서, AD-65492 및 AD-66017의 효능을 사이노몰거스 원숭이에서 이들 iRNA 작용제의 상이한 투여량 및 상이한 투여 요법의 투여에 의해 추가로 연구하였다. 도 7은 이러한 연구의 개괄을 제공한다. 간략하면, 4개의 그룹인 그룹 1, 2, 4, 및 5에 0.3 mg/kg의 단일 투여량(그룹 1 및 4) 또는 1 mg/kg의 단일 투여량의 iRNA 작용제(그룹 2 및 5)를 피하 투여하였다. 4개의 다른 그룹인 그룹 3 및 6 내지 8에는 4개월 동안 1 mg/kg의 월별 투여량을 투여하거나(QMx4)(그룹 7 및 8), 4개월 동안 3 mg/kg의 월별 투여량을 투여하였다(QMx4)(그룹 3 및 6). 투여 7 및 1일 전 및 투여 후 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 105, 및 119일째에 혈청을 수집하고; 투여 1일 전 및 투여 후 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 및 168일째에 혈장을 수집하였다. TTR 단백질

의 혈청 수준을 전술된 바와 같이 결정하였다.

[0719] 도 8a는 0.3 mg/kg의 단일 투여량 연구의 결과를 제공하고, 도 8b는 1 mg/kg의 단일 투여량 연구의 결과를 제공하며, 도 8c는 3 mg/kg의 단일 투여량 연구의 결과를 제공한다. 비교 목적을 위해, 도 8b는 사이노몰거스 원숭이에서 AD-51547의 2.5 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여의 TTR 발현에 대한 효과를 도시하고, 도 8c는 사이노몰거스 원숭이에서 AD-51547의 5 mg/kg의 단일 투여량의 피하 투여의 TTR 발현에 대한 효과를 도시한다. 이 그레프는, AD-65492 및 AD-66017 iRNA 작용제 둘 모두의 ED<sub>50</sub>이 약 0.3 mg/kg이고, TTR 발현의 최저치가 iRNA 작용제 둘 모두의 두 가지 투여량 모두에서 약 28일째에 도달되며, AD-65492가 더 높은 투여량 수준의 단일 투여량에서 AD-66017보다 TTR 단백질 발현의 저해에 더욱 효과적임을 입증한다. 이러한 그레프는 또한, AD-65492가 1 mg/kg의 단일 투여량 후 42일째에 걸쳐 TTR 발현의 90% 초과의 지속적인 저해를 제공하고, 63일째에 걸쳐 80% 초과의 TTR 저해를 제공하고, 투여 후 119일째까지 약 40%의 TTR 저해가 잔류하고, AD-66017은 1 mg/kg의 단일 투여량 후 TTR 발현의 73%의 최대 저해를 제공하고, TTR 발현의 회복이 35일 전에 개시되며, 투여 후 119일째까지 기준치의 약 20% 이내로 회복됨을 입증한다.

[0720] 도 9a는 AD-65492 및 AD-66017에 대한 1 mg/kg의 다회 투여량 연구의 결과를 제공하며, 도 9b는 3 mg/kg의 다회 투여량 연구의 결과를 제공한다. 비교 목적을 위해, 도 9a는 또한, 사이노몰거스 원숭이에서 5일 동안(0 내지 4일째에 처음 5개의 화살로 표시됨) AD-51547의 5 mg/kg의 일별 투여량 후, 4주 동안(7, 14, 21, 및 28일째에 화살 표시됨) 5 mg/kg의 주별 투여량의 투여(QDX5, QWx4)의 TTR 발현에 대한 효과를 도시한다. 이 그레프는, iRNA 작용제 둘 모두가 강력한 TTR 단백질 저해를 제공하고, iRNA 작용제 둘 모두가 3 mg/kg 투여량에서 21일 내지 28일째에 TTR 단백질 발현을 완전히 저해함을 입증한다. 이러한 그레프는 또한, AD-65492가 1 mg/kg의 투여량에서 AD-66017보다 더욱 효과적임을 입증한다. 추가로, 이 그레프는, TTR 발현의 최저치가 1 mg/kg의 iRNA 작용제 둘 모두에서 35 내지 42일째에 달성되고, AD-65492의 2개월째의 투여량 전에 85% 초과가 저해되며, AD-66017의 2개월째의 투여량 전에 약 70%가 저해됨을 입증한다. AD-65492 및 AD-66017의 3개월째 및 4개월째의 투여량 후 각각 약 95% 및 85% 저해의 유지가 달성되었다.

[0721] 추가로, 도 10a에서 입증된 바와 같이, AD-65492의 월별 투여(QMx4)는 95% 초과의 TTR 저해의 유지를 야기하고, 도 10b에서 입증된 바와 같이, AD-66017의 다회 투여(QMx4)는 1 mg/kg 투여량에서 추가된다. 도 10b는 또한, AD-66017의 2개월째의 투여량 후 TTR 단백질 발현의 85%가 저해되며, 이러한 저해가 3개월째 및 4개월째의 투여량에 의해 유지됨을 입증한다.

#### 실시예 6. TTR을 표적화하는 화학적으로 변형된 작용제의 설계 및 합성

[0723] 실질적으로 모든 센스 가닥 뉴클레오타이드 및 실질적으로 모든 안티센스 가닥 뉴클레오타이드가 변형된 뉴클레오타이드이고, SEQ ID NO:2에 상보성인 영역을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하는, TTR을 표적화하는 추가의 이중 가닥 RNAi 작용제를 전술된 바와 같이 설계하고, 합성하였다.

[0724] 이를 작용제의 센스 및 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열이 표 5에 제공된다.

#### 실시예 7. TTR을 표적화하는 화학적으로 변형된 작용제의 설계 및 합성

[0726] TTR을 표적화하는 추가의 이중 가닥 RNAi 작용제를 전술된 바와 같이 설계하고, 합성하였다.

[0727] 이를 작용제의 비변형된 센스 및 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열이 표 6에 제공되며, 이를 작용제의 변형된 센스 및 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열이 표 7에 제공된다.

## 표 5

## TTR dsRNA의 변형된 센스 및 안티센스 가닥 서열

| 이종체 ID   | 센스 ID     | 센스 서열 5' - 3'                     | SEQ ID NO | 안티센스 ID  | 안티센스 서열 5' - 3'                   | SEQ ID NO |
|----------|-----------|-----------------------------------|-----------|----------|-----------------------------------|-----------|
| AD-65496 | A-131354  | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96     | 51        | A-131360 | PusCfusugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc | 93        |
| AD-65488 | A-131354  | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96     | 52        | A-131358 | PusCfusugGfuuacauagAfaAfucccasusc | 94        |
| AD-65474 | A-131354  | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96     | 53        | A-131362 | PusCfusugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc | 95        |
| AD-65478 | A-131354  | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96     | 54        | A-131363 | UfsCfusugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc | 96        |
| AD-65493 | A-128512  | usgggauuuucadTguacaaagaL96        | 55        | A-131366 | PusCfusugguuacauagAfaAfucccasusc  | 97        |
| AD-65481 | A-131354  | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96     | 56        | A-131364 | UfsCfusugGfuuacauagAfaAfucccasusc | 98        |
| AD-65489 | A-131365  | usgggauuuucadTguacaaagaL96        | 57        | A-128520 | usCfusugguuacauagAfaaucccasusc    | 99        |
| AD-65495 | A-131353  | usgggauUfuCfAfUfguaacaaCfcaagaL96 | 58        | A-128516 | usCfusugGfuUfcaugAfaAfucccasusc   | 100       |
| AD-65482 | A-131373  | usasggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96    | 59        | A-131374 | usCfusugGfuuacauagAfaAfucccasusc  | 101       |
| AD-65468 | A-131354  | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96     | 60        | A-128516 | usCfusugGfuUfcaugAfaAfucccasusc   | 102       |
| AD-65367 | A-128499  | usgggauUfuCfAfUfgUfaaccaagAfl96   | 61        | A-128520 | usCfusugguuacauagAfaaucccasusc    | 103       |
| AD-65485 | A-128512  | usgggauuuucadTguacaaagaL96        | 62        | A-128520 | usCfusugguuacauagAfaaucccasusc    | 104       |
| AD-65470 | A-131367  | sgsauUfuCfAfUfguaaccaagaL96       | 63        | A-131369 | usCfusugguuacauagAfaaucccsa       | 105       |
| AD-65469 | A-131354  | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96     | 64        | A-131361 | usCfusugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc  | 106       |
| AD-65473 | A-131355  | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96     | 65        | A-131356 | usCfusugGfuUfcaugAfaAfucccasusc   | 107       |
| AD-65484 | A-131355  | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96     | 66        | A-131357 | usCfusugGfuuacauagAfaAfucccasusc  | 108       |
| AD-65477 | A-131353  | usgggauUfuCfAfUfguaacaaCfcaagaL96 | 67        | A-128517 | usCfusugGfuuacauagAfaAfucccasusc  | 109       |
| AD-65497 | A-131367  | sgsauUfuCfAfUfguaaccaagaL96       | 68        | A-131368 | usCfusugguuacauagAfaaucccsa       | 110       |
| AD-65475 | A-131370  | sgsauUfuCfAfUfguaaccaagaL96       | 69        | A-131371 | usCfusugguuacauagAfaaucccsa       | 111       |
| AD-65480 | A-131354  | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96     | 70        | A-128517 | usCfusugGfuuacauagAfaAfucccasusc  | 112       |
| AD-65479 | A-131372  | sgsauuuucAfUfguaaccaagaL96        | 71        | A-131369 | usCfusugguuacauagAfaaucccsa       | 113       |
| AD-65492 |           | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96     | 72        |          | usCfusugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc  | 114       |
| AD-65494 | A-1285120 | usgggauuuucadTguacaaagaL96        | 73        | A-128526 | PusdCsuugguudCaugdAaaaucccasusc   | 115       |

[0728]

|          |           |  |    |           |  |     |
|----------|-----------|--|----|-----------|--|-----|
| AD-65499 | A-128557  | usgggauuuucadTguacacY34agaL96            | 74 | A-128526  | PusdCsuugguadCaugdAaaaucccasusc        | 116 |
| AD-65491 | A-128557  | usgggauuuucadTguacacY34agaL96            | 75 | A-128525  | usdCsuugguadCaugdAaaaucccasusc         | 117 |
| AD-65498 | A-1285121 | usgggauuuucadTguacaaagaL96               | 76 | A-131375  | UfsCsuugguadCaugdAaaaucccasusc         | 118 |
| AD-65490 | A-128512  | usgggauuuucadTguacaaagaL96               | 77 | A-128553  | usdCsuugguadCsaudgAsaaaucccasusc       | 119 |
| AD-64520 | A-128557  | usgggauuuucadTguacacY34agaL96            | 78 | A-128553  | usdCsuugguadCsaudgAsaaaucccasusc       | 120 |
| AD-64527 | A-128512  | usgggauuuucadTguacaaagaL96               | 79 | A-128525  | usdCsuugguadCsaudgAaaaucccasusc        | 121 |
| AD-65472 | A-131376  | sgsauuuucadTguacaaagaL96                 | 80 | A-131377  | usdCsuugguadCsaudgAaaaucccsa           | 122 |
| AD-65486 | A-128557  | usgggauuuucadTguacacY34agaL96            | 81 | A-128520  | usCfusugguuacauagAfaaucccasuse         | 123 |
| AD-65472 | A-131376  | sgsauuuucadTguacaaagaL96                 | 82 | A-131377  | usdCsuugguadCsaudgAaaaucccsa           | 124 |
| AD-64515 |           | usgggauuuucadTguuac(Cgn)agaL96           | 83 |           | usdCsuugguadCsaudgAaaueccasusc         | 125 |
| AD-64536 |           | usgggauuuucadTguuac(Cgn)agaL96           | 84 |           | usdCsuugguadCsaudgAsaaueccasusc        | 126 |
| AD-65471 |           | usgggauuuucadTguuac(Cgn)agaL96           | 85 |           | usCfusugguuacauagAfaaucccasusc         | 127 |
| AD-65483 |           | usgggauuuucadTguuac(Cgn)agaL96           | 86 |           | PusdCsuugguadCsaudgAaaaucccasusc       | 128 |
| AD-59152 | A-106305  | UfgGfgAfUfuCfAfUfgUfaacCfaAfgAfL96       | 87 | A-119923  | PuCfuUfgGfUfUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc  | 129 |
| AD-65476 | A-106305  | UfgGfgAfUfuCfAfUfgUfaacCfaAfgAfL96       | 88 | A-131351  | UfcfUfgGfUfUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc   | 130 |
| AD-64480 | A-128493  | UfsgsGfgAfUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAf gAfL96   | 89 | A-128495  | PusCfsuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc | 131 |
| AD-51547 | A-106305  | UfsgsGfgAfUfuCfAfUfgUfaacCfaAfgAf gAfL96 | 90 | A-1029782 | UfcuUfgGfUfUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc   | 132 |
| AD-65487 | A-1284937 | UfsgsGfgAfUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAf gAfL96   | 91 | A-131352  | UfcfsuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc  | 133 |
| AD-64474 | A-1284935 | UfsgsGfgAfUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAf gAfL96   | 92 | A-1284947 | usCfsuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc  | 134 |

[0729]

## 표 6

TTR dsRNA의 비변형된 센스 및 안티센스 가닥 서열

| 이중체 ID   | 센스 서열 (5' - 3')       | SEQ ID NO | NM_000371.2<br>에 대한 안티센스<br>시작 부위 | 안티센스 서열 (5' - 3')       | SEQ ID NO |
|----------|-----------------------|-----------|-----------------------------------|-------------------------|-----------|
| AD-68322 | AUGGGAUUUCAUGUAACCAA  | 135       | 504                               | UUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC  | 167       |
| AD-60668 | AUGGGAUUUCAUGUAACCAA  | 136       | 504                               | UUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC  | 168       |
| AD-68330 | AUGGGAUUUCAUGUAACCAA  | 137       | 504                               | UUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC  | 169       |
| AD-64474 | UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA | 138       | 505                               | UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC | 170       |
| AD-65468 | UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA | 139       | 505                               | UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC | 171       |
| AD-65492 | UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA | 140       | 505                               | UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC | 172       |
| AD-65480 | UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA | 141       | 505                               | UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC | 173       |
| AD-60636 | UUUCAUGUAACCAAGAGUAUU | 142       | 510                               | AAUACUCUUGGUUACAUGAAAUC | 174       |
| AD-68320 | UUUCAUGUAACCAAGAGUAUU | 143       | 510                               | AAUACUCUUGGUUACAUGAAAUC | 175       |
| AD-68326 | UUUCAUGUAACCAAGAGUAUU | 144       | 510                               | AAUACUCUUGGUUACAUGAAAUC | 176       |
| AD-60611 | UGUAACCAAGAGUAUUCCAUU | 145       | 515                               | AAUGGAUAACCUUUGGUUACAUG | 177       |
| AD-68331 | UGUAACCAAGAGUAUUCCAUU | 146       | 515                               | AAUGGAUAACCUUUGGUUACAUG | 178       |
| AD-68315 | UGUAACCAAGAGUAUUCCAUU | 147       | 515                               | AAUGGAUAACCUUUGGUUACAUG | 179       |
| AD-68319 | AACCAAGAGUAUUCCAUUUUU | 148       | 518                               | AAAAAUGGAAUACCUUUGGUUAC | 180       |
| AD-60612 | AACCAAGAGUAUUCCAUUUUU | 149       | 518                               | AAAAAUGGAAUACCUUUGGUUAC | 181       |
| AD-68316 | AACCAAGAGUAUUCCAUUUUU | 150       | 518                               | AAAAAUGGAAUACCUUUGGUUAC | 182       |
| AD-60664 | UUUUUACUAAAGCAGGUGUUU | 151       | 534                               | AAAACACUGCUUAGUAAAAAUG  | 183       |
| AD-68321 | UUUUUACUAAAGCAGGUGUUU | 152       | 534                               | AAAACACUGCUUAGUAAAAAUG  | 184       |
| AD-68318 | UUUUUACUAAAGCAGGUGUUU | 153       | 534                               | AAAACACUGCUUAGUAAAAAUG  | 185       |
| AD-60665 | UUACUAAGCAGGUGUUUCAAA | 154       | 537                               | UUGAAAACACUGCUUAGUAAAAA | 186       |
| AD-60642 | CUAAGCAGGUGUUUCCUA    | 155       | 540                               | UAGGUGAAAACACUGCUUAGUA  | 187       |

[0730]

|          |                       |     |     |                        |     |
|----------|-----------------------|-----|-----|------------------------|-----|
| AD-68329 | CUAAGCAGGUGUUUCCUA    | 156 | 540 | UAGGUGAAAACACUGCUUAGUA | 188 |
| AD-68334 | CUAAGCAGGUGUUUCCUA    | 157 | 540 | UAGGUGAAAACACUGCUUAGUA | 189 |
| AD-68328 | GGCAGAGACAUAACAUUA    | 158 | 582 | UAAUGUUUAUUGUCUCUGCCUG | 190 |
| AD-68333 | GGCAGAGACAUAACAUUA    | 159 | 582 | UAAUGUUUAUUGUCUCUGCCUG | 191 |
| AD-60639 | GGCAGAGACAUAACAUUA    | 160 | 582 | UAAUGUUUAUUGUCUCUGCCUG | 192 |
| AD-60643 | CAGAGACAUAACAUUCU     | 161 | 584 | AGGAAUGUUUAUUGUCUCUGCC | 193 |
| AD-68317 | CAGAGACAUAACAUUCU     | 162 | 584 | AGGAAUGUUUAUUGUCUCUGCC | 194 |
| AD-68335 | CAGAGACAUAACAUUCU     | 163 | 584 | AGGAAUGUUUAUUGUCUCUGCC | 195 |
| AD-68327 | CAAUAAAACAUCUCUGUGAAA | 164 | 590 | UUUCACAGGAUGUUUAUUGUC  | 196 |
| AD-68332 | CAAUAAAACAUCUCUGUGAAA | 165 | 590 | UUUCACAGGAUGUUUAUUGUC  | 197 |
| AD-60637 | CAAUAAAACAUCUCUGUGAAA | 166 | 590 | UUUCACAGGAUGUUUAUUGUC  | 198 |

[0731]

## 표 7

TTR dsRNA의 변형된 센스 및 안티센스 가닥 서열

| 이중체 ID   | 센스 서열 (5' - 3')                         | SEQ ID NO | 안티센스 서열 (5' - 3')                   | SEQ ID NO |
|----------|---|-----------|-------------------------------------|-----------|
| AD-68322 | asusgggaUfuUfCfAfuguaccaaL96            | 199       | usUfsuggUfuAfCfaugaAfaUfcaccausc    | 231       |
| AD-60668 | AfsusGfgGfaUfuUfCfAfUgfuAfaCfcAfaAfL96  | 200       | usUfsuGfgUfuAfcaugaAfaUfcCfcAfususc | 232       |
| AD-68330 | asusgggaUfuUfCfAfuguaccaaL96            | 201       | usUfsuggUfuacaugaAfaUfcaccausc      | 233       |
| AD-64474 | UfsgsGfgAfufUfuUfCfAfUgUfaAfCfcAfgAfL96 | 202       | usCfsuUfgUfuAfcaugaAfaUfcCfcFsusc   | 234       |
| AD-65468 | usggggauUfuCfAfUfuguaccaagaL96          | 203       | usCfsuugGfuUfAfcaugaAfaAfucccasusc  | 235       |

[0732]

|          |   |     |  |     |
|----------|---|-----|--|-----|
| AD-65492 | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96            | 204 | usCfsuugGfuuAfc augAfaAfueccasusc      | 236 |
| AD-65480 | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96            | 205 | usCfsuugGfuuac augAfaAfueccasusc       | 237 |
| AD-60636 | UfsusUfcAfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfL96     | 206 | asAfsuAfcUfcUfuGfguuAfcAfuGfaAfasusc   | 238 |
| AD-68320 | ususucauGfuAfaCfcagaguuuL96               | 207 | asAfsuacUfcUfUfgguuAfcAfugaasusc       | 239 |
| AD-68326 | ususucauGfuAfaCfcagaguuuL96               | 208 | asAfsuacUfcUfUfgguuAfcAfugaasusc       | 240 |
| AD-60611 | UfsgsUfaAfcCfaAfgAf gUfuCfcAfuUfL96       | 209 | asAfsuGfgAfaUfaCfcuUfgGfuUfaCfasusg    | 241 |
| AD-68331 | usgsuaacCfaAfgAf gfuauuccauuL96           | 210 | asAfsuggAfaUfcuUfgGfuuacasusg          | 242 |
| AD-68315 | usgsuaacCfaAfgAf gfuauuccauuL96           | 211 | asAfsuggAfauacu uUfgGfuuacasusg        | 243 |
| AD-68319 | asasccaaGfaGfUfAf uuccauuuuuL96           | 212 | asAfsaaaUfgAf afaucUfcUf ugguusasc     | 244 |
| AD-60612 | AfsasCfcAfaGfaGfUfAf ufcCfaUfuUfL96       | 213 | asAfsaAfaUfgGfaAf uacUfcUfuGfgUf usasc | 245 |
| AD-68316 | asasccaaGfaGfUfAf uuccauuuuuL96           | 214 | asAfsaaaUfggaa uacUfcUf ugguusasc      | 246 |
| AD-60664 | UfsusUfuUfaCfuAfa Af gCfaGfuGfuUfL96      | 215 | asAfsaAfcAfcUfgCfuuuAfgUfaAfaAfasusg   | 247 |
| AD-68321 | ususuuuCuAfaAf gfcaguguuuL96              | 216 | asAfsaacAfcUfGfcuuuAfgUfaaaaasusg      | 248 |
| AD-68318 | ususuuuCuAfaAf gfcaguguuuL96              | 217 | asAfsaacAcfcuguuuAfgUfaaaaasusg        | 249 |
| AD-60665 | UfsusAfcUfaAfaGfCfcAf gUfgUfuUfuCfaAf L96 | 218 | usUfsgAfaAfaCfaCfcUfuUfaGfuAfasasa     | 250 |
| AD-60642 | CfsusAfaAfgCfaGfUfGfuUfuUfcAfcCfaAf L96   | 219 | usAfs gGfuGfaAfaAfcacUfgCfuUfuAfgsusa  | 251 |
| AD-68329 | csusaaagCfaGfUfGfuuuuaccauL96             | 220 | usAfs gguGfaaaaacacUfgCfuuuagsusa      | 252 |
| AD-68334 | csusaaagCfaGfUfGfuuuuaccauL96             | 221 | usAfs gguGfaAf afaacacUfgCfuuuagsusa   | 253 |
| AD-68328 | gsgscagaGfaCfaAf AfaaaaaacauuaL96         | 222 | usAfsaugUfuUf auugUfcUfcugccs usg      | 254 |
| AD-68333 | gsgscagaGfaCfaAf AfaaaaaacauuaL96         | 223 | usAfsaugUfuUf auugUfcUfcugccs usg      | 255 |
| AD-60639 | GfsgsCfaGfaGfaCfaAf ufaAfaCfaUfuAf L96    | 224 | usAfsaUfgUfuUfuAfuugUfcUfcUfgCfcsusg   | 256 |
| AD-60643 | CfsasGfaGfaCfaAf ufaAfaAfaCfaUfuCfcUf L96 | 225 | asGfsgAfaUfgUfuUf uauUfgUfcUfcUfgscsc  | 257 |
| AD-68317 | csasgagaCfaAfuAf afaacauuccuL96           | 226 | asGfsgaaUfgUfuUf uauUfgUfcucugscsc     | 258 |
| AD-68335 | csasgagaCfaAfuAf afaacauuccuL96           | 227 | asGfsgaaUfgUfuUf uauUfgUfcucugscsc     | 259 |

|          |   |     |                                      |     |
|----------|---|-----|--------------------------------------|-----|
| AD-68327 | csasauaaAfaCfAfUfuccugugaaaL96          | 228 | usUfsucaCfaggaaugUfuUfauuugsusc      | 260 |
| AD-68332 | csasauaaAfaCfAfUfuccugugaaaL96          | 229 | usUfsucaCfaGfGfaaugUfuUfauuugsusc    | 261 |
| AD-60637 | CfsasAfuAfaAfaCfAfUfuCfcUfgUfgAfaAf L96 | 230 | usUfsuCfaCfaGfgAfaugUfuUfuAfuUfgsusc | 262 |

#### [0733] 실시예 8. 사이노몰거스 원승이에의 AD-65492의 투여

[0736] AD-65492의 효능을 사이노몰거스 원승이에의 투여에 의해 추가로 평가하였다.

[0737] 제1 세트의 실험에서, 4개의 그룹(그룹 1, 2, 3, 및 7)에 0.3 mg/kg의 단일 투여량을 피하 투여하고(그룹 1); 1 mg/kg의 단일 투여량을 피하 투여하고(그룹 1); 4개월 동안 1 mg/kg의 월별 투여량을 피하 투여하거나(QMx4)(그룹 7); 4개월 동안 3 mg/kg의 월별 투여량을 피하 투여하였다(QMx4)(그룹 3).

[0738] 그룹 3 및 4에서 투여 전 및 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 112, 126, 154, 175, 203, 230, 260, 290, 310, 335, 및 364일째에 혈청, 혈장 및 회소 간 샘플을 수집하였다.

[0739] 그룹 1 및 2에서, 투여 7 및 1일 전 및 투여 후 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 105, 및 119일째에 혈청을 수집하고; 투여 1일 전 및 투여 후 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96 및 168시간째에 혈장을 수집하였으며; 투여 85일 전 및 투여 후 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96 및 168시간째에 혈장을 또한 수집하였다.

[0740] 그룹 3 및 7에서, 투여 7 및 1일 전 및 투여 후 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 112, 127, 155, 176, 204, 232, 260, 288, 316, 344 및 372일째에 혈청을 수집하고; 투여 1일 전 및 투여 후 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96 및 168시간째에 혈장을 수집하였으며; 투여 85일 전 및 투여 후 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96 및 168시간째에 혈장을 또한 수집하였다.

[0741] 그룹 7에서, 회소 간 샘플을 투여 당일, 투여 8시간 전에 수집하였으며(즉, AD-65492의 투여량을 대상체에 투여하기 8시간 전에, 회소 간 샘플을 대상체로부터 수집함); 투여 후 7일째; 22일째; 29일째, 투여 8시간 전; 57일 째; 투여 8시간 전; 85일째, 투여 8시간 전; 91일째; 106일째 및 141일째에 수집하였다.

[0742] 그룹 3에서, 회소 간 샘플을 투여 후 29일째 투여 8시간 전; 57일째 투여 8시간 전; 85일째, 투여 8시간 전; 91일째, 106일째 및 141일째에 수집하였다.

[0743] TTR 단백질의 혈청 수준을 전술된 바와 같이 결정하였다.

[0744] 도 11은 이들 연구 결과를 제공하며, AD-65492의 투여에 의해 TTR 발현의 강력한 저해가 달성을 보여준다. 이러한 데이터는, AD-65492가, 1 mg/kg의 AD-65492(그룹 7) 또는 3 mg/kg의 AD-65492(그룹 3)에 의해, 4개월 동안 월별 투여(QMx4) 후, 각각, 최종 투여량 후 대략 6주 및 17주 동안 TTR 발현의 90% 초과의 지속적 저해를 제공함을 입증한다. 이러한 데이터는 또한, 1 mg/kg의 AD-65492(그룹 7)에 의한 4개월 동안의 월별 투여(QMx4) 후, 최종 투여량 후 17주째에 TTR 발현의 약 40% 저해를 입증한다.

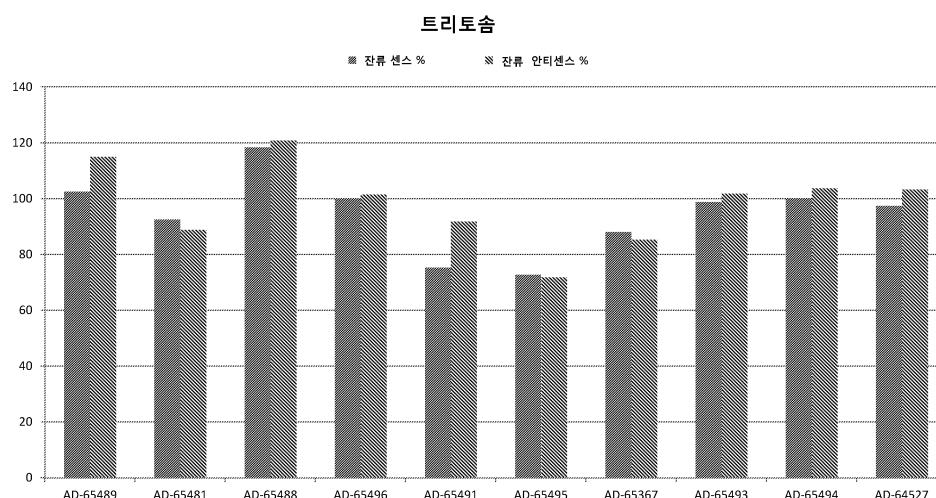
- [0745] 이러한 데이터는, 사이노몰거스 원숭이 및 인간에서 투여 사이에 1:1 번역을 가정하는 경우, AD-65492에 의한 인간 대상체의 분기별 투여가 1 mg/kg 및 3 mg/kg에 대한 중간 투여량 수준, 예를 들어, 2 mg/kg에서 TTR 발현의 저해에 효과적일 것임을 시사한다.
- [0746] 2 세트의 실험에서, 3개의 그룹(그룹 9, 10, 및 11; 도 12 참조)에 6개월 동안 0.3 mg/kg의 월별 투여량을 피하 투여하거나(QMx6)(그룹 9); 6개월 동안 0.6 mg/kg의 월별 투여량을 피하 투여하거나(QMx6)(그룹 10); 1 mg/kg의 최초 투여량 후, 5개월 동안 최초 투여량(QMx5) 후, 1개월 동안 0.3 mg/kg의 월별 유지 투여량(QMx1)을 피하 투여하였다(그룹 11).
- [0747] 혈청 샘플을 투여 7 및 1일 전 및 투여 후 4, 8, 11, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 92, 99, 113, 127, 155, 176, 및 204, 232, 260 및 288일째에 수집하였다. TTR 단백질의 혈청 수준을 전술된 바와 같이 결정하였다.
- [0748] 도 13은 이를 연구 결과를 제공하고, 2개월 동안 0.6 mg/kg의 월별 투여량(QMx2) 후, AD-65492에 의해 달성되는 TTR의 강력한 저해를 입증하며, 이는 1 mg/kg의 최초 투여량 후, TTR 발현의 저해에 필적한다. 이러한 데이터는 또한, AD-65492가 2개월 동안의 0.3 mg/kg의 월별 투여 후, TTR 발현의 약 80%의 지속 저해를 제공하고; 4마리의 원숭이 중 3마리에서 2개월 동안 AD-65492의 0.3 mg/kg의 월별 투여량 후 60% 내지 85% TTR 저해가 달성됨을 입증한다. TTR 발현의 최대 90% 저해가 1 mg/kg의 단일 투여량 후 입증되었으며, 0.3 mg/kg의 제2 투여량에서, 제2 투여량의 투여 후 3주 동안 최저치가 유지되었다.

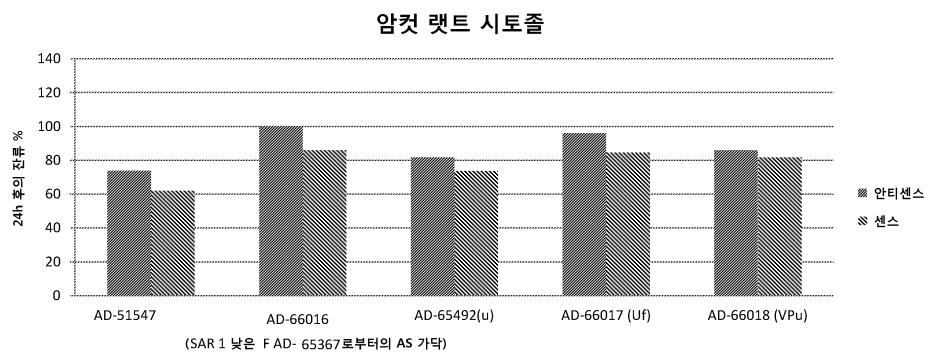
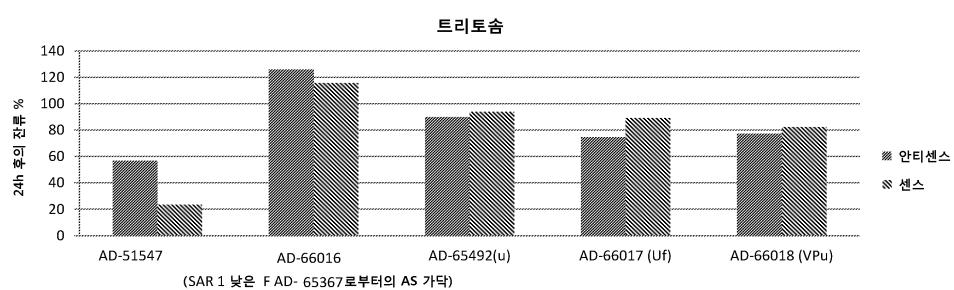
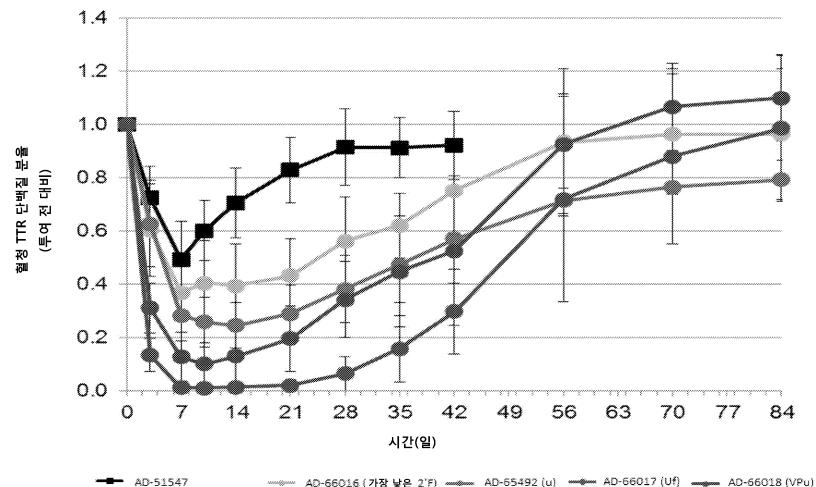
#### 균등물:

- [0750] 당업자는 단지 일상적인 실험만을 사용하여, 본 명세서에 기재된 특정 구현예 및 방법에 대한 많은 균등물을 인식하거나, 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 하기의 청구범위의 범위에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

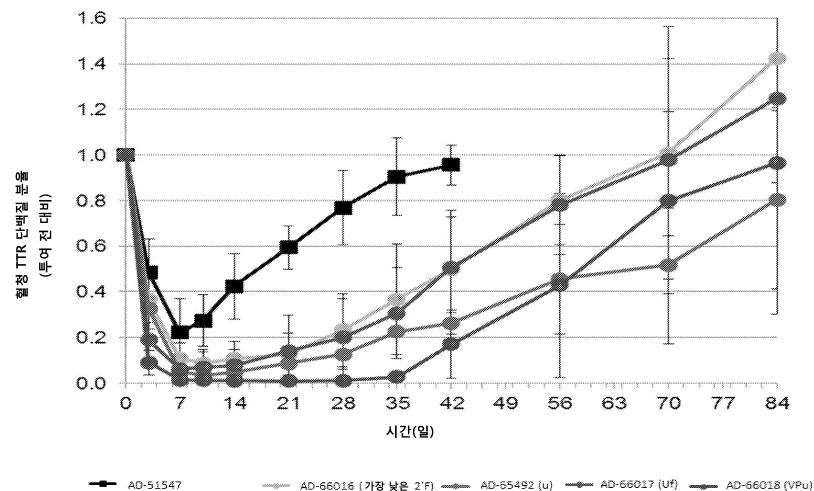
### 도면

#### 도면1

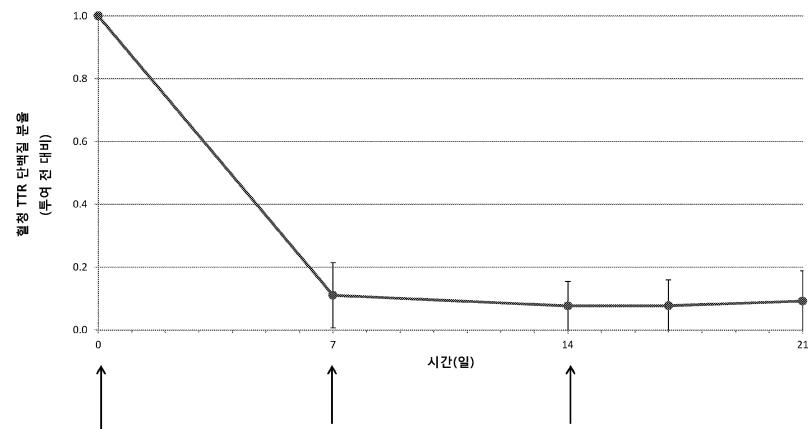


**도면2a****도면2b****도면3**

## 도면4

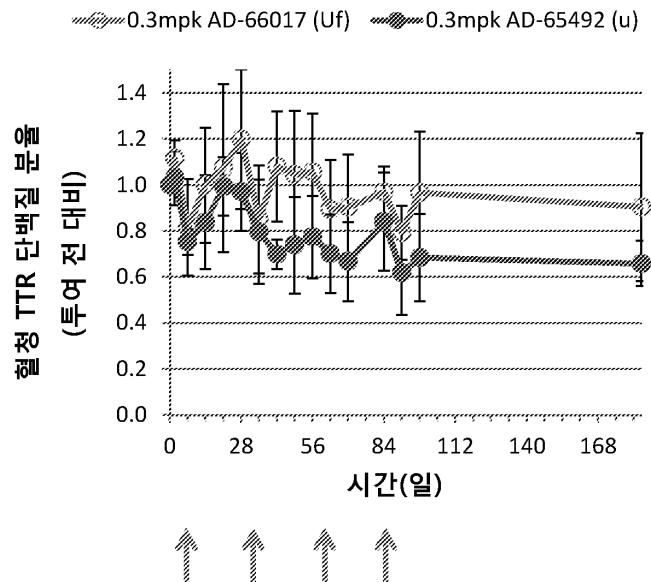


## 도면5



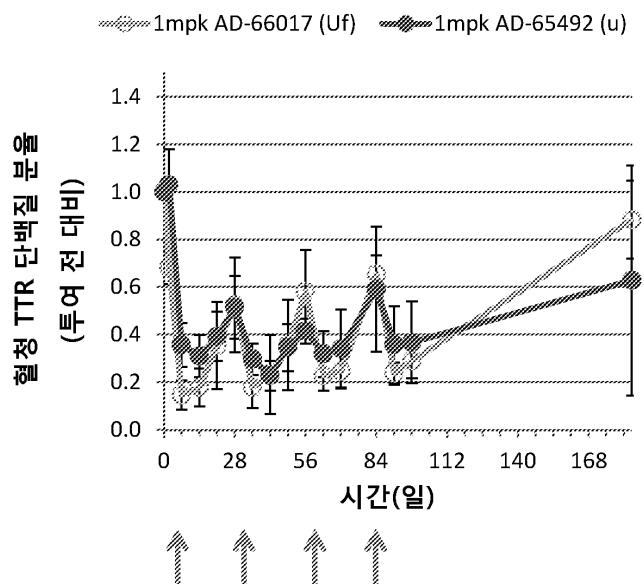
## 도면6a

QMx4 @ 0.3mg/kg



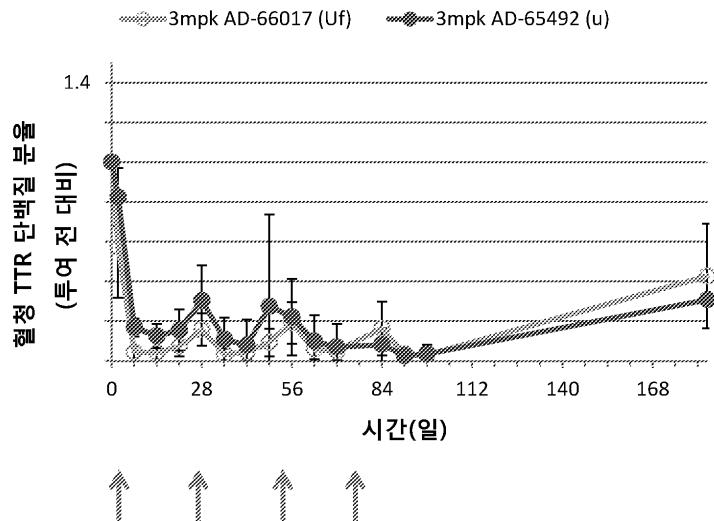
## 도면6b

QMx4 @ 1mg/kg



## 도면6c

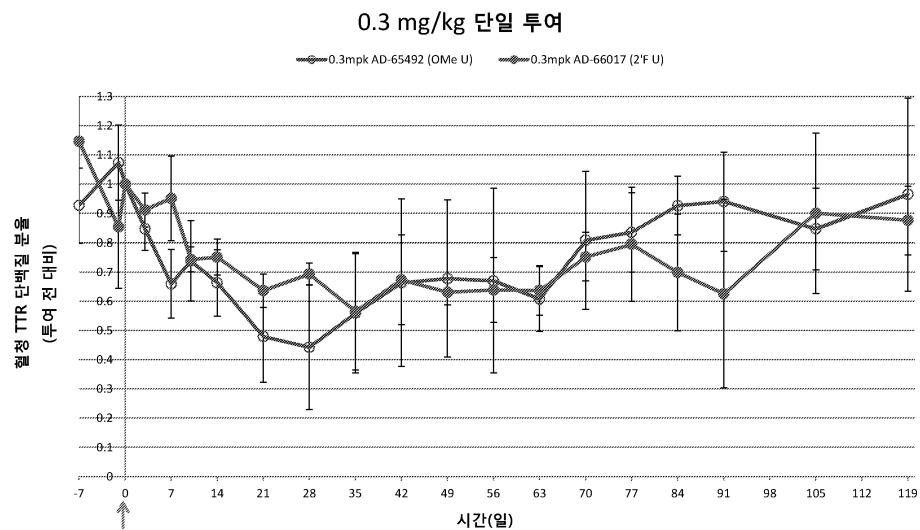
QMx4 @ 3mg/kg



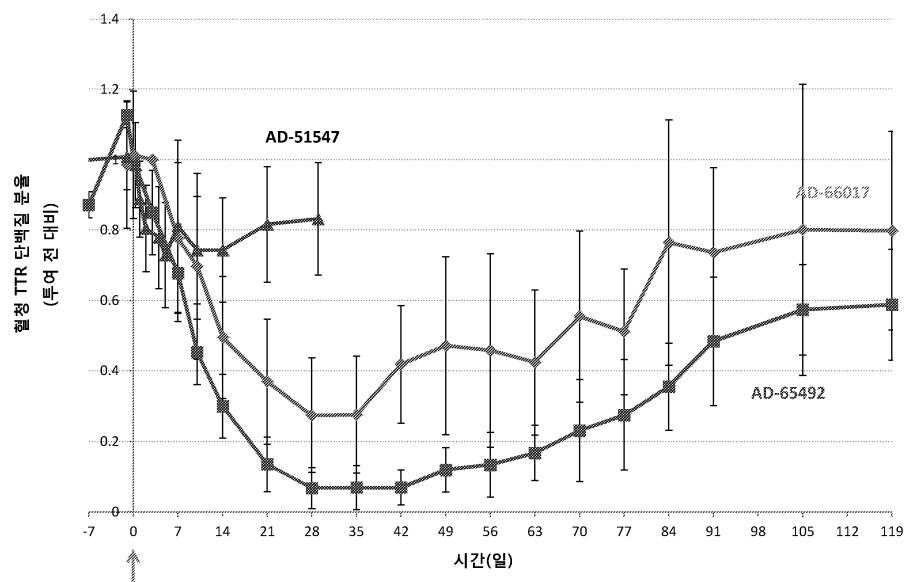
## 도면7

| 투여 일: 1   |       |    |      |               |               |            |                 | 그룹 3, 6, 7&8 (QMx4) |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------|-------|----|------|---------------|---------------|------------|-----------------|---------------------|--|--|--|--|--|--|--|
| 그룹 1 내지 8 | ↓     | 29 | 57   | 85            | ↓             | ↓          | ↓               | →                   |  |  |  |  |  |  |  |
| 시험 품목     | 그룹 번호 | n  | 투여 일 | 투여 수준 (mg/kg) | 투여 용적 (mL/kg) | 재 투여 일     | 재 투여 수준 (mg/kg) |                     |  |  |  |  |  |  |  |
| AD-65492  | 1     | 3  | 1    | 0.3           | 2             | N/A        | N/A             |                     |  |  |  |  |  |  |  |
| AD-65492  | 2     | 3  | 1    | 1             | 2             | N/A        | N/A             |                     |  |  |  |  |  |  |  |
| AD-65492  | 3     | 3  | 1    | 3             | 2             | 29, 57, 85 | 3               |                     |  |  |  |  |  |  |  |
| AD-66017  | 4     | 3  | 1    | 0.3           | 2             | N/A        | N/A             |                     |  |  |  |  |  |  |  |
| AD-66017  | 5     | 3  | 1    | 1             | 2             | N/A        | N/A             |                     |  |  |  |  |  |  |  |
| AD-66017  | 6     | 3  | 1    | 3             | 2             | 29, 57, 85 | 3               |                     |  |  |  |  |  |  |  |
| AD-65492  | 7     | 3  | 1    | 1             | 2             | 29, 57, 85 | 1               |                     |  |  |  |  |  |  |  |
| AD-66017  | 8     | 3  | 1    | 1             | 2             | 29, 57, 85 | 1               |                     |  |  |  |  |  |  |  |

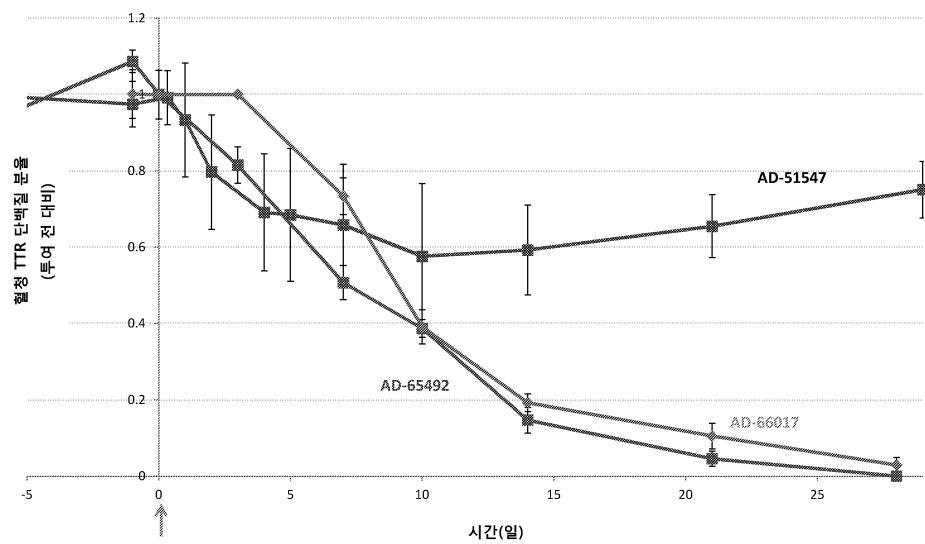
## 도면8a



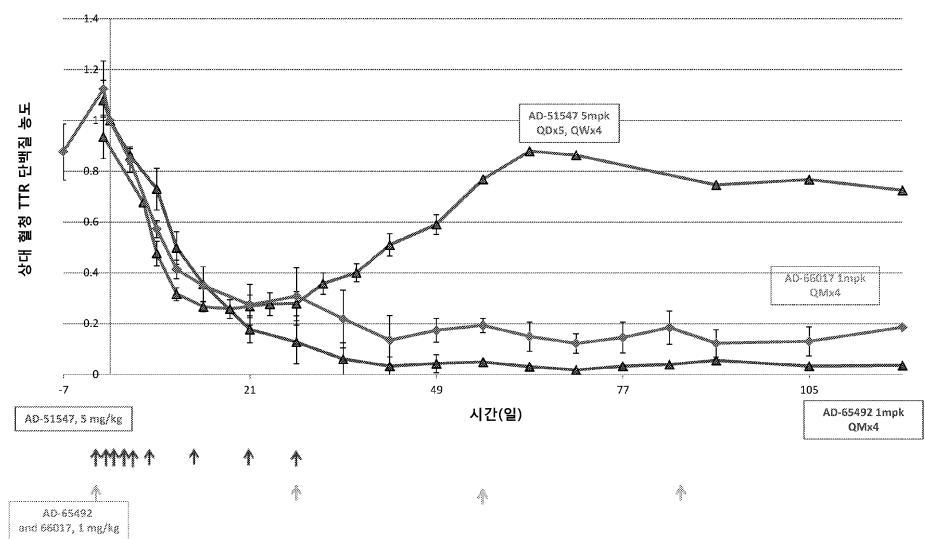
## 도면8b



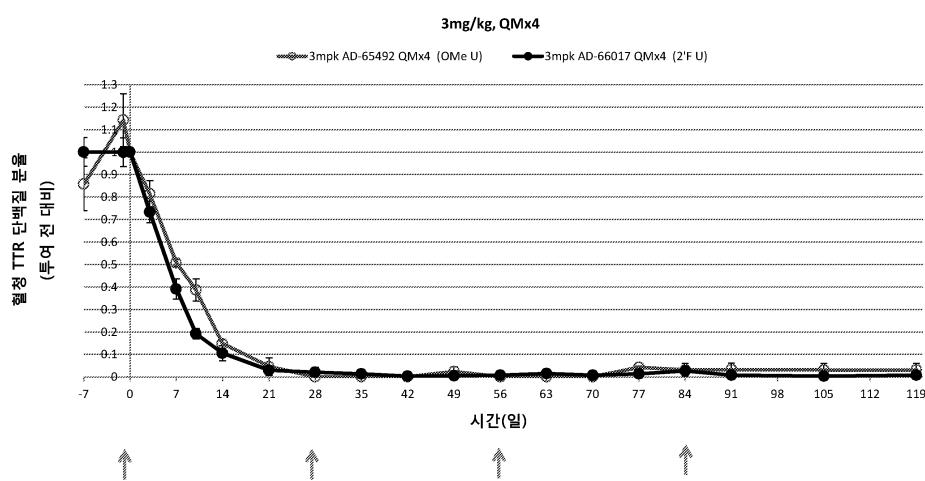
도면8c



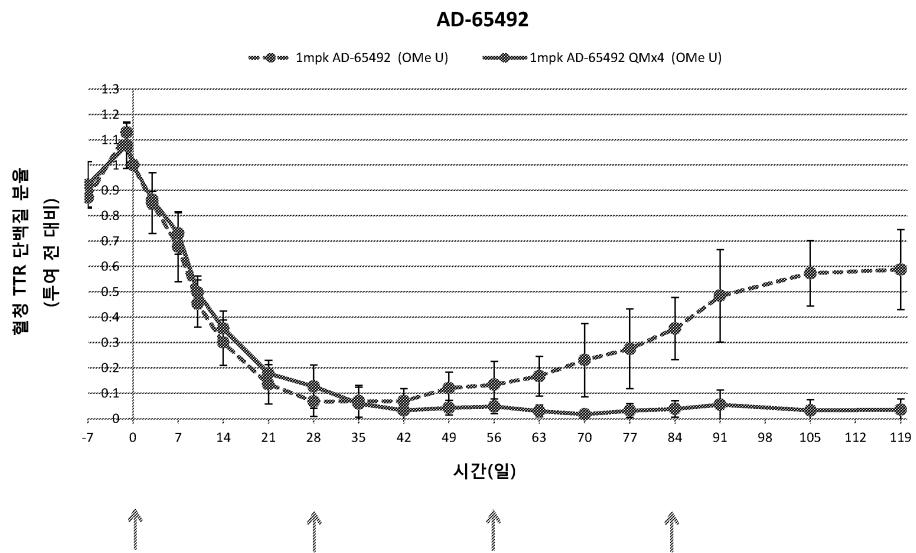
도면9a



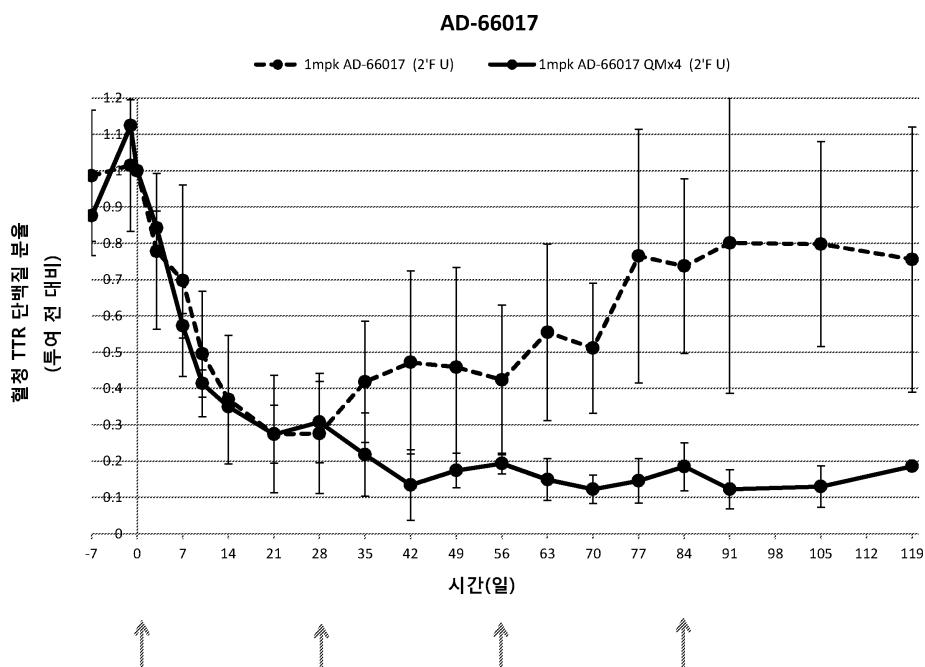
도면9b

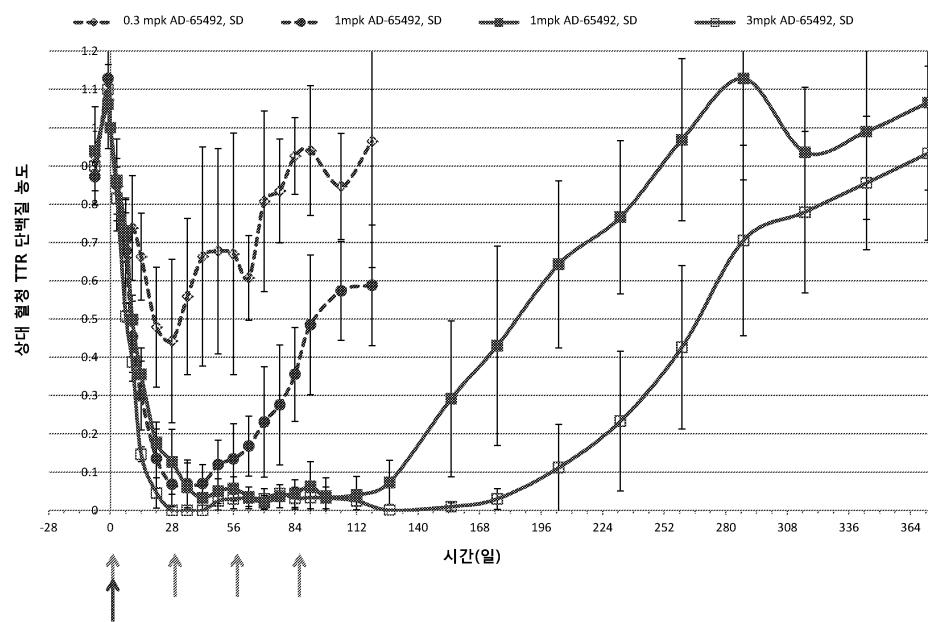
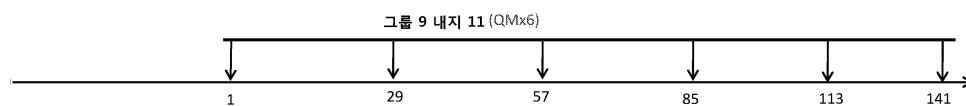


## 도면10a



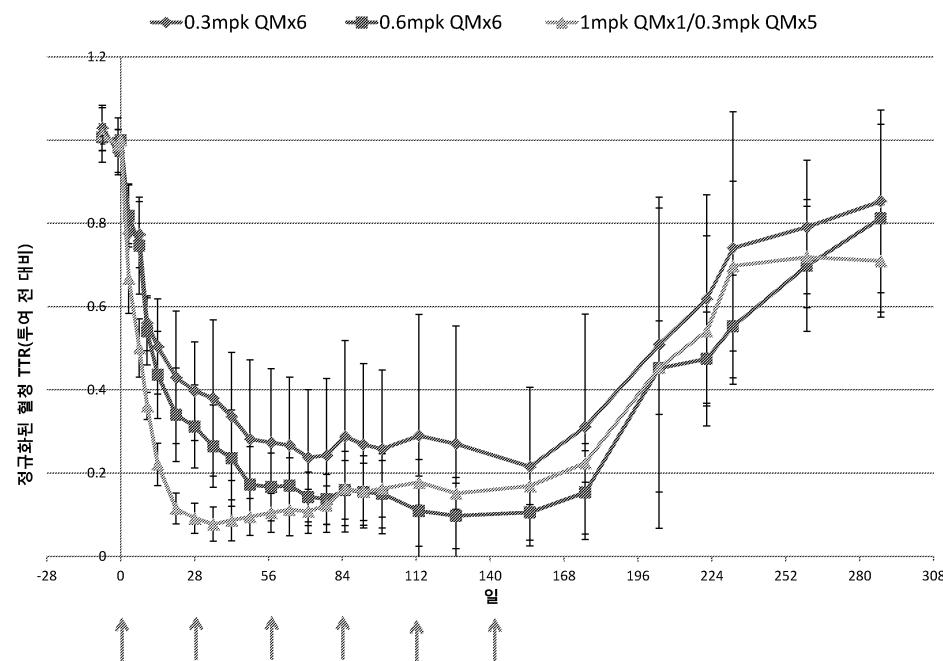
## 도면10b



**도면11****도면12**

| 시험 품목    | 그룹 번호 | n | 투여 일 | 투여 수준<br>(mg/kg) | 투여 용적<br>(mL/kg) | 재 투여 일               | 재 투여 수준<br>(mg/kg) |
|----------|-------|---|------|------------------|------------------|----------------------|--------------------|
| AD-65492 | 9     | 4 | 1    | 0.3              | 2                | 29, 57, 85, 113, 141 | 0.3                |
| AD-65492 | 10    | 4 | 1    | 0.6              | 2                | 29, 57, 85, 113, 141 | 0.6                |
| AD-65492 | 11    | 4 | 1    | 1                | 2                | 29, 57, 85, 113, 141 | 0.3                |

## 도면13



## 서열 목록

SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.

&lt;120&gt; TRANSTHYRETIN (TTR) RNA COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF FOR TREATING OR PREVENTING TTR-ASSOCIATED DISEASES

&lt;130&gt; 121301-03020

&lt;150&gt; US 62/199,563

&lt;151&gt; 2015-07-31

&lt;150&gt; US 62/287,518

&lt;151&gt; 2016-01-27

&lt;160&gt; 262

&lt;170&gt; KoPatentIn 3.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 938

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

gttgactaag tcaataatca gaatcagcag gtttgcagtc agattggcag ggataaggcag 60

ccttagctcag gagaagttag tataaaaagcc ccaggctggg agcagccatc acagaagtcc 120

|   |     |
|---|-----|
| actcattctt ggcaggatgg cttctcatcg tctgctcc tcctgccttg ctggactggt       | 180 |
| atttgtgtct gaggctggcc ctacggcac cggtaatcc aagtgcctc tgatggtcaa        | 240 |
| agttcttagat gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcata tgttcagaaa    | 300 |
| ggctgctgat gacaccctggg agccatttgc ctctggaaa accagtggat ctggagagct     | 360 |
| gcattggctc acaactgagg aggaatttgt agaaggata tacaaagtgg aaatagacac      | 420 |
| caaattttac tggaaaggcac ttggcatctc cccattccat gagcatgcag aggtggatt     | 480 |
| cacagccaaac gactccggcc cccggcgcta caccattgcc gccctgctga gcccctactc    | 540 |
|   |     |
| ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc ctccagtggaa    | 600 |
| cctgaaggac gaggatggg atttcatgtt accaaggatgtt tttccatttttt actaaaggcag | 660 |
| tgttttccacc tcataatgcta tgtagaagt ccaggcagag acaataaaac attcctgtga    | 720 |
| aaggcacttt tcattccact ttaacttgat ttttaaattt cccttattgtt cccttccaaa    | 780 |
| aaaaagagaa tcaaaatttt acaaagaatc aaaggaattc tagaaagtat ctggcagaa      | 840 |
| cgcttaggaga gatccaaattt tccattgtct tgcaagcaaa gcacgtattt aatatgatct   | 900 |
| gcagccattttaaaaagacaca ttctgtaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa                    | 938 |

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 2

|                          |    |
|--------------------------|----|
| ugggauuuca uguuacccaag a | 21 |
|--------------------------|----|

<210> 3

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 3

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ucuugguuac augaaauccc auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 4

|                           |    |
|---------------------------|----|
| gatgggattt catgtAACCA aga | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 5

<211> 650

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

|   |    |
|---|----|
| acagaagtcc actcattttt ggcaggatgg cttctcatcg tctgctcctc ctctgccttg | 60 |
|---|----|

|  |     |
|--|-----|
| ctggactggc atttgtgtct gaggctggcc ctacggcac cggtgaatcc aagtgtcctc | 120 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| tgtatggtaaa agttcttagat gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcata | 180 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| tgttcagaaa ggctgctgat gacacctggg agccatttgc ctctggaaa accagtgagt | 240 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| ctggagagct gcatgggctc acaactgagg aggaatttgt agaaggata tacaaagtgg | 300 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| aaatagacac caaattttac tgaaaggcac ttggcatctc cccattccat gagcatgcag | 360 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| aggtggatt cacagccaac gactccggcc cccggcgcta caccattgcc gcccgtgta | 420 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| gcccctactc ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc | 480 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| ctccagtgga cctgaaggac gaggatggg atttcatgta accaagagta ttccatTTT | 540 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| actaaagcag tggtttacc tcataatgta tgtagaagt ccaggcagag acaataaaac | 600 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| attcctgtga aaggcacttt tcattccaaa aaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa | 650 |
|---|-----|

<210> 6

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 6

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ucuugguuac augaaauccc auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 7

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

|                     |    |
|---------------------|----|
| ucuugguuac augaaauc | 23 |
|---------------------|----|

<210> 8

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 8

|                     |    |
|---------------------|----|
| ucuugguuac augaaauc | 23 |
|---------------------|----|

<210> 9

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 9

|                     |    |
|---------------------|----|
| ucuugguuac augaaauc | 23 |
|---------------------|----|

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 10

|                       |    |
|-----------------------|----|
| ugggauuuca uguaaccaag | 21 |
|-----------------------|----|

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: RFGF

peptide

<400> 11

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro

1 5 10 15

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: RFGF analogue

peptide

<400> 12

Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro

1 5 10

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 13

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln

1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila sp.

<400> 14

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide  
<400> 15  
ugggauuuca uguaccaag a 21  
<210> 16  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 16  
ugggauuuca uguaccaag a 21  
<210> 17  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 17  
ugggauuuca tguaccaaag a 21  
<210> 18  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 18  
ugggauuuca uguaccaag a 21  
<210> 19  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 19

ugggauuuca tguuacaaag a 21

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 20

ugggauuuca uguuaccaag a 21

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 21

ugggauuuca uguuaccaag a 21

<210> 22

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 22

ugggauuuca uguuaccaag a 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<220><221> modified\_base

<222> (17)..(17)

<223> 2-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-4-methoxy-3-phosphate  
(abasic 2'-OMe furanose) nucleotide

<400> 23

|                         |    |
|-------------------------|----|
| ugggauuuca tguaacnaag a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 24

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 24

|                         |    |
|-------------------------|----|
| ugggauuuca uguacccaag a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 25

|                         |    |
|-------------------------|----|
| ugggauuuca uguacccaag a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

oligonucleotide  
<400> 26  
ugggauuuca tguuacaaag a 21  
<210> 27  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 27  
ugggauuuca tguuacaaag a 21  
<210> 28  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 28  
ugggauuuca tguuacaaag a 21  
<210> 29  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 29  
ucuuggguac augaaauccc auc 23  
<210> 30  
<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 30

|                     |    |
|---------------------|----|
| ucuugguuac augaaauc | 23 |
|---------------------|----|

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 31

|                     |    |
|---------------------|----|
| ucuugguuac augaaauc | 23 |
|---------------------|----|

<210> 32

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 32

|                     |    |
|---------------------|----|
| ucuugguuac augaaauc | 23 |
|---------------------|----|

<210> 33

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 33

|                     |    |
|---------------------|----|
| ucuugguuac augaaauc | 23 |
|---------------------|----|

<210> 34

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 34

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt;

&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 35

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 36

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 37

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 38

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 38

ucuugguuac augaaauccc auc

23

<210> 39

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 39

ucuugguuac augaaauccc auc

23

<210> 40

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 40

ucuugguuac augaaauccc auc

23

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 41

|   |    |
|---|----|
| ucuugguuac augaaauc<br>c auc  | 23 |
| <210> 42  |    |
| <211> 23  |    |
| <212> DNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide       |    |
| <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 42  |    |
| ucuugguuac augaaauc<br>c auc  | 23 |
| <210> 43  |    |
| <211> 21  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide       |    |
| <400> 43  |    |
| ugggauuuca uguaac<br>caag a   | 21 |
| <210> 44  |    |
| <211> 21  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide       |    |
| <400> 44  |    |
| ugggauuuca uguaac<br>caag a   | 21 |
| <210> 45  |    |
| <211> 21  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide       |    |
| <400> 45  |    |

ugggauuuca uguaccaag a 21

<210> 46

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 46

ugggauuuca uguaccaag a 21

<210> 47

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 47

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 48

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 48

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 49

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 49

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 50

ucuugguuac augaaauccc auc

23

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 51

ugggauuuca uguaaccaag a

21

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 52

ugggauuuca uguaaccaag a

21

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 53

ugggauuuca uguaaccaag a

21

&lt;210&gt; 54

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 54

|                         |    |
|-------------------------|----|
| ugggauuuca uguaaccaag a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

<400> 55

|                         |    |
|-------------------------|----|
| ugggauuuca tguuacaaag a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 56

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 56

|                         |    |
|-------------------------|----|
| ugggauuuca uguaaccaag a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

&lt;400&gt; 57

ugggauuuca tguuacaaag a 21

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 58

ugggauuuca uguuaccaag a 21

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 59

uaggauuuca uguuaccaag a 21

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 60

ugggauuuca uguuaccaag a 21

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 61

|   |    |
|---|----|
| ugggauuuca uguaccaag a  | 21 |
| <210> 62  |    |
| <211> 21  |    |
| <212> DNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide       |    |
| <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 62  |    |
| ugggauuuca tguaccaaag a   | 21 |
| <210> 63  |    |
| <211> 19  |    |
| <br>  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide       |    |
| <400> 63  |    |
| ggauuucaug uaaccaaga  | 19 |
| <210> 64  |    |
| <211> 21  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide       |    |
| <400> 64  |    |
| ugggauuuca uguaccaag a  | 21 |
| <210> 65  |    |
| <211> 21  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223>  |    |
| > Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide                |    |

&lt;400&gt; 65

ugggauuuca uguaaccaag a 21

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 66

ugggauuuca uguaaccaag a 21

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 67

ugggauuuca uguaaccaag a 21

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 68

ggauuucaug uaaccaaga 19

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 69

ggauuucaug uaaccaaga

19

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 70

ugggauuuca uguaaccaag a

21

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 71

ggauuucaug uaaccaaga

19

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 72

ugggauuuca uguaaccaag a

21

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 73

ugggauuuca tguaacaaag a 21

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;220&gt;&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (17)..(17)

<223> 2-hydroxymethyl-tetrahydrofurane-4-methoxy-3-phosphate  
(abasic 2'-OMe furanose) nucleotide

&lt;400&gt; 74

ugggauuuca tguacnaag a 21

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;220&gt;&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (17)..(17)

<223> 2-hydroxymethyl-tetrahydrofurane-4-methoxy-3-phosphate  
(abasic 2'-OMe furanose) nucleotide

&lt;400&gt; 75

ugggauuuca tguacnaag a 21

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 76

ugggauuuca tguuacaaag a

21

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 77

ugggauuuca tguuacaaag a

21

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (17)..(17)

<223> 2-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-4-methoxy-3-phosphate

(abasic 2'-OMe furanose) nucleotide

<400> 78

ugggauuuca tguuacnaag a

21

<210> 79

<211> 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt;

&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 79

ugggauuuca tguaacaaag a

21

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 80

ggauuucatg uaacaaaga

19

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

&lt;220&gt;&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (17)..(17)

&lt;223&gt; 2-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-4-methoxy-3-phosphate

(abasic 2'-OMe furanose) nucleotide

&lt;400&gt; 81

ugggauuuca tguaacnaag a

21

<210> 82

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 82

ggauuucatg uaacaaaga

19

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 83

ugggauuca tguaaccaag a

21

<210> 84

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 84

ugggauuca tguaaccaag a

21

<210> 85

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

<400> 85

|                         |    |
|-------------------------|----|
| ugggauuuca tguaaccaag a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 86

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

<400> 86

|                         |    |
|-------------------------|----|
| ugggauuuca tguaaccaag a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 87

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 87

|                         |    |
|-------------------------|----|
| ugggauuuca uguaaccaag a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 88

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 88

|                         |    |
|-------------------------|----|
| ugggauuuca uguaaccaag a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 89

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 89

ugggauuuca uguaaccaag a

21

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 90

ugggauuuca uguaaccaag a

21

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 91

ugggauuuca uguaaccaag a

21

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 92

ugggauuuca uguaaccaag a

21

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 93

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ucuugguuac augaaauccc auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 94

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 94

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ucuugguuac augaaauccc auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 95

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 95

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ucuugguuac augaaauccc auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 96

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 96

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ucuugguuac augaaauccc auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 97

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 97

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ucuugguuac augaaauccc auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 98

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 98

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ucuugguuac augaaauccc auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 99

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 99

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ucuugguuac augaaauccc auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 100

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 100

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ucuugguuac augaaauccc auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 101

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 101

|                          |    |
|--------------------------|----|
| ucuugguuac augaaaucu auu | 23 |
|--------------------------|----|

<210> 102

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 102

|                              |    |
|------------------------------|----|
| ucuugguuac augaaaucu ccc auc | 23 |
|------------------------------|----|

<210> 103

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 103

|                              |    |
|------------------------------|----|
| ucuugguuac augaaaucu ccc auc | 23 |
|------------------------------|----|

<210> 104

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 104

|                              |    |
|------------------------------|----|
| ucuugguuac augaaaucu ccc auc | 23 |
|------------------------------|----|

<210> 105

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide  
<400> 105  
ucuugguuac augaaauccc a 21  
<210> 106  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 106  
ucuugguuac augaaauccc auc 23  
<210> 107  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 107  
ucuugguuac augaaauccc auc 23  
<210> 108  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 108  
ucuugguuac augaaauccc auc 23  
<210> 109  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 109

ucuugguuac augaaauc  
23  
<210> 110  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

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

<400> 110  
ucuugguuac augaaauc  
21  
<210> 111  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

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

<400> 111  
ucuugguuac augaaauc  
21  
<210> 112  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 112  
ucuugguuac augaaauc  
23  
<210> 113

<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

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

<400> 113  
ucuugguuac augaaauc  
21

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 114

ucuugguuac augaaauccc auc

23

&lt;210&gt; 115

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 115

ucuugguuac augaaauccc auc

23

&lt;210&gt; 116

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 116

ucuugguuac augaaauccc auc

23

&lt;210&gt; 117

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

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

<400> 117

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 118

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

<400> 118

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 119

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

<400> 119

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 120

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

&lt;400&gt; 120

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 121

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 122

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 122

ucuugguuac augaaauccc a 21

&lt;210&gt; 123

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 123

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 124

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 124

ucuugguuac augaaauccc a 21

<210> 125

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

<400> 125

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 126

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 126

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 127

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

&lt;400&gt; 127

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 128

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 128

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 129

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 129

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 130

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 130

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide  
<400> 131  
ucuugguuac augaaauccc auc 23  
<210> 132  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 132  
ucuugguuac augaaauccc auc 23  
<210> 133  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 133  
ucuugguuac augaaauccc auc 23  
<210> 134  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 134  
ucuugguuac augaaauccc auc 23  
<210> 135  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 135

uggggauuuc auguaaccaa a

21

&lt;210&gt; 136

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 136

uggggauuuc auguaaccaa a

21

&lt;210&gt; 137

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 137

uggggauuuc auguaaccaa a

21

&lt;210&gt; 138

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 138

ugggauuuca uguaccaag a

21

&lt;210&gt; 139

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 139

ugggauuuca uguaccaag a

21

&lt;210&gt; 140

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 140

ugggauuuca uguaaccaag a

21

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 141

ugggauuuca uguaaccaag a

21

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 142

uuucauguaa ccaagaguau u

21

&lt;210&gt; 143

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 143

uuucauguaa ccaagaguau u

21

&lt;210&gt; 144

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 144

uuucauguaa ccaagaguau u

21

&lt;210&gt; 145

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 145

uguaaccaag aguauuccau u

21

&lt;210&gt; 146

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 146

uguaaccaag aguauuccau u

21

&lt;210&gt; 147

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 147

uguaaccaag aguauuccau u

21

&lt;210&gt; 148

&lt;211&gt; 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 148

aaccaagagu auuccauuu u

21

<210> 149

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 149

aaccaagagu auuccauuu u

21

<210> 150

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 150

aaccaagagu auuccauuu u

21

<210> 151

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 151

uuuuuacuaa agcaguguuu u

21

<210> 152

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 152

|                         |    |
|-------------------------|----|
| uuuuuacuaa agcaguguuu u | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 153

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 153

|                         |    |
|-------------------------|----|
| uuuuuacuaa agcaguguuu u | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 154

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 154

|                         |    |
|-------------------------|----|
| uuacuaaagg aguguuuucc a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 155

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 155

|                         |    |
|-------------------------|----|
| cuaaaggagu guuuucaccu a | 21 |
|-------------------------|----|

<210> 156

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 156

cuaaaggcagu guuuucaccu a

21

<210> 157

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 157

cuaaaggcagu guuuucaccu a

21

<210> 158

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 158

ggcagagaca auaaaacauu a

21

<210> 159

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 159

ggcagagaca auaaaacauu a

21

<210> 160

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 160

ggcagagaca auaaaacauu a

21

<210> 161

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 161

cagagacaau aaaacauucc u

21

<210> 162

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 162

cagagacaau aaaacauucc u

21

<210> 163

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 163

cagagacaau aaaacauucc u

21

<210> 164

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

&lt;400&gt; 164

caauaaaaaca uuccugugaa a

21

&lt;210&gt; 165

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 165

caauaaaaaca uuccugugaa a

21

&lt;210&gt; 166

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 166

caauaaaaaca uuccugugaa a

21

&lt;210&gt; 167

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 167

uuugguuuaca ugaaauccca ucc

23

&lt;210&gt; 168

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 168

|   |    |
|---|----|
| uuugguuaca ugaaauccca ucc   | 23 |
| <210> 169   |    |
| <211> 23  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 169   |    |
| uuugguuaca ugaaauccca ucc   | 23 |
| <210> 170   |    |
| <211> 23  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 170   |    |
| ucuugguuac augaaauccc auc   | 23 |
| <210> 171   |    |
| <211> 23  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 171   |    |
| ucuugguuac augaaauccc auc   | 23 |
| <210> 172   |    |
| <211> 23  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 172   |    |
| ucuugguuac augaaauccc auc   | 23 |
| <210> 173   |    |

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 173

ucuugguuac augaaauccc auc 23

&lt;210&gt; 174

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 174

aauacucuug guuacaugaa auc 23

&lt;210&gt; 175

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 175

aauacucuug guuacaugaa auc 23

&lt;210&gt; 176

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 176

aauacucuug guuacaugaa auc 23

&lt;210&gt; 177

&lt;211&gt; 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 177

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aauggaauac ucuugguuac aug | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 178

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 178

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aauggaauac ucuugguuac aug | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 179

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 179

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aauggaauac ucuugguuac aug | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 180

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 180

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aaaaauggaa uacucuuggu uac | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 181

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 181

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aaaaauggaa uacucuuggu uac | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 182

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 182

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aaaaauggaa uacucuuggu uac | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 183

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 183

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aaaacacugc uuuaguaaaa aug | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 184

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 184

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aaaacacugc uuuaguaaaa aug | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 185

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 185

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aaaacacugc uuuaguaaaa aug | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 186

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 186

|                           |    |
|---------------------------|----|
| uugaaaaaac ugcuuuagua aaa | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 187

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 187

|                           |    |
|---------------------------|----|
| uaggugaaaa cacugcuuua gua | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 188

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 188

|                           |    |
|---------------------------|----|
| uaggugaaaa cacugcuuua gua | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 189

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide  
<400> 189  
uaggugaaaa cacugcuuua gua 23  
<210> 190  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 190  
uaauguuuuua uugucucugc cug 23  
<210> 191  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 191  
uaauguuuuua uugucucugc cug 23  
<210> 192  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 192  
uaauguuuuua uugucucugc cug 23  
<210> 193  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 193

|   |    |
|---|----|
| aggaauguuu uauugucucu gcc   | 23 |
| <210> 194   |    |
| <211> 23  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <br>  |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 194   |    |
| aggaauguuu uauugucucu gcc   | 23 |
| <210> 195   |    |
| <211> 23  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <br>  |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 195   |    |
| aggaauguuu uauugucucu gcc   | 23 |
| <210> 196   |    |
| <211> 23  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <br>  |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 196   |    |
| uuucacagga auguuuuauu guc   | 23 |
| <210> 197   |    |
| <211> 23  |    |
| <212> RNA   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <br>  |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 197   |    |
| uuucacagga auguuuuauu guc   | 23 |

&lt;210&gt; 198

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 198

uuucacagga auguuuuauu guc

23

&lt;210&gt; 199

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 199

augggauuuc auguaaccaa a

21

&lt;210&gt; 200

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 200

augggauuuc auguaaccaa a

21

&lt;210&gt; 201

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 201

augggauuuc auguaaccaa a

21

&lt;210&gt; 202

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 202

ugggauuuca uguaccaag a

21

&lt;210&gt; 203

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 203

ugggauuuca uguaccaag a

21

&lt;210&gt; 204

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 204

ugggauuuca uguaccaag a

21

&lt;210&gt; 205

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 205

ugggauuuca uguaccaag a

21

&lt;210&gt; 206

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 206

uuucauguaa ccaagaguau u

21

&lt;210&gt; 207

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 207

uuucauguaa ccaagaguau u

21

&lt;210&gt; 208

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 208

uuucauguaa ccaagaguau u

21

&lt;210&gt; 209

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 209

uguaaccaag aguauuccau u

21

&lt;210&gt; 210

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 210

uguaaccaag aguauuccau u

21

<210> 211

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 211

uguaaccaag aguauuccau u

21

<210> 212

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 212

aaccaagagu auuccauuuu u

21

<210> 213

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 213

aaccaagagu auuccauuuu u

21

<210> 214

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide  
<400> 214  
aaccaagagu auuccauuu u 21  
<210> 215  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 215  
uuuuuacuaa agcaguguuu u 21  
<210> 216  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 216  
uuuuuacuaa agcaguguuu u 21  
<210> 217  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 217  
uuuuuacuaa agcaguguuu u 21  
<210> 218  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 218

uuacuaaac aguguuuuca a

21

&lt;210&gt; 219

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 219

cuaaaggcagu guuuucaccu a

21

&lt;210&gt; 220

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 220

cuaaaggcagu guuuucaccu a

21

&lt;210&gt; 221

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 221

cuaaaggcagu guuuucaccu a

21

&lt;210&gt; 222

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 222

|  |    |
|--|----|
| ggcagagaca auaaaacauu a                                  | 21 |
| <210> 223  |    |
| <211> 21   |    |
| <212> RNA  |    |
| <213> Artificial Sequence                                |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic |    |
| oligonucleotide  |    |
| <400> 223  |    |
| ggcagagaca auaaaacauu a                                  | 21 |
| <210> 224  |    |
| <211> 21   |    |
| <212> RNA  |    |
| <213> Artificial Sequence                                |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic |    |
| oligonucleotide  |    |
| <400> 224  |    |
| ggcagagaca auaaaacauu a                                  | 21 |
| <210> 225  |    |
| <211> 21   |    |
| <212> RNA  |    |
| <213> Artificial Sequence                                |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic |    |
| oligonucleotide  |    |
| <400> 225  |    |
| cagagacaau aaaacauucc u                                  | 21 |
| <210> 226  |    |
| <211> 21   |    |
| <212> RNA  |    |
| <213> Artificial Sequence                                |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic |    |
| oligonucleotide  |    |
| <400> 226  |    |
| cagagacaau aaaacauucc u                                  | 21 |

&lt;210&gt; 227

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 227

cagagacaau aaaacauucc u

21

&lt;210&gt; 228

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 228

caauaaaaca uuccugugaa a

21

&lt;210&gt; 229

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 229

caauaaaaca uuccugugaa a

21

&lt;210&gt; 230

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 230

caauaaaaca uuccugugaa a

21

&lt;210&gt; 231

&lt;211&gt; 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 231

|                           |    |
|---------------------------|----|
| uuugguuaca ugaaauccca ucc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 232

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 232

|                           |    |
|---------------------------|----|
| uuugguuaca ugaaauccca ucc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 233

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 233

|                           |    |
|---------------------------|----|
| uuugguuaca ugaaauccca ucc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 234

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 234

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ucuugguuac augaaauccc auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 235

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 235

|                    |    |
|--------------------|----|
| ucuugguac augaaauc | 23 |
|--------------------|----|

<210> 236

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 236

|                    |    |
|--------------------|----|
| ucuugguac augaaauc | 23 |
|--------------------|----|

<210> 237

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 237

|                    |    |
|--------------------|----|
| ucuugguac augaaauc | 23 |
|--------------------|----|

<210> 238

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 238

|                       |    |
|-----------------------|----|
| aauacucuug guuacaugaa | 23 |
|-----------------------|----|

<210> 239

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 239

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aauacucuug guuacaugaa auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 240

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 240

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aauacucuug guuacaugaa auc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 241

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 241

|                            |    |
|----------------------------|----|
| aauggaaauac ucuugguuac aug | 23 |
|----------------------------|----|

<210> 242

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 242

|                            |    |
|----------------------------|----|
| aauggaaauac ucuugguuac aug | 23 |
|----------------------------|----|

<210> 243

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 243

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aauggaauac ucuugguuac aug | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 244

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 244

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aaaaauggaa uacucuuggu uac | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 245

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 245

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aaaaauggaa uacucuuggu uac | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 246

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 246

|                           |    |
|---------------------------|----|
| aaaaauggaa uacucuuggu uac | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 247

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 247

aaaacacugc uuuaguaaaa aug 23

<210> 248

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 248

aaaacacugc uuuaguaaaa aug 23

<210> 249

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 249

aaaacacugc uuuaguaaaa aug 23

<210> 250

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 250

uugaaaaaacac ugcuuuagua aaa 23

<210> 251

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 251

uaggugaaaa cacugcuuua gua 23

<210> 252  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 252  
uaggugaaaa cacugcuuua gua 23

<210> 253  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 253  
uaggugaaaa cacugcuuua gua 23

<210> 254  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 254  
uaauguuuua uugucucugc cug 23

<210> 255  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 255  
uaauguuuua uugucucugc cug 23

<210> 256

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 256

uaauguuuuua uugucucugc cug 23

&lt;210&gt; 257

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 257

aggaauguuu uauugucucu gcc 23

&lt;210&gt; 258

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 258

aggaauguuu uauugucucu gcc 23

&lt;210&gt; 259

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 259

aggaauguuu uauugucucu gcc 23

&lt;210&gt; 260

&lt;211&gt; 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 260

|                           |    |
|---------------------------|----|
| uuucacagga auguuuuauu guc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 261

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 261

|                           |    |
|---------------------------|----|
| uuucacagga auguuuuauu guc | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 262

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 262

|                           |    |
|---------------------------|----|
| uuucacagga auguuuuauu guc | 23 |
|---------------------------|----|