



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0054907  
(43) 공개일자 2023년04월25일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)<br/>A61P 25/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>A61K 48/00 (2013.01)<br/>A61K 31/713 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-7012768(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2015년08월27일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2022-7019943<br/>원출원일자(국제) 2015년08월27일<br/>심사청구일자 2022년07월12일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2023년04월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2015/047185</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/033326<br/>국제공개일자 2016년03월03일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>62/044,100 2014년08월29일 미국(US)<br/>62/150,596 2015년04월21일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드<br/>미국 매사추세츠주 02142 캠프릿지 헨리 에이. 테르미어 스퀘어 웨스트 켄달 스트리트 675</p> <p>(72) 발명자<br/>베텐코트 브라이언<br/>미국 매사추세츠주 02142 케임브리지 씨드 스트리트 300 알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드</p> <p>(74) 대리인<br/>장훈</p> |
|---|---|

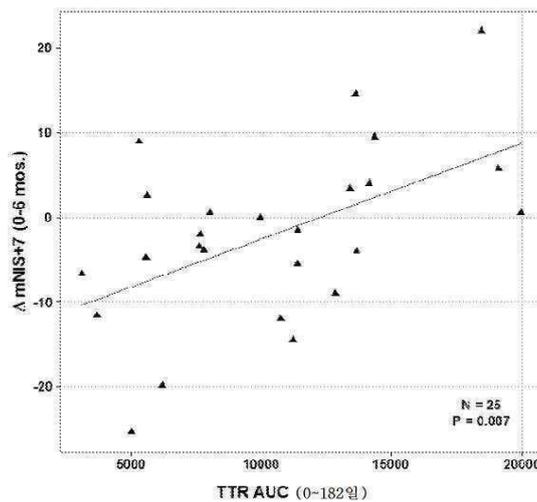
전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 트랜스타이레틴(TTR) 매개 아밀로이드증의 치료 방법

(57) 요약

유효량의 트랜스타이레틴(TTR)-억제 조성물을 투여하는 단계에 의해 인간 대상체에서 신경병증 손상 스코어(NIS) 또는 변형 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나 증가를 정지시키기 위한 방법이 본원에 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61P 25/00* (2018.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

TTR 관련 질병을 갖는 인간 대상체에서 신경병증 손상 스코어(NIS) 또는 변형 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나 NIS 또는 mNIS+7의 증가를 정지시키기 위한 방법으로서, 유효량의 트랜스타이레틴(TTR)-억제 조성물을 인간 대상체에 투여하는 단계를 포함하며, 유효량은 혈청 TTR 단백질의 농도를 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  미만으로 또는 적어도 80% 감소시키는 방법.

#### 청구항 2

TTR 관련 질병을 갖는 인간 대상체에서 NIS 또는 mNIS+7를 감소시키거나 증가를 정지시키기 위한 TTR-억제 조성물의 투여량 조정 방법으로서,

NIS 또는 mNIS+7이 증가하는 대상체에 TTR-억제 조성물을 투여하는 단계;

대상체에서 혈청 TTR 단백질 농도를 결정하는 단계;

혈청 TTR 단백질 농도가 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  초과인 경우, 대상체에 이후 투여되는 TTR-억제 조성물의 양을 증가시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

TTR-억제 조성물이 siRNA, 안티센스 분자, TTR 유전자를 표적으로 하는 siRNA 또는 안티센스 분자, 파티시란, 또는 레부시란인 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

TTR 관련 질병이 선천성 아밀로이드 다발신경병증(FAP), TTR 돌연변이가 보고된 FAP, 선천성 아밀로이드 심근병증(FAC), 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증(ATTR), 또는 증상성 다발신경병증인 방법.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

방법이 NIS 또는 mNIS+7에서 적어도 10% 감소를 일으키는 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

방법이 NIS 또는 mNIS+7의 증가를 정지시키는 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

혈청 TTR 단백질 농도가 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 또는 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  미만까지 감소되는 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

혈청 TTR 단백질 농도가 적어도 85%, 90%, 또는 95% 감소되는 방법.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

TTR-억제 조성물이 파티시란이고, 유효량이 0.01 내지 0.5 mg/kg, 0.15 내지 0.3 mg/kg, 또는 0.3 mg/kg인 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

TTR-억제 조성물이 파티시란이고, 유효량이 21일마다 1회, 선택적으로 21일마다 1회 15분 동안 1 mL/분에 이어 55분 동안 3 mL/분의 70분 주입을 통해, 투여되는 0.3 mg/kg인 방법.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

TTR-억제 조성물이 파티시란이고, 유효량이 0.3 mg/kg이고 3.3 mL/분의 60분 주입을 통해, 또는 15분 동안 1.1 mL/분에 이어 55분 동안 3.3 mL/분의 70분 주입을 통해 21-28일마다 2회 용량으로 투여되는 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

TTR-억제 조성물이 레부시란이고 유효량이 500 mg인 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

TTR-억제 조성물이 정맥내 투여되는 방법.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

TTR-억제 조성물이 사랑제 안정화제, 선택적으로 타파미디스 또는 디플루니살과 공동-투여되는 방법.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

혈청 TTR 단백질 농도가 면역화학 기반 검정, 효소 연관 면역흡착 검정(ELISA), 비타민 A 농도를 결정하기 위한 검정, RBP 농도를 결정하기 위한 검정, 또는 TTR mRNA 농도를 결정하기 위한 검정에 의해 결정되는 방법.

**청구항 16**

표 1에 기재된 0.3 mg/kg의 파티시란을 인간 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, TTR 관련 질병을 갖는 인간 대상체에서 신경병증 손상 스코어(NIS) 또는 변형 NIS(mNIS+7)를 감소시키기 위한 방법으로서, 파티시란이 정맥내 투여되며, 유효량은 인간 대상체의 혈청 중 TTR 단백질 농도를 50 µg/ml 미만까지 또는 적어도 80% 감소시키고, TTR 농도는 효소 연관 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 결정되는 방법.

**청구항 17**

TTR 관련 질병을 갖는 인간 대상체에서 신경병증 손상 스코어(NIS) 또는 변형 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나 증가를 정지시키기 위한 방법으로서, 표 1에 기재된 파티시란 0.3 mg/kg을 21일마다 1회 인간 대상체에 정맥내 투여하는 단계 및 ELISA에 의해 결정되는 혈청 TTR 단백질 농도를 50 µg/ml 미만까지 또는 적어도 80% 감소시키는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 18**

TTR 관련 질병을 갖는 인간 대상체에서 신경병증 손상 스코어(NIS) 또는 변형 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나 증가

를 정지시키기 위한 방법으로서, 유효량의 트랜스타이레틴(TTR)-억제 조성물을 인간 대상체에 투여하는 단계를 포함하며, 유효량은 치료 6개월 후 9000 내지 18000의 평균 혈청 TTR AUC를 일으키는 방법.

**청구항 19**

표 1에 기재된 파티시란을 포함하는 조성물.

**청구항 20**

표 2에 기재된 파티시란으로 구성되는 조성물.

**청구항 21**

인간 대상체에서 트랜스타이레틴(TTR) 발현을 억제하기 위한 방법으로서, 유효량의 제19항 또는 제20항의 조성물을 인간 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서,  
조성물이 0.01 내지 0.5 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

**청구항 23**

제21항에 있어서,  
조성물이 0.15 내지 0.3 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

**청구항 24**

제21항에 있어서,  
조성물이 0.3 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

**청구항 25**

제21항에 있어서,  
조성물이 21일마다 1회 0.3 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

**청구항 26**

제21항에 있어서,  
조성물이 15분 동안 1 mL/분에 이어 55분 동안 3 mL/분의 70분 주입을 통해 21일마다 1회 0.3 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

**청구항 27**

제21항에 있어서,  
치료가 혈청 트랜스타이레틴에 대해 ELISA로 결정되는 82.3% 내지 86.8% 범위의 트랜스타이레틴 수준의 평균 감소를 일으키는 방법.

**청구항 28**

제21항에 있어서,  
인간 대상체가 경도-내지-중등도 신경병증을 갖는 트랜스타이레틴 아밀로이드증의 생검 증명 진단을 갖는 방법.

**청구항 29**

인간 대상체에서 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증(ATTR)의 치료 방법으로서, 유효량의 제19항 또는 제20항의 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서,  
조성물이 0.01 내지 0.5 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

**청구항 31**

제29항에 있어서,  
조성물이 0.15 내지 0.3 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

**청구항 32**

제29항에 있어서,  
조성물이 0.3 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

**청구항 33**

제29항에 있어서,  
조성물이 21일마다 1회 0.3 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

**청구항 34**

제29항에 있어서,  
조성물이 15분 동안 1 mL/분에 이어 55분 동안 3 mL/분의 70분 주입을 통해 21일마다 1회 0.3 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

**청구항 35**

제29항에 있어서,  
치료가 대상체의 신경병증 손상 스코어(NIS)의 감소를 일으키는 방법.

**청구항 36**

제29항에 있어서,  
인간 대상체가 증상성 다발신경병증을 갖는 방법.

**청구항 37**

제29항에 있어서,  
인간 대상체가 보고된 TTR 돌연변이를 갖는 FAP 진단을 갖는 방법.

**청구항 38**

제19항 또는 제20항의 조성물 및 사용 지침을 포함하는 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 둘 다 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 포함되는 2014년 8월 29일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 제62/044,100호 및 2015년 4월 24일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 제62/150,596호의 이익 및 우선권을 주장한다.

**배경 기술**

- [0003] 트랜스타이레틴(TTR)은 간에서 주로 생산되는 사랑체성 단백질이다. TTR 유전자에서의 돌연변이는 단백질 사랑체를 탈안정화하여 단량체의 미스폴딩 및 TTR 아밀로이드 피브릴(ATTR)로의 응집으로 이어진다. 조직 침착은 전신 ATTR 아밀로이드증을 일으킨다(Coutinho et al., Forty years of experience with type I amyloid neuropathy. Review of 483 cases. In: Glenner et al., Amyloid and Amyloidosis, Amsterdam: Excerpta Media, 1980 pg. 88-93; Hou et al., Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration. FEBS J 2007, 274: 1637-1650; Westermark et al., Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87: 2843-2845). 100가지를 넘게 보고된 TTR 돌연변이가 질환 증상 스펙트럼을 나타낸다.
- [0004] TTR 아밀로이드증은 다양한 형태로 분명해진다. 말초 신경계가 더 뚜렷하게 영향받은 경우, 질환은 선천성 아밀로이드 다발신경병증(FAP)으로 명명된다. 심장이 주로 관여되지만 신경계는 관여되지 않은 경우, 질환은 선천성 아밀로이드 심근병증(FAC)으로 불린다. 세 번째 주요 유형의 TTR 아밀로이드증은 연수막/CNS(중추 신경계) 아밀로이드증으로 불린다.
- [0005] 선천성 아밀로이드 다발신경병증(FAP) 및 ATTR-연관 심근병증과 연관된 가장 일반적인 돌연변이는 각각 Val30Met(Coelho et al., Tafamidis for transthyretin familial amyloid polyneuropathy: a randomized, controlled trial. Neurology 2012, 79: 785-792) 및 Val122Ile이다(Connors et al., Cardiac amyloidosis in African Americans: comparison of clinical and laboratory features of transthyretin V122I amyloidosis and immunoglobulin light chain amyloidosis. Am Heart J 2009, 158: 607-614).
- [0006] FAP에 대한 현재의 치료 옵션은 순환하는 아밀로이드 생성 단백질의 양 안정화 또는 감소에 초점을 맞춘다. 동소 간 이식은 돌연변이체 TTR 수준을 감소시키며(Holmgren et al., Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). Clin Genet 1991, 40: 242-246), 초기-단계 FAP 환자에서 개선된 생존이 보고되었지만, 야생형 TTR의 침착이 계속 일어날 수 있다(Yazaki et al., Progressive wild-type transthyretin deposition after liver transplantation preferentially occurs into myocardium in FAP patients. Am J Transplant 2007, 7:235-242; Adams et al., Rapid progression of familial amyloid polyneuropathy: a multinational natural history study Neurology 2015 Aug 25; 85(8) 675-82; Yamashita et al., Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy. Neurology 2012, 78: 637-643; Okamoto et al., Liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: impact on Swedish patients' survival. Liver Transpl 2009, 15:1229-1235; Stangou et al., Progressive cardiac amyloidosis following liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy: implications for amyloid fibrillogenesis. Transplantation 1998, 66:229-233; Fosby et al., Liver transplantation in the Nordic countries - An intention to treat and post-transplant analysis from The Nordic Liver Transplant Registry 1982-2013. Scand J Gastroenterol. 2015 Jun; 50(6):797-808. Transplantation, in press).
- [0007] 타파미디스(Tafamidis) 및 디플루니살(diflunisal)은 순환 TTR 사랑체를 안정화하며, 이는 질환 진행 속도를 늦출 수 있다(Berk et al., Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. JAMA 2013, 310: 2658-2667; Coelho et al., 2012; Coelho et al., Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. J Neurol 2013, 260: 2802-2814; Lozeron et al., Effect on disability and safety of Tafamidis in late onset of Met30 transthyretin familial amyloid polyneuropathy. Eur J Neurol 2013, 20: 1539-1545). 그러나, 환자의 상당 비율에서 치료 시 증상이 계속 악화되어, FAP에 대한 새로운 질환-변형 치료에 대한 필요성을 강조한다.
- [0008] TTR을 표적으로 하는 dsRNA의 기재는, 예를 들어 국제 특허 출원 PCT/US2009/061381(WO2010/048228) 및 국제 특허 출원 PCT/US2010/055311(WO2011/056883)에서 찾아볼 수 있다.

## 발명의 내용

## 해결하려는 과제

## 과제의 해결 수단

[0009] 유효량의 트랜스타이레틴(TTR)-억제 조성물을 투여하는 단계에 의해 인간 대상체에서 신경병증 손상 스코어(NIS) 또는 변형 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나 증가를 정지시키기 위한 방법이 본원에 기재되며, 여기서 유효량은 인간 대상체의 혈청 중 TTR 단백질의 농도를 50  $\mu\text{g/ml}$  미만으로 또는 적어도 80% 감소시킨다. 또한 NIS 또는 FAP가 증가하는 대상체에 TTR-억제 조성물을 투여하는 단계 및 NIS 또는 FAP가 증가하는 대상체에서 TTR 단백질 수준을 결정하는 단계에 의한, 증가하는 NIS 또는 선천성 아밀로이드 다발신경병증(FAP)의 치료를 위한 TTR-억제 조성물의 투여량을 조정하기 위한 방법이 본원에 기재된다. 일부 실시형태에서, 대상체에 이후 투여되는 TTR-억제 조성물의 양은 TTR 단백질 수준이 50  $\mu\text{g/ml}$  초과인 경우 증가되고, 대상체에 이후 투여되는 TTR-억제 조성물의 양은 TTR 단백질 수준이 50  $\mu\text{g/ml}$  미만인 경우 감소된다. 또한, TTR 억제 siRNA의 제형화된 버전이 본원에 기재된다.

**도면의 간단한 설명**

[0010] 도 1은  $\Delta\text{NIS}$  또는  $\Delta\text{mNIS+7}$ 에서의 진행 및 TTR 농도 간 상관관계를 나타내는 그래프이다.

도 2는  $\Delta\text{NIS}$  또는  $\Delta\text{mNIS+7}$ 에서의 진행 및 TTR 농도 간 상관관계를 나타내는 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0011] 아래에 보다 상세히 기재된 바와 같이, 유효량이 혈청 중 TTR 단백질의 농도를 50  $\mu\text{g/ml}$  미만으로 또는 적어도 80% 감소시키도록 하는 유효량의 트랜스타이레틴(TTR)-억제 조성물을 투여하는 단계에 의해 인간 대상체에서 신경병증 손상 스코어(NIS) 또는 변형 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나 증가를 정지시키기 위한 방법이 본원에 개시된다. 일 실시형태에서, TTR-억제 조성물은 파티시란(patisiran)이다. 파티시란은 정맥내(IV) 투여를 위한 간친화성 지질 나노입자(LNP)에 제형화된, TTR에 대해 특이적인 소형 간섭 리보핵산(siRNA)이다.

**TTR-억제 조성물**

[0013] 본원에 기재된 방법에는 TTR-억제 조성물의 투여가 포함된다. TTR-억제 조성물은 인간 대상체의 혈청 중 TTR 단백질의 농도를 감소시키는 임의의 화합물일 수 있다. 예에는 RNAi, 예를 들어, siRNA가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. siRNA의 예에는 TTR 유전자를 표적으로 하는 siRNA, 예를 들어, 아래의 파티시란(보다 상세히 기재됨) 및 레부시란(revusiran)이 포함된다. 예에는 또한 안티센스 RNA가 포함된다. TTR 유전자를 표적으로 하는 안티센스 RNA의 예는 미국 특허 제8,697,860호에서 찾아볼 수 있다.

[0014] TTR-억제 조성물은 TTR 유전자의 발현을 억제한다. 본원에서 이용되는 "트랜스타이레틴("TTR")은 세포 내의 유전자를 나타낸다. TTR은 ATTR, HsT2651, PALB, 프리알부민, TBPA, 및 트랜스타이레틴(프리알부민, 아밀로이드증 I형)으로도 알려져 있다. 인간 TTR mRNA 전사체의 서열은 NM\_000371에서 찾아볼 수 있다. 마우스 TTR mRNA의 서열은 NM\_013697.2에서 찾아볼 수 있고, 래트 TTR mRNA의 서열은 NM\_012681.1에서 찾아볼 수 있다.

[0015] "침묵", "~의 발현을 억제하다", "~의 발현을 하향조절하다", "~의 발현을 억제하다" 등의 용어들은 TTR 유전자를 지칭하는 한, 본원에서 TTR 유전자가 전사되며, TTR 유전자의 발현이 억제되도록 처리된 제1 세포 또는 세포들의 군으로부터 분리될 수 있는 mRNA의 양이 제1 세포 또는 세포들의 군과 실질적으로 동일하지만 그렇게 처리되지 않은 제2 세포 또는 세포들의 군(대조군 세포들)에 비해 감소하는 것에 의해 분명해지는 바와 같이, TTR 유전자의 발현을 적어도 부분적으로 억제하는 것을 지칭한다. 억제도는 통상적으로 하기의 식으로 표현된다:

$$\frac{(\text{대조군 세포들에서의 mRNA}) - (\text{처리된 세포들에서의 mRNA})}{(\text{대조군 세포들에서의 mRNA})} \bullet 100\%$$

[0016] 대안적으로, 억제도는 TTR 유전자 발현에 기능적으로 연결된 매개변수의 감소, 예를 들어, 세포에 의해 분비된 TTR 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 양 또는 특정 표현형, 예를 들어, 세포자살을 나타내는 세포들의 숫자로 환산하여 주어질 수 있다. 원칙적으로, TTR 유전자 침묵화는 상기 표적을 발현하는 임의의 세포 내에서 항상적으로 또는 유전 공학에 의하여 그리고 임의의 적절한 검정에 의하여 결정될 수 있다. 그러나, 주어진 dsRNA가 TTR 유전자의 발현을 특정 정도만큼 억제함으로써 본 발명에 포함되는지 여부를 결정하기 위해 참조가 필요한 경우, 하기 실시예에 제공된 검정은 그러한 참조 역할을 한다.

**RNAi**

[0019] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 방법은 RNAi, 예를 들어, siRNA, 예를 들어, TTR 유전자의 발현을 억제하기 위한 dsRNA인 TTR-억제 조성물을 이용한다. 일 실시형태에서, siRNA는 TTR 유전자를 표적으로 하는 dsRNA이다.

dsRNA에는 TTR 유전자의 발현에서 형성되는 mRNA의 적어도 일부와 상보적인 상보성 영역을 갖는 안티센스 가닥이 포함되며, 상보성 영역은 길이가 30 뉴클레오티드 미만, 일반적으로 길이가 19 내지 24 뉴클레오티드다. 본 발명의 dsRNA에는 하나 이상의 단일-가닥 뉴클레오티드 오버행이 추가로 포함될 수 있다. TTR-억제 siRNA는 둘 다 그 전체가 본원에 참조로 포함된, 국제 특허 출원 PCT/US2009/061381(WO2010/048228) 및 국제 특허 출원 PCT/US2010/055311(WO2011/056883)에 기재된다.

[0020] 일 실시형태에서, TTR-억제 조성물은 아래에 보다 상세히 기재된 파티시란이다. 또 다른 실시형태에서, TTR-억제 조성물은 3가 GalNAc 탄수화물 클러스터에 접합된 TTR에 대해 특이적인 siRNA인 레부시란이다. 레부시란의 전체 설명은, 그 내용의 전체가 참조로 포함되는, 국제 출원 번호 PCT/US2012/065691 및 미국 특허 공개 US20140315835에서 찾아볼 수 있다.

[0021] dsRNA에는 혼성화하여 듀플렉스 구조를 형성하기에 충분히 상보적인 2개의 RNA 가닥이 포함된다. dsRNA의 하나의 가닥(안티센스 가닥)에는 TTR 유전자의 발현 동안 형성되는 mRNA의 서열에서 유래되는, 표적 서열과 실질적으로 상보적인, 그리고 일반적으로 완전히 상보적인 상보성 영역이 포함되며, 다른 가닥(센스 가닥)에는 안티센스 가닥과 상보적인 영역이 포함되어, 두 가닥이 적합한 조건 하에 조합된 경우 혼성화되고 듀플렉스 구조를 형성하게 된다. 용어 "안티센스 가닥"은 표적 서열과 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 dsRNA 가닥을 지칭한다. 본원에서 이용되는 "상보성 영역"이라는 용어는 본원에서 정의된 바와 같이 서열, 예를 들어 표적 서열과 실질적으로 상보적인 안티센스 가닥 상의 영역을 지칭한다. 상보성 영역이 표적 서열과 완전히 상보적이 아닌 경우, 말단 영역에서 미스매치가 가장 잘 관용되며, 존재하는 경우 일반적으로 말단 영역 또는 영역들에, 예를 들어 5' 및/또는 3' 말단의 6, 5, 4, 3, 또는 2 뉴클레오티드 이내에 존재한다. 본원에서 이용되는 "센스 가닥"이라는 용어는 안티센스 가닥의 영역과 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 dsRNA 가닥을 지칭한다. 일반적으로, 듀플렉스 구조는 길이가 15에서 80 염기쌍 사이, 또는 15에서 60 염기쌍 사이 또는 15에서 30 염기쌍 사이 또는 25에서 30 염기쌍 사이, 또는 18에서 25 염기쌍 사이, 또는 19에서 24 염기쌍 사이, 또는 19에서 21 염기쌍 사이, 또는 19, 20, 또는 21 염기쌍이다. 일 실시형태에서, 듀플렉스는 길이가 19 염기쌍이다. 또 다른 실시형태에서, 듀플렉스는 길이가 21 염기쌍이다.

[0022] dsRNA의 각각의 가닥은 일반적으로 길이가 15에서 80 뉴클레오티드 사이 또는 15에서 60 뉴클레오티드 사이 또는 15에서 30 뉴클레오티드 사이, 또는 18에서 25 뉴클레오티드 사이 또는 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 뉴클레오티드이다. 기타 실시형태들에 있어서, 각각의 가닥은 길이가 25 내지 30 뉴클레오티드이다. 듀플렉스의 각각의 가닥은 동일한 길이어거나 상이한 길이일 수 있다. 2 개의 상이한 siRNA들이 병용되는 경우, 각각의 siRNA의 각 가닥의 길이는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0023] dsRNA는 하나 이상의 뉴클레오티드들의 하나 이상의 단일-가닥 오버행(들)을 포함할 수 있다. 일 실시형태에 있어서, dsRNA의 적어도 하나의 말단은 1 내지 4, 일반적으로 1 또는 2 뉴클레오티드의 단일-가닥 뉴클레오티드 오버행을 갖는다. 다른 실시형태에 있어서, dsRNA의 안티센스 가닥은 센스 가닥 상의 3' 말단 및 5' 말단에서 각각 1 내지 10 뉴클레오티드의 오버행들을 갖는다. 또 다른 실시형태에 있어서, dsRNA의 센스 가닥은 안티센스 가닥 상의 3' 말단 및 5' 말단에서 각각 1 내지 10 뉴클레오티드의 오버행들을 갖는다.

[0024] 본원에 사용되고 달리 지시되지 않으면, 제2 뉴클레오티드 서열과 관련하여 제1 뉴클레오티드 서열을 기술하는 데 이용될 때 "상보적"이라는 용어는 당업자가 이해하는 바와 같이, 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 특정 조건 하에서 혼성화하여 듀플렉스(duplex) 구조를 형성하는, 제1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 능력을 지칭한다. 이러한 조건은, 예를 들어 가혹한 조건일 수 있고, 가혹한 조건은 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA, 50°C 또는 70°C에서 12-16시간에 뒤이은 세척을 포함할 수 있다. 유기체 내에서 직면할 수 있는 생리학적으로 적절한 조건과 같은 기타 조건을 적용할 수 있다. 당업자는 혼성화된 뉴클레오티드의 최종적인 적용에 따라 2 개 서열의 상보성 평가를 위해 가장 적절한 조건 세트를 결정할 수 있을 것이다.

[0025] 이는 제1 및 제2 뉴클레오티드 서열의 전체 길이에 걸쳐 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드에 대한 제1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 염기쌍 형성을 포함한다. 이러한 서열은 본원에서 각각에 대하여 "완전히 상보적인" 것으로 지칭될 수 있다. 그러나, 제1 서열이 본원에서 제2 서열에 대하여 "실질적으로 상보적인" 것으로 지칭되는 경우, 두 서열은 완전히 상보적일 수 있거나, 이들의 최종적인 적용에 대하여 가장 적절한 조건 하에서 혼성화하는 능력을 유지하면서, 혼성화 시에 이들이 하나 이상이지만, 일반적으로 4, 3 또는 2 개 이하의 미스매치된 염기쌍들을 형성할 수 있다. 그러나, 2 개의 올리고뉴클레오티드들이 혼성화 시에 하나 이상의 단일 가닥 오버행들을 형성하도록 설계되

는 경우, 그러한 오버행들은 상보성의 결정에 대하여 미스매치로 간주되지 않는다. 예를 들면, 길이가 더 긴 올리고뉴클레오타이드가 길이가 더 짧은 올리고뉴클레오타이드에 대하여 완전 상보적인 21 뉴클레오타이드들의 서열을 포함하는, 길이가 21 뉴클레오타이드인 하나의 올리고뉴클레오타이드 및 길이가 23 뉴클레오타이드인 또 다른 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 dsRNA는 본원에 기술된 목적을 위해 "완전히 상보적인" 것으로 지칭될 수 있다.

[0026] 본원에 사용된 "상보적인" 서열은 혼성화하는 이들의 능력에 대하여 상기 요구사항이 충족되는 한, 비-왓슨-크릭 염기쌍 및/또는 비-천연 및 변형 뉴클레오타이드로부터 형성된 염기쌍을 포함하거나 전적으로 이들로부터 형성될 수도 있다. 이러한 비-왓슨-크릭 염기쌍들은 G:U 워블(Wobble) 또는 후그스타인 염기쌍 형성을 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다.

[0027] 본원에서 "상보적인", "완전히 상보적인" 및 "실질적으로 상보적인"이라는 용어들은 이들의 이용의 맥락에서 이해될 바와 같이, dsRNA의 센스 가닥 및 안티센스 가닥 사이, 또는 dsRNA의 안티센스 가닥 및 표적 서열 사이의 염기 매칭에 대하여 이용될 수 있다.

[0028] 본원에 사용된, 전령 RNA(mRNA)의 "적어도 일부에 실질적으로 상보적인" 폴리뉴클레오타이드는 5' UTR, 개방 해독 틀(open reading frame: ORF) 또는 3' UTR을 포함하는, 관심 대상 mRNA(예를 들어, TTR을 인코딩하는 mRNA)의 연속 부분에 실질적으로 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 예를 들면, 서열이 TTR을 인코딩하는 mRNA의 비 단속(non-interrupted) 부분에 실질적으로 상보적이라면 폴리뉴클레오타이드는 TTR mRNA의 적어도 일부에 상보적이다.

[0029] dsRNA는, 예를 들면, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.로부터 상업적으로 이용가능한 것과 같이, 예를 들어, 자동화된 DNA 합성기를 이용함으로써, 하기에 더 토의된 바와 같이 업계에 알려진 표준 방법에 의하여 합성될 수 있다.

[0030] **변형 dsRNA**

[0031] 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기재된 방법에서 이용되는 dsRNA는 화학적으로 변형되어 안정성을 강화시킨다. 본 발명에서 특징되는 핵산은 본원에 참조로 포함되어 있는 "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA에 기술된 방법과 같이 업계에 잘 확립된 방법에 의하여 합성되고/되거나 변형될 수 있다. 본 발명에서 유용한 dsRNA 화합물의 구체적인 예로는 변형된 골격을 포함하거나 천연 인티뉴클레오시드 연결(internucleoside linkages)을 포함하지 않는 dsRNA를 포함한다. 본 명세서에 정의된 바와 같이, 변형된 골격을 갖는 dsRNA는 상기 골격 내에 인 원자를 보유하는 것들과 상기 골격 내에 인 원자를 갖지 않는 것들을 포함한다. 본 명세서를 위해, 그리고 때로는 업계에 참조된 바와 같이, 그 인티뉴클레오시드 골격 내에 인 원자를 갖지 않는 변형 dsRNA도 올리고뉴클레오시드로 간주될 수 있다.

[0032] 변형 dsRNA 골격은 예를 들면, 포스포로티오에이트, 카이랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 3'-알킬렌 포스포네이트 및 카이랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 기타 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 3'-아미노 포스포아미데이트 및 아미노알킬포스포아미데이트를 포함하는 포스포아미데이트, 티오노포스포아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르 및 보통의 3'-5' 연결, 이들의 2'-5' 연결된 유사체 및 반전된 극성을 갖는 보라노포스포에이트를 포함하며, 뉴클레오시드 단위의 인접 쌍들은 연결된 3'-5' 내지 5'-3' 또는 2'-5' 내지 5'-2'이다. 다양한 염, 혼합된 염 및 유리 산 형태도 포함된다.

[0033] 상기 인-함유 연결의 제제를 교시하는 대표적인 미국 특허들은 그 각각이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 및 5,625,050 호를 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다.

[0034] 그 안에 인 원자를 포함하지 않는 변형 dsRNA 골격은 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 인티뉴클레오시드 연결, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 시클로알킬 인티뉴클레오시드 연결 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 인티뉴클레오시드 연결에 의하여 형성된 골격을 갖는다. 이들은 (부분적으로는 뉴클레오시드의 당 부분으로부터 형성된) 모르폴리노 연결; 실록산 골격; 설파이드, 설파사이드 및 설피온 골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 알켄 함유 골격; 설파메이트 골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 골격; 설포네이트 및 설피온아미드 골격; 아미드 골격; 및 혼합된 N, O, S 및 CH<sub>2</sub> 성분 부분

을 갖는 기타사항을 갖는 것들을 포함한다.

- [0035] 상기 올리고뉴클레오시드의 체제를 교시하는 대표적인 미국 특허들은 그 각각이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 및 5,677,439 호를 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다.
- [0036] 기타 적당한 dsRNA 의태물(mimetics)에 있어서, 뉴클레오티드 단위의 당 및 인터뉴클레오시드 연결, 즉, 골격은 모두 신규한 그룹으로 대체된다. 염기 단위는 적절한 핵산 표적 화합물과 혼성화되기 위해 유지된다. 하나의 그러한 올리고머 화합물, 우수한 혼성화 특성을 갖는 것으로 밝혀진 dsRNA 의태물은 펩티드 핵산(PNA)로 지칭된다. PNA 화합물에 있어서, dsRNA의 당 골격은 골격, 특히 아미노에틸글리신 골격을 포함하는 아미드로 대체된다. 뉴클레오염기는 지탱되며 골격의 아미드 부분의 아자 질소 원자에 직접 또는 간접으로 결합된다. PNA 화합물의 체제를 교시하는 대표적인 미국 특허들은 그 각각이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262 호를 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다. PNA 화합물의 다른 교시는 Nielsen *et al.*, Science, 1991, 254, 1497-1500에서 찾을 수 있다.
- [0037] 본 발명의 다른 실시형태들은 포스포로티오에이트 골격을 갖는 dsRNA 및 헤테로원자 골격, 및 특히, 상기 참조된 미국 특허 번호 5,489,677 호의  $--CH_2--NH--CH_2--$ , [메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 골격으로 알려진]  $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ ,  $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$ ,  $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$  및  $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$  [여기서, 자연상태 포스포디에스테르 골격(native phosphodiester backbone)은  $--O--P--O--CH_2--$ 로 표시됨] 및 상기 참조된 미국 특허 번호 5,602,240 호의 아미드 골격을 갖는 올리고뉴클레오시드이다. 또한, 상기 참조된 미국 특허 번호 5,034,506 호의 모르폴리노 골격 구조를 갖는 dsRNA가 바람직하다.
- [0038] 변형 dsRNA는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티들을 포함할 수 있다. 바람직한 dsRNA는 2' 위치에서 하기 사항들 중 하나를 포함한다: OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알킬닐; 또는 O-알킬-O-알킬로서, 상기 알킬, 알케닐 및 알킬닐은 치환 또는 비치환 C1 내지 C10 알킬 또는 C2 내지 C10 알케닐 및 알킬닐일 수 있다.  $O[(CH_2)_nO]mCH_3$ ,  $O(CH_2)_nOCH_3$ ,  $O(CH_2)_nNH_2$ ,  $O(CH_2)_nCH_3$ ,  $O(CH_2)_nONH_2$ , 및  $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ 로서, n 및 m은 1 내지 약 10인 것이 특히 바람직하다. 다른 바람직한 dsRNA는 2' 위치에서 하기사항들 중 하나를 포함한다: C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알카릴, 아랄킬, O-알카릴 또는 O-아랄킬, 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>, 헤테로시클로알킬, 헤테로시클로알카릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 시릴, RNA 절단기(cleaving group), 지시기, 인터칼레이터, dsRNA의 약동학적 특성을 개선하기 위한 기 또는 dsRNA의 약력학적 특성을 개선하기 위한 기 및 유사한 특성을 갖는 기타 치환체. 바람직한 변형은 2'-메톡시에톡시(2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로도 알려진 2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)(Martin *et al.*, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) 즉, 알콕시-알콕시기를 포함한다. 다른 바람직한 변형은 본원에서 하기 실시예에 기술된 바와 같이, 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 즉, 2'-DMAOE로도 알려진  $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$  기, 및 본원에서 하기 실시예에 기술된 바와 같이, (업계에서 2'-O-디메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE로도 알려진) 2'-디메틸아미노에톡시에톡시, 즉, 2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>를 포함한다.
- [0039] 다른 바람직한 변형은 2'-메톡시(2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-아미노프로폭시(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) 및 2'-플루오로(2'-F)를 포함한다. dsRNA 상의 기타 위치들, 특히, 3' 터미널 뉴클레오티드 상 또는 2'-5' 연결된 dsRNA에서 당의 3' 위치 및 5' 터미널 뉴클레오티드의 5' 위치에서 유사한 변형도 이루어질 수 있다. dsRNA는 펜토피라노실 당을 대신하여 시클로부틸 모이어티들과 같은 당 의태물을 가질 수도 있다. 그러한 변형 당 구조의 체제를 교시하는 대표적인 미국 특허들은 그중 특정한 것이 본 출원과 공유되며 그 각각이 본원에 전체가 참조로 포함된 미국 특허 번호 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 및 5,700,920 호를 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다.
- [0040] dsRNA는 (업계에서 단순히 "염기"로 자주 지칭되는) 뉴클레오염기 변형 또는 치환을 포함할 수도 있다. 본원에 사용된 "비변형" 또는 "천연" 뉴클레오염기는 퓨린계인 아데닌(A) 및 구아닌(G) 및 피리미딘계인 티민(T), 시토신(C) 및 우라실(U)를 포함한다. 변형 뉴클레오염기는 5-메틸시토신(5-me-C), 5-히드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 기타 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필

및 기타 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실(슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 기타 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히, 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 기타 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-디아자구아닌 및 7-디아자아데닌, 및 3-디아자구아닌 및 3-디아자아데닌과 같은 기타 합성 및 천연 뉴클레오염기를 포함한다. 다른 뉴클레오염기는 미국 특허 번호 3,687,808 호에 개시된 것들, The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990에 개시된 것들, Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613에 개시된 것들 및 Sanghvi, Y S., Chapter 15, DsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993에 개시된 것들을 포함한다. 이러한 뉴클레오염기들 중 특정한 것들은 본 발명에서 특징된 올리고머 화합물의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 이러한 것들은 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및, 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함하는 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린을 포함한다. 5-메틸시토신 치환으로 인해 핵산 듀플렉스 안정성이 0.6° C 내지 1.2° C 정도 증가하는 것으로 밝혀져 있으며(Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. 및 Lebleu, B., Eds., DsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), 5-메틸시토신 치환은 더욱 더 특히, 2'-O-메톡시에틸 당 변환과 조합되는 경우 예시적인 염기 치환이다.

[0041] 기타 변형 뉴클레오염기뿐만 아니라 상기 언급된 변형 뉴클레오염기의 일부의 제제를 교시하는 대표적인 미국 특허는 그 각각이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 및 5,681,941 호 뿐만 아니라 상기 언급된 미국 특허 번호 3,687,808 호 및 또한 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,750,692 호도 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다.

[0042] **파티시란**

[0043] 일 실시형태에서, TTR-억제 조성물은 파티시란(patisiran)이다. 파티시란은 정맥내(IV) 투여를 위해 간친화성 지질 나노입자(LNP)에 제형화된, TTR에 대해 특이적인 소형 간섭 리보핵산(siRNA)이다(Akinc A, Zumbuhl A, et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. Nat Biotechnol. 2008;26(5):561-569). 상기 TTR siRNA는 WT TTR 뿐만 아니라 모든 보고된 TTR 돌연변이와의 상동성을 보장하고 확인하기 위해 TTR 유전자의 3' UTR 영역 내에 표적 영역을 갖는다. 간으로의 LNP-매개 전달 후, 파티시란은 분해를 위해 TTR mRNA를 표적으로 하여, RNAi 기전을 통해 돌연변이체 및 WT TTR 단백질의 강력하고 지속된 감소를 일으킨다.

[0044] TTR siRNA(ALN-18328로도 알려져 있음)는 하기 서열을 갖는 센스 가닥 및 안티센스 가닥으로 구성된다; 소문자는 뉴클레오티드의 2'-O-메틸 버전을 나타낸다:

	가닥	올리고 명칭	5' 에서 3' 으로의 서열	SEQ ID NO:
AD-18328	센스	A-32345	GuAaccAAGAGuAuuccAudTdT	1
AD-18328	안티센스	A-32346	AUGGAauACUCUUGGUuACdTdT	2

[0045]

[0046] 제조 과정은 통상적인 고상 올리고뉴클레오티드 합성에 의한 듀플렉스의 2개의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 합성으로 구성된다. 정제 후, 2개의 올리고뉴클레오티드는 듀플렉스로 어닐링된다.

[0047] 파티시란 완제 의약품은 등장성 포스페이트 완충 식염수 중 지질 부형제(DLin-MC3-DMA, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG<sub>2000</sub>-C-DMG)를 포함하는 TTR siRNA ALN-18328의 멸균 제형물이다.

[0048] 파티시란 제형물을 아래의 표 1에 나타낸다:

**표 1**

**파티시란 완제 의약품의 조성**

기능	파티시란 성분, 등급 농도(mg/mL)
활성 성분	ALN-18328, cGMP 2.0 mg/mL
부형제: 활성 성분과의 상호작용에 대해 적정 가능한 아미노지질	DLin-MC3-DMA (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트, cGMP ; 12.7 mg/mL
부형제: 완제 의약품의 안정성 및 원하는 생체분포	PEG <sub>2000</sub> -C-DMG ((R)-메톡시-PEG <sub>2000</sub> -카바모일-디-0-미리스틸-sn-글리세라이드), cGMP ; 1.5 mg/mL
LNP 입자의 구조적 온전성:	DSPC(1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린), cGMP ; 3.1 mg/mL
LNP 입자의 구조적 온전성:	콜레스테롤, 합성, cGMP ; 5.9 mg/mL
완충액	인산염 완충 식염수, cGMP, 충분량

[0049]

[0050]

일부 실시형태에서, 파티시란 완제 의약품은 용기, 예를 들어 유리 바이알에, 바이알 당 하기 양으로 제공된다:

**표 2**

**바이알 당 포함하는 파티시란 완제 의약품의 조성**

기능	파티시란 성분, 등급 농도(mg/mL)/바이알 당(mg)
활성 성분	ALN-18328, cGMP 2.0 mg/mL/11.0 mg
부형제: 활성 성분과의 상호작용에 대해 적정 가능한 아미노지질	DLin-MC3-DMA (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트, cGMP 분자량 642; 12.7 mg/mL/69.6 mg
부형제: 완제 의약품의 안정성 및 원하는 생체분포	PEG <sub>2000</sub> -C-DMG ((R)-메톡시-PEG <sub>2000</sub> -카바모일-디-0-미리스틸-sn-글리세라이드), cGMP 분자량 2510; 1.5 mg/mL/8.2 mg
LNP 입자의 구조적 온전성:	DSPC(1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린), cGMP 분자량 790; 3.1 mg/mL/17.3 mg
LNP 입자의 구조적 온전성:	콜레스테롤, 합성, cGMP 분자량 387; 5.9 mg/mL/32.2 mg
완충액	인산염 완충 식염수, cGMP, 충분량

[0051]

[0052]

주사용 파티시란 용액은 2 mg/mL의 TTR siRNA 원료 의약품을 함유한다. 파티시란 완제 의약품은 5.5 mL의 충전 부피로 10 mL 유리 바이알에 포장된다. 용기 밀폐 시스템은 미국 약전/유럽 약전(USP/EP) I형 보로실리케이트 유리 바이알, 테프론을 덧댄 부틸 고무 마개, 및 알루미늄 플립-오프 캡으로 구성된다.

[0053]

**사량체 안정화제**

[0054]

일부 실시형태에서, 본원에 기재된 방법에는 사량체 안정화제와 또 다른 TTR-억제 조성물의 공동-투여가 포함된다.

[0055]

사량체 안정화제는 TTR 단백질에 결합하고 TTR 사량체를 안정화하는 작용을 하는 화합물이다. TTR 사량체를 탈안정화하는 돌연변이는 잘못 파일링되고 응집된 TTR을 생성한다.

[0056]

사량체 안정화제의 예에는 타파미디스 및 디플루니살이 포함된다. 타파미디스 및 디플루니살은 둘 다 질환 진행

속도를 늦출 수 있다(Berk et al., Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. JAMA 2013, 310: 2658-2667; Coelho et al., 2012; Coelho et al., Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. J Neurol 2013, 260: 2802-2814; Lozeron et al., Effect on disability and safety of Tafamidis in late onset of Met30 transthyretin familial amyloid polyneuropathy. Eur J Neurol 2013, 20: 1539-1545).

[0057] **대상체 및 진단**

[0058] 인간 대상체에서 신경병증 손상 스코어(NIS) 또는 변형 NIS(mNIS+7)를 감소시키거나 증가를 정지시키기 위한 방법이 본원에 개시되며, 여기서 인간 대상체는 TTR 관련 질병을 갖는다. 일부 실시형태에서, TTR 관련 질병은 트랜스타이레틴(TTR) 유전자에서의 돌연변이에 의해 유도되는 질환 중 하나이다. 일 실시형태에서, 질환은 TTR 아밀로이드증이며, 이는 다양한 형태, 예를 들어 선천성 아밀로이드 다발신경병증(FAP), 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증(ATTR), 및 증상성 다발신경병증으로 분명해진다. 말초 신경계가 더 뚜렷하게 영향받은 경우, 질환은 FAP로 명명된다. 심장이 주로 관여되지만 신경계는 관여되지 않은 경우, 질환은 선천성 아밀로이드 심근병증(FAC)으로 불린다. 세 번째 주요 유형의 TTR 아밀로이드증은 연수막/CNS(중추 신경계) 아밀로이드증으로 불린다. ATTR은 자율 신경계에 영향을 미친다.

[0059] 일부 실시형태에서, TTR 관련 질병을 갖는 인간 대상체는 돌연변이체 TTR 유전자를 갖는다. 100가지를 넘게 보고된 TTR 돌연변이가 질환 증상 스펙트럼을 나타낸다. FAP 및 ATTR-연관 심근병증과 연관된 가장 일반적인 돌연변이는 각각 Val30Met 및 Val122Ile이다. TTR 돌연변이는 단백질의 미스폴딩을 유도하고 TTR 아밀로이드 형성 과정을 가속화하며, 임상적으로 중요한 TTR 아밀로이드증(또한 ATTR(아밀로이드증-트랜스타이레틴 유형)로 불림)의 발생에 대한 가장 중요한 위험 인자이다. 85가지를 초과하는 아밀로이드 생성 TTR 변이체가 전신 선천성 아밀로이드증을 유도하는 것으로 공지되어 있다.

[0060] 일부 실시형태에서, 인간 대상체가 생검-증명 ATTR 아밀로이드증 및 경도-내지-중등도 신경병증을 갖는 성인(18세 이상)인 경우, 인간 대상체는 임의 형태의 TTR 아밀로이드증에 대한 치료를 수여받도록 선택된다. 추가 실시형태에서, 인간 대상체는 또한 하기 중 하나 이상을 갖는다: 카노프스키(Karnofsky) 수행 상태(KPS)  $\geq 60\%$ ; 체질량 지수(BMI)  $17-33 \text{ kg/m}^2$ ; 적절한 간 및 신장 기능(아스파르테이트 트랜스아미나아제(AST) 및 알라닌 트랜스아미나아제(ALT)  $\leq 2.5 \times$  정상 상한치(ULN), 정상 한계 내의 총 빌리루빈, 알부민  $>3 \text{ g/dL}$ , 및 국제 정상화비(INR)  $\leq 1.2$ ; 혈청 크레아티닌  $\leq 1.5 \text{ ULN}$ ); 및 B형 간염 바이러스 및 C형 간염 바이러스에 대해 혈청음성.

[0061] 또 다른 실시형태에서, 인간 대상체가 간 이식물을 가진 경우; 치료 동안 수술이 계획된 경우; HIV-양성인 경우; 30일 내에 타파미디스 또는 디플루니살 이외의 연구 약물을 수여받은 경우; 뉴욕 심장 협회의 심부전 분류  $>2$ 인 경우; 임신 중 또는 수유 중인 경우; 전신 박테리아, 바이러스, 기생충, 또는 진균 감염을 가진 것을 알고 있거나 이렇게 추정되는 경우; 불안정형 협심증, 제어되지 않는 임상적으로 유의미한 심장 부정맥을 가진 경우; 또는 리포좀 제품에 대해 중증 반응 이력을 갖거나 올리고뉴클레오타이드에 대한 과민성이 알려져 있는 경우, 인간 대상체는 치료로부터 제외된다.

[0062] **신경병증 손상 스코어(NIS)**

[0063] 본원에 개시된 방법은 트랜스타이레틴(TTR)-억제 조성물을 투여하는 단계에 의해 인간 대상체에서 신경병증 손상 스코어(NIS)를 감소시키거나 증가를 정지시킨다. NIS는 특히 말초 신경병증에 대해, 쇠약, 감각, 및 반사를 측정하는 스코어링 시스템을 지칭한다. NIS 스코어는 쇠약에 대한 표준군의 근육(1은 25% 쇠약, 2는 50% 쇠약, 3은 75% 쇠약, 3.25는 중력에 반한 이동, 3.5는 중력이 제거된 이동, 3.75는 운동 없는 근육 깜빡임, 및 4는 마비임), 표준군의 근육 신축 반사(0은 정상, 1은 감소, 2는 부재임), 및 터치-압, 진동, 관절 위치 및 움직임, 및 찌르기를 평가한다(집게 손가락 및 엄지 발가락 상에서 모두 등급평가됨: 0은 정상, 1은 감소, 2는 부재임). 평가는 연령, 성별, 및 신체 건강상태에 대해 교정되었다.

[0064] 일 실시형태에서, NIS 스코어를 감소시키기 위한 방법은 NIS를 적어도 10% 감소시킨다. 다른 실시형태에서, 방법 스코어는 NIS를 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 또는 적어도 50% 감소시킨다. 다른 실시형태에서, 방법은 NIS 스코어 증가를 정지시킨다, 예를 들어 방법은 NIS 스코어의 0% 증가를 일으킨다.

[0065] 인간 대상체에서 NIS의 결정 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 하기에서 찾아볼 수 있다:

[0066] Dyck, PJ et al., Longitudinal assessment of diabetic polyneuropathy using a composite score in the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort, Neurology 1997. 49(1): pgs. 229-239).

- [0067] Dyck PJ. Detection, characterization, and staging of polyneuropathy: assessed in diabetics. Muscle Nerve. 1988 Jan;11(1):21-32.
- [0068] **변형 신경병증 손상 스코어(mNIS+7)**
- [0069] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 방법은 트랜스타이레틴(TTR)-억제 조성물을 투여하는 단계에 의해 인간 대상체에서 변형 신경병증 손상 스코어(mNIS+7)를 감소시키거나 증가를 정지시킨다. 당업자에게 널리 공지된 바와 같이, mNIS+7은 소신경 및大神경 섬유 기능의 전기생리적 측정(NCS 및 QST), 및 자율 기능(자세 혈압)의 측정과 조합된 신경학적 손상(NIS)의 임상 시험-기반 평가를 나타낸다.
- [0070] mNIS+7 스코어는 NIS+7 스코어의 변형(NIS에 더한 7가지 평가를 나타냄)이다. NIS+7은 쇠약 및 근육 신축 반사를 분석한다. 7가지 평가 중 5가지에는 신경 전도 속성이 포함된다. 이들 속성은 종아리 신경 복합근 활동 전위 크기, 운동 신경 전도 속도 및 운동 신경 원위 잠시(MNDL), 정강 MNDL, 및 장딴지 감각 신경 활동 전위 크기이다. 이들 값은 연령, 성별, 신장, 및 체중 변수에 대해 교정된다. 7가지 평가 중 나머지 2가지에는 진동 검출 역치 및 깊은 호흡 시 심박수 감소가 포함된다.
- [0071] mNIS+7 스코어는 NIS+7을 변형하여 신규 자율 평가인 스마트 신체 정량 감각 평가(Smart Somatotopic Quantitative Sensation Testing)의 이용, 및 자, 종아리, 및 정강 신경의 복합근 활동 전위 크기, 및 자 및 장딴지 신경의 감각 신경 활동 전위의 이용을 고려한다(Suanprasert, N. et al., Retrospective study of a TTR FAP cohort to modify NIS+7 for therapeutic trials, J. Neurol. Sci., 2014. 344(1-2): pgs. 121-128).
- [0072] 일 실시형태에서, mNIS+7 스코어를 감소시키기 위한 방법은 mNIS+7을 적어도 10% 감소시킨다. 다른 실시형태에서, 방법 스코어는 mNIS+7 스코어를 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 또는 적어도 50% 감소시킨다. 다른 실시형태에서, 방법은 mNIS+7 증가를 정지시킨다, 예를 들어 방법은 mNIS+7의 0% 증가를 일으킨다.
- [0073] **혈청 TTR 단백질 농도.**
- [0074] 본원에 기재된 방법에는 유효량의 트랜스타이레틴(TTR)-억제 조성물을 인간 대상체에 투여하는 단계가 포함되며, 여기서 유효량은 인간 대상체의 혈청 중 TTR 단백질의 농도를 50 µg/ml 미만 또는 적어도 80% 감소시킨다. 혈청 TTR 단백질 농도는 당업자에게 공지된 임의 방법, 예를 들어, 항체 기반 검정, 예를 들어, ELISA를 이용해서 직접 결정될 수 있다. 대안적으로, 혈청 TTR 단백질 농도는 TTR mRNA의 양을 측정하여 결정될 수 있다. 추가 실시형태에서, 혈청 TTR 단백질 농도는 대리물, 예를 들어 비타민 A 또는 레티놀 결합 단백질(RBP)의 농도를 측정하여 결정된다. 일 실시형태에서, 혈청 TTR 단백질 농도는 아래 실시예에 기재된 바와 같이 ELISA 검정을 이용하여 결정된다.
- [0075] 일부 실시형태에서, 혈청 TTR 단백질의 농도는 50 µg/ml 미만까지, 또는 40 µg/ml, 25 µg/ml, 또는 10 µg/ml 미만까지 감소된다. 일부 실시형태에서, 혈청 TTR 단백질의 농도는 80%, 또는 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 또는 95% 감소된다.
- [0076] **AUC**
- [0077] AUC는 약물, 예를 들어, TTR-억제 조성물의 하나의 용량이 환자에게 투여된 후, 경시적으로 혈류의 혈장 중 조성물, 예를 들어 TTR의 농도 곡선 하 면적을 지칭한다. 이것은 환자의 혈장으로의 흡수 속도 및 이로부터 조성물의 제거 속도에 의해 영향받는다. 당업자가 주지하는 바와 같이, AUC는 약물이 투여된 후 혈장 조성물 농도의 적분을 계산하여 결정될 수 있다. 또 다른 양태에서, AUC는 하기 공식을 이용하여 예측될 수 있다:
- [0078] 예측 AUC = (D x F) / CL
- [0079] 식에서, D는 투여량 농도이고, F는 생체이용률의 측정이고, CL은 예측 제거 속도이다. 당업자는 예측 AUC에 대한 값이 ±3 내지 4-배 범위의 오차를 가짐을 이해한다.
- [0080] 일부 실시형태에서, AUC를 결정하기 위한 데이터는 약물 투여 후 다양한 시간 간격에서 환자로부터 혈액 샘플을 채취하여 수득된다. 하나의 양태에서, TTR-억제 조성물의 투여 후 환자의 혈장 중 평균 AUC는 약 9000 내지 약 18000의 범위이다.
- [0081] TTR의 혈장 농도는 대사에 관한 가변성 및/또는 다른 치료제와의 가능한 상호작용으로 인해, 대상체 간에 유의미하게 변할 수 있음이 이해된다. 본 발명의 하나의 양태에 따르면, TTR의 혈장 농도는 대상체 별로 변할 수 있다. 마찬가지로, 최대 혈장 농도(C<sub>max</sub>) 또는 최대 혈장 농도에 도달하기 위한 시간(T<sub>max</sub>) 또는 시간 0부터 농도가

마지막으로 측정 가능한 시간까지의 곡선 하 면적(AUC<sub>last</sub>) 또는 혈장 농도 시간 곡선 하의 총 면적(AUC)과 같은 값은 대상체 별로 변할 수 있다. 상기 가변성으로 인해, 화합물, 예를 들어 TTR-억제 조성물의 "치료 유효량"을 구성하기 위해 필요한 양은 대상체 별로 변할 수 있다.

**[0082] 약학적 조성물**

**[0083]** 본원에 기재된 방법에는 TTR 억제 조성물, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 siRNA, 예를 들어, 파티시란의 투여가 포함된다. 일부 실시형태에서, TTR 억제 조성물은 약학적 조성물이다.

**[0084]** 본원에서 이용되는 "약학적 조성물"은 TTR 억제 조성물 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. "약학적으로 허용 가능한 담체"라는 용어는 치료제의 투여를 위한 담체를 나타낸다. 이러한 담체에는 식염수, 완충 식염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올, 및 이들의 조합이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 상기 용어에는 세포 배양 배지가 구체적으로 제외된다. 경구 투여되는 약물에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체에는 약학적으로 허용 가능한 부형제, 예를 들어 불활성 희석제, 붕해제, 결합제, 윤활제, 감미제, 향미제, 착색제 및 보존제가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 적합한 불활성 희석제에는 나트륨 및 칼슘 카보네이트, 나트륨 및 칼슘 포스페이트, 및 락토오스가 포함되는 반면, 옥수수 전분 및 알긴산은 적합한 붕해제이다. 결합제에는 전분 및 젤라틴이 포함될 수 있는 반면, 윤활제는, 존재하는 경우, 일반적으로 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 또는 활석일 것이다. 원하는 경우, 정제는 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트와 같은 물질로 코팅되어 위장관에서의 흡수를 지연시킬 수 있다.

**[0085]** 본 발명의 약학적 조성물은, 국소 또는 전신 치료가 바람직한지의 여부, 및 치료 영역에 따라, 다수의 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 국소, 폐, 예를 들어, 분무기에 의하는 것을 비롯하여, 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 통기(insufflation)에 의하고; 기관삽관, 비강 내, 표피 및 경피, 경구 또는 비경구일 수 있다. 비경구 투여는 정맥 내, 동맥 내, 피하, 복막 내 또는 근육 내 주사 또는 주입; 또는 두개 내, 예를 들어, 뇌실질 내, 척수강 내 또는 뇌실 내 투여를 포함한다.

**[0086]** 조성물은 특정 조직, 예를 들어 간(예를 들어, 간의 간세포)을 표적화하는 방식으로 전달될 수 있다. 약학적 조성물은 뇌 내로 직접 주사에 의해 전달될 수 있다. 주사가 뇌의 특정 영역(예를 들어, 흑색질, 피질, 해마, 선조체, 또는 창백핵) 내로의 정위 주사에 의할 수도 있고, 또는 dsRNA가 중추 신경계의 여러 영역 내로 전달될 수도 있다(예를 들어, 뇌의 여러 영역 내로 및/또는 척추 내로). dsRNA는 뇌의 광범위 영역 내로 전달될 수도 있다(예를 들어, 뇌의 피질로의 광범위 전달).

**[0087]** 일 실시형태에서, TTR을 표적으로 하는 dsRNA는 캐놀라 또는 하나의 말단이 조직, 예를 들어, 뇌, 예를 들어, 뇌의 흑색질, 피질, 해마, 선조체, 뇌돌보 또는 창백핵에 임플란트된 다른 전달 장치에 의해 전달될 수 있다. 캐놀라는 dsRNA 조성물의 저장소에 연결될 수 있다. 흐름 또는 전달은 펌프, 예를 들어, 삼투 펌프 또는 미니펌프, 예를 들어 Alzet 펌프(Durect, Cupertino, CA)에 의해 매개될 수 있다. 일 실시형태에서, 펌프 및 저장소는 조직으로부터 원위 영역에, 예를 들어, 복부에 임플란트되고, 전달은 펌프 또는 저장소로부터 방출 부위로 이어지는 유로에 의해 시행된다. dsRNA 조성물의 뇌 내로의 주입은 수 시간 또는 수 일, 예를 들어, 1, 2, 3, 5, 또는 7일 또는 그 초과 동안에 걸칠 수 있다. 뇌로의 전달을 위한 장치는, 예를 들어, 미국 특허 제6,093,180호 및 제5,814,014호에 기재된다.

**[0088] 투여량 및 시점**

**[0089]** 당업자는 대상체의 질환 또는 질병의 중증도, 이전 치료, 대상체의 일반 건강 및/또는 연령, 및 존재하는 다른 질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는 특정한 요인이 대상체를 효과적으로 치료하기 위해 요구되는 투여량 및 시점에 영향을 미칠 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 치료 유효량의 조성물을 이용한 대상체의 치료에는 단회 치료 또는 일련의 치료가 포함될 수 있다. 본 발명에 의해 포함되는 TTR-억제 조성물에 대한 유효 투여량 및 생체내 반감기의 추산치는 통상적 방법론을 이용하여 또는 본원에서 다른 곳에 기재된, 적절한 동물 모델을 이용하는 생체내 평가에 근거하여 수행될 수 있다.

**[0090]** 일반적으로, TTR-억제 조성물의 약학적 조성물의 적합한 용량은 1일 당 수신체의 체중kg 당 0.01 내지 200.0 mg 범위, 일반적으로 1일 당 체중kg 당 1 내지 50 mg의 범위일 것이다.

**[0091]** 예를 들어, TTR-억제 조성물은 siRNA일 수 있고, 단회 용량 당 0.01 mg/kg, , 0.05 mg/kg, , 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, , 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.628 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 5.0 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg,

30 mg/kg, 40 mg/kg, 또는 50 mg/kg으로 투여될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 투여량은 0.15 mg/kg 내지 0.3 mg/kg이다. 예를 들어, TTR-억제 조성물은 0.15 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.25 mg/kg, 또는 0.3 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, TTR-억제 조성물은 0.3 mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0092] 약학적 조성물(예를 들어, 파티시란)은 1일 1회 또는 5, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30일마다 1회 또는 2회 투여될 수 있다. 투여량 단위는 수 일에 걸친 전달을 위해, 예를 들어, 수 일의 기간에 걸쳐 TTR-억제 조성물의 지속 방출을 제공하는 통상적인 지속 방출 제형물을 이용하여, 배합될 수 있다. 지속 방출 제형물은 당분야에 널리 공지되어 있으며, 특히 본 발명의 제제와 함께 이용될 수 있는 바와 같이, 특정 부위에서 제제의 전달을 위해 특히 유용하다.

[0093] 일 실시형태에서, TTR-억제 조성물은 파티시란이며, 투여량은 0.3 mg/kg이고, 용량은 21일마다 1회 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 유효량은 0.3 mg/kg이고, 유효량은 15분 동안 1 mL/분에 이어 55분 동안 3 mL/분의 70분 주입을 통해 21일마다 1회 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 유효량은 0.3 mg/kg이고, 유효량은 3.3 mL/분의 60분 주입을 통해, 또는 15분 동안 1.1 mL/분에 이어 55분 동안 3.3 mL/분의 70분 주입을 통해 21~28일마다 2회 용량으로 투여된다.

[0094] TTR-억제 조성물의 투여량은 TTR-억제 조성물을 투여하는 단계 및 대상체에서 TTR 단백질 수준을 결정하는 단계에 의해, NIS 또는 FAP 증가의 치료를 위해 조정될 수 있다. TTR 단백질 수준이 50 µg/ml 초과인 경우, 이후 대상체에 투여되는 TTR-억제 조성물의 양은 증가되며, TTR 단백질 수준이 50 µg/ml 미만인 경우, 이후 대상체에 투여되는 TTR-억제 조성물의 양은 감소된다.

[0095] TTR-억제 조성물은 표적 유전자 발현에 의해 매개되는 병리적 과정의 치료에 효과적인 다른 공지된 제제와의 조합으로 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 파티시란은 사랑체 안정화제, 예를 들어 타파미디스 또는 디플루니살과 함께 투여된다. 임의 경우, 투여 의사는 당분야에 공지되거나 본원에 기재된 유효성의 표준 측정을 이용하여 관찰되는 결과에 근거하여, 파티시란 및/또는 사랑체 안정화제 투여의 양 및 시점을 조정할 수 있다.

[0096] **실시예**

[0097] 하기는 본 발명을 수행하기 위한 구체적 실시형태의 예이다. 실시예는 단지 예시적인 목적으로 제공되며, 본 발명의 범위를 어떠한 방식으로든 한정하려는 것은 아니다. 이용되는 수치(예를 들어, 양, 온도 등)에 관한 정확성을 보장하기 위해 노력을 기울였으나, 일부 실험 오차 및 편차는 당연히 허용된다.

[0098] 본 발명의 실시는, 달리 지시되지 않는 한, 당해분야의 기술수준 내에서 단백질 화학, 생화학, 제조합 DNA 기법 및 약리학의 통상적 방법을 채용할 것이다. 이러한 기법은 문헌에서 자세히 설명된다. 예를 들어, 하기 문헌들을 참고하라: T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3<sup>rd</sup> Ed.* (Plenum Press) Vols A and B(1992).

[0099] **실시예 1: TTR 아밀로이드증에 대한 파티시란의 안전성 및 유효성**

[0100] 임상 시험 I상에서, 파티시란은 28일의 기간에 걸쳐 환자에서 TTR 수준을 감소시키는 것으로 나타났다. 상기 연구 결과는 문헌[New England Journal of Medicine(Coelho et al., N Engl J Med 2013;369:819-29)]에 공개되었다. 문헌은 모든 목적을 위해 참조로 포함된다. 연구 설계 및 결과의 요약이 또한 하기와 같이 제시된다.

[0101] 상기 시험은 TTR 아밀로이드증을 갖는 환자에서 또는 건강한 성인에서 단회 용량의 파티시란의 안전성 및 유효성을 평가하기 위한 다기관, 무작위, 단일-맹검, 위약-대조, 용량 범위 시험이었다. 18~45세 연령의 남성 및 여성은 이들이 건강하고(병력, 신체 검사, 및 12-전극 심전도 측정에 근거하여 결정됨), 18.0~31.5의 BMI를 가지며, 적절한 간 기능 및 혈구수를 가지고, 임신 가능성이 없는 경우, 상기 시험에 대해 적격이었다.

[0102] 여러 시리즈의 참가자(각 시리즈 당 4명)를 3:1의 비로 0.01~0.5 mg/kg 용량의 파티시란 또는 위약(일반 식염수)을 수여받도록 무작위 배정하였다. 파티시란을 각각 15분 및 60분의 기간 동안 정맥내 투여하였다. 시험에서, 환자는 주입-관련 반응의 위험을 감소시키기 위해, 주입 전날 저녁 및 당일에 유사한 사전 처방을 수여받았다. 이들 처방에는 텍사메타손, 아세트아미노펜, 디펜하이드라민 또는 세티리진, 및 라니티딘이 포함되었다.

- [0103] 총 TTR에 대해 검증된 효소-연관 면역흡착 검정(ELISA)(Charles River Laboratories, Wilmington MA)을 이용하여, 혈청 TTR 수준으로 반영되는 파티시란 약리학 활성을 측정하였다. 각 환자에 대한 TTR, 레티놀-결합 단백질, 및 비타민 A의 기준선 수준을 파티시란의 투여 전 4회 측정의 평균으로 정의하였다. 약물 투여 개시부터 28일까지 역효과를 모니터링하였다. 안전성 모니터링에는 또한 혈액학적 평가, 혈액 화학 분석, 및 갑상샘-기능 평가가 포함되었다.
- [0104] 파티시란에 함유된 TTR siRNA의 혈장 약동학을 검증된 ELISA-기반 혼성화 검정에 의해 평가하였다. siRNA의 검출 및 정량을 위해, ATTO-Probe-HPLC 검정(정량 하한, 1.0 ng/mL)(Tandem Laboratories, Salt Lake City UT)을 이용하였다. WinNonlin(Pharsight, Princeton NJ)을 이용하여 약동학 추산치를 결정하였다.
- [0105] TTR, 비타민 A, 및 레티놀-결합 단백질의 녹다운을 기준선 수준에 비해 측정하였다(데이터는 나타내지 않음).
- [0106] **결과**
- [0107] 파티시란의 2가지 최저 용량에서 TTR 수준의 유의미한 변화(위약 대비)는 관찰되지 않았다. 그러나, 0.15~0.5 mg/kg의 용량을 수여받은 모든 참가자에서는 상당한 TTR 녹다운이 관찰되었다(데이터는 나타내지 않음). 모든 3가지 용량 수준에 걸쳐 TTR 녹다운은 신속하고, 강력하고, 지속되었으며, 28일에 걸쳐 위약에 비해 고도로 유의미한 변화를 가졌다( $P < 0.001$ ). 0.15 및 0.3 mg/kg에서 나타난 강력한 반응 및 0.5 mg/kg에서 반응의 중등도 증분 개선의 측면에서, 1명의 참가자만 0.5 mg/kg 용량을 수여받았다.
- [0108] 특히 적어도 0.3 mg/kg 용량에서, 반응 역학에서 참가자 간 가변성은 거의 없었고(데이터는 나타내지 않음), 3일까지 50% 초과 저하, 대략 10일까지 최저 수준, 그리고 28일째에 50%를 초과하는 지속된 억제력을 가졌고, 70일까지 완전 회복이 일어났다. 0.15 mg/kg, 0.3 mg/kg, 및 0.5 mg/kg을 수여받는 참가자에 있어서 TTR 녹다운에 대한 최대 값은 각각 85.7%, 87.6%, 및 93.8%였다. 0.15 mg/kg 및 0.3 mg/kg 용량에서의 평균 최저 수준이 각각 82.3%(95% 신뢰도 구간(CI), 67.7~90.3) 및 86.8%(95% CI, 83.8~89.3)였고; 이들 최저 수준은 절대 TTR 수준 또는 TTR 녹다운 백분율로 분석되었을 때 참가자 간 가변성을 거의 나타내지 않았고 위약에 비해 매우 유의미하였다( $P < 0.001$ )(데이터는 나타내지 않음).
- [0109] 녹다운 정도가 억제 기간을 결정하는 것으로 나타났으며, 28일째의 평균 감소는 0.15 mg/kg 및 0.3 mg/kg을 수여받는 참가자에 대해 각각 56.6%(95% CI, 11.6~78.7) 및 67.1%(95% CI, 45.5~80.1)였으며, 0.5 mg/kg을 수여받는 1명의 환자에 대해서는 28일째 감소가 76.8%였다. 0.3 mg/kg 용량으로 인간에서 관찰된 TTR 녹다운은 동일한 용량 수준으로 비인간 영장류에서 나타난 것과 실질적으로 동일하였다(데이터는 나타내지 않음). 파티시란에 의한 TTR에서의 이러한 감소는 레티놀-결합 단백질 및 비타민 A 수준에서의 변화와 연관되었다(데이터는 나타내지 않음).
- [0110] 파티시란의 이용은 혈액학적, 간, 또는 신장 측정에서 또는 갑상샘 기능에서 임의의 유의미한 변화를 일으키지 않았고, 약물-관련 심각한 유해 사례 또는 유해-사례로 인한 임의의 연구-약물 중단이 없었다(데이터는 나타내지 않음).
- [0111] 파티시란의 혈장 약동학 프로파일은 피크 혈장 농도에 대한 그리고 TTR siRNA에 대한 최종 일을 통한 곡선 하 면적에 대한 값이 평가된 용량 범위에 걸쳐 대략 용량-비례적 방식으로 증가함을 나타내었다(데이터는 나타내지 않음).
- [0112] **파티시란의 특이성**
- [0113] 파티시란 효과의 특이성을 추가로 나타내기 위해, TTR을 파티시란에서 이용되는 동일 유형의 지질 나노입자에서 제형화되는 PCSK9(콜레스테롤 저하를 위한 표적)를 표적으로 하는 siRNA를 함유하는, ALN-PCS의 1상 시험에서 건강한 자원자 그룹에서도 측정하였다. 단회 용량의 0.4 mg/kg ALN-PCS(소위 대조군 siRNA)는 TTR에 대한 효과를 갖지 않았으며(데이터는 나타내지 않음), TTR에 대한 파티시란의 효과가 siRNA에 의한 특이적 표적화에 기인하며 지질 나노입자 제형물의 비특이적인 효과가 아님을 나타내었다.
- [0114] 파티시란의 약리학 효과의 특이성 및 작용 기전을 뒷받침하는 추가 증거를 순환하는 세포외 RNA에서 예측 TTR mRNA 절단 산물을 검출하기 위해 0.3 mg/kg 용량을 수여받는 참가자로부터 수득한 혈액 샘플 상의 5' RACE(상보적 DNA 말단의 신속 증폭) 검정을 이용하여 수득하였다. 혈액 샘플을 수집하기 위해, 20분 동안 1200 ×g에서 응고 혈액 샘플(대상체로부터 투여 전 및 투여 24시간 후)의 원심분리 후 혈청을 수집하였다. 혈청을 10분 동안 1200 ×g에서 두 번째로 원심분리하여, 부유 세포 물질을 제거한 뒤 냉동시켰다. 해동 혈청을 리튬 클로라이드(최종 농도 1 M)와 혼합하고, 1 시간 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 샘플을 4°C에서 2시간 동안 120,000 ×g에

서 회전침강시켜 RNA를 펠렛화하고, Trizol 추출(Life Technologies, Grand Island, New York, USA) 및 이소프로판올 침전에 의해 펠렛으로부터 총 RNA를 단리하였다.

- [0115] TTR siRNA-매개 절단 산물을 검출하기 위해, 단리된 RNA를 GeneRacer 키트(Life Technologies)를 이용하여 결찰-매개 RACE PCR을 위해 이용하였다. RNA를 GeneRacer 어댑터에 결찰시키고 TTR-특이적 후방 프라이머(5'-aatcaagttaaagtggaatgaaagtgcctttcacag-3')(SEQ ID NO:3)를 이용하여 역전사한 뒤, 어댑터에 상보적인 GeneRacer GR5' 전방 프라이머 및 TTR-특이적 후방 프라이머(5'-gcctttcacaggaatgtttattgtctctg-3')(SEQ ID NO:4)를 이용하여 2회 PCR하였다. GR5' 네스티드(nested) 프라이머 및 TTR-특이적 후방 네스티드 프라이머(5'-ctctgctggacttctaacaatagcatatgaggtg-3')(SEQ ID NO:5)로 네스티드 PCR을 수행하였다. TOPO-Blunt 벡터(Life Technologies)를 이용하여 PCR 산물을 클로닝하였다. 클로닝된 삽입물을 M13 전방 및 후방 프라이머를 이용한 콜로니 PCR에 의해 증폭시켰다. Macrogen 서열분석 시설에서 T7 프로모터 프라이머로 앰플리콘을 서열분석하였다. 96개 클론으로부터의 서열을 CLC WorkBench를 이용하여 인간 TTR에 대해 정렬하였다.
- [0116] 투여 전 샘플 및 약물 투여 24시간 후 수득한 샘플에서 모두 TTR mRNA를 검출하였다. RNAi 기전과 일치하게, 모든 3명의 참가자에서 예측 mRNA 절단 산물이 투여 전 샘플에는 없었고, 투여 후 샘플에는 존재하였다(데이터는 나타내지 않음).
- [0117] 인간 혈청 중 야생형 및 돌연변이체 TTR의 정량을 위한 LC/MS/MS 검정은 Tandem Labs에서 자격을 갖춰 수행하였다. 혈청 샘플을 키모트립신을 이용해서 소화시키고 이어서 단백질을 침전 추출에 의해 가공한 뒤, LC/MS/MS에 의해 분석하였다. 야생형 TTR을 나타내는 키모트립신 분해 펩타이드 TTRW-1 및 돌연변이체 V30M을 나타내는 V30M-1을 이들의 고유한 특이적 질량-대-전하 비 전이에 따라 모니터링하였다. 안정한 동위원소-표지 펩타이드(TTRW-1-D8 및 V30M-1-D8)를 이용하여 수득한 표준 검정 곡선 데이터를 이용해서 인간 혈청 샘플 중 내인성 펩타이드 단편(TTRW-1 및 V30M-1)을 계산하였다. 표준에 대한 피크 면적 비(즉, 내부 표준 TTRW-L1-D16 대비 TTRW-1-D8 및 V30M-L1-D16 대비 V30M-1-D8)를 이용하여 1/×2 가중 최소-자승 회귀 분석을 이용하는 선형 검정 곡선을 생성하였다. 적격 LC/MS/MS 방법으로 5 내지 2500 ng/ml 범위의 표준 곡선으로 5 ng/ml의 정량 하한(LLOQ)을 달성하였다.
- [0118] **실시예 2: 선천성 아밀로이드 다발신경병증을 위한 파티시란 치료법의 안전성 및 유효성에 대한 다회-용량 연구**
- [0119] 상기 임상 II상 시험에서, 다회 용량의 파티시란을 TTR-매개 FAP를 갖는 환자에게 투여하여 이들 환자에서 다회 증량 정맥내 용량의 파티시란의 안전성, 관용성, 약동학, 및 약력학을 평가하였다. 상기 데이터는 2013년 11월에 개최된 선천성 아밀로이드 다발신경병증 국제 심포지엄(ISFAP)에서 제시되었다.
- [0120] 적격 환자는 생검-증명 ATTR 아밀로이드증 및 경도-내지-중등도 신경병증; 카노프스키(Karnofsky) 수행 상태 (KPS) ≥60%; 체질량 지수(BMI) 17-33 kg/m<sup>2</sup>; 적절한 간 및 신장 기능(아스파르테이트 트랜스아미나아제(AST) 및 알라닌 트랜스아미나아제(ALT) ≤ 2.5 × 정상 상한치(ULN), 정상 한계 내의 총 빌리루빈, 알부민 >3 g/dL, 및 국제 정상화 비(INR) ≤ 1.2; 혈청 크레아티닌 ≤ 1.5 ULN); 및 B형 간염 바이러스 및 C형 간염 바이러스에 대해 혈청음성을 갖는 성인(18세 이상)이었다. 환자가 간 이식물을 가진 경우; 연구 동안 수술이 계획된 경우; HIV-양성인 경우; 30일 내에 타파미디스 또는 디플루니살 이외의 연구 약물을 수여받은 경우; 뉴욕 심장 협회의 심부전 분류 >2인 경우; 임신 중 또는 수유 중인 경우; 전신 박테리아, 바이러스, 기생충, 또는 진균 감염을 가진 것을 알고 있거나 이렇게 추정되는 경우; 불안정형 협심증, 제어되지 않는 임상적으로 유의미한 심장 부정맥을 가진 경우; 또는 리포좀 제품에 대해 중증 반응 이력을 갖거나 올리고뉴클레오타이드에 대한 과민성이 알려져 있는 경우, 이들은 제외되었다.
- [0121] 이는 FAP 환자에서 파티시란의 다기관, 국제, 공개-라벨, 다회 용량 증량 II상 연구였다. 3명 환자 코호트는 2회 용량의 파티시란을 수여받았으며, 각각의 용량은 정맥내(IV) 주입으로 투여되었다. 코호트 1-3은 4주마다(Q4W) 각각 0.01, 0.05 및 0.15 mg/kg의 2회 용량의 파티시란을 수여받았으며; 코호트 4 및 5는 모두 0.3 mg/kg Q4W의 2회 용량의 파티시란을 수여받았다. 코호트 6-9의 모든 환자는 3주마다(Q3W) 0.3 mg/kg으로 투여되는 2회 용량의 파티시란을 수여받았다. 모든 환자는 주입-관련 반응의 위험을 감소시키기 위해 각각의 파티시란 주입 전에 텍사메타손, 파라세타몰(아세트아미노펜), H2 차단제(예를 들어, 라니티딘 또는 파모티딘), 및 H1 차단제(예를 들어, 세티리진, 하이드록시진 또는 퀵소페나딘)로 구성된 사전 처방을 수여받았다. 파티시란은 60분에 걸쳐 3.3 mL/분으로 또는 마이크로-투여 방식을 이용해서 70분에 걸쳐(15분 동안 1.1 mL/분에 이어 나머지 용량에 대해 3.3 mL/분으로) IV 투여하였다.
- [0122] 총 TTR 단백질의 혈청 수준을 효소-연관 면역흡착 검정(ELISA)을 이용하여 모든 환자에 대해 평가하였다. 추가

적으로, 야생형 및 돌연변이체 TTR 단백질을 독점적 질량 분광측정 방법(Charles River Laboratories, Quebec, Canada)을 이용하여 Val30Met 돌연변이를 갖는 환자에 대해 혈청에서 별도로 그리고 특이적으로 측정하였다. 혈청 샘플을 스크리닝 시, 그리고 하기 날짜: 0, 1, 2, 7, 10, 14, 21, 22, 23(Q3W만); 28, 29(Q4W만); 30(Q4W만); 31(Q3W만); 35, 38(Q4W만) 및 42, 49, 56, 112 및 208일 추적 시 수집하였다.

[0123] 혈장 농도-시간 프로필을 0일 및 하기 시점에 수집한 혈액 샘플에 근거하여, TTR siRNA에 대해 생성하였다: 투여 전(계획된 투여 개시 1시간 이내), 주입 종료(EOI), 주입 후 5, 10 및 30분 및 1, 2, 4, 6, 24, 48, 168, 336, 504시간(21일, Q3W 방식만) 및 672시간(28일, Q4W 방식만). 추가 샘플을 Q4W 방식에 대해 84일 및 180일에, 그리고 Q3W 방식에 대해 35, 91 및 187일에 수집하였다. 코호트 3~9에 있어서, 0일째 EOI 시 및 주입 2시간 후 혈액 샘플을 또한 자유 및 캡슐화된 TTR siRNA 둘 다에 대해 분석하였다. 혈청 TTR siRNA를 검증된 ATTO-Probe 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 검정(Tandem Laboratories, Salt Lake City, Utah, USA)을 이용해서 분석하였다. PK 분석을 TTR siRNA 혈장 농도-시간 데이터의 비-구획 및/또는 구획 평가를 이용해서 수행하여 검증된 소프트웨어 프로그램 WinNonlin<sup>®</sup>을 이용하여 PK 매개변수 추산치를 결정하였다. 소변 샘플을 배출된 TTR siRNA의 수준에 대해 분석하고, 신장 제거( $CL_R$ )를 투여 후 측정하였다.

[0124] 비타민 A 및 레티놀 결합 단백질(RBP)의 혈청 수준을 총 TTR에 대해 명시된 것과 동일한 시점에, HPLC 및 혼탁 측정에 의해 각각 측정하였다(Biomins Specialized Medical Pathology, Lyon, France).

[0125] 기준선으로부터 TTR 녹다운에 대한 평균 및 분산을 PP 모집단에 대해 계산하였으며, 기준선은 모든 투여-전 값의 평균으로 정의하였다. 분산 분석(ANOVA) 및 공분산 분석(ANCOVA)을 이용하여(용량 수준 간) 개별 페어식 비교의 터키 포스트 후(Tukey's post hoc) 테스트로 PD 데이터를 분석하였다(기준선 대비 자연 로그로 변환된 TTR). 최저 TTR 수준은 각각의 용량 투여(제1 투여, 제2 투여 기간: Q4W 및 Q3W군에 대해 각각 1~28일, 29~56일 및 1~21일, 22~42일) 후 28일 기간(Q3W군에 대해 21일 기간) 동안 환자 별 최소 수준으로 정의하였다. 기준선 대비, TTR 및 RBP 또는 비타민 A 간 상관관계, 및 야생형 및 V30M TTR 수준 간 상관관계를 선형 회귀를 통해 탐색하였다. PK 매개변수에서 파티시란 성분의 용량-비례를 파워 모델 분석을 이용하여 평가하였다. AE는 MedDRA(Medical Dictionary for Regulatory Activities) 코딩 시스템, 버전 15.0을 이용해서 코드화하고, AE, 실험 데이터, 생체 신호 데이터, 및 ECG 간격 데이터에 대한 기술 통계를 제공하였다. 모든 통계 분석은 SAS 소프트웨어, 버전 9.3 이상을 이용해서 수행하였다. 유효성 및 약력학: 평균(SD) 기준선 혈청 TTR 단백질 수준은 용량 코호트에 걸쳐 유사하였다: 0.01, 0.05, 0.15, 0.3 Q4W 및 0.3 mg/kg Q3W 투여량군에 대해 각각 272.9(98.86), 226.5(12.67), 276.1(7.65), 242.6(38.30) 및 235.5(44.45)  $\mu\text{g/mL}$ .

[0126] 0.01 mg/kg 용량 코호트와 비교하여, 0.3 mg/kg Q4W 및 Q3W 코호트에서 제1 및 제2 용량의 파티시란 후 TTR에서 유의미한 감소(ANCOVA 후 포스트 후 테스트에 의해  $p < 0.001$ )가 관찰되었다(데이터는 나타내지 않음). Val30Met 돌연변이를 갖는 환자에서, 야생형 및 돌연변이체 TTR에 대해 매우 유사한 정도의 녹다운이 관찰되었다(데이터는 나타내지 않음). 혈청 TTR 녹다운 수준은 RBP( $r^2 = 0.89$ ,  $p < 10^{-15}$ ) 및 비타민 A( $r^2 = 0.90$ ,  $p < 10^{-15}$ )의 순환 수준에서의 감소와 높은 관련성을 가졌다(데이터는 나타내지 않음).

[0127] 타파미디스 또는 디플루니살을 복용하는 환자가 안정화제 치료법을 복용하지 않는 환자에 비해 유의미하게 증가된 혈청 TTR의 기준선 수준을 가진 반면( $p < 0.001$ , ANOVA)(데이터는 나타내지 않음), 파티시란 투여는 이들 두 환자군에서 유사한 정도의 TTR 녹다운을 일으켰다(데이터는 나타내지 않음).

[0128] 약동학: 파티시란 TTR siRNA 성분의 평균 농도는 EOI 후 감소되었고(데이터는 나타내지 않음), 21/28일에 제2 용량 이후 siRNA는 측정되지 않았다. 각 용량 이후 TTR siRNA의 캡슐화 대 비-캡슐화 농도의 측정은 순환 LNP 제형물의 안정성을 나타내었다. 제1 및 제2 용량 모두에 있어서, 최대 혈장 농도에 대한 평균 값( $C_{max}$ ) 및 시점 0부터 마지막으로 측정 가능한 시점까지의 혈장 농도-시간 곡선 하 면적(AUC<sub>0-last</sub>)은 평가되는 용량 범위에 걸쳐 용량-비례적 방식으로 증가하였다. 용량 1 및 용량 2 이후  $C_{max}$  및 AUC<sub>0-last</sub>는 측정 없이, 필적하였다. 0일 및 21/28일째에 파티시란의 중앙값 말단 반감기는 용량  $> 0.01$  mg/kg에서 39~59시간이었고, 각각의 용량 코호트에 있어서 용량 1 및 용량 2의 비교 시 비교적 변하지 않았다.

[0129] 이들 II상 데이터는 파티시란을 이용한 FAP 환자의 치료가 강력하고, 용량-의존적이며, 혈청 TTR 단백질 수준의 통계적으로 유의미한 녹다운으로 이어졌음을 나타낸다. 3~4주마다 투여되는 파티시란 0.3 mg/kg의 2회 연속 용량으로 80%를 초과하는 TTR의 평균 지속 감소가 달성되었고, Q3W군에서 96%의 최대 녹다운이 달성되었다. 이들 녹다운 비율은 파티시란의 단회 증량 용량, 위약-대조 1상 연구에서 관찰된 비율과 일치한다(Coelho et al. 2013a). 다른 전신 아밀로이드 질환으로부터의 증거는 질환 유도 단백질의 50% 만큼의 감소만으로도 임상적 질

환 개선 또는 안정화를 일으킬 수 있음을 나타낸다(Lachmann et al. 2003; Lachmann et al. 2007). 파티시란을 이용한 TTR 녹다운 정도는 타파미디스 또는 디플루니살을 복용하는 환자에 의해 영향을 받지 않아, 이들 TTR 안정화제 약물이 파티시란의 약리학적 활성을 방해하지 않음을 제시하였다. Val30Met 돌연변이를 갖는 환자에서, 파티시란은 돌연변이 및 야생형 TTR 모두의 생산을 억제하였고; 후자는 간 이식 후 후기-개시 FAP를 갖는 환자에서 아밀로이드 생성이 유지되었다(Yazaki et al, 2003; Liepnieks et al, 2010).

[0130] 실시예 3: 파티시란 투여에 의한 NIS 및 mNIS+7에 의해 측정되는 신경학적 손상의 감소

[0131] 실시예 2에 기재된 프로토콜을 이용해서 FAP 환자로 공개 라벨 연장 연구를 수행하였고 수행 중이다. 파티시란의 투여는 NIS 및 mNIS+7 둘 다의 감소로 이어졌다.

[0132] 2상 시험에서 이전에 투여받은 FAP 환자는 2상 OLE 연구 상으로의 이관에 적격이었다. 최대 2년의 투여가 3주마다 0.30 mg/kg으로 수행되었고 수행 중이며, 6개월마다 임상 종결점을 평가하였다. 연구 목표에는 신경학적 손상(mNIS+7 및 NIS), 삶의 질, mBMI, 장애, 운동성, 그림 강도, 자율 증상, 피부 생검에서의 신경 섬유 밀도, 심장 관여(심장 하위군에서), 및 혈청 TTR 수준에 대한 효과가 포함되었다.

[0133] 환자 인구통계를 아래에 나타낸다.

특징	결과	
환자의 수	N=27(심장 하위군의 11명 환자 포함)	
중양값 연령	64.0세(29~77세 범위)	
성별	남성 18명, 여성 9명	
TTR 유전형	· Val30Met (V30M) = 20 · Ser77Tyr (S77Y) = 2 · Ser77Phe (S77F) = 2	· Tyr116Ser (Y116S) = 1 · Phe64Leu (F64L) = 1 · Arg54Thr (R54T) = 1
FAP 단계/PND 스코어	· 단계 1: 24 · 단계 2: 3	· I: 14 · II: 10 · IIIa: 2 · IIIb: 1
기준선에서 사랑체 안정화제의 동시 이용	타파미디스 13, 디플루니살 7, 없음 7	
현재의 사랑체 안정화제 이용	타파미디스 12, 디플루니살 6, 없음 9	
총 투여 용량	511	
현재까지의 중양값 용량/환자	19(13~24 범위)	
평균 치료 기간	12.9개월(8.4~16.7개월 범위)	

[0134]

[0135] 기준선 특징에는 하기가 포함되었다:

특징	N	평균 (범위)
mNIS+7a (최대 손상: 304)	27	52.9 (2.0 - 122.5)
NIS (최대 손상: 244)	27	34.8 (4.0 - 93.4)

[0136]

[0137] 아래 표에 나타낸 바와 같이, 파티시란의 투여는 혈청 TTR 수준의 저하를 일으켰다. 파티시란은 대략 80%의 지속되는 혈청 TTR 저하를 달성하였고, 용량 간에 최대 88%의 추가 최저 수준을 가졌다.

날짜	N	평균 녹다운%
1	25	21.4
3	25	46.8
7	25	71.1
17	24	77.8
84	26	78.1
168	27	80.5
182	27	87.7
231	25	82.4
234	24	87.0
238	24	88.1
248	25	86.0
273	22+	80.7
357	22	81.3
371	18	87.1
462	3	79.2

[0138]

[0139] 아래 표에 나타난 바와 같이, 파티시란의 투여는 6 및 12개월에 측정되는 mNIS+7에서 변화를 일으켰다.

mNIS+7 성분	기준선으로부터 6개월까지의 변화(n=27)		기준선으로부터 12개월까지의 변화(n=20)	
	평균(SEM)	중앙값(최소, 최대)	평균(SEM)	중앙값(최소, 최대)
전체	-1.4 (2.06)	-2 (-25.38, 22)	-2.5 (2.85)	-1.5 (-29.75, 24)
NIS-쇠약	0.2 (1.17)	0 (-9.88, 16)	-0.5 (0.86)	0 (-10.38, 6)
NIS-만사	-0.7 (0.49)	0 (-8, 3)	0.6 (0.43)	0 (-5.5, 4)
QST <sup>a</sup>	-1.1 (1.49)	-1.5 (-15, 16)	-2.6 (2.35)	-2 (-23, 19)
NCS ES	0.2 (0.13)	0 (-1.5, 1.5)	-0.1 (0.25)	0 (-2, 3.5)
자세 BP <sup>b</sup>	0 (0.08)	0 (-1, 1)	-0.1 (0.11)	0 (-1.5, 0.5)

[0140]

[0141] 아래 표에 나타난 바와 같이, 파티시란의 투여는 6 및 12개월에 측정되는 NIS에서 변화를 일으켰다.

NIS 성분	기준선으로부터 6개월까지의 변화(n=27)		기준선으로부터 12개월까지의 변화(n=20)	
	평균(SEM)	중앙값(범위)	평균(SEM)	중앙값(범위)
전체	-0.7 (1.3)	-1.0 (-12.9, 12)	0.4 (1.2)	-0.8 (-8.4, 11)
NIS-쇠약	0.2 (1.2)	0 (-9.9, 16)	-0.5 (0.9)	0 (-10.4, 6)
NIS-만사	-0.7 (0.5)	0 (-8, 3)	0.6 (0.44)	0 (-5.5, 4)
NIS-감각	-0.3 (0.7)	0 (-9.5, 5)	0.4 (0.8)	0.5 (-5, 8)

[0142]

[0143] ΔNIS 또는 ΔmNIS+7에서의 진행 및 TTR 농도 간 상관관계를 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이 선형 회귀를 통해 탐색하였다. TTR 및 평균 투여 전 최저치[TTR]는 6개월째에 mNIS+7에서의 변화와 연관되었다.

[0144] NIS 및 mNIS+7을 0, 6, 및 12개월째에 측정하였다. 0 내지 6개월 및 0 내지 12개월의 ΔNIS 또는 ΔmNIS+7을 반응 변수로 이용하였다. 예측 변수에는 2개의 상이한 TTR 농도 측정이 포함되었다: 84 및 168일(0~6개월 비교를 위해) 및 84, 168, 273, 및 357일(0~12개월 비교를 위해)에 곡선 하 TTR 단백질 농도 면적("AUC"), 및 기준선 대비 평균 녹다운 백분율.

[0145] 두 TTR 측정을 위해, "기준선"은 모든 투여 전 값의 평균으로 정의하였다. TTR AUC는 미가공 TTR 농도(μg/mL) 및 사다리꼴 방법을 이용하여, 기준선 값에서 시작하여(0일에 삽입) 182일(0~6개월 비교를 위해) 또는 357일(0~12개월 비교를 위해)까지 연장하여 계산하였다. 기준선 대비 녹다운 백분율을 각각의 일정잡힌 시점에 계산

하였다. 선형 회귀를 수행하였고, 예측자 및 반응 변수 간 연관이 존재하지 않는 귀무 가설(null hypothesis)의 평가와 연관된 P 값을 보고하였다.

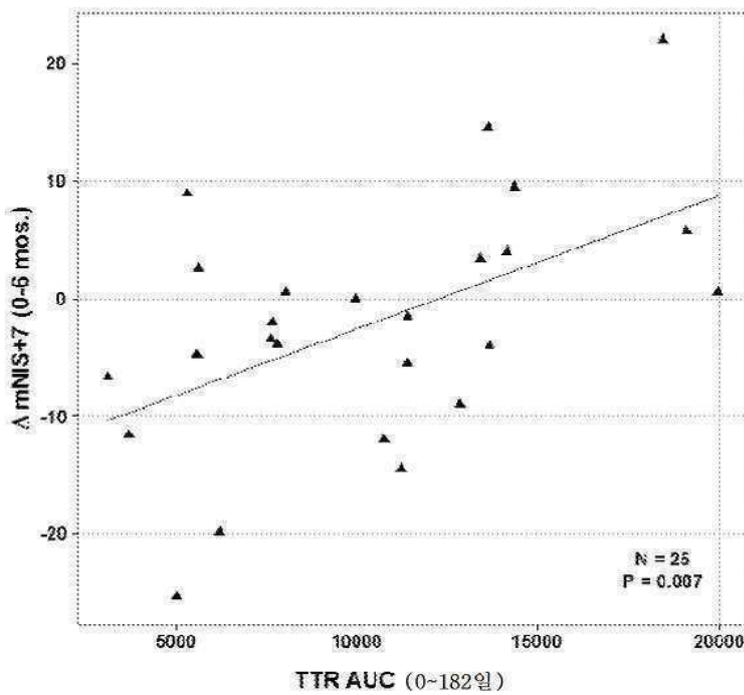
[0146] mNIS+7 및 NIS에서는 12개월째에 각각 -2.5 및 0.4 포인트의 평균 변화가 존재하였고, 유사한 기준선 NIS를 갖는 환자 모집단에서의 이전 FAP 연구로부터 12개월째에 추산된 mNIS+7 및 NIS에서의 급격한 증가(예를 들어, 10~18 포인트 증가)에 비해 긍정적이다. 신경병증 손상 스코어 진행에 대한 파티시란의 바람직한 영향은 TTR 저하 정도와 연관되었다. 이는 파티시란에 의한 혈청 TTR 부담 감소가 FAP 환자에서 임상적 이익으로 이어짐을 나타낸다.

[0147] 본 발명이 바람직한 구현예 및 다양한 대안적 구현예를 참조하여 구체적으로 나타내어지고 기재되었으나, 당업자에게는 형태와 세부사항에 있어서 다양한 변화가 본 발명의 요지와 범위에서 벗어나지 않고 그 안에서 수행될 수 있음이 이해될 것이다.

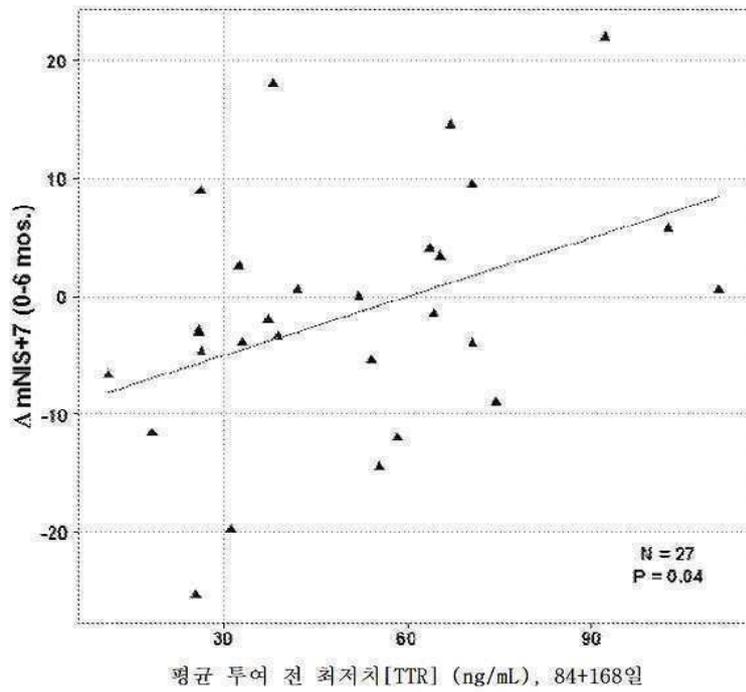
[0148] 본 명세서의 본문 내에 인용된 모든 참고문헌, 허여된 특허 및 특허 출원은 그 전문이 모든 목적을 위해 참조로 본원에 포함된다.

**도면**

**도면1**



도면2



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> METHODS OF TREATING TRANSTHYRETIN (TTR) MEDIATED AMYLOIDOSIS

<130> 26421-30613/PCT

<150> US 62/044,100

<151> 2014-08-29

<150> US 62/150,596

<151> 2015-04-21

<160> 5

<170> KopatentIn 3.0

<210> 1

<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> 1	
guaaccaaga guauuccaut t	21
<210> 2	
<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> 2	
auggaauacu cuugguact t	21
<210> 3	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 3	
aatcaagtta aagtggaatg aaaagtcct ttcacag	37
<210> 4	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 4	
gcctttcaca ggaatgtttt attgtctctg	30
<210> 5	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	

primer

<400> 5

ctctgctgg acttctaaca tagcatatga ggtg

34