

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192943 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.24

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.05.12

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (ВГВ)

(31) 62/846,927; 62/893,646; 62/992,785;
62/994,177; 63/009,910

(71) Заявитель:
ВИР БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.
(US)

(32) 2019.05.13; 2019.08.29; 2020.03.20;
2020.03.24; 2020.04.14

(72) Изобретатель:
Пан Филлип С., Бакарджиев Анна,
Коннолли Линн Е. (US)

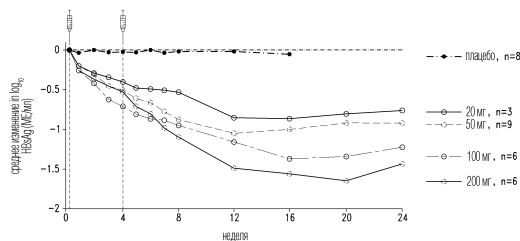
(33) US

(86) PCT/US2020/032525

(87) WO 2020/232024 2020.11.19

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способам лечения ВГВ инфекции, применяя миРНК, которая направлена на ген ВГВ. В некоторых вариантах осуществления способ лечения ВГВ включает совместное введение миРНК с PEG-INF α .



202192943

A1

A1

202192943

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 571674EA/011

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (ВГВ)

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Список последовательностей, связанный с этой заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии, и таким образом, он включен посредством ссылки в настоящее изобретение. Имя текстового файла, содержащего список последовательностей, представляет собой 930485_405WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Текстовый файл имеет размер 6,5 КБ был создан 6 мая 2020 г. и был отправлен в электронном виде через EFS-Web.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Хроническая инфекция вирусом гепатита В (ВГВ) остается важной глобальной проблемой общественного здравоохранения с высокой заболеваемостью и смертностью (Трепо С., A brief history of hepatitis milestones, Liver International 2014, 34(1):29-37). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) около 257 миллионов человек во всем мире живут с хронической инфекцией ВГВ (WHO, 2017; Schweitzer A, et al., Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 и 2013, The Lancet 2015, 387(10003):1546-1555). Со временем хроническая инфекция ВГВ приводит к серьезным последствиям, включая цирроз, печеночную недостаточность, гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) и смерть. По оценкам, ежегодно почти 800000 человек умирают из-за последствий, связанных с хронической инфекцией ВГВ (Stanaway JD, et al., The global burden of viral hepatitis составляет от 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013, The Lancet 2016, 388(10049):1081-1088).

Распространенность ВГВ варьирует географически: от менее 2% в странах с низкой до более 8% в странах с высокой распространенностью (Schweitzer et al., 2015). В странах с высокой распространенностью, таких как страны Африки к югу от Сахары и страны Восточной Азии, передача происходит преимущественно у младенцев и детей перинатальным и горизонтальным путями. В более промышленно развитых странах количество новых инфекций выше всего среди молодых людей, и передача происходит преимущественно при употреблении инъекционных наркотиков и рискованном сексуальном поведении. Риск развития хронической инфекции ВГВ зависит от возраста на момент заражения. Хотя только примерно у 10% людей, инфицированных в зрелом возрасте, развивается хроническая инфекция ВГВ, 90% младенцев, инфицированных перинатально или в течение первых 6 месяцев жизни, и 20-60% детей, инфицированных в возрасте от 6 месяцев до 5 лет, остаются хронически инфицированными. У двадцати пяти процентов людей, инфицированных ВГВ в младенчестве и детстве, в зрелом возрасте разовьется первичный рак или цирроз печени.

ВГВ представляет собой ДНК вирус, который инфицирует, реплицируется и

персистирует в гепатоцитах человека (Protzer U, et al., Living in the liver: hepatic infections, *Nature Reviews Immunology* 2011, 12: 201-213). Небольшой вирусный геном (3,2 т.п.н.) состоит из частично двухцепочечной релаксированной кольцевой ДНК (ркДНК) и имеет 4 открытые рамки считывания, кодирующие 7 белков: НВсAg (коровый антиген ВГВ, вирусный капсидный белок), НВеAg (е-антиген гепатита В), Pol/RT ВГВ (полимераза, обратная транскриптаза), PreS1/PreS2/НВсAg (большой, средний и малый поверхностный оболочечный гликопротеин) и НВх (ВГВ × антиген, регулятор транскрипции, необходимый для инициации инфекции) (Seeger C, et al., Molecular biology of hepatitis B virus infection, *Virology*, 2015, 479-480:672-686; Tong S, et al., Overview of viral replication и genetic variability, *Journal of Hepatology*, 2016, 64(1):S4-S16).

В гепатоцитах ркДНК, форма нуклеиновой кислоты ВГВ, которая вводится инфекционным вирионом, превращается в ковалентно замкнутую кольцевую ДНК (кзкДНК), которая сохраняется в ядре клетки-хозяина в виде эписомальной хроматинизированной структуры (Allweiss L, et al., The Role of cccDNA in HBV Maintenance, *Viruses* 2017, 9: 156). кзкДНК служит матрицей транскрипции для всех вирусных транскриптов (Lucifora J, et al., Attacking hepatitis B virus cccDNA-The holy grail to hepatitis B cure, *Journal of Hepatology* 2016, 64(1): S41-S48). Транскрипты прегеномной РНК (пгРНК) обратно транскрибируются в новую ркДНК для новых вирионов, которые секретируются, не вызывая цитотоксичности. Помимо инфекционных вирионов, инфицированные гепатоциты секретируют большие количества свободных от генома субвирусных частиц, которые могут превышать количество секретируемых вирионов в 10000 раз (Seeger et al., 2015). Также может происходить случайная интеграция вируса в геном хозяина, механизм, который способствует трансформации гепатоцитов (Levrero M, et al., Mechanisms of ВГВ-induced hepatocellular carcinoma, *Journal of Hepatology* 2016, 64(1): S84 - S101). ВГВ сохраняется в гепатоцитах в виде кзкДНК и интегрированной ДНК (интДНК).

Инфекция гепатита В характеризуется серологическими вирусными маркерами и антителами (рисунок 1). При острых излечимых инфекциях вирус уничтожается за счет эффективных врожденных и адаптивных иммунных ответов, которые включают цитотоксические Т-клетки, приводящие к гибели инфицированных гепатоцитов, и индукцией В-клеток, продуцирующих нейтрализующие антитела, которые предотвращают распространение вируса (Bertoletti A, 2016, Adaptive immunity in HBV infection, *Journal of Hepatology* 2016, 64(1): S71 - S83; Maini MK, et al., The role of innate immunity in the immunopathology and treatment of HBV infection, *Journal of Hepatology* 2016, 64(1): S60-S70; Li Y, et al., Genome-wide association study identifies 8p21,3 associated with persistent hepatitis B virus infection among Chinese, *Nature Communications* 2016, 7:11664). Напротив, хроническая инфекция связана с дисфункцией Т- и В-клеток, опосредованной множеством регуляторных механизмов, включая презентацию вирусных эпитопов на гепатоцитах и секрецию субвирусных частиц (Bertoletti et al., 2016; Maini et al., 2016; Burton AR, et al., Dysfunctional surface antigen specific memory B cells accumulate in chronic

hepatitis B infection, EASL International Liver Congress, Paris, France 2018). Таким образом, продолжающаяся экспрессия и секреция вирусных белков из-за персистенции кзкДНК в гепатоцитах считается ключевым этапом неспособности хозяина избавиться от инфекции.

Хроническая инфекция ВГВ представляет собой динамический процесс, отражающий взаимодействие между репликацией ВГВ и иммунными ответами хозяина. Лабораторным признаком хронической инфекции ВГВ является наличие HBsAg в крови более шести месяцев и отсутствие поддающихся обнаружению анти-HBs. Хроническая инфекция делится на четыре стадии в зависимости от маркеров ВГВ в крови (HBsAg, HBeAg/анти-HBe, ДНК ВГВ) и болезни печени на основе биохимических параметров (аланинаминотрансфераза, «ALT»), а также маркеров фиброза (неинвазивный или на основе биопсии печени) (EASL, 2017). В целом, на различных этапах хронической инфекции ВГВ только меньшая часть пациентов (менее 1% в год) излечивается от заболевания, что измеряется серологическим клиренсом HBsAg.

Стерилизующее лечение ВГВ должно включать полное уничтожение ДНК ВГВ или постоянное подавление транскрипции ДНК ВГВ без риска рецидива. Возможные способы лечения, которые могут устранить или навсегда подавить кзкДНК/интДНК, несут в себе риск повреждения или изменения транскрипции хромосомной ДНК человека.

Напротив, функциональное излечение определяют как пожизненный контроль над вирусом. Пациенты с острым гепатитом В в анамнезе, которые кажутся излеченными, имеют ~40% риск рецидива ВГВ при иммуносупрессии. Таким образом, функциональное излечение является частью естественного течения инфекции ВГВ. Возможные способы лечения, обеспечивающие функциональное излечение, могут потребовать иммуномодуляции. Это связано с тем, что хроническая инфекция ВГВ приводит к истощению В- и Т-клеток, потенциально из-за экспрессии антигенов ВГВ (толерогенов), которые могут препятствовать эффективности иммуномодуляторов.

В настоящее время существует два основных варианта лечения пациентов с хронической инфекцией ВГВ: лечение нуклеозидными/нуклеотидными ингибиторами обратной транскриптазы (NRTI) и пегилированным интерфероном-альфа (PEG-IFN α) (Liang TJ, et al., Present и Future Therapies of Hepatitis B: From Discovery to Cure, *Hepatology* 2015, 62(6):1893-1908). NRTI подавляют выработку инфекционных вирионов и часто снижают уровень ДНК ВГВ в сыворотке до необнаруживаемого. Однако NRTI не устраняют напрямую кзкДНК, и поэтому транскрипция и трансляция вирусных белков продолжается. Следовательно, терапия NRTI в значительной степени не влияет на экспрессию вирусных эпитопов на гепатоцитах, секрецию субвирусных частиц и иммунную дисфункцию. Как следствие, это требует продолжительной, часто пожизненной терапии (однако менее половины пациентов продолжают лечение через 5 лет). Терапия NRTI приводит к потере сывороточного HBsAg со скоростью ~0-3% в год. Кроме того, хотя терапия NRTI обращает вспять фиброз и снижает частоту ГЦК, она не устраняет повышенный риск ГЦК, связанный с инфекцией ВГВ.

Напротив, PEG-IFN может вызывать длительный иммунологический контроль, но

только у небольшого процента пациентов (<10%) (Konerman MA, et al., Interferon Treatment for Hepatitis B, Clinics in Liver Disease 2016, 20(4): 645-665). PEG-IFN обычно требует 48-недельной терапии, и побочные эффекты, зависящие от продолжительности, являются значительными. В исследованиях, посвященных оценке PEG-IFN α для лечения хронической инфекции гепатита С, 12- или 24-недельные схемы были связаны с более низкой частотой серьезных побочных эффектов, побочных эффектов 3 степени и прекращения лечения, чем те, которые наблюдались в исследованиях, оценивающих 48-недельные схемы (Lawitz E, et al., Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection, N Engl J Med. 2013, 368(20): 1878-1887); Hadziyannis SJ, et al., Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose, Ann Intern Med. 2004, 140(5): 346-355; Fried MW, et al., Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection, N Engl J Med. 2002, 347(13): 975-982). Высокая вариабельность ответа в сочетании с неблагоприятным профилем безопасности и побочных эффектов делает значительное число пациентов не подходящими или не желающими проходить лечение PEG-IFN α .

Неспособность терапии NRTI уничтожить вирус и ограничения терапии PEG-IFN α подчеркивают клиническую потребность в новых эффективных, хорошо переносимых и не требующих пожизненного применения новых способов лечения ВГВ.

Сущность изобретения

В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения ВГВ миРНК, в частности HBV02. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, изобретение относится к способу лечения ВГВ инфекции у субъекта введением миРНК, где миРНК содержит смысловую цепь, которая содержит SEQ ID NO: 5, и антисмысловую цепь, которая содержит SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления, способ лечения дополнительно включает введение субъекту пегилированного интерферона-альфа (PEG-INF α). В некоторых вариантах осуществления PEG-INF α вводят перед, одновременно или после введения миРНК HBV02. В некоторых вариантах осуществления, ВГВ инфекция является хронической. В некоторых других вариантах осуществления, субъекту вводят нуклеозидный/нуклеотидный ингибитор обратной транскриптазы (NRTI). В некоторых вариантах осуществления NRTI вводят перед, одновременно или после введения HBV02. В некоторых вариантах осуществления NRTI вводят за 2-6 месяцев до HBV02.

В некоторых аспектах, настоящее изобретение также относится к миРНК для применения в лечении ВГВ инфекции у субъекта, где миРНК представляет собой HBV02 и содержит смысловую цепь, которая содержит SEQ ID NO: 5, и антисмысловую цепь, которая содержит SEQ ID NO: 6. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, миРНК HBV02 вводят субъекту, которому также вводят PEG-INF α . В некоторых вариантах осуществления, PEG-INF α вводят перед, одновременно или после введения миРНК HBV02. В некоторых вариантах осуществления, ВГВ инфекция является хронической. В некоторых других вариантах осуществления, субъекту вводят NRTI. В

некоторых вариантах осуществления NRTI вводят перед, одновременно или после введения HBV02. В некоторых вариантах осуществления NRTI вводят за 2-6 месяцев перед HBV02.

В некоторых дополнительных аспектах, настоящее изобретение относится к применению миРНК в получении лекарственного средства для лечения ВГВ инфекции, где миРНК представляет собой HBV02 и содержит смысловую цепь, которая содержит SEQ ID NO: 5, и антисмысловую цепь, которая содержит SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления, применение миРНК HBV02 предназначено для применения с PEG-IFN α . В некоторых вариантах осуществления, миРНК HBV02 предназначено для применения с PEG-IFN α и NRTI.

В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, доза миРНК HBV02 составляет 0,8 мг/кг, 1,7 мг/кг, 3,3 мг/кг, 6,7 мг/кг, 10 мг/кг или 15 мг/кг. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, доза миРНК HBV02 составляет от 20 мг до 900 мг. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, доза миРНК HBV02 составляет 20 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 450 мг. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, HBV02 вводят раз в неделю. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, вводят более одной дозы миРНК. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, вводят две, три, четыре, пять, шесть или более доз миРНК, причем каждая доза отделена 1, 2, 3 или 4 неделями. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, вводят шесть 200-мг доз миРНК. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, вводят две 400-мг дозы миРНК. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, миРНК вводят подкожной инъекцией; например, в некоторых вариантах осуществления, введение миРНК HBV02 включает введение 1, 2, или 3 подкожных инъекций на дозу.

В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, доза PEG-IFN α составляет 50 мкг, 100 мкг, 150 мкг или 200 мкг. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, PEG-IFN α вводят раз в неделю. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, PEG-IFN α вводят подкожной инъекцией.

В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, NRTI представляет собой тенофовир, тенофовир дизопроксилфумарат (TDF), тенофовир алафенамид (TAF), ламивудин, адефовир, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин, AGX-1009, эмтрицитабин (FTC), клевудин, ритонавир, дипивоксил, лобукавир, фамвир, N-ацетилцистеин (NAC), PC1323, терадигм-ВГВ, тимозин-альфа, ганцикловир, безифовир (ANA-380/LB-80380) или тенофовир-эксалиадес (TLX/CMX157).

В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления, субъект является HBeAg отрицательным. В некоторых вариантах осуществления, субъект является HBeAg положительным.

В некоторых аспектах настоящего изобретения, изобретение относится к набору, содержащему: фармацевтическую композицию, содержащую миРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, и фармацевтически приемлемый эксципиент;

и фармацевтическую композицию, содержащую PEG-IFN α и фармацевтически приемлемый эксципиент. Набор может также содержать NRTI и фармацевтически приемлемый эксципиент.

КРАТНОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 показывает характеристики острой и хронической инфекции гепатита В.

Фигура 2 показывает характеристики хронической инфекции гепатита В. Заболевание делится на 4 фазы в зависимости от статуса HBeAg и лабораторных или рентгенологических данных о заболевании печени. Неоднородность заболевания может быть связана с различиями в вирусе (например, генотипах, мутациях ВГВ), хозяине (например, иммунные ответы, возраст на момент заражения, количество инфицированных гепатоцитов) и другими факторами (например, коинфекциями (ВГД, ВГЦ, ВИЧ), интеркуррентными инфекциями, сопутствующими заболеваниями).

Фигура 3 показывает дизайн однократной возрастающей дозы для части А примера 2. ^аВыписка субъекта происходит после завершения всех оценок на 2-й день.

Фигура 4 показывает дизайн многократной возрастающей дозы для частей В и С примера 2. ^аДополнительный мониторинг HBsAg требуется для субъектов с уровнями HBsAg с >10% снижением по сравнению с уровнем до введения дозы в день 1 при посещении на 16 неделе. Посещения осуществляют каждые 4 недели, начиная с 20-й по 48-ю неделю, или до тех пор, пока уровень HBsAg не вернется к $\geq 90\%$ уровня до введения дозы в 1-ый день.

Фигура 5А-фигура 5В показывают график дозирования групп для частей А, В и С примера 2, включая необязательные группы и «плавающих» субъектов. *До 8 субъектов для части А и до 16 субъектов для частей В/С могут быть добавлены как часть расширения имеющейся группы или групп, если требуются дополнительные данные (не требуется, чтобы распределение «плавающих» субъектов в частях В/С было равномерным; общее количество n для частей В/С не превышает 48 субъектов). **Дозы, указанные в режимах частей В/С, указывают на однократную дозу HBV02 или плацебо; субъекты получают всего до 2 доз.

Фигура 6А-фигура 6D показывают график дозирования группы для части D примера 2. На фигуре 6А показан план дозирования для группы 1d; На фигуре 6В показан план для группы 2d; Фигура 6С показывает дизайн для группы 3d; и фигура 6D показывает дизайн для группы 4d.

Фигура 7А-7В показывает схему дозирования группы для частей А, В, С и D примера 2, включая необязательные группы и «плавающих» субъектов (пунктирные линии на фигуре 7А).

Фигура 8 показывает график дозирования группы для частей А, В, и С исследования в примере 3.

Фигура 9А-9С показывает исследования, генерирующие предварительные данные в примере 3. На фигуре 9А показан план исследования на момент завершения дозирования для групп 1-5 части А (50 мг, 100 мг, 200 мг, 400 мг, 600 мг) и для групп 1-2 части В (50

мг, 100 мг). На фигуре 9В показано завершённое дозирование для части А для групп 1-5 и исключение субъектов в различных группах. На фигуре 9С показано завершённое дозирование для части В для групп 1-2 и исключение субъектов в разных группах.

Фигура 10А-фигура 10В показывает АЛТ уровни для субъектов в группах 1-4 части А примера 3. Фигура 10А показывает АЛТ уровни для субъектов, которые получали 50 мг (группа 1а) или 100 мг (группа 2а) HBV002. Фигура 10В показывает АЛТ уровни для субъектов, которые получали 200 мг (группа 3а) или 400 мг (группа 4а) HBV002. У одного субъекта из группы 200 мг на 29-й день уровень АЛТ был на уровне ULN, связанный с тяжелыми физическими упражнениями и высоким уровнем креатининкиназы (СК: 5811 ед/л). У двух субъектов из группы 400 мг значения АЛТ были выше ULN в день 1 до введения дозы; один из данных субъектов был допущен к интенсивным упражнениям, имел высокий уровень СК (20001 ед/л), и был исключен на 2-й день, что не было связано с побочными эффектами, и АЛТ другого субъекта восстановился к 8-му дню без внешнего вмешательства.

Фигура 11 показывает АЛТ уровни для субъектов в части В примера 3, которые получали 50 мг (группа 1b) или 100 мг (группа 2b) HBV002. Одна женщина из группы 100 мг показала повышение уровня АЛТ 1 степени на 8 неделе.

Фигура 12А-12С показывает противовирусную активность в части В групп 1b (50 мг) и 2b (100 мг) примера 3, как измерено изменением уровня HBsAg. Фигура 12А показывает изменение уровня HBsAg среди активных субъектов и субъектов, получающих плацебо. Фигура 12В показывает изменение уровня HBsAg только среди активных субъектов. Фигура 12С показывает изменение уровня HBsAg (среднее изменение с 1 дня в HBsAg после введения HBV02) среди субъектов в группах с 50 мг (группа 1b) и 100 мг (группа 2b).

Фигура 13А-фигура 13Е показывает уровни АЛТ у пациентов с хроническим ВГВ в примере 3 до 16 недели (n=32). На фигуре 13А показаны уровни АЛТ для всех пациентов, и данные результаты показаны отдельно для различных уровней дозы HBV02 на фигурах 13В (20 мг), 13С (50 мг), 13D (100 мг) и 13Е (200 мг).

Фигура 14 показывает повышение уровня АЛТ после начала лечения у здоровых добровольцев с нормальным уровнем АЛТ на исходном уровне, что соответствует примеру 3. Наибольшее повышение уровня АЛТ после начала лечения, выраженное относительно верхнего предела нормы (ULN), показано на оси y. Доза ВГВ01 или HBV02 показана на оси x. *Ориентировочная доза мг/кг из расчета на средний вес взрослого человека 60 кг; фиксированные дозы HBV02 варьировались от 50 до 900 мг.

Фигура 15А-фигура 15В показывают профили концентрации в плазме в зависимости от времени для HBV02 (А) и AS (N-1) 3 HBV02 (В) после однократной подкожной дозы здоровым добровольцам, соответствующим примеру 3.

Фигура 16 показывает AUC₀₋₁₂ плазмы для HBV02 после однократной подкожной дозы здоровым добровольцам, соответствующим примеру 3. Пропорциональность дозы соблюдалась от 50 мг до 900 мг.

Фигура 17 показывает C_{\max} плазмы для HBV02 после однократной подкожной дозы здоровым добровольцам, соответствующим примеру 3. Пропорциональность дозы соблюдалась от 50 мг до 900 мг.

Фигура 18 показывает PK параметры плазмы для HBV02 и AS(N-1)3' HBV02 после однократной подкожной дозы здоровым добровольцам в примере 3. Временные параметры выражают в виде медианы (квартиль [Q] 1, Q3); все остальные данные представлены как среднее значение (% коэффициент вариации [CV]). Из-за короткого периода полувыведения HBV02 ($t_{1/2}$) и ограничений графика отбора проб для PK, терминальная фаза не была должным образом охарактеризована; следовательно, о наблюдаемом клиренсе и $t_{1/2}$ не приводили. ^aисключает 1 добровольца, получившего частичную дозу; ^bвключает PK от запасного добровольца; ^cизмеренные у 3/6 добровольцев; AUC, площадь под кривой; AUC₀₋₁₂, AUC от 0 до 12 ч; AUC_{last}, AUC от времени дозирования до последней измеряемой временной точки; BLQ, ниже предела количественного определения; C_{\max} , максимальная концентрация; CV, коэффициент вариации; MR, соотношение метаболитов и исходных веществ; NC, не рассчитывают; T_{\max} =время C_{\max} ; T_{last} , последнее измеряемое время.

Фигура 19A-19B показывает профили концентрации в моче в зависимости от времени для HBV02 (A) и AS (N-1) 3' HBV02 (B) после однократной подкожной дозы здоровым добровольцам, соответствующим примеру 3.

Фигура 20 показывает PK параметры плазмы для HBV02 и AS(N-1)3' HBV02 у здоровых добровольцев в примере 3. Все PK параметры выражены как среднее значение (CV%). ^aисключает 1 добровольца, получившего частичную дозу; ^bвключает PK от запасного добровольца; ^cAUC₀₋₂₄ экстраполируют; AUC₀₋₂₄, AUC от 0 до 24 часов; CLR, общий почечный клиренс; fe_{0-24} , фракция, выводимая с 0 до 24 часов; NC, не рассчитывают.

Фигура 21A-21B показывает противовирусную активность в частях B и C примера 3, измеренные изменением уровня HBsAg. Фигура 21A показывает изменение уровня HBsAg в логарифмической шкале.

Фигура 22 показывает изменение HBsAg относительно исходного значения дозой HBV02 или для плацебо, для примера 3. Данные последующего наблюдения доступны для всех пациентов, получавших плацебо, до 16 недели по сравнению с 24 неделями для групп лечения.

Фигура 23 показывает индивидуальное максимальное изменение HBsAg относительно исходного значения для примера 3. Планки погрешностей представляют собой медианное значение (межквартильный размах).

Фигура 24 показывает индивидуальное изменение HBsAg относительно исходного значения на 24 неделю для примера 3. Планки погрешностей представляют собой медианное значение (межквартильный размах).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к способам, композициям и наборам для

применения в лечении инфекции вируса гепатита В (ВГВ), где вводят молекулу малой интерферирующей РНК (миРНК), которая нацелена на ВГВ. В некоторых вариантах осуществления, молекулу миРНК вводят с терапией пегилированным интерфероном-2 α (PEG-IFN α) или вводят субъекту, который получает или будет получать терапию PEG-IFN- α . В некоторых вариантах осуществления, способы, композиции и наборы, описанные в настоящем изобретении, применяют для лечения хронической инфекции ВГВ.

I. Терминология

Прежде чем изложить настоящее изобретение более подробно, может быть полезно для его понимания предоставить определения некоторых терминов, которые будут использоваться в рамках изобретения. Дополнительные определения приведены в данном описании.

В настоящем изобретении, термин “приблизительно” обозначает +20% указанного диапазона, величины или структуры, если не указано иначе.

Термин «содержит» обозначает наличие указанных признаков, целых чисел, стадий или компонентов, как указано в формуле изобретения, но не препятствует присутствию или добавлению одного или нескольких других признаков, целых чисел, стадий, компонентов или их групп. Термин «состоящий по существу из» ограничивает объем формулы изобретения указанными материалами или стадиями и теми, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленного изобретения.

Ясно, что термины “а” и “an”, как применяют в настоящем изобретении, относятся к “одному или более” перечисленных компонентов. Применение альтернативы (например, «или») следует понимать как обозначающее одну, обе или любую их комбинацию из альтернатив, и можно использовать как синоним «и/или». Как применяется в настоящем изобретении, термины «включать» и «иметь» применяют как синонимы, и данные термины и их варианты предназначены для толкования как неограничивающие.

Слово “по существу” не исключает «полностью»; например, композиция, которая «по существу не содержит» Y, может полностью не содержать Y. При необходимости слово «по существу» может быть опущено из определений, приведенных в настоящем изобретении.

Термин “заболевание”, как применяют в настоящем изобретении, в целом является синонимом, и его применяют взаимозаменяемо с терминами «расстройство» и «состояние» (например, «состояние здоровья»), в том смысле, что все они отражают ненормальное состояние тела человека или животного или одной из его частей, которое нарушает нормальное функционирование. «Заболевание» обычно проявляется отличительными признаками и симптомами и приводит к сокращению продолжительности или качества жизни человека или животного.

Как применяют в настоящем изобретении, термины “пептид,” “полипептид,” и “белок” и варианты данных терминов относятся к молекуле, в частности пептиду, олигопептиду, полипептиду или белку, включая слитый белок, соответственно, содержащей, по меньшей мере, две аминокислоты, соединенные друг с другом

нормальной пептидной связью или модифицированной пептидной связью, такой как, например, в случаях изостерных пептидов. Например, пептид, полипептид или белок могут состоять из аминокислот, выбранных из 20 аминокислот, определенных генетическим кодом, соединенные друг с другом нормальной пептидной связью (“классический” полипептид). Пептид, полипептид, или белок может состоять из L-аминокислот и/или D-аминокислот. В частности, термины “пептид,” “полипептид” и “белок” также включают “пептидомиметики,” которые определяют как пептидные аналоги, содержащие непептидные структурные элементы, которые способны имитировать или противодействовать биологическому действию (ям) природного исходного пептида. Пептидомиметику не хватает классических пептидных характеристик, таких как ферментативно разрезаемые пептидные связи. В частности, пептид, полипептид или белок может содержать аминокислоты, отличные от 20 аминокислот, определенных генетическим кодом, в дополнение к данным аминокислотам, или он может состоять из аминокислот, отличных от 20 аминокислот, определенных генетическим кодом. В частности, пептид, полипептид или белок в контексте настоящего изобретения может в равной степени состоять из аминокислот, модифицированных естественными процессами, такими как процессы посттрансляционного созревания или химическими процессами, которые хорошо известны специалисту в данной области техники. Данные модификации подробно описаны в литературе. Данные модификации могут появиться где угодно в полипептиде: в скелете пептида, в аминокислотной цепи или даже на карбокси- или амино конце. В частности, пептид или полипептид может быть разветвленным после убиквитинирования или быть циклическим с разветвлением или без него. Данный тип модификации может быть результатом естественных или синтетических посттрансляционных процессов, которые хорошо известны специалисту в данной области техники. Термины «пептид», «полипептид» или «белок» в контексте настоящего изобретения, в частности, также включают модифицированные пептиды, полипептиды и белки. Например, модификации пептида, полипептида или белка могут включать ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентную фиксацию нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентную фиксацию липида или липидного производного, ковалентную фиксацию фосфатидилинозитола, ковалентное или нековалентное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, гликозилирование, включая пегилирование, гидроксигилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитические процессы, фосфорилирование, пренилирование, рацемизация, сенолоилирование, сульфатирование, добавление аминокислоты, такое как аргинилирование, или убиквитинирование. Данные модификации подробно описаны в литературе (Proteins Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T.E. Creighton, New York (1993); Post-translational Covalent Modifications of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter, et al., Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. 182:626-46 (1990); and Rattan, et al., Protein Synthesis: Post-translational

Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992)). Соответственно, термины “пептид,” “полипептид” и “белок” включают, например, липопептиды, липобелки, гликопептиды, гликобелки и подобные.

Как применяют в настоящем изобретении “(поли)пептид” включает одну цепь аминокислотных мономеров, соединенных пептидными связями, как объяснено выше. «Белок», применяемый в настоящем изобретении, содержит один или несколько, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (поли)пептидов, то есть одну или несколько цепей аминокислотных мономеров, соединенных пептидными связями, как описано выше. В конкретных вариантах осуществления белок согласно настоящему изобретению содержит 1, 2, 3 или 4 полипептида.

Термин “рекомбинантный”, как применяют в настоящем изобретении (*например*, рекомбинантный белок, рекомбинантная нуклеиновая кислота и т.д.), относится к любой молекуле (белку, нуклеиновой кислоте, миРНК и т.д.), которую получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, и которая не имеет природное происхождение.

Как применяют в настоящем изобретении, термины “нуклеиновая кислота,” “молекула нуклеиновой кислоты” и “полинуклеотид” применяют взаимозаменяемо и предполагается, что они включают молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двуцепочечной. В конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты представляет собой двухцепочечную молекулу РНК.

Как применяют в настоящем изобретении, термины «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» применяют взаимозаменяемо, и все данные обозначения включают потомство. Таким образом, слова «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичную рассматриваемую клетку и полученные из нее культуры без учета количества переносов. Также ясно, что все потомство не может быть точно идентичным по содержанию ДНК из-за преднамеренных или случайных мутаций. Включены варианты потомства, которые обладают той же функцией или биологической активностью, что и проверенные в первоначально трансформированной клетке.

Как применяют в настоящем изобретении, термин “вариант по последовательности” относится к любой последовательности, содержащей одно или несколько изменений по сравнению с эталонной последовательностью, при этом эталонная последовательность представляет собой любую из последовательностей, перечисленных в списке последовательностей, то есть от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6. Таким образом, термин «вариант по последовательности» включает нуклеотидные варианты по последовательности и аминокислотные варианты по последовательности. Для варианта по последовательности в контексте нуклеотидной последовательности эталонная последовательность также является нуклеотидной последовательностью, тогда как для варианта по последовательности в контексте аминокислотной последовательности эталонная последовательность также является аминокислотной последовательностью.

“Вариант по последовательности”, как применяют в настоящем изобретении является, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичным эталонной последовательности. Идентичность последовательности обычно рассчитывают относительно полной длины эталонной последовательности (то есть последовательности, указанной в заявке), если не указано иное. Идентичность в процентах, как приводят в настоящем изобретении, может быть определена, например, применяя BLAST, применяя параметры по умолчанию, указанные NCBI (the National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62 matrix; штраф за открытие гэпа =1 и штраф за продление гэпа =1].

“Вариант по последовательности” в контексте последовательности нуклеиновой кислоты (нуклеотидной) имеет измененную последовательность, в которой один или несколько нуклеотидов в эталонной последовательности удалены или заменены, или один или несколько нуклеотидов вставлены в последовательность эталонной нуклеотидной последовательности. Нуклеотиды обозначают в настоящем изобретении стандартным однобуквенным обозначением (А, С, G или Т). Из-за вырожденности генетического кода «вариант по следовать» нуклеотидной последовательности может либо привести к изменению соответствующей эталонной аминокислотной последовательности, то есть в аминокислотном «варианте по последовательности», либо нет.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидные варианты по последовательности представляют собой варианты, которые не приводят в результате к аминокислотным вариантам по последовательности (*m.e.*, молчащие мутации). Однако, нуклеотидные варианты по последовательности, приводящие к “немолчащим” мутациям, также включены в объем, в частности такие нуклеотидные варианты по последовательности, которые приводят в результате к аминокислотной последовательности, которая является, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичной эталонной аминокислотной последовательности. “Вариант по последовательности” в контексте аминокислотной последовательности имеет измененную последовательность, в которой одна или несколько аминокислот удалены, заменены или вставлены по сравнению с эталонной аминокислотной последовательностью. В результате данных изменений данный вариант по последовательности имеет аминокислотную последовательность, которая является, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичной эталонной аминокислотной последовательности. Например, на 100 аминокислот эталонной последовательности вариантная последовательность, содержащая не более 10 изменений, т.е., любая комбинация делеций, вставок или замен, является «по меньшей мере, на 90% идентичной» эталонной последовательности.

Хотя возможны неконсервативные аминокислотные замены, в некоторых вариантах осуществления замены представляют собой консервативные аминокислотные

замены, в которых замещенная аминокислота имеет сходные структурные или химические свойства с соответствующей аминокислотой в контрольной последовательности. В качестве примера, консервативные аминокислотные замены включают замену одной алифатической или гидрофобной аминокислоты, например, аланина, валина, лейцина и изолейцина, другой; замена одной гидроксилсодержащей аминокислоты, например серина и треонина, другой; замещение одного кислотного остатка, например глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, другим; замена одного амидосодержащего остатка, например, аспарагина и глутамина, другим; замена одного ароматического остатка, например, фенилаланина и тирозина, другим; замена одного основного остатка, например лизина, аргинина и гистидина, другим; и замена одной небольшой аминокислоты, например, аланина, серина, треонина, метионина и глицина, другой.

Вставки аминокислотных последовательностей включает амино- и/или карбоксильные концевые слияния длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают слияние N- или C-конца аминокислотной последовательности с репортерной молекулой или ферментом.

Если не указано иначе, изменения в вариантах по последовательности не обязательно отменяют функциональность соответствующей эталонной последовательности, например, в данном случае, функциональность миРНК по снижению экспрессии белка ВГВ. Рекомендации по определению того, какие нуклеотидные и аминокислотные остатки, соответственно, могут быть заменены, вставлены или удалены без отмены данной функциональности, можно найти, применяя компьютерные программы, известные в данной области техники.

Как применяют в настоящем изобретении, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность “полученная из” указанной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка относится к происхождению нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая получена из конкретной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая является по существу идентичной данной последовательности или ее части, из которой она получена, при этом «по существу идентичное» включает вариант по последовательности, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновых кислот или аминокислотная последовательность, которая получена из определенного пептида или белка, происходит из соответствующего домена в конкретном пептиде или белке. Таким образом, «соответствующий» относится, в частности, к той же функциональности. Например, «внеклеточный домен» соответствует другому «внеклеточному домену» (другого белка), или «трансмембранный домен» соответствует другому «трансмембранному домену» (другого белка). «Соответствующие» части пептидов,

белков, нуклеиновых кислот, таким образом, могут быть идентифицированы специалистом в данной области техники. Аналогичным образом, последовательности, «полученные из» другой последовательности, обычно могут быть идентифицированы специалистом в данной области техники как имеющие свое происхождение в последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может быть идентичной исходной нуклеиновой кислоте, пептиду, полипептиду или белку (из которого она получена). Однако последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может содержать одну или более мутаций относительно исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которого она получена), в частности последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может представлять собой функциональный вариант по последовательности, как описано выше, исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которого она получена). Например, в пептиде/белке один или несколько аминокислотных остатков можно замещать другими аминокислотными остатками или можно осуществлять вставки или делеции одного или нескольких аминокислотных остатков.

Как применяют в настоящем изобретении, термин “мутация” относится к изменению последовательности нуклеиновой кислоты и/или аминокислотной последовательности по сравнению с эталонной последовательностью, *например*, соответствующей геномной последовательностью. Мутация, *например*, по сравнению с геномной последовательностью, может представлять собой, например, (природную) соматическую мутацию, спонтанную мутацию, индуцированную мутацию, *например*, индуцированную ферментами, химическими веществами или радиацией, или мутацию, полученную сайт-специфическим мутагенезом (молекулярно-биологические способы для внесения специфических и преднамеренных изменений в последовательность нуклеиновой кислоты и/или в аминокислотную последовательность). Таким образом, ясно, что термины “мутация” или “мутирующий” также включают физическое создание мутации, *например*, в последовательности нуклеиновой кислоты или в аминокислотной последовательности. Мутация включает замещение, делецию и вставку одного или более нуклеотидов или аминокислот, а также вставку нескольких последовательных нуклеотидов или аминокислот. Для введения мутации в аминокислотную последовательность, мутацию можно вводить в нуклеотидную последовательность, кодирующую указанную аминокислотную последовательность для экспрессии (рекомбинантного) мутированного полипептида. Мутация может быть достигнута, например, изменением, например, сайт-направленным мутагенезом, кодона молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одну аминокислоту, с получением кодона,

кодирующего другую аминокислоту, или синтезом варианта по последовательности, например, зная нуклеотидную последовательность молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, и дизайном синтеза молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант нуклеотида, без необходимости в мутации одного или нескольких нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты.

Как применяют в настоящем изобретении, предполагается, что термин “кодирующая последовательность” относится к молекуле полинуклеотида, которая кодирует аминокислотную последовательность белкового продукта. Границы кодирующей последовательности обычно определяют открытой рамкой считывания, которая обычно начинается со стартового кодона АТГ.

Термин “экспрессия”, как применяют в настоящем изобретении, относится к любой стадии, участвующей в получении полипептида, включая транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию, секрецию и подобные.

Дозы часто выражают по отношению к массе тела. Таким образом, доза, выраженная как [г, мг или другая единица]/кг (или г, мг и т.д.), обычно относится к [г, мг или другой единице] «на кг (или г, мг и т.д.) веса тела», даже если термин «вес тела» явно не упоминается.

Как применяют в настоящем изобретении, “вирус гепатита В,” применяемый взаимозаменяемо с термином “ВГВ” относится к хорошо известному нецитопатическому гепатотропному ДНК вирусу, принадлежащему к семейству *Hepadnaviridae*. Геном ВГВ представляет собой частично двухцепочечную кольцевую ДНК с четырьмя перекрывающимися рамками считывания (которые можно называть в настоящем изобретении «генами», «открытые рамки считывания» или «транскрипты»): С, Х, Р и S. Основной белок кодируется геном С (НВсАg). Е-антиген гепатита В (НВеАg) продуцируется протеолитическим процессингом предядерного (пре-С) белка. ДНК полимеразы кодируется геном Р. Ген S представляет собой ген, кодирующий поверхностные антигены (НВsАg). Ген НВsАg представляет собой одну длинную открытую рамку считывания, которая содержит три кодона в «стартовой» рамке (АТГ), в результате чего образуются полипептиды трех разных размеров, называемые большим, средним и малым S-антигенами, пре-S1+пре-S2+S, пре-S2+S или S. Поверхностные антигены, помимо декорирования оболочки ВГВ, также являются частью субвирусных частиц, которые продуцируются в большом избытке по сравнению с частицами вириона, и играют роль в иммунной толерантности и в секвестировании анти-НВsАg антител, что позволяет инфекционным частицам ускользать от иммунного обнаружения. Функция неструктурного белка, кодируемого геном Х, до конца не изучена, но он играет роль в транскрипционной трансактивации и репликации и связан с развитием рака печени.

Были определены девять генотипов ВГВ, обозначенных от А до I, и был предложен дополнительный генотип J, каждый из которых имеет свое географическое

распространение (Velkov S, et al., The Global Hepatitis B Virus Genotype Distribution Approximated from Available Genotyping Data, *Genes* 2018, 9(10):495). Термин «ВГВ» включает любой из генотипов ВГВ (от А до J). Полную кодирующую последовательность эталонной последовательности генома ВГВ можно найти, например, по номеру доступа GenBank GI:21326584 и GI:3582357. Аминокислотные последовательности для С, Х, Р и S белков можно найти, например, по номерам доступа NCBI YP_009173857.1 (С белок); YP_009173867.1 и ВАА32912.1 (Х белок); YP_009173866.1 и ВАА32913.1 (Р белок); и YP_009173869.1, YP_009173870.1, YP_009173871.1 и ВАА32914.1 (S белок).

Дополнительные примеры последовательностей матричной РНК (мРНК) ВГВ доступны, применяя общедоступные базы данных, например, GenBank, UniProt и OMIM. Доступ к Международному репозиторию данных о штаммах вируса гепатита В можно получить по адресу <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/HepSEQ/main.php>. Термин «ВГВ», как применяют в настоящем изобретении, также относится к встречающимся в природе вариациям последовательности ДНК генома ВГВ, то есть генотипам А-J и их вариантам.

миРНК опосредует целевое расщепление РНК транскрипта РНК-индуцированным комплексом молчания (RISC), тем самым подавляя экспрессию генов. Данный процесс часто называют «РНК интерференцией» (РНКи). Не желая быть привязанным к какой-либо конкретной теории, длинная двухцепочечная РНК (дцРНК), вводимая в клетки растений и беспозвоночных, расщепляется на миРНК эндонуклеазой типа III, известной как Dicer (Sharp, et al., *Genes Dev.* 15: 485). (2001)). Дайсер, фермент, подобный рибонуклеазе III, преобразует дцРНК в миРНК из 19-23 пар оснований с характерными выступами из двух оснований 3' (Bernstein, et al., *Nature* 2001, 409: 363). миРНК затем включаются в RISC, где одна или несколько геликаз раскручивают миРНК дуплекс, позволяя комплементарной антисмысловой цепи управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al., 2001, *Cell* 107: 309). После связывания с соответствующей мРНК-мишенью одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, вызывая сайленсинг (Elbashir, et al., *Genes Dev.* 2001, 15:188).

Термины “сайленсинг,” “ингибировать экспрессию,” «негативно регулировать экспрессию», «подавлять экспрессию» и подобные в той мере, в какой они относятся к гену ВГВ, в настоящем изобретении относятся, по меньшей мере, к частичному снижению экспрессии гена ВГВ, что проявляется в уменьшении количества мРНК ВГВ, которая может быть выделена или обнаружена в первой клетке или группе клеток, в которых транскрибируется ген ВГВ и которые были обработаны ингибитором экспрессии гена ВГВ, так что экспрессия гена ВГВ подавляется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичным первой клетке или группе клеток, но которая не была или которые не были обработаны таким образом (контрольные клетки).

Степень ингибирования можно измерить, например, как разница между степенью экспрессии мРНК в контрольной клетке минус степень экспрессии мРНК в обработанной клетке. В качестве альтернативы, степень ингибирования может быть выражена в терминах уменьшения параметра, который функционально связан с экспрессией гена

ВГВ, например, количества белка, кодируемого геном ВГВ, или количества клеток, демонстрирующих определенный фенотип, например, фенотип ВГВ инфекции. В принципе, сайленсинг гена ВГВ можно определить в любой клетке, экспрессирующей ген ВГВ, например, в инфицированной ВГВ клетке или в клетке, сконструированной для экспрессии гена ВГВ, и с помощью любого подходящего анализа.

Уровень РНК ВГВ, который экспрессируется клеткой или группой клеток, или уровень циркулирующей РНК ВГВ, можно определить, применяя любой способ, известный в данной области техники для оценки экспрессии мРНК, такой как способ ПЦР в реальном времени, представленный в Примере 2 публикации международной заявки № WO 2016/077321A1 и заявке на патент США № US2017/0349900A1, которые включены в настоящее изобретение посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена ВГВ (например, общая РНК ВГВ, транскрипт ВГВ, например, 3,5 т.п.н. транскрипт ВГВ) в образце определяют обнаружением транскрибированного полинуклеотида или его части, например, РНК гена ВГВ.

РНК можно экстрагировать из клеток, применяя способы экстракции РНК, включая, например, кислую экстракцию фенолом/гуанидинизотиоцианатом (RNAzol B; Biogenesis), наборы для приготовления РНК RNeasy (Qiagen®) или PAXgene (PreAnalytix, Switzerland). Типичные форматы анализов, применяющие гибридизацию с рибонуклеиновой кислотой, включают ядерные анализы с повторным запуском, ОТ-ПЦР, анализы защиты от РНКаз (Melton DA, et al., Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter, Nuc. Acids Res. 1984, 12:7035-56), нозерн-блоттинг, гибридизацию in situ и микроматричный анализ. Циркулирующую мРНК ВГВ можно обнаружить, применяя способы, описанные в публикации международной заявки № WO 2012/177906A1 и заявке на патент США № US2014/0275211A1, которые включены в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Как применяют в настоящем изобретении, “целевая последовательность” относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена ВГВ, включая мРНК, которая представляет собой продукт процессинга РНК первичного продукта транскрипции. Целевая часть последовательности будет, по меньшей мере, достаточно длинной, чтобы служить субстратом для РНКи-направленного расщепления в данной части или рядом с ней. Например, целевая последовательность обычно будет состоять из 9-36 нуклеотидов в длину, например, 15-30 нуклеотидов в длину, включая все поддиапазоны между ними. В качестве неограничивающих примеров, целевая последовательность может состоять из 15-30 нуклеотидов, 15-26 нуклеотидов, 15-23 нуклеотидов, 15-22 нуклеотидов, 15-21 нуклеотидов, 15-20 нуклеотидов, 15-19 нуклеотидов, 15-18 нуклеотидов, 15-17 нуклеотидов, 18-30 нуклеотидов, 18-26 нуклеотидов, 18-23 нуклеотидов, 18-22 нуклеотидов, 18-21 нуклеотидов, 18-20 нуклеотидов, 19-30 нуклеотидов, 19-26 нуклеотидов, 19-23 нуклеотидов, 19-22 нуклеотидов, 19- 21 нуклеотидов, 19-20 нуклеотидов, 20-30 нуклеотидов, 20-26 нуклеотидов, 20-25 нуклеотидов, 20- 24

нуклеотидов, 20-23 нуклеотидов, 20-22 нуклеотидов, 20-21 нуклеотидов, 21-30 нуклеотидов, 21-26 нуклеотидов, 21-25 нуклеотидов, 21-24 нуклеотидов, 21-23 нуклеотидов или 21- 22 нуклеотидов.

Как применяют в настоящем изобретении, термин “цепь, содержащая последовательность” относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которые описаны последовательностью, указанной, применяя стандартную номенклатуру нуклеотидов.

Как применяют в настоящем изобретении, и если не указано иначе, термин “комплементарность,” при применении для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться и образовывать дуплексную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как ясно специалисту в данной области техники. Данные условия могут, например, быть строгими условиями, где строгие условия могут включать: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES pH 6,4, 1 мМ EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующей промывкой. Можно использовать другие условия, такие как физиологически релевантные условия, которые могут встречаться внутри организма. Специалист в данной области техники сможет определить набор условий, наиболее подходящих для теста комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в миРНК, как описано в настоящем изобретении, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Данные последовательности можно называть в настоящем изобретении «полностью комплементарными» по отношению друг к другу. Однако, когда первая последовательность упоминается как «по существу комплементарная» по отношению ко второй последовательности в настоящем изобретении, две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одну или несколько, но обычно не более 5, 4, 3 или 2 несовпадающие пары оснований при гибридизации для дуплекса до 30 пар оснований, сохраняя при этом способность гибридизоваться в условиях, наиболее подходящих для их конечного применения, например, ингибирование экспрессии гена посредством RISC пути.

Однако, если два олигонуклеотида предназначены для образования после гибридизации одного или нескольких одноцепочечных выступов, данные выступы не должны рассматриваться как несоответствия с точки зрения определения комплементарности. Например, миРНК, содержащую один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид включает последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью

комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все же можно называть «полностью комплементарной» для целей, описанных в настоящем изобретении.

“Комплементарные” последовательности, как применяют в настоящем изобретении, могут также включать или быть образованы полностью из пар оснований, отличных от Уотсон-Криковских, и/или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, в той мере, в какой выполняются вышеуказанные требования в отношении их способности к гибридизации. Такие пары оснований, отличные от Уотсон-Криковских, включают, но не ограничиваются ими, G:U воббл пары оснований или Хугстиновские пары оснований.

Термины «комплементарный», «полностью комплементарный» и «по существу комплементарный» в настоящем изобретении можно использовать в отношении соответствия оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью миРНК или между антисмысловой цепью миРНК агента и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их применения.

Как применяют в настоящем изобретении, полинуклеотид, который является «по существу комплементарным», по меньшей мере, части мРНК, относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен прилегающей части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей белок ВГВ). Например, полинуклеотид является комплементарным, по меньшей мере, части мРНК ВГВ, если последовательность является по существу комплементарной непрерываемой части мРНК ВГВ.

Термин “миРНК,” как применяют в настоящем изобретении, относится к молекуле РНК-интерференции, которая включает молекулу РНК или комплекс молекул, имеющих гибридизованную дуплексную область, которая содержит две антипараллельные и по существу комплементарные цепи нуклеиновых кислот, которые будут называть имеющими «смысловую» и «антисмысловую» ориентацию в отношении к целевой РНК. Дуплексная область может иметь любую длину, которая допускает специфическую деградацию требуемой РНК-мишени посредством RISC пути, но обычно ее длина составляет от 9 до 36 пар оснований, например, 15-30 пар оснований в длину.

Учитывая дуплекс от 9 до 36 пар оснований, дуплекс может быть любой длины в данном диапазоне, например, 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 или 36 и любом поддиапазоне между ними, включая, но не ограничиваясь ими, 15-30 пар оснований, 15-26 пар оснований, 15-23 пар оснований, 15-22 пар оснований, 15-21 пар оснований, 15-20 пар оснований, 15-19 пар оснований, 15-18 пар оснований, 15-17 пар оснований, 18-30 пар оснований, 18-26 пар оснований, 18-23 пар оснований, 18-22 пар оснований, 18-21 пар оснований, 18-20 пар оснований, 19-30 пар оснований, 19-26 пар оснований, 19-23 пар оснований, 19-22 пар оснований, 19-21 пар оснований, 19-20 пар оснований, 20-30 пар оснований, 20-26 пар оснований, 20-25 пар оснований, 20-24 пар оснований, 20-23 пар оснований, 20-22 пар оснований, 20-21 пар оснований, 21-30 пар оснований, 21-26 пар оснований, 21-25 пар оснований, 21-24 пар

оснований, 21-23 пар оснований и 21-22 пар оснований. миРНК, образующиеся в клетке при процессинге Dicer и аналогичными ферментами, обычно имеют длину в диапазоне 19-22 пар оснований.

Одна цепь дуплексной области миРНК содержит последовательность, которая является по существу комплементарной области целевой РНК. Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут быть из одной молекулы РНК, имеющей, по меньшей мере, одну самокомплементарную область, или могут быть образованы из двух или более отдельных молекул РНК. Когда дуплексная область образована из двух цепей одной молекулы, молекула может иметь дуплексную область, разделенную одноцепочечной цепью нуклеотидов (в настоящем изобретении называют «петлей шпильки») между 3'-концом одной цепи и 5'-конец соответствующей другой цепи, образующей дуплексную структуру. Петля шпильки может содержать, по меньшей мере, один неспаренный нуклеотид; в некоторых вариантах осуществления петля шпильки может содержать, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 5, по меньшей мере, 6, по меньшей мере, 7, по меньшей мере, 8, по меньшей мере, 9, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 20, по меньшей мере, 23 или более неспаренных нуклеотидов. Если две по существу комплементарные цепи миРНК состоят из отдельных молекул РНК, данные молекулы не обязательно, но могут быть ковалентно соединены. Если две цепи ковалентно соединены друг с другом структурами, отличными от петли шпильки, соединительную структуру называют «линкером».

миРНК, как описано в настоящем изобретении, можно получить стандартными способами, известными в данной области техники, например, применяя автоматический ДНК синтезатор, такой как имеющийся в продаже, например, у Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Термин «антисмысловая цепь» или «направляющая цепь» относится к цепи миРНК, которая содержит область, которая является по существу комплементарной целевой последовательности. Как применяется в настоящем изобретении, термин «область комплементарности» относится к области в антисмысловой цепи, которая является по существу комплементарной последовательности, например, целевой последовательности, как определено в настоящем изобретении. Если область комплементарности не является полностью комплементарной целевой последовательности, несовпадения могут быть во внутренних или концевых областях молекулы. Как правило, наиболее переносимые несоответствия находятся в терминальных областях, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5'- и/или 3'-конца.

Термин «смысловая цепь» или «пассажирская цепь», применяемый в настоящем изобретении, относится к цепи миРНК, которая включает область, которая является по существу комплементарной области антисмысловой цепи, как этот термин определен в настоящем изобретении.

Термин «молекула РНК» или «молекула рибонуклеиновой кислоты» охватывает не только молекулы РНК, экспрессируемые или встречающиеся в природе, но также аналоги

и производные РНК, содержащие один или несколько рибонуклеотидных/рибонуклеозидных аналогов или производных, как описано в настоящем изобретении или как известно в данной области техники. Строго говоря, «рибонуклеозид» включает нуклеозидное основание и рибозный сахар, а «рибонуклеотид» представляет собой рибонуклеозид с одним, двумя или тремя фосфатными фрагментами. Однако термины «рибонуклеозид» и «рибонуклеотид» можно рассматривать как эквивалентные, как применяют в настоящем изобретении. РНК может быть модифицирована в структуре азотистых оснований или в структуре рибозо-фосфатного остова, например, как более подробно описано ниже. Однако молекулы миРНК, содержащие рибонуклеозидные аналоги или производные, сохраняют способность образовывать дуплекс. В качестве неограничивающих примеров молекула РНК может также содержать, по меньшей мере, один модифицированный рибонуклеозид, включая, но не ограничиваясь, 2'-О-метил модифицированный нуклеозид, нуклеозид, содержащий 5'-фосфортиоатную группу, концевой нуклеозид, соединенный с холестерильным производным или бисдециламидной группой додекановой кислоты, конформационно замкнутый нуклеозид, нуклеозид без основания, 2'-дезоксид-2'-фтор модифицированный нуклеозид, 2'-амино модифицированный нуклеозид, 2'-алкил модифицированный нуклеозид, морфолинуклеозид, фосфорамидат или нуклеозид, содержащий неприродное основание, или любую их комбинацию.

В другом примере молекула РНК может содержать, по меньшей мере, два модифицированных рибонуклеозида, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 5, по меньшей мере, 6, по меньшей мере, 7, по меньшей мере, 6, по меньшей мере, 7, по меньшей мере, 8, по меньшей мере, 9, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 15, по меньшей мере, 20 и более, по всей длине молекулы миРНК. Модификации не обязательно должны быть одинаковыми для каждого из множества модифицированных рибонуклеозидов в молекуле РНК. В некоторых вариантах осуществления модифицированный рибонуклеозид включает дезоксирибонуклеозид. Например, миРНК может содержать один или несколько дезоксинуклеозидов, включая, например, дезоксинуклеозидный выступ(ы) или один или несколько дезоксинуклеозидов в двухцепочечной части миРНК. Однако термин «миРНК», как применяют в настоящем изобретении, не включает полностью ДНК молекулу.

Как применяют в настоящем изобретении, термин «нуклеотидный выступ» относится, по меньшей мере, к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры миРНК. Например, когда 3'-конец одной цепи миРНК выходит за 5'-конец другой цепи, или наоборот, возникает нуклеотидный выступ. миРНК может содержать выступ, по меньшей мере, из одного нуклеотида; альтернативно выступ может содержать, по меньшей мере, два нуклеотида, по меньшей мере, три нуклеотида, по меньшей мере, четыре нуклеотида, по меньшей мере, пять нуклеотидов или больше. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из нуклеотидного/нуклеозидного аналога, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может быть в смысловой цепи,

антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступа может присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах либо антисмысловой, либо смысловой цепи миРНК.

Термины «тупой» или «тупой конец», как применяют в настоящем изобретении применительно к миРНК, обозначают, что отсутствуют непарные нуклеотиды или нуклеотидные аналоги на данном терминальном конце миРНК, т.е. отсутствует нуклеотидный выступ. Один или оба конца миРНК могут быть тупыми. Если оба конца миРНК являются тупыми, миРНК называют «тупоконечной». миРНК с «тупыми концами» представляет собой миРНК с тупым концом на обоих концах, т.е., не содержит нуклеотидный выступ на обоих концах молекулы. Чаще всего данная молекула будет двухцепочечной по всей длине.

II. миРНК, нацеленная ВГВ

Настоящее изобретение относится к способам лечения, включающим введение миРНК, которая нацелена на ВГВ, и соответствующим композициям и наборам. В некоторых вариантах осуществления, миРНК, которая нацелена ВГВ, представляет собой HBV02. HBV02 представляет собой синтетическую, химически модифицированную миРНК, нацеленную на РНК ВГВ, с ковалентно присоединенным триантенным N-ацетилгалактозаминным (GalNAc) лигандом, который обеспечивает специфическое поглощение гепатоцитами. HBV02 нацелен на область генома ВГВ, которая является общей для всех вирусных транскриптов ВГВ, и является фармакологически активной против генотипов ВГВ от А до J. На доклинических моделях было показано, что HBV02 ингибирует репликацию, трансляцию и секрецию вируса HBsAg и может обеспечивать функциональное лечение хронических инфекций ВГВ. Одна миРНК может обладать множественными противовирусными эффектами, включая деградацию мРНК, таким образом подавляя репликацию вируса, и деградацию всех вирусных мРНК транскриптов, тем самым предотвращая экспрессию вирусных белков. Это может привести к возвращению функционального иммунного ответа, направленного против ВГВ, либо отдельно, либо в сочетании с другими способами лечения. Способность HBV02 снижать содержание HBsAg-содержащих неинфекционных субвирусных частиц также отличает ее от доступных в настоящее время способов лечения.

HBV02 нацелена на и ингибирует экспрессию мРНК, кодируемую ВГВ геномом согласно NCBI эталонной последовательности NC_003977.2 (номер доступ GenBank GI:21326584) (SEQ ID NO:1). Более конкретно, HBV02 направлена на мРНК, кодируемую частью ВГВ генома, содержащего последовательность GTGTGCACTTCGCTTCAC (SEQ ID NO:2), которая соответствует нуклеотидам 1579-1597 SEQ ID NO:1. Поскольку транскрипция генома ВГВ приводит к полицистронным, перекрывающимся РНК, HBV02 приводит к значительному подавлению экспрессии большинства или всех транскриптов ВГВ.

HBV02 содержит смысловую цепь, содержащую 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ ID NO:3), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-

UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO:4), где нуклеотиды включают 2'-фтор (2'F) и 2'-О-метокси (2'OMe) модификации сахара рибозы, фосфортиоатные модификации остова, модификацию гликолевой нуклеиновой кислотой(GNA), и конъюгацию с трехантенным N-ацетилгалактозаминовым лигандом (GalNAc) на 3'-конце смысловой цепи для облегчения доставки в гепатоциты через асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR). Включая модификации, смысловая цепь HBV02 содержит 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5) и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:6), где модификации имеют сокращения, показанные в таблице 1.

Таблица 1. Сокращения нуклеотидных мономеров, применяемых в презентации модифицированной последовательности нуклеиновой кислоты. Ясно, что, если не указано иначе, данные мономеры, при налции в олигонуклеотиде, соединены между собой 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Сокращение	Нуклеотид(ы)
A	аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфортиоат
As	аденозин-3'-фосфортиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфортиоат
Cs	цитидин-3'-фосфортиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфортиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфортиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфортиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфортиоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин -3'-фосфортиоат
Us	уридин -3'-фосфортиоат
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'- фосфортиоат

Сокращение	Нуклеотид(ы)
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'- фосфортиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'- фосфортиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфортиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфортиоат
s	фосфортиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол (Нур-(GalNAc-алкил)3)
(Agn)	аденозингликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
dA	2'-дезоксаденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксаденозин-3'-фосфортиоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксцитидин-3'-фосфортиоат
dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфортиоат
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфортиоат
dU	2'-деоксиуридин
dUs	2'-деоксиуридин-3'-фосфортиоат

В некоторых вариантах осуществления, миРНК, применяемая в способах, композициях или наборах, описанных в настоящем изобретении, представляет собой HBV02.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК, применяемая в способах, композициях или наборах, описанных в настоящем изобретении, содержит вариант по последовательности HBV02. В конкретных вариантах осуществления, часть ВГВ транскрипта (транскриптов), являющегося мишенью варианта по последовательности HBV02, перекрывается с частью ВГВ транскрипта (транскриптов), являющегося мишенью HBV02.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где (1) смысловая цепь содержит SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:5, или последовательность, которая отличается не более чем 4, не более чем 3, не более чем 2 или не более чем 1 нуклеотидом от SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:5, соответственно; или

(2) антисмысловая цепь содержит SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6, или последовательность, которая отличается не более чем 4, не более чем 3, не более чем 2, или не более чем 1 нуклеотидом от SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, применяют более короткие дуплексы, содержащие одну из последовательностей SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6 минус только несколько нуклеотидов на одном или обоих концах. Следовательно, в настоящем изобретении предполагаются миРНК, содержащие частичную последовательность из, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или более непрерывных нуклеотидов из одной или обеих SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, и отличающиеся в их способности ингибировать экспрессию ВГВ гена не более чем на 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от миРНК, содержащей полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, обеспечивают миРНК, содержащую тупой конец по одному или обоим концам, образованную удалением нуклеотидов с одного или обоих концов HBV02.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК, как описано в настоящем изобретении, может содержать один или более мисматчей по отношению к целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления, миРНК, как описано в настоящем изобретении, содержит не более чем 3 мисматча. В некоторых вариантах осуществления, если антисмысловая цепь миРНК содержит мисматчи относительно целевой последовательности, положение мисматчей не локализуется в центре области комплементарности. В конкретных вариантах осуществления, если антисмысловая цепь содержит мисматчи относительно целевой последовательности, мисматч ограничен положениями в пределах последних 5 нуклеотидов с 5' или 3' конца области комплементарности. Например, для цепи миРНК из 23 нуклеотидов, которая является комплементарной области ВГВ гена, РНК цепь может не содержать любой мисматч в области центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем изобретении, или способы, известные в данной области техники, можно использовать для определения того, является ли миРНК, содержащая мисматч относительно целевой последовательности, эффективной для ингибирования экспрессии ВГВ гена.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК, применяемая в способах, композициях и наборах, описанных в настоящем изобретении, содержит два олигонуклеотида, где первый олигонуклеотид описан как смысловая цепь, и второй олигонуклеотид описан как соответствующая антисмысловая цепь смысловой цепи. Как описано в другом месте в настоящем изобретении и как известно в данной области техники, комплементарные последовательности миРНК могут также содержаться в виде самокомплементарных участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, в отличие от наличия в отдельных олигонуклеотидах.

В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечная анисмысловая РНК молекула, содержащая антисмысловую цепь HBV02 или ее вариант по последовательности, применяют в способах, композициях и наборах, описанных в настоящем изобретении. Анисмысловая РНК молекула может содержать 15-30

нуклеотидов, комплементарных мишени. Например, анисмысловая РНК молекула может содержать последовательность из, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более непрерывных нуклеотидов из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит SEQ ID NO:5, и антисмысловая цепь содержит SEQ ID NO:6, и дополнительно содержит дополнительные нуклеотиды, модификации или конъюгаты, как описано в настоящем изобретении. Например, в некоторых вариантах осуществления, миРНК может содержать дополнительные модификации в дополнение к модификациям, указанным в SEQ ID NO: 5 и 6. Данные модификации можно получить, применяя способы, разработанные в данной области техники, такие как способы, описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage SL, et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, где способы включены в настоящее изобретение с помощью ссылки. Примеры данных модификаций описаны более подробно ниже.

а. Модифицированные миРНК

Модификации, описанные в настоящем изобретении, включают, например, (a) модификации сахара (например, в положении 2' или 4') или замену сахара; (b) модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей; (c) модификации оснований, например, замена стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пары оснований с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (нуклеотиды без оснований), или конъюгированные основания; и (d) модификации концов, например, модификации 5'-конца (фосфорилирование, конъюгация, инвертированные связи и т.д.), модификации 3'-конца (конъюгация, ДНК нуклеотиды, инвертированные связи и т.д.). Некоторые конкретные примеры модификаций, которые можно включать в миРНК настоящей заявки, показаны в таблице 1.

Модификации включают замещенные сахарные остатки. МиРНК, описанные в настоящем изобретении, могут содержать одну из следующих по 2' положению: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил; где алкил, алкенил и алкинил может представлять собой замещенный или незамещенный C₁-C₁₀ алкил или C₂-C₁₀ алкенил и алкинил. Примеры подходящих модификаций включают O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m равны от 1 до приблизительно 10. В некоторых других вариантах осуществления, миРНК содержат одну из следующих по 2' положению: C₁-C₁₀ низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино, полиалкиламино, замещенный силл, РНК расщепляющую группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств миРНК, или группу для улучшения фармакодинамических свойств миРНК, и другие заместители, имеющие аналогичные

свойства. В некоторых вариантах осуществления, модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, также известную как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin, et al., *Helv. Chim. Acta* 1995, 78:486-504), *m.e.*, алкоксиалкокси группу. Другой пример модификации представляет собой 2'-диметиламинооксиэтокси, *m.e.*, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂ группу, также известную как 2'-DMAOE, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известную в данной области техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2^{*}-DMAEOE), *m.e.*, 2^{*}-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂. Другие примеры модификаций включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Аналогичные модификации также можно вводить в других положениях РНК миРНК, в частности по 3'-положению сахара 3'-концевого нуклеотида или в 2'-5'-соединенных миРНК и по 5'-положению 5'-концевого нуклеотида. Модификации могут также включать миметики сахаров, такие как циклобутильные фрагменты, вместо пентофуранозилового сахара.

Репрезентативные патенты США, которые описывают получение данных модифицированных сахарных структур, включают, но не ограничиваются, Патенты США № 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; и 5700920; каждый из которых включен в настоящее изобретение с помощью ссылки для данных, релевантных для способов получения данных модификаций.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфортиоаты, хиральные фосфортиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоксилфосфотриэфиры, и метил и другие алкилфосфонаты, включая алкил 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоксилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, содержащие нормальные 3'-5' связи, их 2'-5' соединенные аналоги, и те, что имеют инвертированную полярность, где соседние пары нуклеозидных звеньев соединены 3'-5' - 5'-3' или 2'-5' - 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот.

Репрезентативные патенты США, которые описывают получение фосфорсодержащих связей, включают, но не ограничиваются, патенты США № 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6 239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029; и патент США RE39464; каждый из которых включен в настоящее изобретение с помощью ссылки для данных, релевантных для способов получения данных модификаций.

РНК, содержащие модифицированный остов, включают, среди прочих, те, что не содержат атом фосфора в остове. Для целей настоящего изобретения и как иногда упоминается в данной области техники, модифицированные РНК, которые не содержат

атом фосфора в их межнуклеозидном остове, также могут рассматриваться как олигонуклеозиды. Модифицированные РНК остовы, которые не содержат атом фосфора, содержат остовы, которые образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомами и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. К ним относятся те, которые содержат морфолиновые связи (образованные частично из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метиленимино и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, содержащие смешанные компоненты N, O, S и CH₂.

Репрезентативные патенты США, которые описывают получение олигонуклеотидов выше, включают, но не ограничиваются, патенты США № 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437; и 5677439; каждый из которых включен в настоящее изобретение с помощью ссылки для данных, релевантных для способов получения данных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления, как сахар, так и межнуклеозидная связь, т.е. остов нуклеотидных звеньев, заменены новыми группами. Звенья оснований сохраняются для гибридизации с соответствующей целевой нуклеиновой кислотой. Одно данное олигомерное соединение, миметик РНК, который, как было показано, обладает превосходными гибридизационными свойствами, называется пептидонуклеиновая кислота (ПНК). В соединениях ПНК сахарный остов РНК заменен амид-содержащим остовом, в частности аминоэтилглициновым остовом. Азотистые основания сохраняются и связываются прямо или косвенно с атомом азота амидной части остова. Репрезентативные патенты США, которые описывают получение ПНК соединений, включают, но не ограничиваются, патенты США № 5,539,082; 5714331; и 5719262; каждый из которых включен в настоящее изобретение с помощью ссылки. Дополнительные сведения о соединениях ПНК можно найти, например, например, в Nielsen, et al. (Science, 254:1497- 1500 (1991)).

Некоторые варианты осуществления, представленные в технологии, описанной в настоящем изобретении, включают РНК с фосфортиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами, и в частности -CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [известный как метилен (метилямино) или MMI остов], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-, и -N(CH₃)-CH₂-CH₂- [где принодный фосфодиэфирный остов представлен как -O-P-O-CH₂-] патента США № 5489677, и амидные остовы патента США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления, РНК, представленная в настоящем

изобретении, содержит морфолино остовные структуры патента США № 5034506.

Модификации миРНК, описанные в настоящем изобретении, могут также содержать модификации и замещения нуклеинового основания (часто называемого просто “основанием”). Как применяют в настоящем изобретении, “немодифицированные” или “природные” нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, в частности 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, и 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные нуклеиновые основания включают оснований, описанные в патенте США № 3687808, основания, описанные в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine* (Herdewijn P, ed., Wiley-VCH, 2008); основания, описанные в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering* (стр. 858-859, Kroschwitz JL, ed., John Wiley & Sons, 1990), основания, описанные Englisch et al. (*Angewandte Chemie, International Edition*, 30, 613, 1991), и основания, описанные Sanghvi YS (глава 15, *dsRNA Research and Applications*, стр. 289-302, Crooke ST и Lebleu B, ed., CRC Press, 1993). Некоторые из данных нуклеиновых оснований являются особенно пригодными для увеличения сродства связывания олигомерных соединений, представленных в технологии, описанной в настоящем изобретении. К ним относятся 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. 5-Метилцитозинового замены увеличивают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2 °C (Sanghvi YS, et al., Eds., *DsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, pp. 276-278, 1993) и представляют собой типичные замены оснований, даже более конкретно в сочетании с 2'-O-метоксиэтильными сахарными модификациями.

Репрезентативные патенты США, которые описывают получение некоторых из приведенных выше модифицированных оснований, а также других модифицированных оснований, включают, но не ограничиваются, патент США № 3687808; патенты США № 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121; 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672; и 7495088; каждый из которых включен в настоящее изобретение с помощью ссылки для данных, релевантных для способов получения данных

модификаций.

миРНК можно также модифицировать так, чтобы они содержали одну или более аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA). Описание аденозин-GNA можно найти, например, в Zhang, et al. (JACS 2005, 127(12):4174-75), которая включена в настоящее изобретение с помощью ссылки для данных, релевантных для способов получения GNA модификаций.

РНК миРНК можно также модифицировать так, чтобы она содержала одну или более запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированный остаток рибозы, в котором рибозный остаток содержит дополнительный мостик, соединяющий 2' и 4' углероды. Данная структура эффективно “запирает” рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот к миРНК увеличивает стабильность миРНК в сыворотке и снижает нецелевые эффекты (Elmen J, et al., Nucleic Acids Research 2005, 33(1):439-47; Mook OR, et al., Mol Cane Ther 2007, 6(3):833-43; Grunweller A, et al., Nucleic Acids Research 2003, 31(12):3185-93).

Репрезентативные патенты США, которые описывают получение нуклеотидов запертой нуклеиновой кислоты, включают, но не ограничиваются, следующие: патенты США № 6268490; 6670461; 6794499; 6998484; 7053207; 7084125; и 7399845; каждый из которых включен в настоящее изобретение с помощью ссылки для данных, релевантных для способов получения данных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК содержит модификации, включающие химическое связывание с РНК одного или нескольких лигандов, фрагментов или конъюгатов, которые улучшают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение миРНК. Данные фрагменты включают, но не ограничиваются, липидные фрагменты, такие как остаток холестерина (Letsinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86:6553-56), холевую кислоту (Manoharan, et al., Biorg. Med. Chem. Lett. 1990, 4:1053-60), тиоэфир, *например*, берил-S-тримилтиол (Manoharan, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992, 660:306-9); Manoharan, et al., Biorg. Med. Chem. Lett. 1993, 3:2765-70), тиохолестерин (Oberhauser, et al., Nucl. Acids Res. 1992, 20:533-38), алифатическую цепь, *например*, додекандиольные или ундецильные остатки (Saison-Behmoaras, et al., EMBO J 1991, 10:1111-18; Kabanov, et al., FEBS Lett. 1990, 259:327-30; Svinarchuk, et al., Biochimie 1993, 75:49-54), фосфолипид, *например*, ди-гексадецил-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-глицеро-3-фосфонат (Manoharan, et al., Tetrahedron Lett. 1995, 36:3651-54; Shea, et al., Nucl. Acids Res. 1990, 18:3777-83), поламиновую или полиэтиленгликольную цепь (Manoharan, et al., Nucleosides & Nucleotides 1995, 14:969-73), или адамантануксусную кислоту (Manoharan, et al., Tetrahedron Lett. 1995, 36:3651-54), пальмитильный остаток (Mishra, et al., Biochim. Biophys. Acta 1995, 1264:229-37) или октадециламиноновый или гексиламино-карбонилкоксистероиновый остаток (Crooke, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996, 277:923-37).

В некоторых вариантах осуществления, лиганд изменяет распределение,

нацеливание или время жизни миРНК, в которую он включен. В некоторых вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенное сродство к выбранной мишени, например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, клетке или компартменту органа, ткани, органу или области тела, как, например, по сравнению с молекулами, у которых данный лиганд отсутствует. В данных вариантах осуществления лиганды не будут принимать участие в дуплексном спаривании в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать природное вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота); или липид. Лиганд также может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминовая кислота. Примеры полиаминокислоты включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли L-аспарагиновую кислоту, поли L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер L-лактида и гликолида, сополимер дивинильного эфира и ангидрида малеиновой кислоты, N-(2-гидроксипропил)метакриламидный сополимер (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловая кислота), N-изопропилакриламидный полимер или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина и альфа спиральный пептид.

Лиганды могут также включать нацеливающие группы, например, агент, нацеливающий на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка печени. Нацеливающая группа может представлять собой тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, муциновый углевод, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолиевую кислоту, витамин В12, витамин А, биотин RGD пептид или миметик RGD пептида.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), сшивающие агенты (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, ЭДТА), липофильные молекулы (например, холестерин, холевая кислота, адамантануксусная кислота, 1-пиренмасляная кислота, дигидротестостерон, 1,3-бис-0(гексадецил)глицерин, геранилосигексильная группа, гексадецилглицерин, борнеол,

ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильная группа, пальмитиновая кислота, миристиновая кислота, 03-(олеоил)литохолевая кислота, 03-(олеоил)холеновая кислота, диметокситритил или феноксазин), пептидные конъюгаты (например, antennapedia пептид, Tat пептид), алкилирующие агенты, фосфат, аминокислота, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]2, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченные маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), ускорители транспорта/абсорбции (например, аспирин, витамин E, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, акридин-имидазольные конъюгаты, комплексы Eu^{3+} тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP и AP.

Лиганды могут представлять собой белки, *например*, гликопротеины или пептиды, *например*, молекулы, обладающие специфическим сродством с колиганду, или антитело, *например*, антитело, которое связывается со специфической линией клеток, такой как линия гепатоцитов. Лиганды могут также включать гормоны и рецепторы гормонов. Они могут также включать непептидные молекулы, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, многовалентную лактозу, многовалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, многовалентную маннозу и многовалентную фукозу. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор p38 MAP киназы или активатор NF- κ B.

Лиганд может быть веществом, например, лекарственным средством, которое может увеличивать поглощение миРНК клеткой, например, разрушая цитоскелет клетки, например, разрушая микротрубочки, микрофиламенты и/или промежуточные филаменты клетки. Лекарственным средством может быть, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, джаплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд представляет собой молекулу, *например*, витамин, который поглощается клеткой-мишенью, например, клеткой печени. Примеры витаминов включают витамины А, Е и К. Другие типичные витамины включают витамин В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, усваиваемые клетками-мишенями, такими как клетки печени. Также включены HSA и липопротеин низкой плотности (LDL).

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, присоединенный к миРНК, как описано в настоящем изобретении, действует как фармакокинетический модулятор (PK). Как применяют в настоящем изобретении, "PK модулятор" относится к фармакокинетическому модулятору. PK модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие агенты, PEG, витамины и т.д. Примеры PK модуляторов включают, но не ограничиваются, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин E, биотин и т.д. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат ряд

фосфортионатных связей, связываются с сывороточным белком, таким образом короткие олигонуклеотиды, *например*, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержание несколько фосфортионатных связей в остове, являются также пригодными в технологии, описанной в настоящем изобретении, в качестве лигандов (*например*, в качестве РК модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связываются с компонентами сыворотки (*например*, сывороточными белками) также являются пригодными для применения в качестве РК модулирующих лигандов в вариантах осуществления, описанных в настоящем изобретении.

(i) *Липидные конъюгаты*. В некоторых вариантах осуществления, лиганд или конъюгат представляет собой липидную молекулу или молекулу на основе липида. Липидный лиганд или лиганд на основе липидов может (a) повышать устойчивость к деградации конъюгата, (b) улучшать нацеливание или транспорт в клетку-мишень или клеточную мембрану и/или (c) можно использовать для регулирования связывания с сывороточным белком, например, HSA. Данная липидная молекула или молекула на основе липида может связывать сывороточный белок, например, человеческий сывороточный альбумин (HSA). Лиганд, связывающийся с HSA, обеспечивает распределение конъюгата в ткани-мишени, например, в ткани тела, не относящейся к почкам. Например, целевой тканью может быть печень, включая паренхиматозные клетки печени. Другие молекулы, которые могут связываться с HSA, можно также использовать в качестве лигандов. Например, можно использовать непроксин или аспирин.

Лиганд на основе липида можно использовать для ингибирования, например, контроля связывания конъюгата с тканью-мишенью. Например, липидный лиганд или лиганд на основе липидов, который сильнее связывается с HSA, с меньшей вероятностью попадет в почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выведен из организма. Липидный лиганд или лиганд на основе липидов, который менее сильно связывается с HSA, можно использовать для нацеливания конъюгата на почки.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд на основе липида связывается с HSA. Лиганд на основе липида может связываться с HSA с достаточным сродством так, что конъюгат будет распределяться в ткани, отличной от почек. В некоторых конкретных вариантах осуществления, связывание HSA-лиганд является обратимым.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд на основе липида слабо связывается с HSA или не связывается вообще, так что конъюгат будет распределяться в почке. Вместо лиганд на основе липида или в добавление к нему можно использовать другие молекулы, которые нацелены на клетки почек.

(ii) *Пептид и агенты, способствующие проникновению в клетку*. В другом аспекте, лиганд представляет собой агент, способствующий проникновению в клетку, такой как спиральный агент, способствующий проникновению в клетку. В некоторых вариантах осуществления, агент является амфипатическим. Пример агента представляет собой пептид, такой как tat или antennopedia. Если агент представляет собой пептид, его можно

модифицировать, включая пептидилмиметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи, и применение D-аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, спиральный агент представляет собой альфа-спиральный агент. В некоторых конкретных вариантах осуществления, спиральный агент имеет липофильную и липофобную фазу.

“Пептид, способствующий проникновению в клетку” способен проникать в клетку, *например*, микробную клетку, такую как бактериальная или грибковая клетка, или клетку млекопитающего, такую как человеческая клетка. Проникающим в микробные клетки пептидом может быть, например, альфа-спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Secorin PI), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефенсин, β -дефенсин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две доминирующие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин).

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем изобретении олигопептидомиметик) представляет собой молекулу, способную складываться в определенную трехмерную структуру, аналогичную природному пептиду. Присоединение пептида и пептидомиметиков к миРНК может влиять на фармакокинетическое распределение РНКи, такое как усиление клеточного узнавания и абсорбции. Пептидная или пептидомиметиковая молекула может быть приблизительно 5-50 аминокислот в длину, *например*, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину.

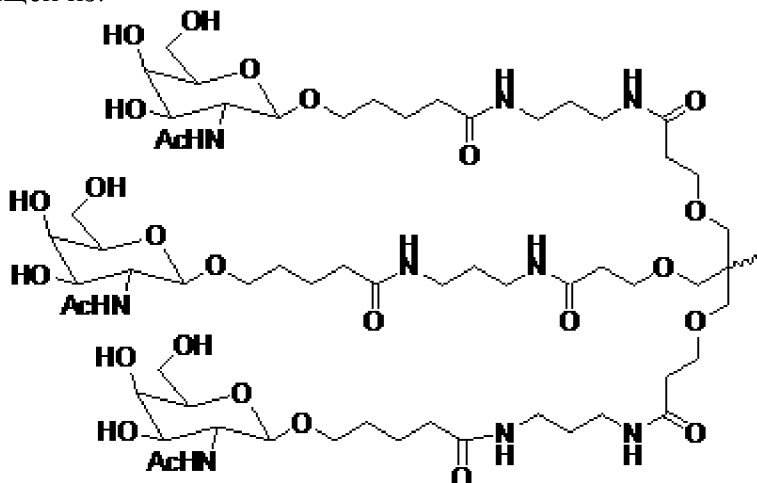
Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид, способствующий проникновению в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (*например*, состоящий в основном из Tyr, Trp или Phe). Пептидная молекула может представлять собой дендримерный пептид, затрудненный пептид или сшитый пептид. В качестве другой альтернативы, пептидная молекула может содержать гидрофобную последовательность транслокации мембраны (MTS). Примером гидрофобного пептида, содержащего MTS, является RFGF, который имеет аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 7). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 8), содержащий гидрофобный MTS, также может быть нацеливающим компонентом. Пептидная молекула может быть пептидом «доставки», который может переносить большие полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из белка Tat ВИЧ (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 9) и белка Antennapedia дрозофилы (RQIKIWFQNRRMKWK (SEQ ID NO: 10)) способны функционировать в качестве пептидов доставки. Пептид или пептидомиметик может кодироваться случайной последовательностью ДНК, такой как пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея, или комбинаторной библиотеки один шарик-одно соединение (OBOC) (Lam, et al., Nature 1991, 354: 82 -84).

Пептид, способствующий проникновению в клетку, может также включать сигнал

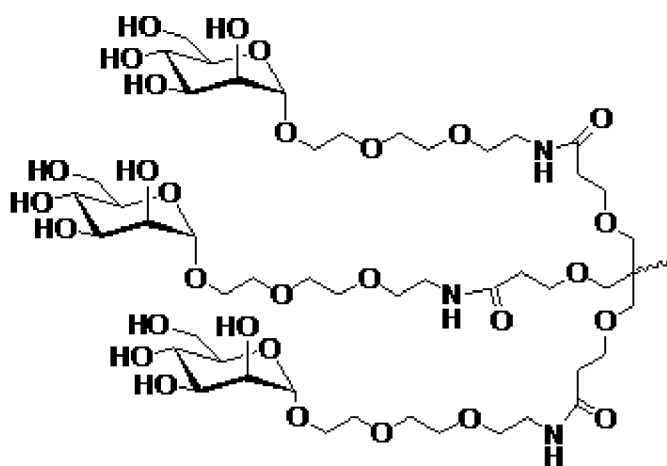
ядерной локализации (NLS). Например, пептид, способствующий проникновению в клетку, может представлять собой двухсторонний амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из пептидного домена слияния ВИЧ-1 gp41 и NLS SV40 большого Т антигена (Simeoni, et al., Nucl. Acids Res. 1993, 31:2717-24).

(iii) *Углеводные конъюгаты.* В некоторых вариантах осуществления, миРНК олигонуклеотиды, описанные в настоящем изобретении, дополнительно включают углеводные конъюгаты. Углеводные конъюгаты могут быть полезны для *in vivo* доставки нуклеиновых кислот, а также композиций, пригодных для *in vivo* терапевтического применения. Как применяют в настоящем изобретении, “углевод” относится к соединению, которое само по себе представляет собой углевод, состоящий из одного или более моносахаридных звеньев, содержащих, по меньшей мере, 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), причем атом кислорода, азота или серы соединен с каждым атомом углерода; или соединение, содержащее в качестве части углеводную молекулу, состоящую из одного или более моносахаридных звеньев, каждый из которых содержит, по меньшей мере, шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), причем атом кислорода, азота или серы соединен с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие приблизительно 4-9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают сахара C5 и выше (в некоторых вариантах осуществления C5-C8); и ди- и трисахариды включают сахара, содержащие два или три моносахаридных звена (в некоторых вариантах осуществления, C5-C8).

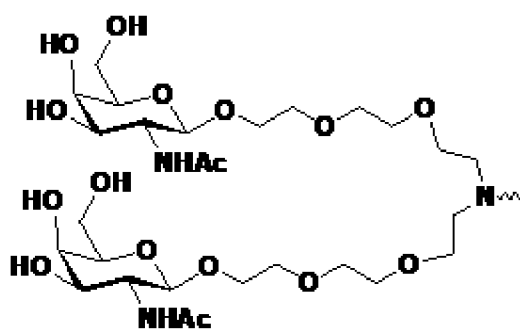
В некоторых вариантах осуществления, углеводный конъюгат выбран из группы, состоящей из:



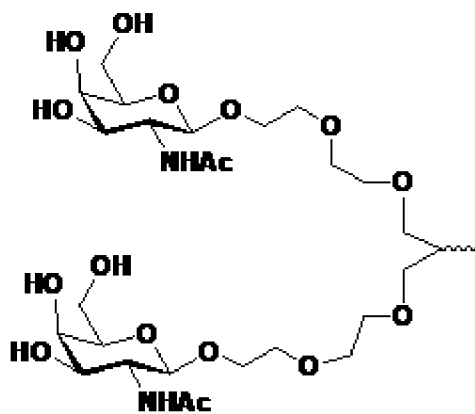
(формула I),



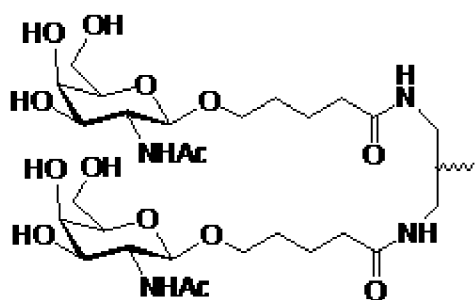
(формула II),



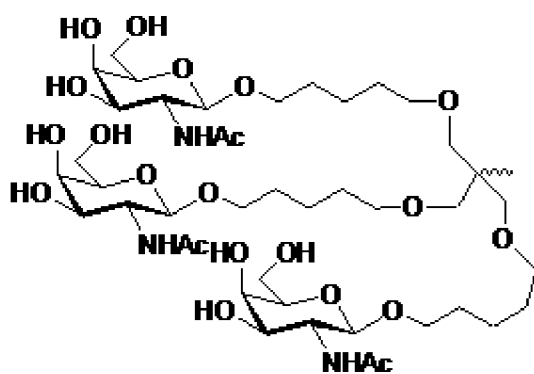
(формула III),



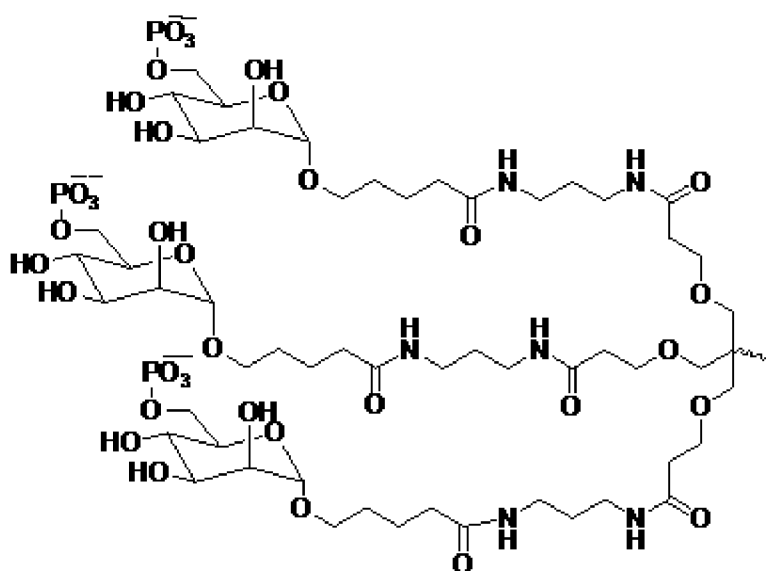
(формула IV),



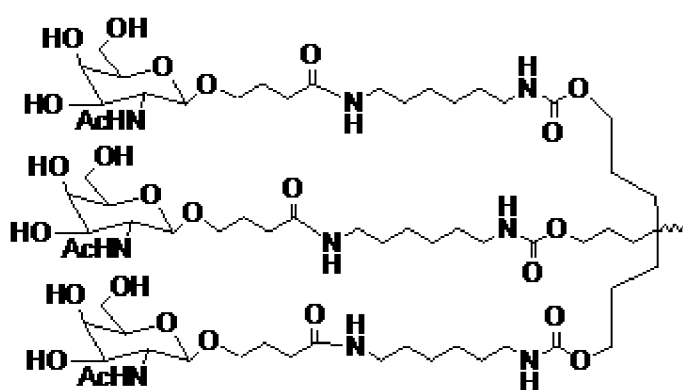
(формула V),



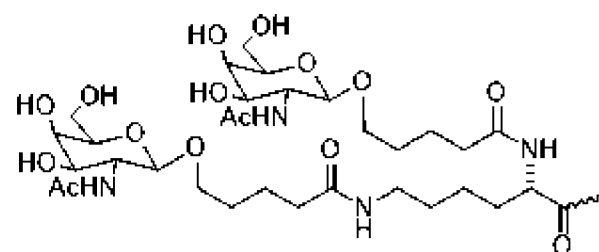
(формула VI),



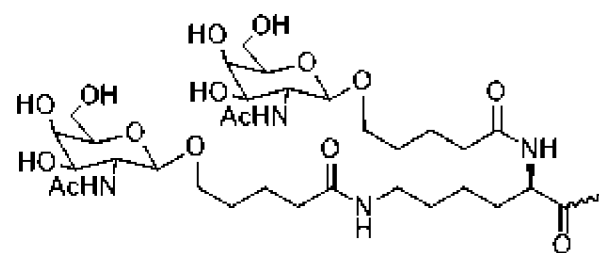
(формула XI),



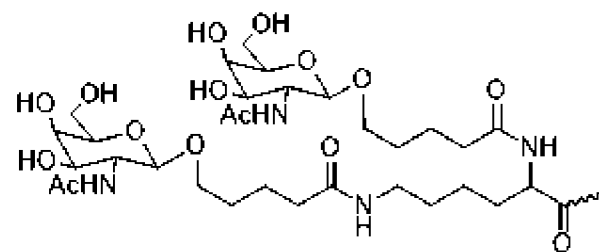
(формула XII),



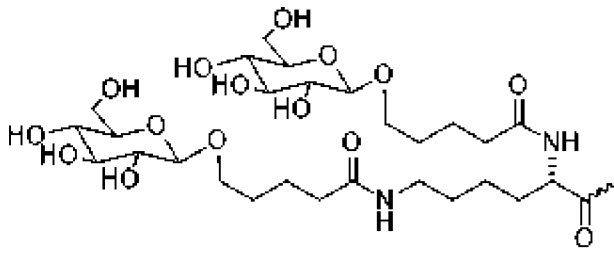
(формула XIII),



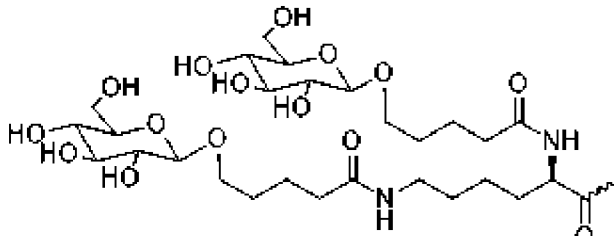
(формула XIV),



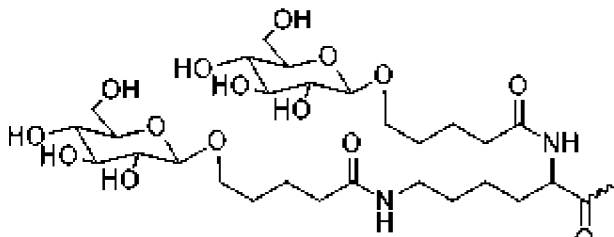
(формула XV),



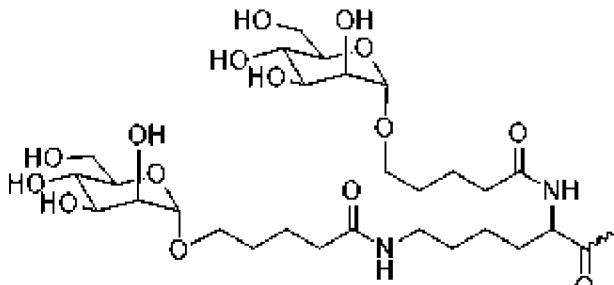
(формула XVI),



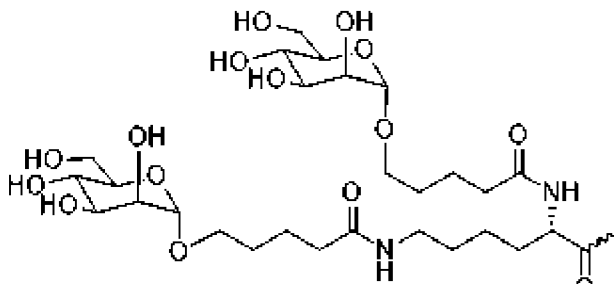
(формула XVII),



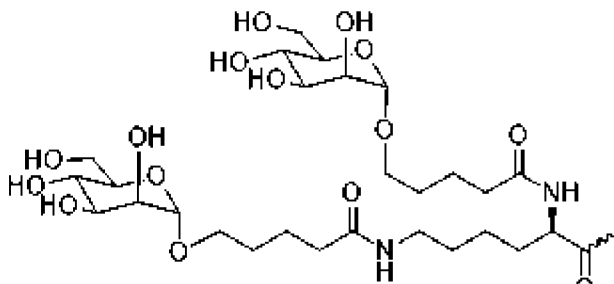
(формула XVIII),



(формула XIX),

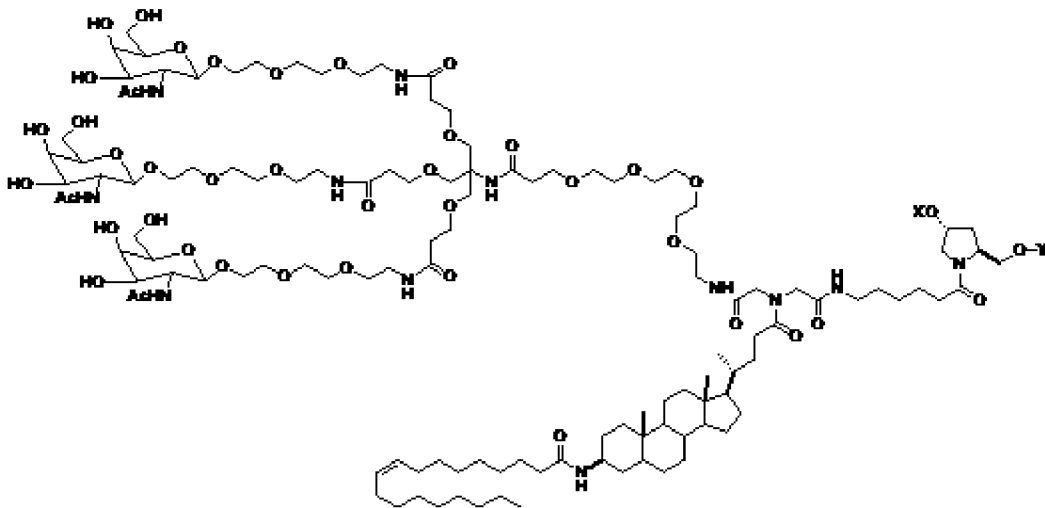


(формула XX), и



(формула XXI).

Другой репрезентативный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в настоящем изобретении, включает, но не ограничивается,



(формула XXII), где, когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления, углеводный конъюгат дополнительно включает другой лиганд, такой как, но не ограничиваясь, РК модулятор, эндосомолитический лиганд или пептид, способствующий проникновению в клетку.

(iv) *Линкеры*. В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты, описанные в настоящем изобретении, можно присоединять к миРНК олигонуклеотиду различными линкерами, который могут быть расщепляемыми и нерасщепляемыми.

Термин “линкер” или “линкерная группа” обозначает органическую молекулу, которая соединяет две части соединения. Линкеры обычно содержат простую связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как NR8, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, или цепочку атомов, такую как, но не ограничиваясь, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил и алкинилгетероарил, где один или более метиленов могут прерываться или оканчиваться O, S, S(O), SO₂, N(R8), C(O), замещенным или незамещенным арилом, замещенным или незамещенным гетероарилом или замещенным или незамещенным гетероциклилом; где R8 представляет собой водород, ацил, алифатический или замещенный алифатический

фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, линкер составляет 1-24 атома, 4-24 атома, 6-18 атомов, 8-18 атомов или 8-16 атомов.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая является достаточно стабильной вне клетки, но которая после проникновения в клетку-мишень, расщепляется, высвобождая две части, которые линкер удерживает вместе. В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая линкерная группа расщепляется, по меньшей мере, в раз 10, или, по меньшей мере, 100 раз быстрее в клетке-мишени или при первых эталонных условиях (которые можно, *например*, выбрать так, чтобы они имитировали или представляли внутриклеточные условия), чем в крови субъекта, или при вторых эталонных условиях (которые можно, *например*, выбрать так, чтобы они имитировали или представляли условия, обнаруживаемые в крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы являются чувствительными к расщепляющим агентам, *например*, рН, окислительно-восстановительному потенциалу или наличию разрушающих молекул. Обычно, расщепляющие агенты расщепления более распространены или обнаруживаются в более высоких количествах или активностях внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры данных разлагающих агентов включают: окислительно-восстановительные агенты, которые выбраны для определенных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, включая, *например*, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные агенты, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать окислительно-восстановительно расщепляемую линкерную группу посредством восстановления; эстеразы; эндосомы или агенты, которые могут создавать кислую среду, *например*, агенты, которые приводят к рН, равному пяти или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разлагать кислотно расщепляемую линкерную группу, действуя как обычная кислота, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатазы. Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к рН. рН человеческой сыворотки составляет 7,4, в то время как средний внутриклеточный рН является немного более низким, в пределах приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы имеют более кислый рН в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы имеют еще более кислый рН около 5,0. Некоторые линкеры будут содержать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при определенном рН, посредством этого высвобождая катионный липид из лиганда внутри клетки или в требуемом компартменте клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется конкретным ферментом. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, которая является мишенью. *Например*, лиганды, нацеленные на печень, могут быть соединены с катионными липидами через линкер, который содержит сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, и поэтому линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты эстеразами. Другие типы клеток, богатые эстеразами, включают клетки легких, коры почек и семенников.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно использовать при нацеливании на типы клеток, которые богаты пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

В общем, пригодность кандидата в расщепляемую линкерную группу можно оценить тестированием способности разрушающего агента (или условия) расщеплять кандидата в линкерную группу. Также может быть желательно протестировать кандидата в расщепляемую линкерную группу на способность противостоять расщеплению в крови или при контакте с другими тканями, не являющимися мишенями. Таким образом, можно определить относительную предрасположенность к расщеплению между первым и вторым условием, где первое выбрано для указания на расщепление в клетке-мишени, и второе выбрано для указания на расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке.

Оценки можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в органе или культуре ткани, или на целых животных. Может быть пригодно провести первоначальную оценку в бесклеточных условиях или в условиях культивирования и для подтверждения дальнейшими оценками на целых животных. В некоторых вариантах осуществления пригодные кандидаты в соединения расщепляются, по меньшей мере, в 2, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 10 или, по меньшей мере, 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточного условий) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

Один класс расщепляемой линкерной группы представляет собой окислительно-восстановительно расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Пример восстановительно расщепляемой линкерной группы представляет собой дисульфидную линкерную группу (-S-S-). Чтобы определить, является ли кандидат в расщепляемую линкерную группу «восстановительно расщепляемой линкерной группой» или, например, подходит ли она для применения с определенной молекулой РНКи и конкретным нацеливающим агентом, можно обратиться к способам, описанным в настоящем изобретении. Например, кандидата можно оценить путем инкубации с дитиотрептолом (ДТТ) или другим восстанавливающим агентом, применяя реагенты, известные в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например, в клетке-мишени.

Кандидатов также можно оценивать в условиях, выбранных для имитации условий в крови или сыворотке. В некоторых вариантах осуществления кандидаты в соединения расщепляются максимум на 10% в крови. В некоторых вариантах осуществления пригодные кандидаты в соединения разлагаются, по меньшей мере, в 2, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 10 или, по меньшей мере, 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточные условия) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления кандидатов в соединения можно определить, применяя стандартные анализы

кинетики ферментов в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и по сравнению с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

Фосфатные расщепляемые линкерные группы расщепляются агентами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Пример агента, который расщепляет фосфатные группы в клетках, представляют собой ферменты, такие как фосфотазы, в клетках. Примеры фосфатных линкерных групп представляют собой $-O-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(SRk)-O-$, $-S-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(ORk)-S-$, $-S-P(O)(ORk)-S-$, $-O-P(S)(ORk)-S-$, $-S-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(Rk)-O-$, $-O-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-O-$, $-S-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-S-$, $-O-P(S)(Rk)-S-$. В некоторых вариантах осуществления, фосфатные линкерные группы выбирают из: $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$, и $-O-P(S)(H)-S-$. В конкретных вариантах осуществления, фосфатная линкерная группа представляет собой $-O-P(O)(OH)-O-$. Данные кандидаты можно оценить, применяя способы, аналогичные способам, описанным выше.

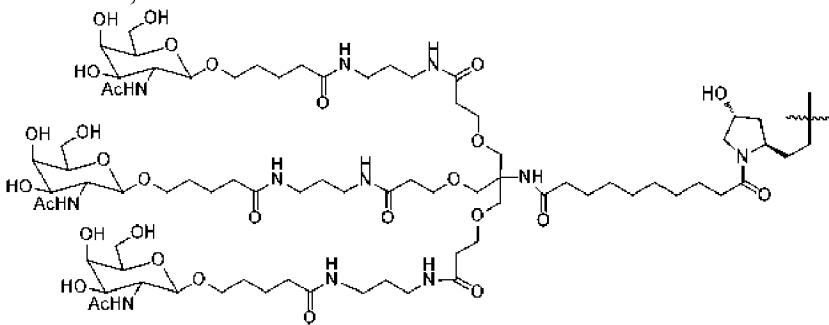
Кислотно расщепляемые линкерные группы представляют собой линкерные группы, которые расщепляются в кислых условиях. В некоторых вариантах осуществления, кислотно расщепляемые линкерные группы расщепляются в кислотном окружении с pH приблизительно 6,5 или ниже (*например*, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или ниже), или агентами, такими как ферменты, которые действуют как обычная кислота. В клетке специфические органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать расщепляющую среду для кислотно расщепляемых линкерных групп. Примеры кислотно расщепляемых линкерных групп включают, но не ограничиваются, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Кислотно расщепляемые группы может иметь общую формулу $-C=N-$, $C(O)O$ или $-OC(O)$. В некоторых вариантах осуществления углерод, присоединенный к кислороду сложного эфира (алкоксигруппа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Данные кандидаты можно оценить, применяя способы, аналогичные способам, описанным выше.

Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы расщепляются ферментами, такими как эстеразы и амидазы в клетках. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают, но не ограничиваются ими, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы имеет общую формулу $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Данные кандидаты можно оценить, применяя способы, аналогичные способам, описанным выше.

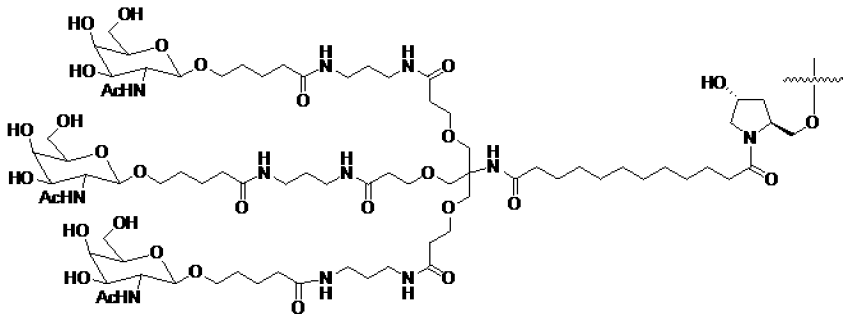
Пептидные расщепляемые линкерные группы расщепляются ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Пептидные расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами, давая олигопептиды (*например*, дипептиды, трипептиды и т.д.) и полипептиды. Пептидные расщепляемые группы не включают амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидная группа может

образовывать любой алкиленом, алкениленом или алкилененом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Пептидная расщепляемая группа обычно ограничивается пептидной связью (т.е. амидной связью), образованной между аминокислотами, дающими пептиды и белки, и не включает всю амидную функциональную группу. Пептидные расщепляемые линкерные группы имеют общую формулу - NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, где RA и RB представляют собой группы R двух соседних аминокислот. Данные кандидаты можно оценить, применяя способы, аналогичные способам, описанным выше.

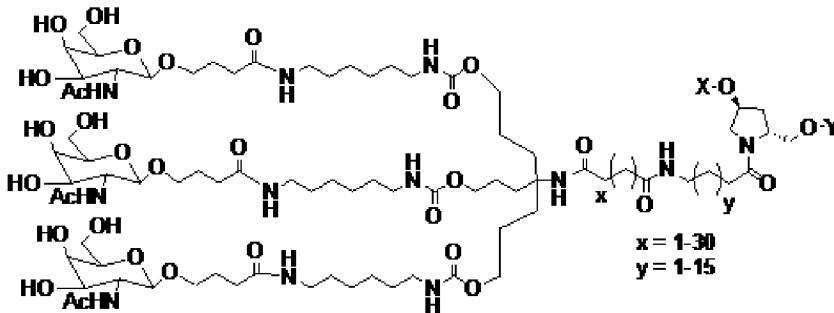
Репрезентативные углеводные конъюгаты с линкерами включают, но не ограничиваются,



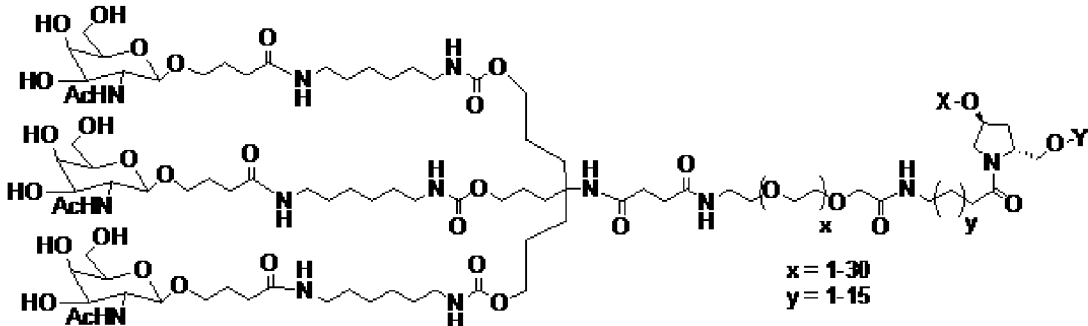
(формула XXIII),



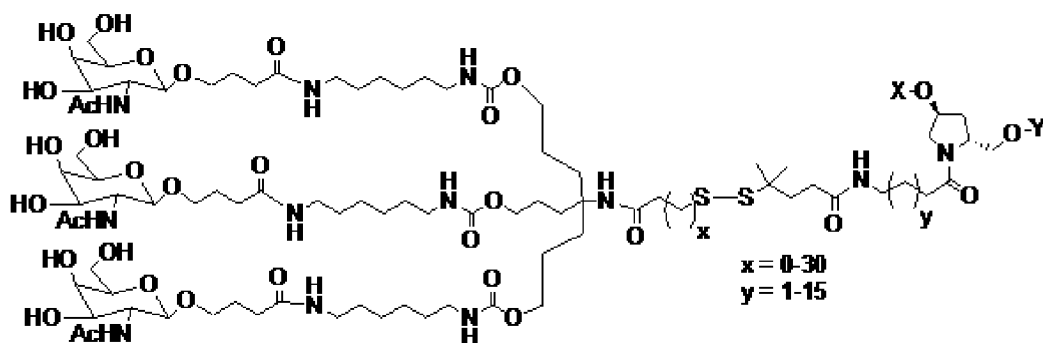
(формула XXIV),



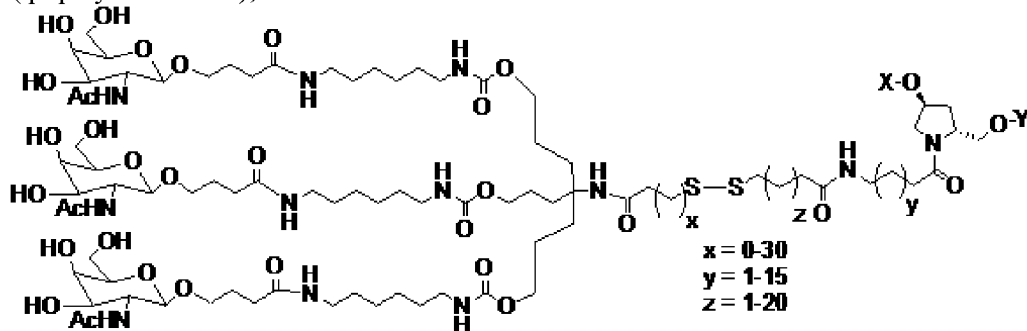
(формула XXV),



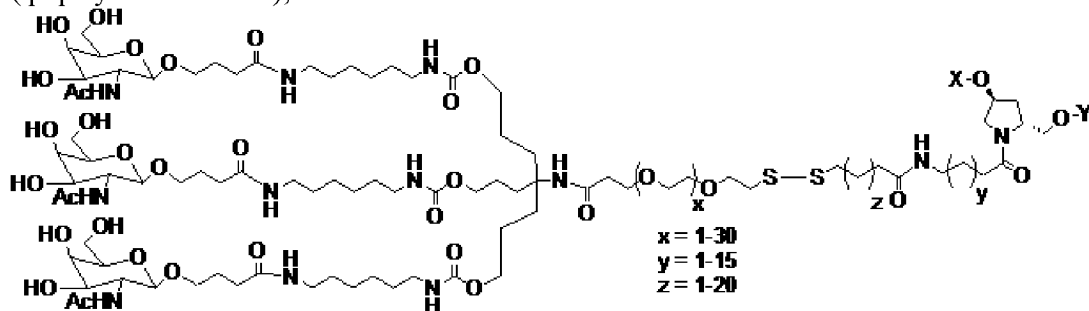
(формула XXVI),



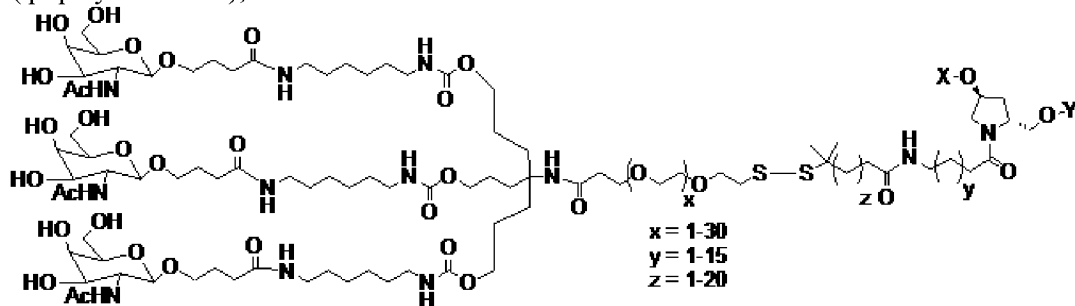
(формула XXVII),



(формула XXXVIII),



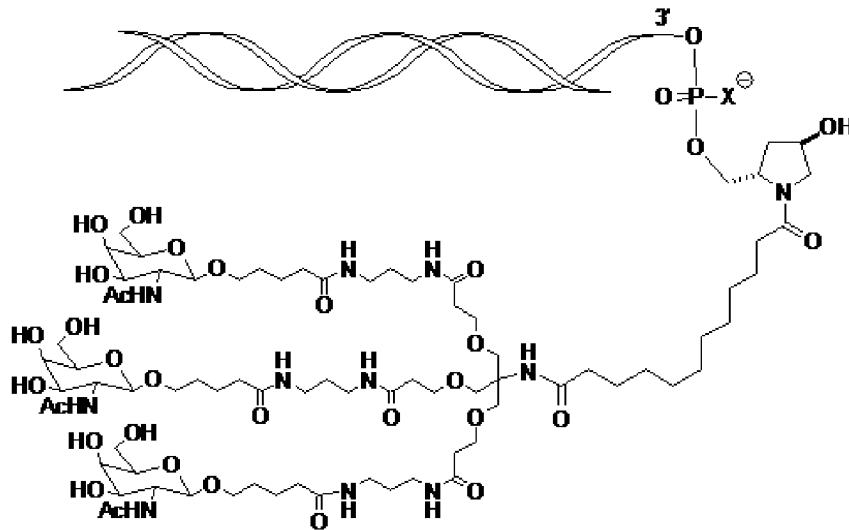
(формула XXIX), и



(формула XXX),

Где когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

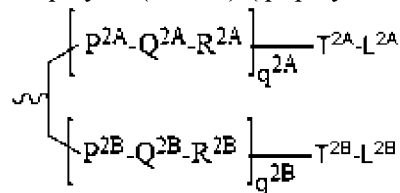
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов лиганд представляет собой одно или несколько производных «GalNAc» (N-ацетилгалактозамин), присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер. Например, в некоторых вариантах осуществления миРНК конъюгирована с лигандом GalNAc, как показано на следующей схеме:



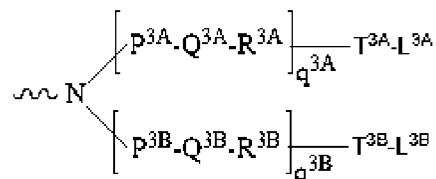
где X представляет собой O или S.

В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия включает миРНК, которая конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XXXI)-(XXXIV):

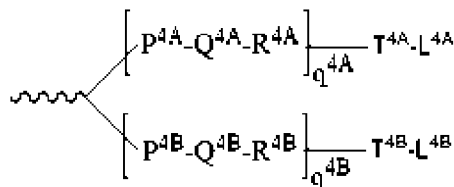
Формула (XXXI) (формула XXXII)



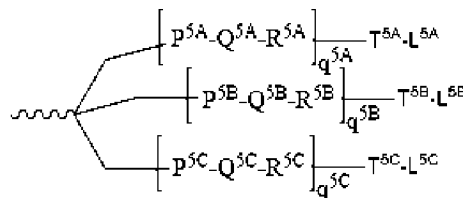
Formula (IV)



Formula (V)



Formula (VI)



Formula (VII)

или

;

(формула XXXIII) (формула XXXIV)

где:

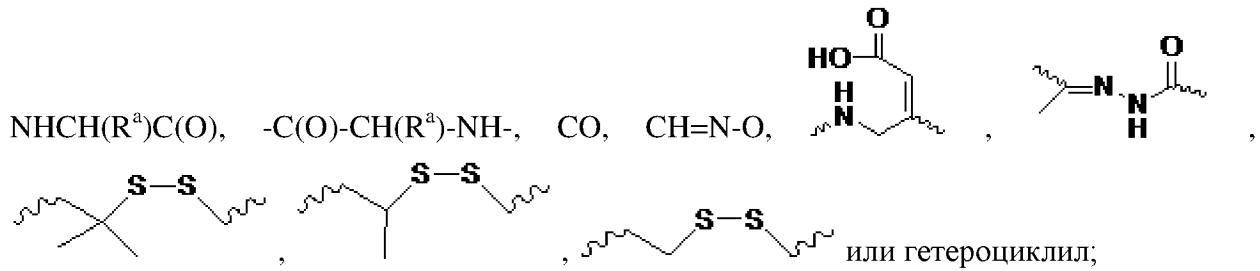
q_{2A} , q_{2B} , q_{3A} , q_{3B} , q_{4A} , q_{4B} , q_{5A} , q_{5B} и q_{5C} представляют собой независимо для каждого появления 0-20 и где повторяющееся звено может быть одинаковым или отличным;

каждый P^{2A} , P^{2B} , P^{3A} , P^{3B} , P^{4A} , P^{4B} , P^{5A} , P^{5B} , P^{5C} , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{4A} , T^{5B} и T^{5C} независимо для каждого появления отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , и Q^{5C} независимо для каждого появления отсутствует, представляет собой алкилен или замещенный алкилен, где один или более

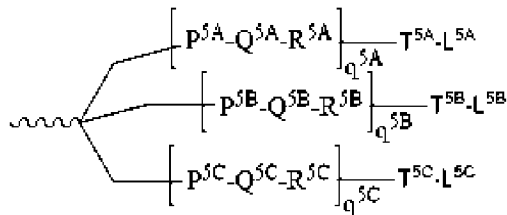
метилов прерываются или оканчиваются одной или более из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

Каждый R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B} и R^{5C} независимо для каждого появления отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH,



L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B}, и L^{5C} представляют собой лиганд; *m.e.*, каждый независимо для каждого появления моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгирующие GalNAc производные являются особенно пригодными для применения с миРНК для ингибирования экспрессии гена-мишени, такие как производные формулы (XXXV):

(формула XXXV)



Formula (VII)

где L^{5A}, L^{5B} и L^{5C} представляют собой моносахарид, такой как GalNAc производное.

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих GalNAc производные, включают, но не ограничиваются, структуры, приведенные выше в виде формул I, VI, X, IX и XII.

Репрезентативные патенты США, которые описывают получение РНК конъюгатов, включают патенты США № 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241 5391723; 5416203 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928 и 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; и 7037646; каждый из которых включен в настоящее изобретение с помощью ссылки относительно данных, релевантных для данных способов получения.

В некоторых случаях, РНК миРНК можно модифицировать нелигандной группой.

Ряд нелигандных молекул конъюгированы с миРНК для увеличения активности, клеточного распределения или поглощения клетками миРНК, и способы проведения данного конъюгирования имеются в научной литературе. Данные нелигандные молекулы включали липидные молекулы, такие как холестерин (Kubo, T., et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 365(1):54-61 (2007); Letsinger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553 (1989)), холевая кислота (Manoharan, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:1053 (1994)), тиоэфир, *например*, гексил-S-тримитиол (Manoharan, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:306 (1992); Manoharan, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3:2765 (1993)), тиохолестерин (Oberhauser, et al., *Nucl. Acids Res.* 20:533 (1992)), алифатическая цупь, *например*, додекандиольный или ундецильный остатки (Saison-Behmoaras, et al., *EMBO J.* 10:111 (1991); Kabanov, et al., *FEBS Lett.* 259:327 (1990); Svinarchuk, et al., *Biochimie* 75:49 (1993)), фосфолипид, *например*, ди-гексадецил-гас-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-гас-глицеро-3-Н-фосфонат триэтиламмония (Manoharan, et al., *Tetrahedron Lett.* 36:3651 (1995); Shea, et al., *Nucl. Acids Res.* 18:3777 (1990)), полиаминовая или полиэтиленгликольная цепь (Manoharan, et al., *Nucleosides & Нуклеотидс* 14:969 (1995)) или адамантануксусная кислота (Manoharan, et al., *Tetrahedron Lett.* 36:3651 (1995)), а palmityl moiety (Mishra, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1264:229 (1995)), или октадециламиновый или гексиламинокарбонилкоксихолестериновый остаток (Crooke, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:923 (1996)).

Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих амиолинкер в одном или нескольких положениях последовательности. Затем, аминогруппа реагирует с молекулой, которую конъюгируют, применяя подходящие конденсирующие или активирующие реагенты. Реакцию конъюгации можно проводить либо с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после отщепления РНК в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК ВЭЖХ обычно дает чистый конъюгат.

в. Фармацевтические композиции и доставка миРНК

В некоторых вариантах осуществления, обеспечивают фармацевтические композиции, содержащие миРНК, как описано в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Фармацевтическую композицию, содержащую миРНК, можно использовать для лечения ВГВ инфекции. Данные фармацевтические композиции формулируют в зависимости от способа введения. Например, композиции можно формулировать для системного введения парентеральной доставкой, *например*, подкожной (SC) доставкой.

“Фармацевтически приемлемый носитель” или “вспомогательное вещество” представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующий агент или любой другой фармакологически инертный носитель для доставки животному одного или нескольких агентов, таких как нуклеиновая кислота. Вспомогательное вещество может быть жидким или твердым, и его выбирают с учетом запланированного способа введения, чтобы обеспечить требуемый объем, консистенцию и т.д., в сочетании с агентом (например, нуклеиновая кислота) и другими компонентами данной фармацевтической

композиции. Типичные фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества включают, но не ограничиваются, связующие (например, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (например, лактоза и другие сахара, микрокристаллическая целлюлоза, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлоза, полиакрилаты, гидрофосфат кальция); смазывающие агенты (например, стеарат магния, тальк, диоксид кремния, коллоидный диоксид кремния, стеариновая кислота, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликолы, бензоат натрия, ацетат натрия); разрыхлители (например, крахмал, крахмалгликолят натрия); и смачивающие вещества (например, лаурилсульфат натрия).

Фармацевтически приемлемое органическое или неорганическое вспомогательное вещество, пригодное для непарентерального введения, которое не реагирует отрицательно с нуклеиновой кислотой, можно также использовать для формулирования композиции миРНК. Подходящие фармацевтически приемлемые носители для составов, применяемых для непарентеральной доставки, включают, но не ограничиваются, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и подобные.

Составы для местного введения нуклеиновых кислот могут содержать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно использовать фармацевтически приемлемые органические или неорганические вспомогательные вещества, пригодные для непарентерального введения, которое не реагирует отрицательно с нуклеиновой кислотой.

В некоторых вариантах осуществления, введение фармацевтических композиций и составов, описанных в настоящем изобретении, может быть местным (например, с помощью трансдермального пластыря), легочным (например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, включая распылителями); интратрахеальным; интраназальным; эпидермальным и трансдермальным; пероральным; или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную и внутримышечную инъекцию или инфузию; подкожное введение (например, через имплантированное устройство); или внутричерепное введение (например, путем интрапаренхиматозного, интратекального или интравентрикулярного введения).

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит стерильный раствор NBV02, сформулированный в воде для подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит стерильный раствор NBV02, сформулированный в воде для подкожной инъекции при концентрации свободной кислоты 200 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, содержащие миРНК, описанную в настоящем изобретении, вводят в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии ВГВ гена. В некоторых вариантах осуществления, доза миРНК находится в диапазоне 0,00-200,0 миллиграмм на килограмм веса тела реципиента в день, или в диапазоне 1-50 миллиграмм на килограмм веса тела в день. Например, миРНК можно вводить при 0,01 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, или 50 мг/кг на одну дозу. Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в день, или ее можно вводить в виде двух, трех или более поддоз с подходящими интервалами в течение дня или даже, применяя непрерывную инфузию или доставку посредством состава с контролируемым высвобождением. В данном случае, миРНК, содержащаяся в каждой поддозе, должна быть соответственно меньше для достижения общей суточной дозировки. Единичная доза также может быть составлена для доставки в течение нескольких дней, например, применяя обычный состав с замедленным высвобождением, который обеспечивает замедленное высвобождение миРНК в течение нескольких дней. Композиции с замедленным высвобождением являются хорошо известными в данной области техники и особенно пригодны для доставки агентов в конкретное место, например, которые можно использовать с агентами технологии, описанной в настоящем изобретении. В данных вариантах осуществления стандартная доза содержит соответствующую кратную величину суточной дозы.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, содержащая миРНК, которая нацелена на ВГВ, описанную в настоящем изобретении (*например*, HBV02), содержит миРНК при дозе 0,8 мг/кг, 1,7 мг/кг, 3,3 мг/кг, 6,7 мг/кг или 15 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, содержащая миРНК, описанную в настоящем изобретении (*например*, HBV02), содержит миРНК при дозе 20 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг или 900 мг.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, содержащая миРНК, описанную в настоящем изобретении (*например*, HBV02), содержит миРНК при дозе 20 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 450 мг.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, содержащая миРНК, описанную в настоящем изобретении (*например*, HBV02), содержит миРНК при дозе 200 мг.

III. Способы лечения и дополнительные терапевтические агенты

Настоящее изобретение относится к способам лечения ВГВ инфекции миРНК, описанной в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления, обеспечивают способ лечения ВГВ, включающий введение HBV02 субъекту.

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, способ дополнительно включает введение пегилированного интерферона-альфа (PEG-IFN α)

субъекту.

В некоторых других вариантах осуществления приведенных выше способов, способ дополнительно включает введение нуклеозидного/нуклеотидного ингибитора обратной транскриптазы (NRTI) субъекту. В некоторых вариантах осуществления, NRTI вводят перед, одновременно с или после введения HBV02.

В некоторых вариантах осуществления, обеспечивают способ лечения ВГВ, включающий введение HBV02 и PEG-IFN α субъекту. В некоторых вариантах осуществления, PEG-IFN α вводят перед, одновременно с или после введения HBV02.

В некоторых вариантах осуществления, обеспечивают способ лечения ВГВ, включающий введение HBV02 и PEG-IFN α , субъекту, где субъекту ранее вводили NRTI. В некоторых вариантах осуществления, PEG-IFN α вводят одновременно с или после введения HBV02.

В некоторых вариантах осуществления, обеспечивают способ лечения ВГВ, включающий введение HBV02, где субъекту ранее вводили PEG-IFN α и ранее вводили NRTI.

В любом из приведенных выше способов, ВГВ инфекция может представлять собой хроническую ВГВ инфекцию.

Как применяют в настоящем изобретении, “нуклеозидный/нуклеотидный ингибитор обратной транскриптазы” или “нуклеоз(т)идный ингибитор обратной транскриптазы” (NRTI) относится к ингибитору репликации ДНК, который является структурно схожим с нуклеотидом или нуклеозидом и специфически ингибирует репликацию кзкДНК ВГВ, ингибируя действие полимеразы ВГВ, и не подавляет существенно репликацию ДНК хозяина (например, человека). Данные ингибиторы включают тенофовир, тенофовир дизопроксилфумарат (TDF), тенофовир алафенамид (TAF), ламивудин, адефовир, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин, AGX-1009, эмтрицитабин (FTC), клебудин, ритонавир, дипивоксил, лобукавир, фамвир, N-ацетил-цистеин (NAC), PC1323, терадигм-ВГВ, тимозин-альфа, ганцикловир, безифовир (ANA-380/LB-80380), и тенофовир-эксалиадес (TLX/CMX157). В некоторых вариантах осуществления, NRTI представляет собой энтекавир (ETV). В некоторых вариантах осуществления, NRTI представляет собой тенофовир. В некоторых вариантах осуществления, NRTI представляет собой ламивудин. В некоторых вариантах осуществления, NRTI представляет собой адефовир или адефовир дипивоксил.

Как применяют в настоящем изобретении, “субъект” представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая любое млекопитающее, которое может быть инфицировано ВГВ, *например*, примата (такого как, человек, примат, не являющийся человеком, например, обезьяна или шимпанзе), или животное, которое считается приемлемой клинической моделью ВГВ инфекции, мышинной моделью ВГВ-AAV (смотри, например, Yang, et al., Cell и Mol Immunol 11:71 (2014)) или ВГВ 1,3xfs моделью трансгенных мышей (Guidotti, et al., J. Virol. 69:6158 (1995)). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает инфекцией вируса гепатита В (ВГВ). В некоторых

вариантах осуществления субъект представляет собой человека, такого как человека, страдающего инфекцией ВГВ, особенно хронической инфекцией вируса гепатита В.

Как применяют в настоящем изобретении, термин “лечение” относится к полезному или требуемому результату, включая, но не ограничиваясь, облегчение или улучшение одного или более признаков или симптомов, связанных с нежелательной экспрессией генов ВГВ или репликацией ВГВ, *например*, наличие кзкДНК ВГВ в сыворотке или печени, наличие ДНК ВГВ в сыворотке, наличие антигена ВГВ в сыворотке или печени, *например*, HBsAg или HBeAg, повышенная ALT, повышенная AST (нормальным считается диапазон от 10 до 34 Ед/л), отсутствие или низкий уровень анти-ВГВ антител; травма печени; цирроз печени; гепатит дельта; острый гепатит В; острый молниеносный гепатит В; хронический гепатит В; фиброз печени; терминальная стадия заболевания печени; гепатоцеллюлярная карцинома; синдром, подобный сывороточной болезни; анорексия; тошнота; рвота, субфебрильная температура; миалгия; утомляемость; нарушение остроты вкуса и обоняния (отвращение к пище и сигаретам); или боль в правом подреберье и в эпигастрии (периодическая, от легкой до умеренной); печеночная энцефалопатия; сонливость; нарушения режима сна; спутанность сознания; кома; асцит; желудочно-кишечное кровотечение; коагулопатия; желтуха; гепатомегалия (умеренно увеличенная, мягкая печень); спленомегалия; ладонная эритема; паутинные невусы; атрофия мышц; паучьи ангиомы; васкулит; варикозное кровотечение; периферические отеки; гинекомастия; атрофия яичек; коллатеральные вены брюшной полости (голова медузы); уровни АЛТ выше, чем уровни АСТ; повышенный уровень гамма-глутамилтранспептидазы (GGT) (нормальный диапазон обычно считается от 8 до 65 Ед/л) и уровни щелочной фосфатазы (ALP) (нормальным диапазоном обычно считается от 44 до 147 МЕ/л (международные единицы на литр), не более чем в 3 раза больше ULN); слегка заниженный уровень альбумина; повышенный уровень железа в сыворотке; лейкопения (т.е. гранулоцитопения); лимфоцитоз; повышенная скорость оседания эритроцитов (СОЭ); сокращение выживаемости красных кровяных телец; гемолиз; тромбоцитопения; продление международного нормализованного отношения (INR); наличие в сыворотке или печени HBsAg, HBeAg, ядерных антител к гепатиту В (анти-HBc), иммуноглобулина М (IgM); поверхностное антитело к гепатиту В (анти-HBs), антитело е к гепатиту В (анти-HBe) или ДНК ВГВ; повышенный уровень билирубина; гиперглобулинемия; наличие тканеспецифических антител, таких как антитела к гладким мышцам (ASMA) или антинуклеарные антитела (ANA) (10-20%); наличие тканеспецифических антител, таких как антитела к щитовидной железе (10-20%); повышенный уровень ревматоидного фактора (RF); низкий уровень тромбоцитов и лейкоцитов; дольчатая, с дегенеративными и регенеративными гепатоцеллюлярными изменениями и сопутствующим воспалением; и преимущественно центрилобулярный некроз, обнаруживаемый или необнаруживаемый. Вероятность развития, например, фиброза печени снижается, например, когда у человека, имеющего один или несколько факторов риска фиброза печени, например, хроническую инфекцию гепатита В, либо не развивается фиброз печени, либо развивается фиброз

печени с меньшей степенью тяжести по сравнению с популяцией, имеющей те же факторы риска и не получающей лечения, как описано в настоящем изобретении. «Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения.

Как применяют в настоящем изобретении, термин “предотвращение” относится к неспособности развития заболевания, расстройства или состояния, или снижению развития признака или симптома, связанного с данным заболеванием, нарушением или состоянием (например, на клинически значимое степень), или проявление отсроченных признаков или отложенных симптомов (например, на дни, недели, месяцы или годы). Профилактика может требовать прием более одной дозы.

В некоторых вариантах осуществления, лечение ВГВ инфекции приводит к «функциональному излечению» гепатита В. Как применяют в настоящем изобретении, функциональное излечение понимают как устранение циркулирующего HBsAg, и оно может сопровождаться переходом в состояние, при котором антитела к HBsAg становятся детектируемыми, применяя клинически значимый анализ. Например, детектируемые антитела могут включать сигнал выше 10 мМЕ/мл, как измерено иммуноанализом на хемилюминесцентных микрочастицах (СМИА) или любым другим иммуноанализом. Функциональное лечение не требует удаления всех репликативных форм ВГВ (например, кзкДНК из печени).

анти-HBs сероконверсия происходит спонтанно примерно у 0,2-1% хронически инфицированных пациентов в год. Однако даже после сероконверсии анти-HBs низкий уровень персистенции ВГВ часто наблюдают в течение десятилетий, что указывает на функциональное, а не полное излечение. Без привязки к конкретному механизму иммунная система может поддерживать ВГВ под контролем в условиях, в которых было достигнуто функциональное излечение. Функциональное излечение позволяет прекратить любое лечение ВГВ инфекции. Однако ясно, что «функционального лечения» ВГВ инфекции может быть недостаточным для предотвращения или лечения заболеваний или состояний, которые возникают в результате ВГВ инфекции, например, фиброза печени, ГЦК или цирроза. В некоторых конкретных вариантах осуществления, «функциональное излечение» может относиться к устойчивому снижению уровня HBsAg в сыворотке, например, <1 МЕ/мл, в течение, по меньшей мере, 3 месяцев, по меньшей мере, 6 месяцев, или, по меньшей мере, одного года после начала схемы лечения или завершения схемы лечения. Формальная конечная точка, принятая Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для демонстрации функционального излечения от ВГВ, представляет собой недетектируемый HBsAg, определяемый как менее 0,05 международных единиц на миллилитр, или МЕ/мл, а также ДНК ВГВ меньше, чем нижний предел количественного определения, в крови через шесть месяцев после окончания терапии.

Как применяют в настоящем изобретении, термин «заболевание, связанное с вирусом гепатита В» или «заболевание, связанное с ВГВ», представляет собой

заболевание или расстройство, которое вызвано или связано с инфекцией или репликацией ВГВ. Термин «заболевание, связанное с ВГВ» включает заболевание, расстройство или состояние, для которого может быть полезно снижение экспрессии или репликации генов ВГВ. Неограничивающие примеры заболеваний, связанных с ВГВ, включают, например, вирусную инфекцию гепатита D, дельта гепатит, острый гепатит В; острый молниеносный гепатит В; хронический гепатит В; фиброз печени; терминальная стадия заболевания печени; и гепатоцеллюлярную карциному.

В некоторых вариантах осуществления, заболевание, связанное с ВГВ, является хроническим гепатитом. Хронический гепатит В определяют одним из следующих критериев: (1) положительный HBsAg, ДНК ВГВ или HBeAg в сыворотке крови в двух случаях, по меньшей мере, с интервалом в 6 месяцев (любая комбинация данных тестов, выполненных с интервалом в 6 месяцев, является приемлемой); или (2) отрицательные антитела иммуноглобулина М (IgM) к коровому антигену ВГВ (IgM анти-HBc) и положительный результат одного из следующих тестов: HBsAg, HBeAg или ДНК ВГВ (смотри фигуру 2). Хронический ВГВ обычно включает воспаление печени, которое длится более шести месяцев. Субъекты с хроническим ВГВ являются HBsAg положительными и имеют либо высокую вирусную нагрузку ($\geq 10^4$ копий ДНК ВГВ/мл крови), либо низкую вирусную нагрузку ($< 10^3$ копий ДНК ВГВ/мл крови). В некоторых вариантах осуществления субъекты инфицированы ВГВ в течение, по меньшей мере, пяти лет.

В некоторых вариантах осуществления субъекты инфицированы ВГВ в течение, по меньшей мере, десяти лет. В некоторых вариантах осуществления субъекты заразились ВГВ при рождении. Субъекты, страдающие хроническим гепатитом В, могут иметь иммунную толерантность или иметь неактивную хроническую инфекцию без каких-либо признаков активного заболевания, и она также протекает бессимптомно. Пациенты с хроническим активным гепатитом, особенно в репликативном состоянии, могут иметь симптомы, сходные с симптомами острого гепатита. Субъекты, страдающие хроническим гепатитом В, могут иметь активную хроническую инфекцию, сопровождающуюся некровоспалительным заболеванием печени, иметь повышенный обмен гепатоцитов при отсутствии обнаруживаемого некровоспаления или иметь неактивную хроническую инфекцию без каких-либо признаков активного заболевания, и она также протекает бессимптомно. Сохранение инфекции ВГВ у пациентов с хронической ВГВ является результатом кзкДНК ВГВ.

Статус HBeAg отражает множественные различия между субъектами (таблица 2). Статус HBeAg может влиять на реакцию на различные терапии, и примерно одна треть пациентов с ВГВ являются HBeAg-положительными.

Таблица 2: HBeAg статус.

	HBeAg-положительный	HBeAg-отрицательный
возраст	молодые	пожилые
Приблизительный средний	10^4 - 10^5 МЕ/мл	10^3 МЕ/мл

уровень HBsAg		
транскрипционная активность	кзкДНК > интДНК	интДНК > кзкДНК
ВГВ-специфический иммунный профиль	Менее скомпрометированный	более скомпрометированный

В некоторых вариантах осуществления, субъекта с хроническим ВГВ является HBeAg положительным. В некоторых других вариантах осуществления субъект, страдающий хроническим ВГВ, является HBeAg отрицательным. Субъекты с хроническим ВГВ имеют уровень сывороточной ДНК ВГВ менее 10^5 и стойкое повышение уровня трансаминаз, например, ALT, AST и гамма-глутамилтрансферазы. Субъект с хроническим ВГВ может иметь оценку биопсии печени менее 4 (например, балл некровоспалительного процесса).

В некоторых вариантах осуществления, заболевание, связанное с ВГВ, представляет собой острый фульминантный гепатит В. У субъекта, страдающего острым фульминантным гепатитом В, наблюдаются симптомы острого гепатита и дополнительные симптомы спутанности сознания или комы (из-за неспособности печени выводить токсины) и синяки или кровотечение (из-за отсутствия факторов свертывания крови).

У субъектов с инфекцией ВГВ, например, хроническим ВГВ, может развиваться фиброз печени. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с ВГВ, представляет собой фиброз печени. Фиброз печени или цирроз печени определяют гистологически как диффузный печеночный процесс, характеризующийся фиброзом (избыток волокнистой соединительной ткани) и преобразованием нормальной архитектуры печени в структурно аномальные узлы.

У субъектов с инфекцией ВГВ, например, хроническим ВГВ, может развиваться терминальная стадия заболевания печени. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с ВГВ, является терминальной стадией заболевания печени. Например, фиброз печени может прогрессировать до такой степени, что организм больше не может компенсировать, например, снижение функции печени в результате фиброза печени (т.е. декомпенсированной печени) и может привести, например, к психическим и неврологическим симптомам и печеночной недостаточности.

У субъектов с инфекцией ВГВ, например, хроническим ВГВ, может развиваться гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), также называемая злокачественной гепатомой. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с ВГВ, представляет собой ГЦК. ГЦК обычно развивается у субъектов с хроническим ВГВ и может быть фиброламеллярной, псевдоглангулярной (аденоид), плеоморфной (гигантоклеточной) или светлоклеточной.

В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в настоящем изобретении, терапевтически эффективное количество миРНК, PEG-IFN α , или

обоих вводят субъекту. Предполагается, что “терапевтически эффективное количество”, как применяют в настоящем изобретении, включает количество активного агента, которое при введении субъекту для лечения субъекта, имеющего инфекцию ВГВ или заболевание, связанное с ВГВ, является достаточным для эффективного лечения заболевания (например, путем уменьшения или поддержания существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от активного агента, способа его введения, заболевания и его тяжести, а также анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического состава, стадии патологических процессов, опосредованных экспрессией генов ВГВ, типов предшествующего или сопутствующего лечения, если таковое имеется, и других индивидуальных характеристик субъекта, подлежащего лечению. Терапевтически эффективное количество может требовать введения более одной дозы.

“Терапевтически эффективное количество” также включает количество активного агента, которое дает требуемый эффект при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому лечению. Терапевтические агенты (например, миРНК, PEG-IFN α), применяемые в способах настоящего изобретения, можно вводить в количестве, достаточном для получения разумного соотношения польза/риск, применимого к данному лечению.

Термин “образец”, как применяют в настоящем изобретении, включает отбор подобных жидкостей, клеток или тканей, выделенных у субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в субъекте. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, лимфу, мочу, слюну и подобные. Образцы тканей могут включать образцы тканей, органов или локализованных областей. Например, образцы могут быть получены из конкретных органов, частей органов или жидкостей, или клеток в данных органах. В некоторых вариантах осуществления образцы могут быть получены из печени (например, цельной печени или определенных сегментов печени или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В некоторых вариантах осуществления, «образец, полученный от субъекта» относится к крови, плазме или сыворотке, полученным из крови, взятой у субъекта. В дополнительных вариантах осуществления «образец, полученный у субъекта» относится к ткани печени (или ее субкомпонентам) или ткани крови (или ее субкомпонентам, например, сыворотке), полученной у субъекта.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают способы лечения хронической инфекции ВГВ или заболевания, связанного с ВГВ, у нуждающегося субъекта, включающие: введение субъекту миРНК, где миРНК содержит смысловую цепь, содержащую 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:6), где а, с, g, и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-

фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно; (Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA); s представляет собой фосфортиоатную связь; и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол. В некоторых вариантах осуществления способов, способ дополнительно включает введение субъекту пегилированного интерферона-альфа (PEG-IFN α). В некоторых вариантах осуществления, миРНК и PEG-IFN α вводят субъекту в течение того же периода времени. В некоторых вариантах осуществления, миРНК вводят субъекту в течение периода времени перед введением PEG-IFN α субъекту. В некоторых вариантах осуществления, PEG-IFN α вводят субъекту в течение периода времени перед введением миРНК субъекту. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят PEG-IFN α перед введением миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят PEG-IFN α в течение того же периода времени, в течение которого субъекту вводят миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту затем вводят PEG-IFN α после введения миРНК.

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, способы дополнительно включают введение субъекту NRTI. В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, субъекту, которому вводят миРНК, вводили NRTI перед введением миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят NRTI в течение, по меньшей мере, 2 месяцев, по меньшей мере, 3 месяцев, по меньшей мере, 4 месяцев, по меньшей мере, 5 месяцев, или, по меньшей мере, 6 месяцев перед введением миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят NRTI в течение, по меньшей мере, 2 месяцев перед введением миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят NRTI в течение, по меньшей мере, 6 месяцев перед введением миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят NRTI в течение того же периода времени, в течение которого субъекту вводят миРНК. В некоторых вариантах осуществления способов, субъекту затем вводят NRTI после введения миРНК.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают миРНК для применения в лечении хронической инфекции ВГВ у субъекта, где миРНК содержит смысловую цепь, содержащую 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:6), где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно; (Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA); s представляет собой фосфортиоатную связь; и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол. В некоторых вариантах осуществления миРНК для применения, субъекту также вводят PEG-IFN α . В некоторых вариантах осуществления, миРНК и PEG-IFN α вводят субъекту в течение того же периода

времени. В некоторых вариантах осуществления, миРНК вводят субъекту в течение периода времени перед введением субъекту PEG-IFN α . В некоторых вариантах осуществления, PEG-IFN α вводят субъекту в течение периода времени перед введением миРНК субъекту. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят PEG-IFN α перед введением миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят PEG-IFN α в течение того же периода времени, в течение которого субъекту вводят миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту затем вводят PEG-IFN α . В любой из приведенных выше миРНК для применения, субъекту также вводят NRTI или ранее вводили NRTI. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят NRTI перед введением миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят NRTI в течение, по меньшей мере, 2 месяцев, по меньшей мере, 3 месяцев, по меньшей мере, 4 месяцев, по меньшей мере, 5 месяцев, или, по меньшей мере, 6 месяцев перед введением миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят NRTI в течение, по меньшей мере, 2 месяцев перед введением миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят NRTI в течение, по меньшей мере, 6 месяцев перед введением миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят NRTI в течение того же периода времени, в течение которого субъекту вводят миРНК. В некоторых вариантах осуществления, субъекту затем вводят NRTI.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к применению миРНК в получении лекарственного средства для лечения хронической инфекции ВГВ, где миРНК содержит смысловую цепь, содержащую 5'-gsusguGfcAfCfUfucgscuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:6), где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат, и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно; (Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA); s представляет собой фосфортиоатную связь; и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил]-4-гидроксипролинол.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к применению миРНК и PEG-IFN α в получении лекарственного средства для лечения хронической инфекции ВГВ, где миРНК содержит смысловую цепь, содержащую 5'-gsusguGfcAfCfUfucgscuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:6), где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат, и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно; (Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA); s представляет собой фосфортиоатную связь; и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил]-4-гидроксипролинол.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к применению миРНК, PEG-IFN α и NRTI в получении лекарственного средства для лечения хронической инфекции ВГВ, где миРНК содержит смысловую цепь, содержащую 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:6), где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат, и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно; (Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA); s представляет собой фосфортиоатную связь; и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипропиол.

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, доза миРНК составляет 0,8 мг/кг, 1,7 мг/кг, 3,3 мг/кг, 6,7 мг/кг или 15 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, доза миРНК составляет 20 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг или 900 мг. В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, доза миРНК составляет 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 450 мг. В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, доза миРНК составляет 200 мг. В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, доза миРНК составляет, по меньшей мере, 200 мг.

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, миРНК вводят раз в неделю.

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, вводят более одной дозы миРНК. Например, в некоторых вариантах осуществления, вводят две дозы миРНК, где вторую дозу вводят через 2, 3 или 4 недели после первой дозы. В некоторых конкретных вариантах осуществления, вводят две дозы миРНК, где вторую дозу вводят через 4 недели после первой дозы.

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, вводят две, три, четыре, пять, шесть или более доз миРНК. Например, в некоторых вариантах осуществления, две 400-мг дозы миРНК вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления, шесть 200-мг доз миРНК вводят субъекту.

В некоторых вариантах осуществления способов, композиций для применения или применений, описанных в настоящем изобретении, способ включает:

(а) введение субъекту двух или более доз, по меньшей мере, 200 мг миРНК, содержащей смысловую цепь, содержащую 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:6), где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-

метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фторадеозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат, и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно; (Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA); s представляет собой фосфортиоатную связь; и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол; и

(b) введение субъекту нуклеозидного/нуклеотидного ингибитора обратной транскриптазы (NRTI);

где субъект является HBeAg отрицательным или HBeAg положительным.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение субъекту PEG-IFN α .

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, миРНК вводят подкожной инъекцией. В некоторых вариантах осуществления, миРНК включает введение 1, 2 или 3 подкожных инъекций на дозу.

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, доза PEG-IFN α составляет 50 мкг, 100 мкг, 150 мкг или 200 мкг. В некоторых вариантах осуществления, доза PEG-IFN α составляет 180 мкг.

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, PEG-IFN α вводят раз в неделю.

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, PEG-IFN α вводят подкожной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, NRTI может представлять собой тенофовир, тенофовир дизопроксилфумарат (TDF), тенофовир алафенамид (TAF), ламивудин, адефовир, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин, AGX-1009, эмтрицитабин (FTC), клебудин, ритонавир, дипивоксил, лобукавир, фамвир, N-Ацетил-Цистеин (NAC), PC1323, терадигм-ВГВ, тимозин-альфа, ганцикловир, безифовир (ANA-380/LB-80380) или тенофовир-эксалиадес (TLX/CMX157). В некоторых вариантах осуществления, NRTI представляет собой энтекавир (ETV). В некоторых вариантах осуществления, NRTI представляет собой тенофовир. В некоторых вариантах осуществления, NRTI представляет собой ламивудин. В некоторых вариантах осуществления, NRTI представляет собой адефовир или адефовир дипивоксил.

В некоторых вариантах осуществления приведенных выше способов, композиций для применения или применений, субъект является HBeAg отрицательным. В некоторых вариантах осуществления, субъект является HBeAg положительным.

миРНК могут присутствовать либо в той же фармацевтической композиции, что и другие активные агенты, либо активные агенты могут присутствовать в разных фармацевтических композициях. Данные разные фармацевтические композиции можно вводить либо вместе/одновременно, либо в разное время, либо в разные места (например,

в отдельные части тела).

IV. Наборы для терапии ВГВ

В настоящем изобретении также обеспечивают наборы, содержащие компоненты ВГВ терапии. Наборы могут содержать миРНК (*например*, HBV02) и необязательно один или оба из (a) PEG-IFN α и (b) NRTI (*например*, энтекавир, тенофовир, ламивудин или адефовир или адефовир дипивоксил). Наборы могут дополнительно содержать инструкции по получению и/или введению компонентов комбинированной терапии ВГВ.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к набору, содержащему: фармацевтическую композицию, содержащую миРНК согласно любому из предшествующих пунктов, и фармацевтически приемлемый эксципиент; и фармацевтическую композицию, содержащую PEG-IFN α , и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления, набор дополнительно содержит NRTI и фармацевтически приемлемый эксципиент.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Лечение хронической ВГВ инфекции HBV02

Безопасность, переносимость, фармакокинетику (PK) и противовирусную активность HBV02 оценивают в рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом клиническом исследовании фазы 1/2. Исследование состоит из трех частей. Часть А представляет собой дизайн однократной возрастающей дозы для здоровых добровольцев. Части В и С представляют собой схемы множественных возрастающих доз для субъектов с терапией хронического ВГВ нуклеоз(т)идным ингибитором обратной транскриптазы (NRTI). Субъекты в части В являются HBeAg отрицательными; субъекты в части С являются HBeAg положительными. Положительность HBeAg отражает высокий уровень активной репликации вируса в клетках печени человека.

В части А, однократную дозу HBV02 вводят здоровым взрослым людям. Каждая доза может состоять из 2 подкожных (SC) инъекций в зависимости от назначенного уровня дозы. В состав части А входят четыре группы уровней доз: 50 мг, 100 мг, 200 мг и 400 мг. Два индикаторных субъекта рандомизированы 1:1 на HBV02 или плацебо. Индикаторным субъектам одновременно вводят дозу и наблюдают в течение 24 часов; если исследователь не обеспокоен безопасностью, вводят дозы остальным субъектам в той же группе. Остальные пациенты будут рандомизированы 5:1 на HBV02 или плацебо.

Две необязательные группы в части А могут быть добавлены, следуя той же стратификации, включая сигнальное дозирование, до максимальной дозы 900 мг. В дополнение к необязательным группам можно добавить в общей сложности 8 «плавающих» субъектов, чтобы расширить любую группу в части А. «Плавающие» субъекты должны добавляться с приращениями по 4 и случайным образом 3:1 для HBV02 или плацебо. План увеличения дозы для части А показан в Таблице 3. Дизайн однократной возрастающей дозы для части А показан на фигуре 3.

Таблица 3. План увеличения дозы для части А.

Группа	Доза по весу (мг/кг)	Фиксированная доза ^a (мг)	Фактор увеличения дозы
1a	0,8	50	-
2a	1,7	100	2,0-кратный
3a	3,3	200	2,0-кратный
4a	6,7	400	2,0-кратный
необязательно: 5a и 6a	Вплоть до 15	Вплоть до 900	Вплоть до 2,25-кратного

^a при среднем весе взрослого человека 60 кг.

Данные из части А проверяют перед началом обработки группы доза-уровень у субъектов с хронической ВГВ инфекцией. Стратегия группового дозирования для части В/С данного исследования разнесена; 2 уровня доз в части А (1a: 50 мг и 2a: 100 мг) завершены, и данные проверены перед началом дозирования при начальной дозе в части В (1b: 50 мг). Часть С начинают с начальной дозы части С (3c: 200 мг) в то же самое время, когда начинают группу эквивалентного уровня дозы части В (3b: 200 мг).

Субъекты в части В являются взрослыми субъектами без цирроза печени с HBeAg-отрицательной хронической ВГВ инфекцией и проходили NRTI терапию в течение ≥ 6 месяцев и имеют уровень ДНК ВГВ в сыворотке < 90 МЕ/мл. Чтобы исключить наличие фиброза или цирроза, скрининг включает неинвазивную оценку фиброза печени, такую как оценка FibroScan, если субъект не имеет результатов оценки FibroScan, выполненной в течение 6 месяцев до скрининга, или биопсии печени, выполненной в течение 1 года до скрининга, что подтверждает отсутствие фиброза F3 или цирроза F4 по шкале МЕТАВИР.

Две дозы HBV02 вводят субъектам с разницей в 4 недели. Каждая доза может состоять из 2-х подкожных инъекций в зависимости от назначенного уровня дозы. Включены три группы уровней доз в части В, 50 мг, 100 мг и 200 мг, так что совокупная доза, полученная субъектами в части В, составляет 100 мг, 200 мг и 400 мг. Каждая группа рандомизирована в соотношении 3:1 к HBV02 или плацебо. Две необязательные группы в части В можно добавлять после той же стратификации, с 1,5-кратным коэффициентом, вплоть до максимума о 450 мг на дозу (кумулятивная доза 900 мг).

В дополнение к необязательным группам, можно добавить в общей сложности 16 «плавающих» субъектов, чтобы расширить любую группу в части В. «Плавающие» субъекты следует добавлять с приращениями по 4 и рандомизировать 3:1 для HBV02 или плацебо. Группа 1b инициируется после общего обзора всех доступных данных по безопасности, включая лабораторные данные 4-й недели и клинические данные последнего доступного здорового добровольца в группе 100 мг (группа 2a). План увеличения дозы для частей В и С показан в таблице 4. Схема многократного увеличения дозы для частей В/С показана на фигуре 4.

Субъекты в части С являются взрослыми субъектами без цирроза печени с HBeAg-положительной хронической ВГВ инфекцией и получали NRTI в течение ≥ 6 месяцев и

имеют уровень ДНК ВГВ в сыворотке <90 МЕ/мл. Чтобы исключить наличие фиброза или цирроза, скрининг включает неинвазивную оценку фиброза печени, такую как оценка FibroScan, если субъект не имеет результатов оценки FibroScan, выполненной в течение 6 месяцев до скрининга, или биопсии печени, выполненной в течение 1 года до скрининга, что подтверждает отсутствие фиброза F3 или цирроза F4 по шкале МЕТАВИР. Две дозы HBV02 вводят субъектам с интервалом в 4 недели. Каждая доза может состоять из 2-х подкожных инъекций в зависимости от назначенного уровня дозы. Чтобы учесть ожидаемое низкое преобладание HBeAg-положительных пациентов на терапии NRTI, для HBeAg-положительных пациентов запланирована только 1 группа уровня дозы (200 мг). Часть С включает одну группу уровня дозы, 200 мг, так что совокупная доза, полученная для субъектов в части С, составляет 400 мг. Группа рандомизирована 3:1 на HBV02 или плацебо. Две необязательные группы в части С могут быть добавлены после той же стратификации, с 1,5-кратным коэффициентом, вплоть до максимума 450 мг на дозу (кумулятивная доза 900 мг).

В дополнение к необязательным группам можно добавить в общей сложности 16 «плавающих» субъектов, чтобы расширить любую группу части С. «Плавающие» субъекты следует добавлять с приращениями по 4 и рандомизировать 3:1 для HBV02 или плацебо. Единственная запланированная группа в части С, группа 3с, инициируется одновременно с группой 3b после анализа всех доступных данных по безопасности, включая клинические и лабораторные данные 6-й недели из группы 2b. Субъекты из группы 3с получают HBV02 в той же дозе, что и субъекты из группы 3b (200 мг вводятся дважды с интервалом между дозами 4 недели).

Таблица 4. План увеличения дозы группы В/С.

Группа	Доза по весу (мг/кг)	Фиксированная доза ^a (мг)	Фактор увеличения дозы
1b	0,8	50	-
2b	1,7	100	2,0-кратный
3b и 3с	3,3	200	2,0-кратный
необязательная: 4b и 4с	Вплоть до 5	Вплоть до 300	Вплоть до 1,5-кратного
необязательная: 5b и 6с	Вплоть до 7,5	Вплоть до 450	Вплоть до 1,5-кратного

^a При среднем весе взрослого человека 60 кг

Краткое описание дозирования и введения исследуемого лекарственного средства для частей А-С показано в таблице 5 и на фигурах 5А и 5В.

Таблица 5. Дозирование и введения исследуемого лекарственного средства

Группа	Уровень дозы при визите (мг)	Объем дозы при визите (мл)	Суммарная доза (мг)	Инъекций на введение дозы	Инъекции и в сумме	Объем суммарной дозы (мл) ^a
1a	50	0,25	50	1	1	0,25
2a	100	0,50	100	1	1	0,50
3a	200	1,0	200	1	1	1,0
4a	400	2,0	400	2	2	2,0
необязательная: 5a	≤ 900	≤ 4,5	≤ 900	3	3	≤ 4,5
Необязательная: 6a	≤ 900	≤ 4,5	≤ 900	3	3	≤ 4,5
1b	50	0,25	100	1	2	0,50
2b	100	0,50	200	1	2	1,0
3b	200	1,0	400	1	2	2,0
Необязательная: 4b	≤ 300	≤ 1,5	≤ 600	1	2	≤ 3
Необязательная: 5b	≤ 450	≤ 2,5	≤ 900	2	4	≤ 5
3c	200	1,0	400	1	2	2,0
Необязательная: 4c	< 300	≤ 1,5	≤ 600	1	2	≤ 3
Необязательная: 5c	< 450	≤ 2,5	≤ 900	2	4	≤ 5

^a вводимый объем в одно место не превышает 1,5 мл

НВV02 поставляют в виде стерильного раствора для подкожного введения с концентрацией свободной кислоты 200 мг/мл. Плацебо представляет собой стерильный 0,9% физиологический раствор без консервантов для подкожного введения.

После введения НВV02 или плацебо отмечают любые побочные эффекты. Также измеряются РК параметры НВV02 и возможные метаболиты, которые могут включать плазму: максимальная концентрация, время достижения максимальной концентрации, площадь под кривой зависимости концентрации от времени [до последней измеряемой временной точки и до бесконечности], процент экстраполированной площади, кажущееся конечное время полувыведения, клиренс и объем распределения; моча: доля, удаляемая с мочой, и почечный клиренс.

Также определяют следующее: максимальное снижение уровня НВsAg в сыворотке

от дня 1 до недели 16; количество субъектов с потерей сывороточного HBsAg в любой момент времени; количество субъектов с устойчивой потерей HBsAg в сыворотке в течение ≥ 6 месяцев; количество субъектов с анти-HBs сероконверсией в любой момент времени; количество субъектов с потерей HBeAg и/или анти-HBe сероконверсией в любой момент времени (только для HBeAg-положительных субъектов в части C); оценку влияния HBV02 на другие маркеры ВГВ инфекции, включая определение сывороточного HBcrAg, РНК ВГВ и ДНК ВГВ; и оценку потенциальных биомаркеров ответов хозяина на инфекцию и/или терапию, включая генетические, метаболические и протеомные параметры.

Для оценки РК параметров образцы крови собирают перед дозой (≤ 15 минут до дозирования), и затем через 30 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 8 часов, 10 часов, 12 часов, 24 часа и 48 часов после дозирования; и образцы мочи собирают перед дозой (≤ 15 мин до дозирования), и затем собирают и объединяют в течение 0-4 часов, 4-8 часов, 8-12 часов, 12-24 часов, 48 часов и 1 недели после дозирования. Для субъектов в частях В или С образцы крови для измерения HBsAg, анти-HBs, HBeAg, анти-HBe, ДНК ВГВ, РНК ВГВ или HBcrAg могут быть собраны в один или несколько следующих моментов времени: скрининг (от 28 дней до 1 дня перед дозированием), день 1 (дозирование), день 2 (после дозирования), раз в неделю в течение периода дозирования, раз в неделю в течение 4 недель после дозирования, 12 недель после дозирования, 16 недель после дозирования, 20 недель после дозирования и 24 недели после дозирования.

Голодание не требуется для способов исследования.

ПРИМЕР 2

Лечение хронического ВГВ отдельно HBV02 или в комбинации с PEG-IFN α

Безопасность, переносимость, фармакокинетику и противовирусную активность HBV02 отдельно или в комбинации с PEG-IFN α оценивали в клиническом исследовании фазы 1/2. Исследование состоит из четырех частей. Части А-С представляют собой рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование HBV02, вводимого подкожно здоровым взрослым субъектам или взрослым субъектам без цирроза печени с хронической инфекцией ВГВ, которые получают терапию NRTI. Часть А представляет собой дизайн однократной возрастающей дозы для здоровых добровольцев. Части В и С представляют собой схемы множественных возрастающих доз для субъектов без цирроза печени с хроническим ВГВ, получающих терапию NRTI. Субъекты в части В являются HBeAg отрицательными; субъекты в части С являются HBeAg положительными. Положительность HBeAg отражает высокий уровень активной репликации вируса в клетках печени человека. Часть D представляет собой рандомизированное открытое исследование фазы 2 HBV02, вводимого отдельно или в комбинации с PEG-IFN α , у взрослых субъектов без цирроза печени с хроническим ВГВ на терапии NRTI; Часть D включает HBeAg-положительных и HBeAg-отрицательных субъектов.

В части А однократную дозу HBV02 вводят здоровым взрослым субъектам.

Каждая доза может состоять вплоть до 3 подкожных (SC) инъекций в зависимости от назначенного уровня дозы. В состав части А входят четыре группы уровней доз: 50 мг, 100 мг, 200 мг и 400 мг. Два индикаторных субъекта рандомизированы 1:1 на HBV02 или плацебо. Индикаторным субъектам одновременно вводят дозу и наблюдают в течение 24 часов; если исследователь не обеспокоен безопасностью, вводят дозы остальным субъектам в той же группе. Остальные субъекты будут рандомизированы 5:1 на HBV02 или плацебо. Две необязательные группы в части А можно добавлять после той же стратификации, включая индикаторное дозирование, вплоть до максимальной дозы 900 мг. В дополнение к необязательным группам можно добавить в общей сложности 8 «плавающих» субъектов, чтобы расширить любую группу в части А. «Плавающие» субъекты следует добавлять с приращениями по 4 и рандомизировать 3:1 для HBV02 или плацебо. Дизайн однократной возрастающей дозы для части А показан на фигуре 3.

Субъекты в части В являются взрослыми субъектами без цирроза печени с HBeAg-отрицательной хронической ВГВ инфекцией, и проходили NRTI терапию в течение ≥ 6 месяцев и имеют уровень ДНК ВГВ в сыворотке < 90 МЕ/мл. Чтобы исключить наличие фиброза или цирроза, скрининг включает неинвазивную оценку фиброза печени, такую как оценка FibroScan. Две дозы HBV02 вводят субъектам с разницей в 4 недели. Каждая доза может состоять вплоть до 2 подкожных инъекций в зависимости от назначенного уровня дозы. Включены три группы уровней доз в части В, 50 мг, 100 мг и 200 мг, так что совокупная доза, полученная для субъектов в части В, составляет 100 мг, 200 мг и 400 мг. Каждая группа рандомизирована в соотношении 3:1 к HBV02 или плацебо.

Чтобы учесть ожидаемое низкое преобладание HBeAg-положительных пациентов на терапии NRTI, для HBeAg-положительных пациентов запланирована только 1 группа уровня дозы (200 мг). Две необязательные группы в части В можно добавлять после той же стратификации, вплоть до максимума 450 мг на дозу (кумулятивная доза 900 мг). В дополнение к необязательным группам, можно добавить в общей сложности 16 «плавающих» субъектов, чтобы расширить любую группу в части В. «Плавающих» субъектов следует добавлять с приращениями по 4 и рандомизировать 3:1 для HBV02 или плацебо. Группа 1b инициируется после кумулятивного обзора всех доступных данных по безопасности, включая лабораторные данные 4-й недели и клинические данные последнего доступного здорового добровольца в группе 100 мг (группа 2a). План увеличения дозы для частей В и С показан в таблице 5. Схема многократного возрастания дозы для частей В/С показана на фигуре 4.

Субъекты в части С являются взрослыми субъектами без цирроза печени с HBeAg-положительной хронической ВГВ инфекцией, и проходили NRTI терапию в течение ≥ 6 месяцев и имеют уровень ДНК ВГВ в сыворотке < 90 МЕ/мл. Две дозы HBV02 вводят субъектам с разницей в 4 недели. Каждая доза может состоять вплоть до 2 подкожных инъекций в зависимости от назначенного уровня дозы. Часть С включает одну группу уровня дозы, 200 мг, так что совокупная доза, полученная для субъектов в части С, составляет 400 мг. Группа рандомизирована 3:1 на HBV02 или плацебо. Две

INF α ^a												
---------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

^a Субъекты, которые прекращают лечение PEG-IFN α из-за побочных реакций, связанных с PEG-IFN α , могут продолжать получать лечение HBV02.

Чтобы исключить наличие цирроза, скрининг субъектов, включенных в части В/С и часть D, включает неинвазивную оценку фиброза печени, такую как оценка FibroScan, если субъект не имеет результатов оценки FibroScan, выполненной в течение 6 месяцев до скрининга, или биопсии печени, выполненной в течение 1 года до скрининга, которая подтверждает отсутствие фиброза F3 или цирроза F4 по шкале МЕТАВИР.

HBV02 поставляется в виде стерильного раствора для подкожного введения с концентрацией свободной кислоты 200 мг/мл. Плацебо представляет собой стерильный 0,9% физиологический раствор без консервантов для подкожного введения.

После введения HBV02 или плацебо отмечают любые побочные эффекты. Также измеряют РК параметры HBV02 и возможные метаболиты, которые могут включать плазму: максимальная концентрация, время достижения максимальной концентрации, площадь под кривой зависимости концентрации от времени [до последней измеряемой временной точки и до бесконечности], процент экстраполированной площади, кажущееся конечное время полувыведения, клиренс и объем распределения; моча: доля, выводимая с мочой, и почечный клиренс. Также определяют следующее: максимальное снижение уровня HBsAg в сыворотке от дня 1 до недели 16; количество субъектов с потерей сывороточного HBsAg в любой момент времени; количество субъектов с устойчивой потерей HBsAg в сыворотке в течение ≥ 6 месяцев; количество субъектов с анти-HBs сероконверсией в любой момент времени; количество субъектов с потерей HBeAg и/или анти-HBe сероконверсией в любой момент времени (только для HBeAg-положительных субъектов в частях С и D); оценку влияния HBV02 на другие маркеры ВГВ инфекции, включая определение сывороточного HBcAg, РНК ВГВ и ДНК ВГВ; и оценку потенциальных биомаркеров ответов хозяина на инфекцию и/или терапию, включая генетические, метаболические и протеомные параметры.

Данные из части А проверяют перед началом группы уровня доз у субъектов с хронической ВГВ инфекцией. Стратегия группового дозирования для части В/С данного исследования разнесена; 2 уровня доз в части А (1a: 50 мг и 2a: 100 мг) завершены, и данные проверены перед началом дозирования при начальной дозе в части В (1b: 50 мг). Часть С начинают с начальной дозы части С (3c: 200 мг) в то же самое время, когда начинают эквивалентную группу с уровнем дозы части В (3b: 200 мг).

Голодание не требуется для способов исследования.

Фигуры 7А и 7В показывают дизайн исследования для частей А-D.

ПРИМЕР 3

Лечение хронического ВГВ HBV02 Отдельно или в комбинации с PEG-IFN α

Безопасность, переносимость, фармакокинетику и противовирусную активность HBV02 оценивали в клиническом исследовании фазы 1/2. Исследование состоит из четырех частей. Части А-С представляют собой рандомизированное двойное слепое

плацебо-контролируемое клиническое исследование HBV02, вводимого подкожно здоровым взрослым субъектам или взрослым субъектам без цирроза печени с хронической инфекцией ВГВ, которые получают терапию NRTI. Часть А представляет собой дизайн однократной возрастающей дозы для здоровых добровольцев. Части В и С представляют собой схемы множественных возрастающих доз для субъектов без цирроза печени с хроническим ВГВ, получающих терапию NRTI.

Субъекты в части В являются HBeAg отрицательными; субъекты в части С являются HBeAg положительными. Положительность HBeAg отражает высокий уровень активной репликации вируса в клетках печени человека. HBeAg положительные пациенты, как правило, моложе и считается, что у них лучше сохранена иммунная функция, по сравнению с HBeAg отрицательными пациентами, которые, как правило, старше и испытывают большее иммунное истощение. Считается, что HBeAg отрицательные пациенты имеют большее количество интегрированной ДНК по сравнению с HBeAg положительными пациентами. Часть D представляет собой рандомизированное открытое исследование фазы 2 HBV02, вводимого отдельно или в комбинации с PEG-IFN α взрослым субъектам без цирроза печени с хроническим ВГВ на терапии NRTI; часть D включает HBeAg-положительных и HBeAg-отрицательных субъектов.

і. Предварительное исследование дозирования на животных

Дозы HBV02, применяемые в исследовании, определяли расчетом эквивалентных доз для человека (HED) для уровней отсутствия наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) в токсикологических исследованиях на животных и применением запаса безопасности к данным HED. Коэффициенты преобразования площади поверхности тела ($\text{м}^2/\text{кг}^2$) применяли для расчета HED доз для животных. Никакой токсичности не наблюдали в исследовании на крысах с надлежащей лабораторной практикой (GLP) после 3 доз раз в две недели HBV02 при наивысшей испытываемой дозе, 150 мг/кг, что соответствует HED 24 мг/кг/доза (таблица 7). Никакой токсичности не наблюдали в GLP исследовании на нечеловеческих приматах (NHP) после 3 доз раз в две недели HBV02 при наивысшей испытываемой дозе, 300 мг/кг, что соответствует HED 97 мг/кг/доза (таблица 7). Применяя данную методологию, предлагаемая начальная доза 0,8 мг/кг для людей представляет собой 30-кратный запас безопасности HED NOAEL, прогнозируемый для крыс, и 120-кратный запас безопасности HED NOAEL, прогнозируемый в NHP. Другие миРНК, применяющие платформу GalNAc, продемонстрировали значимое поражение печени при дозах от 1 до 15 мг/кг. Кроме того, наблюдали статистически значимое снижение HBsAg в доклинических моделях мышей с ВГВ в диапазоне доз от 1 до 9 мг/кг.

Таблица 7. Предложенная начальная доза для HBV02.

Виды для исследования и продолжительность	NOAEL (мг/кг)	HED (мг/кг)	Начальная доза (мг/кг)
яванский макак	300	97	0,8

4-недельное исследование (3 дозы раз в две недели) с последующим 13-недельным восстановлением			(120-кратный запас безопасности)
крысы	150	24	0,8
4-недельное исследование (3 дозы раз в две недели) с последующим 13-недельным восстановлением			(30-кратный запас безопасности)

Фиксированную дозу HBV02 применяли в клиническом исследовании, потому что HBV02, как и другие GalNAc-конъюгированные миРНК, поглощается печенью и минимально распределяется в других органах и тканях. Поэтому не ожидают, что дозирование на основе веса уменьшит межиндивидуальные вариации фармакокинетики (ФК) HBV02 у взрослых, и фиксированная доза имеет то преимущество, что позволяет избежать возможных ошибок при расчете дозы.

ii. Способы

Дизайн эксперимента показан на фигуре 12.

В части А здоровым взрослым субъектам вводили однократную дозу HBV02. Каждая доза состояла из вплоть до 3 подкожных (SC) инъекций в зависимости от назначенного уровня дозы. Были включены шесть групп уровней доз в части А: 50 мг, 100 мг, 200 мг, 400 мг, 600 мг и 900 мг. Два индикаторных субъекта рандомизировали 1:1 на HBV02 или плацебо. Индикаторным субъектам одновременно вводили дозу и наблюдали в течение 24 часов; если исследователь не беспокоился о безопасности, получали дозу оставшиеся субъекты в той же группе.

Субъекты в части В были взрослыми субъектами без цирроза печени с HBeAg-отрицательной хронической ВГВ инфекцией, и получали NRTI терапию в течение ≥ 6 месяцев и имели уровень ДНК ВГВ в сыворотке < 90 МЕ/мл. Чтобы исключить наличие фиброза или цирроза, скрининг включал неинвазивную оценку фиброза печени. Две дозы HBV02 вводили субъектам с интервалом в 4 недели (т.е. в день 1 и день 29). Каждая доза состояла из вплоть до 2 подкожных инъекций в зависимости от назначенной дозы. В состав части В входили шесть групп при дозах 20 мг, 50 мг, 100 мг или 200 мг, так что совокупная доза, полученная для субъектов в части В, составляла 40 мг, 100 мг, 200 мг или 400 мг. Каждую группу рандомизировали 3:1 на HBV02 или плацебо. 50 мг группу части В начинали после кумулятивного обзора всех доступных данных по безопасности, включая лабораторные данные недели 4 и клинические данные последнего доступного здорового добровольца в 100 мг группе.

Субъекты в части С были взрослыми субъектами без цирроза печени с HBeAg-положительной хронической ВГВ инфекцией, и принимали NRTI терапию в течение ≥ 6 месяцев и имели уровень ДНК ВГВ в сыворотке < 90 МЕ/мл. Чтобы учесть ожидаемое низкое преобладание HBeAg-положительным пациентам на терапии НИОТ, для HBeAg-положительных пациентов были включены только 2 группы уровней доз (50 мг и 200 мг).

Две дозы HBV02 вводили субъектам с интервалом в 4 недели (т.е. в день 1 и день 29). Каждая доза состояла из до 2 подкожных инъекций в зависимости от назначенной дозы. Часть С включала две группы уровней доз, 50 мг и 200 мг, так что совокупная доза, полученная для субъектов в части С, составляла 100 мг или 400 мг. Группу рандомизировали 3:1 на HBV02 или плацебо.

Пациентов с хроническим ВГВ, у которых наблюдали более чем 10% снижение относительно исходного значения HBsAg в сыворотке крови на 16 неделе приема HBsAg, наблюдали в течение вплоть до 32 дополнительных недель.

Критерии включения для частей В и С включал: возраст 18-65 лет; определяемый сывороточный HBsAg в течение ≥ 6 месяцев; на терапии NRTI ≥ 6 месяцев; HBsAg > 150 МЕ/мл; ВГВ ДНК <90 МЕ/мл; и сывороточная аланинаминотрансфераза (ALT) и аспаратаминотрансфераза (AST) $\leq 2 \times$ верхний предел нормы (ULN). Критерии исключения включали: значительный фиброз или цирроз (FibroScan > 8,5 кПа при скрининге или биопсия печени F3/F4 по шкале МЕТАВИР в пределах 1 года); билирубин, международное нормализованное отношение (INR) или протромбиновый индекс > ULN; активная инфекция ВИЧ, гепатита С или дельта гепатита; и клиренс креатинина <60 мл/мин (Кокрофт-Голт).

Субъекты в части D являются взрослыми субъектами без цирроза печени с HBeAg-положительным или HBeAg-отрицательным хроническим ВГВ, и получали NRTI терапию в течение ≥ 2 месяцев и имели уровни ДНК ВГВ в сыворотке <90 МЕ/мл и уровни HBsAg в сыворотке > 50 МЕ/мл. Уровень дозы и количество доз HBV02 в части D определяют на основании безопасности и переносимости HBV02 в части А-С и анализа противовирусной активности HBV02 в частях В и С. Уровень дозы в частях D не превышает наивысшего уровня дозы, оцененного в частях В и С, и количество доз будет составлять вплоть до 6 доз (например, между 3 и 6 дозами), вводимых каждые 4 недели. Субъектов рандомизировали в одну из группы 1d, группы 2d, группы 3d и группы 4d (необязательная) (например, всего 100 субъектов, 25 субъектов в группе). В группе 1d вплоть до 6 доз (например, от 3 до 6 доз) HBV02 вводят субъектам с частотой каждые 4 недели. Каждый субъект получает дозу HBV02 в день 1, неделю 4 и неделю 8 и может получать дополнительные дозы на неделе 12, 16 и 20. В группе 2d, вплоть до 6 (например, от 3 до 6 доз) HBV02 вводят субъектам с разницей в 4 недели, и PEG-IFN α вводят в течение 24 недель раз в неделю (т.е. каждая доза вводится с интервалом в 1 неделю), начиная с 1 дня.

Каждый субъект получает дозу HBV02 в день 1, неделю 4 и неделю 8 и может получать дополнительные дозы на неделе 12, 16 и 20. В группе 3d, вплоть до 6 (например, от 3 до 6 доз) HBV02 вводят субъектам с разницей в 4 недели, и PEG-IFN α вводят в течение 12 недель раз в неделю (т.е. каждую дозу вводят с интервалом в 1 неделю), начиная с 12 недели. Каждый субъект получает дозу HBV02 в день 1, неделю 4 и неделю 8 и могут получать дополнительные дозы на неделе 12, 16 и 20. В группе 4d 3 дозы HBV02 вводят субъектам с интервалом в 4 недели, и PEG-IFN α вводят в течение 12 недель раз в

неделю (т.е. каждая доза вводится с интервалом в 1 неделю), начиная с дня 1. Каждый субъект получает дозу HBV02 в день 1, неделю 4 и неделю 8. Доза PEG-INF α , вводимого субъектам в группах 2d, 3d и 4d, составляет 180 мкг, вводимая подкожной инъекцией. Фигуры 6A-6D представляют собой схемы, иллюстрирующие дизайн исследования для части D. График введения лекарственного средства для группы 4d показан в таблице 8.

Таблица 8. Группа 4d График введения исследуемого лекарственного средства (D1=день 1, W1=неделя 1 и т.д.).

	D1	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11
HBV02	X				X				X			
PEG-INF α ^a	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

^a Субъекты, которые прекращают лечение PEG-INF α из-за побочных реакций, связанных с PEG-INF α , могут продолжать получать лечение HBV02.

Чтобы исключить наличие цирроза, скрининг субъектов, включенных в части B и C, включал неинвазивную оценку фиброза печени, такую как оценка FibroScan, если субъект не имел результатов оценки FibroScan, выполненной в течение 6 месяцев до скрининга, или биопсии печени, выполненной в течение 1 года до скрининга, подтвердившей отсутствие фиброза F3 или цирроза F4 по шкале МЕТАВИР. Те же способы применяют для исключения субъектов с циррозом печени от включения в часть D.

HBV02 предоставляли в виде стерильного раствора для подкожного введения с концентрацией свободной кислоты 200 мг/мл. Плацебо представлял собой стерильный 0,9% физиологический раствор без консервантов для подкожного введения.

После введения HBV02 или плацебо не отмечали каких-либо побочных эффектов. Были также измерены РК параметры HBV02 и возможные метаболиты, включая плазму: максимальная концентрация, время достижения максимальной концентрации, площадь под кривой зависимости концентрации от времени [до последней измеряемой временной точки и до бесконечности], процент экстраполированной площади, кажущееся конечное время полувыведения, клиренс и объем распределения; моча: доля, выводимая с мочой, и почечный клиренс. Также были определены следующие параметры: максимальное снижение сывороточного HBsAg с дня 1 по неделю 16; количество субъектов с потерей сывороточного HBsAg в любой момент времени; количество субъектов с устойчивой потерей HBsAg в сыворотке в течение ≥ 6 месяцев; количество субъектов с анти-HBs сероконверсией в любой момент времени; количество субъектов с потерей HBeAg и/или анти-HBe сероконверсией в любой момент времени (только для HBeAg положительных субъектов в частях C и D); оценку влияния HBV02 на другие маркеры ВГВ инфекции, включая определение сывороточного HBcrAg, РНК ВГВ и ДНК ВГВ; и оценку потенциальных биомаркеров ответов хозяина на инфекцию и/или терапию, включая генетические, метаболические и протеомные параметры. Чтобы оценить параметры РК

для субъектов в части А, образцы крови собирали перед дозой (≤ 15 минут до введения дозы), и затем через 30 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 8 часов, 10 часов, 12 часов, 24 часа и 48 часов после дозирования; и образцы мочи собирали перед дозированием (≤ 15 мин до дозирования), и затем собирали и объединяли в течение 0-4 часов, 4-8 часов, 8-12 часов, 12-24 часов, 48 часов и 1 недели после дозирования. Для субъектов в частях В или С образцы крови для измерения HBsAg, анти-HBs, HBeAg, анти-HBe, ДНК ВГВ, РНК ВГВ или HBcrAg собирали в одну или несколько следующих временных точек: скрининг (от 28 дней до 1 дня до дозирования), день 1 (дозирование), день 2 (после дозирования), раз в неделю в течение периода дозирования, раз в неделю в течение 4 недель после дозирования, 12 недель после дозирования, 16 недель после дозирования, 20 недель после дозирования и 24 недель после дозирования.

Данные из части А анализировали перед началом группы уровня дозы на субъектах с хронической ВГВ инфекцией. Стратегия группового дозирования для части В/С данного исследования была ступенчатой; 2 уровня доз в части А (50 мг и 100 мг) были завершены, и данные анализировали перед началом дозирования при начальной дозе в части В (50 мг). Часть С инициировали при начальной дозе части С (200 мг) одновременно с началом группы с эквивалентной дозой в группе В (200 мг).

Голодание не требовалось для способов исследования.

iii. Предварительные результаты частей А и В

На фигуре 9А показан план исследования части А, части В и части С на момент завершения дозирования для групп 1-5 части А (50 мг, 100 мг, 200 мг, 400 мг, 600 мг) и для групп 1-2 части В (50 мг, 100 мг). На фигуре 9В показано завершённое дозирование для части А для групп 1-5, и также исключение субъектов в разных группах. На фигуре 9С показано завершённое дозирование для части В для групп 1-2 и исключение субъектов в разных группах.

Предварительные демографические данные для субъектов, включенных в части А и В, показаны в таблице 9 ниже.

Таблица 9: Демография для субъектов, включенных в части А и В.

			Группы 1-5 части А N=41	Группы 1, 2, 4 части В N =13 (10 активных, 3 плацебо)
ПОЛ		Мужской	13 (31,7%)	11 (84,6%)
		Женский	28 (68,3%)	2 (15,4%)
Раса/Этническая		Белый	21 (51,2%)	1 (7,7%)
		Азиат	8 (19,5%)	11 (84,6%)
		Коренной житель	3 (7,3%)	0

		Гавайских островов/островов Тихого океана		
		Другие	9 (30,0%)	1 (маори) (7,7%)
		Испаноязычный	1 (2,4%)	0
Другие		Средний возраст (диапазон)	25,9 (19-41)	43 (31-53)
		Среднее исходного HBsAg (диапазон)	N/A	3253 (547-16522)
		ВГВ генотип	N/A	неизвестен

Сводка побочных эффектов (АЕ), полученных в результате предварительного анализа завершенных дозировок частей А и В, представлена в таблице 10.

Таблица 10. Сводка побочных эффектов.

Количество субъектов с:	Группы 1-5 части А N=41	Группы 1, 2, 4 N=13 части В (10 активных, 3 плацебо)
любые АЕ	32 (78%)	4 (31%)
степень 1	30 (73%)	4 (31%)
степень 2	2 (4,9%), URI	0
степень 3 или 4	0	0
Любые нежелательные явления, возникшие в связи с лечением (ТЕАЕ) (Через 4 недели после введения дозы)	25 (61%)	4 (31%)
любые АЕ, связанные с лечением (все, что произошло через 4 недели после дозирования)	3 (7,3%), все степени 1 Головная боль Болезненность в месте инъекции Дискомфорт в животе	1 (7,7%), степень 1 Боль в месте введения
Реакции в месте введения	6 (15%) 5/6 страдают от боли в месте введения 1/6 синяк	1 (7,7%)

Субъекты в частях А и В не показали значительных отклонений в лабораторных показателях, гипербилирубинемии или повышенном INR. У некоторых субъектов в частях А и В обнаружены отклонения в лабораторных показателях функции печени (фигуры 10А, 10В и 11). У двух из 41 субъекта в части А было повышение уровня ALT в день 1 до дозирования (нормальное значение ALT при скрининге). В части В, у 1 из 12 субъектов на неделе 8 было выявлено повышение уровня ALT (39 Ед/л, 1,1 x ULN) и AST (50 Ед/л, 1,5 x ULN). Один испытуемый в группе 3а (200 мг) с ALT на верхней границе нормы на 29 день был связан с физическими нагрузками и высоким уровнем креатининкиназы (СК: 5811 Ед/л). У двух субъектов в группе 4а (400 мг) уровень ALT был выше верхнего предела нормы в день 1 до дозирования. Один, преступивший к интенсивным упражнениям, имел высокий уровень СК, равный 20001 Ед/л, и выбыл в день 2, что не связано с побочными эффектами. Второй субъект с повышением ALT пришел в норму к дню 8 без вмешательства. Как показано на фигуре 11, одна женщина из группы 2b (100 мг) показала повышение уровня ALT 1 степени на 8 неделе.

Субъекты из части В показали снижение HBsAg с течением времени в активных группах групп 1 и 2. На фигуре 12А показывает изменение HBsAg в группах 1b (50 мг) и 2b (100 мг) для субъектов, получающих HBV02 или плацебо. На фигуре 12В показано изменение HBsAg в группах 1b и 2b только для субъектов, получающих HBV02. В группе 4b (группа 20 мгх2) у субъекта было 0,47 log снижение через 2 недели после первой дозы.

На фигуре 12С показано среднее изменение HBsAg в группах 1b и 2b со дня 1 до недели 4 или недели 20 (в зависимости от группы) после введения HBV02, причем 3 субъекта с хронической ВГВ инфекцией (HBeAg отрицательные) получили 50 мг HBV02 в день 1 и день 28, и шесть субъектов получили 100 мг в день 1. В группе 50 мг среднее снижение HBsAg на 12 неделе после двух доз составило 1,5 log₁₀, или приблизительно 30-кратное снижение. Все субъекты в данной группе достигли наблюдаемого максимального снижения HBsAg, который колебался от 0,6 до 2,2 log₁₀. В группе 100 мг все субъекты достигли 4-й недели, где после одной дозы наблюдали среднее снижение на 0,7 log₁₀, или приблизительно шестикратное снижение.

Среди 10 HBeAg-отрицательных субъектов в части В, 7 субъектов показали хороший ответ, показав 0,29-0,95-log снижение HBsAg через 2 недели после первой дозы (20, 50 или 100 мг). Двое из 10 были показали промежуточный ответ, показав 0,06-0,21 log снижение HBsAg через 2 недели после первой дозы 20, 50 или 100 мг. Наконец, один из 10 субъектов не показал ответа, показав 0,16 log увеличение HBsAg через 2 недели после первой дозы. Возможные причины наличия промежуточных ответов и отсутствия ответа включают: ответ на дозу, фармакокинетику, вирусную резистентность и факторы хозяина.

HBV02 хорошо переносилось субъектами. Разовые дозы от 50 до 600 мг хорошо переносились здоровыми добровольцами. Две дозы от 50 до 100 мг хорошо переносились HBeAg-отрицательными субъектами. Отмечалась высокая вариабельность снижения HBsAg между пациентами, с восстановлением через 12 недель после последней дозы.

iv. Демография и исходные характеристики - части А, В, и С

Демография и исходные характеристики в частях А, В, и С показаны в таблице 11, таблице 12 и таблице 13, соответственно. Все субъекты в частях В и С не получали NRTI и имели FibroScan $\leq 8,5$ кПа или F0/F1/F2 по шкале МЕТАВИР.

Таблица 11. Демография и исходные характеристики в части А (здоровые добровольцы).

	HBV02							плацебо n=12
	50 мг n=6	100 мг n=6	200 мг n=6	400 мг n=7 ^a	600 мг n=6	900 мг n=6	суммарно n=37	
Средний возраст, у (SD)	25 (3)	23 (4)	27 (4)	24 (4)	29 (6)	33 (10)	27 (6)	27 (7)
Мужской пол, n (%)	0	2 (33)	3 (50)	0	3 (50)	3 (50)	11 (30)	7 (58)
Средний вес, кг (SD)	62 (12)	63 (7)	75 (5)	65 (10)	72 (8)	72 (12)	68 (10)	76 (10)
средний BMI, кг/м ² (SD)	23 (5)	23 (3)	24 (2)	25 (4)	26 (1)	26 (4)	25 (3)	24 (2)
раса, n (%)								
Азиат	2 (33)	3 (50)	0	0	2 (33)	1 (17)	8 (22)	1 (8)
Белый	2 (33)	2 (33)	5 (83)	5 (71)	3 (50)	3 (50)	20 (54)	8 (67)
Другой	1 (17)	1 (17)	1 (17)	1 (14)	1 (17)	2 (33)	6 (16)	1 (8)

SD=стандартное отклонение.

^a включает заменяющего добровольца

Таблица 12. Демография и исходные характеристики субъектов в части В (HBsAg-отрицательные пациенты).

	HBV02					плацебо n=6
	20 мг n=3	50 мг n=6	100 мг n=6	200 мг n=3	суммарно n=18	

	HBV02					плацебо n=6
	20 мг n=3	50 мг n=6	100 мг n=6	200 мг n=3	суммарно n=18	
Средний возраст, у (SD)	40 (9)	43 (11)	45 (6)	55 (4)	45 (9)	44 (7)
Мужской пол, n (%)	2 (67)	5 (83)	5 (83)	0	12 (67)	3 (50)
раса, n (%)						
азиат	3 (100)	5 (83)	5 (83)	3 (100)	16 (89)	6 (100)
белый	0	0	1 (17)	0	1 (6)	0
другой	0	1 (17)	0	0	1 (6)	0
средний log ₁₀ HBsAg (SD)	3,3 (0,3)	3,3 (0,5)	3,4 (0,5)	3,3 (0,4)	3,3 (0,4)	3,5 (0,4)

SD=стандартное отклонение.

Таблица 13. Демография и исходные характеристики субъектов в части С (HBsAg-положительные пациенты).

	HBV02			плацебо n=2
	50 мг n=3	200 мг n=3	суммарно n=6	
Средний возраст, у (SD)	35 (10)	34 (13)	34 (10)	59 (8)
Мужской пол, n (%)	1 (33)	2 (67)	3 (50)	1 (50)
раса, n (%)				

	HBV02			плацебо n=2
	50 мг n=3	200 мг n=3	суммарно n=6	
азиат	3 (100)	3 (100)	6 (100)	2 (100)
белый	0	0	0	0
другой	0	0	0	0
средний \log_{10} HbsAg (SD)	3,5 (0,3)	3,9 (0,6)	3,7 (0,5)	3,2 (0,3)

SD=стандартное отклонение.

v. Безопасность и переносимость - результаты из частей А, В и С

Предварительные данные получали для частей А, В и С на основе 37 здоровых добровольцев, которые получали HBV02; 12 здоровых добровольцев, которые получали плацебо; 24 пациента с хроническим ВГВ на NRTI, которые получали HBV02; и 8 пациентах с хронической ВГВ на NRTI, которые получали плацебо. HBV02 обычно хорошо переносилось.

У здоровых добровольцев и пациентов с хроническим ВГВ, HBV02 в целом хорошо переносился здоровыми добровольцами, принимающими в виде однократной дозы вплоть до 900 мг, и пациентами, принимающими две дозы по 20 мг, 50 мг, 100 мг или 200 мг на каждую дозу. Никаких клинически значимых отклонений от нормы аланинтрансаминазы (ALT), которые являются маркером воспаления печени, не наблюдали до 16-й недели у пациентов с хроническим ВГВ (части В и С) (фигуры 13А-13Е). Не наблюдали повышения степени ≥ 2 ALT, уровня билирубина $> ULN$ или клинически значимых изменений или тенденций в других лабораторных параметрах, жизненно важных функциях или ЭКГ.

Что касается части А, последующее повышение уровня ALT до уровня $> ULN$ не было связано с повышением уровня билирубина $> ULN$. Никаких изменений функционального статуса печени (например, альбумина, параметров коагуляции) или клинических признаков/симптомов печеночной дисфункции не наблюдали ни у одного из субъектов, получавших HBV02. Преходящие повышения ALT наблюдали с HBV02 у 1/6 (17%) и 4/6 (67%) субъектов после однократной дозы 1 и 3 мг/кг, соответственно. Данные повышения были бессимптомными и не сопровождалась гипербилирубинемией. Напротив, не наблюдали повышения уровня ALT, потенциально связанного с HBV02, при однократных дозах HBV02 в диапазоне от 50 до 600 мг (~0,8-10 мг/кг).

В группе А 900 мг (~15 мг/кг) легкое бессимптомное повышение уровня ALT 1 степени без связанных изменений билирубина наблюдали в подгруппе субъектов (5/6 субъектов с повышением ALT 1,1-2,6 x ULN). Уровни ALT для субъектов в части А,

включая относительно субъектов, которым вводили ВГВ01 (аналогичная миРНК без модификации GNA), показаны на фигуре 14. Данные результаты предполагают, что включение технологии ESC+ (обеспечивающей повышенную стабильность и минимизирующую нецелевую активность за счет включения модификации GNA) снижает склонность миРНК вызывать повышение уровня ALT у здоровых добровольцев при уровнях доз, которые, как ожидается, будут клинически релевантными.

Никаких дозозависимых тенденций в частоте нежелательных явлений не наблюдали. Большинство нежелательных явлений, возникших при лечении, как сообщалось, были легкой степени тяжести, и ни один из пациентов не был исключен из-за нежелательного явления. Наиболее частым нежелательным явлением была головная боль (6/24, 25%). Сообщалось о трех нежелательных явлениях 3 степени, таких как инфекция верхних дыхательных путей, боль в груди и низкий уровень фосфата в крови, но их не считали связанными с HBV02. У пациента, принимавшего тенофовир дизопроксилфумарат, наблюдали единичное нежелательное явление гипофосфатемии 3 степени. Сообщалось о двух серьезных побочных эффектах, или SAE, оба в части В. Первое, головная боль 2 степени, устранялось с помощью внутривенных жидкостей и неопиоидных обезболивающих. У этого пациента были дополнительные симптомы лихорадки, тошноты, рвоты и обезвоживания, которые оценивались как соответствующие вирусному синдрому. Второе SAE, депрессия 4 степени, возникла через 50 дней после введения последней дозы лекарственного средства и было оценено как несвязанное с лечением HBV02.

Сводка побочных эффектов, возникающих при лечении, показана в таблице 14.

Таблица 14. Сводка побочных явлений (АЕ), возникающих при лечении.

пациенты, n (%)	HBV02 n=24	плацебо n=8
любое АЕ	13 (54)	2 (25)
АЕ, связанное с лечением	5 (21)	0
степень ≥ 3 АЕ	1 (4)	0
серьезное АЕ	1 (4)	0

vi. Фармакокинетика - результаты части А

Были проанализированы предварительные фармакокинетические (ПК) данные первого рандомизированного слепого плацебо-контролируемого исследования с участием людей HBV02 на здоровых добровольцев. Образцы плазмы оценивали для шести групп с однократной возрастающей дозой для восьми субъектов (6:2 активный:плацебо), которые получали однократную подкожную (SC) дозу HBV02 в диапазоне от 50 до 900 мг.

Критерии отбора включали следующее: возраст от 18 до 55 лет; индекс массы тела (ИМТ) $18,0 \leq 32$ кг/м²; CLcr <90 мл/мин (Кокрофт-Голт); и отсутствие клинически

значимых отклонений ЭКГ или клинически значимого хронического заболевания.

Интенсивные РК образцы плазмы и мочи собирали в течение 1 недели. Серийные образцы плазмы собирали через 24 часа, через 48 часов и через 1 неделю после введения дозы. Объединенные образцы мочи собирали в течение 24 часов, и единичные пустые образцы собирали через 48 часов и 1 неделю после введения дозы. Концентрации HBV02 и (N-1)3' HBV02 анисмыслового метаболита в плазме и моче измеряли, применяя валидированный жидкостной хроматографический тандемный масс-спектрометрический анализ (низший предел количественного определения (LLOQ) 10 нг/мл в плазме и моче). РК параметры оценивали, применяя стандартные некомпартментные способы в WinNonlin®, V6.3.0 (Certara L.P., Princeton, NJ). AS(N-1)3' HBV02, основной циркулирующий метаболит с эффективностью, равной HBV02, образуется в результате потери одного нуклеотида с 3'-конца антисмысловой цепи HBV02.

На фигурах 15A и 15B показаны зависимости концентрации в плазме от времени для HBV02 и AS(N-1)3' HBV02, соответственно, после однократной подкожной дозы здоровые добровольцы. HBV02 показало линейную кинетику в плазме после подкожной инъекции. HBV02 поглощался после подкожной инъекции со средней T_{max} 4-8 часов. HBV02 нельзя было измерить в плазме через 48 часов ни у одного субъекта, что согласуется с быстрым GalNAc-опосредованным поглощением печенью; средний кажущийся период полувыведения ($t_{1/2}$) колебался от 2,85 до 5,71 часа. Короткий период полужизни в плазме, вероятно, представляет собой период полураспределения (смотри see Agarwal S, et al., Clin Pharmacol Ther. 2020 Jan 29, doi: 10.1002/cpt.1802). Наблюдали быстрое превращение HBV02 в метаболит (N-1)3', называемый AS(N-1)3' HBV02. AS(N-1)3' HBV02 имел медианное значение T_{max} 2-10 часов, определялся количественно только при дозах ≥ 100 мг и имел концентрации, как правило, в ~ 10 раз ниже по сравнению с HBV02.

Экспозиции HBV02 в плазме (AUC_{0-12} и C_{max}), по-видимому, увеличивались пропорционально дозе вплоть до 200 мг и демонстрировали немного большее, чем пропорциональное дозе увеличение при дозах выше 200 мг (фигура 16; фигура 17; таблица 15). После однократного подкожного введения HBV02 от 50 до 900 мг площадь под кривой плазмы (AUC_{last}) и средние максимальные концентрации (C_{max}) увеличивались с увеличением дозы со средними экспозициями в диапазоне от 786 до 74700 нг*ч/мл и от 77,8 до 6010 нг/мл, соответственно. Аналогичную тенденцию наблюдали для AS(N-1)3' HBV02. Данные результаты указывают на временное насыщение опосредованного ASGPR поглощения HBV02 печенью, что приводит к более высоким циркулирующим концентрациям при более высоких дозах (смотри Agarwal et al., 2020, выше).

Таблица 15. Кратное изменение между экспозицией HBV02 в плазме и дозой.

Диапазон доз	Кратное изменение	AUC_{0-12}	C_{max}
50–200 мг	4	4,57	4,59

200–900 мг	4,5	8,08	7,05
------------	-----	------	------

Вариабельность PK параметров плазмы HBV02 среди пациентов была в целом низкой (~ 30%).

Наиболее распространенный активный метаболит (~12%), AS(N-1)3' HBV02, является равно эффективным HBV02. AS(N-1)3' HBV02 обнаруживали в плазме у 0/6 субъектов при 50 мг, 3/6 субъектов при 100 мг и у всех субъектов при 200, 400, 600 и 900 мг. PK профиль метаболита был аналогичен HBV02 со значениями AUC_{last} и C_{max} AS(N-1)3' HBV02 в плазме ≤11% HBV02.

AUC₀₋₁₂ и C_{max} AS(N-1)3' HBV02 в плазме составляли ≤11% суммарных веществ, связанных с лекарственным средством.

Сводная информация о PK параметрах плазмы для HBV02 и AS(N-1)3' HBV02, наблюдаемых после однократной подкожной дозы у здоровых добровольцев, показана на фигуре 18.

Профили концентрации в моче в зависимости от времени для HBV02 и AS(N-1)3' HBV02 показаны на фигурах 19А и 19В, соответственно. Низкие концентрации HBV02 и AS(N-1)3' HBV02 были обнаружены в моче до последней измеренной временной точки через 1 неделю после введения дозы во всех группах. PK профиль HBV02 в моче отражал профиль PK в плазме, где его можно было рассчитать.

Сводка PK параметров мочи для HBV02 и AS(N-1)3' HBV02 у здоровых добровольцев представлена на Фигура 20. Выведено приблизительно 17-46% и 2-7% введенной дозы (50-900 мг) в моче в неизменном виде HBV02 и AS(N-1)3' HBV02, соответственно, в течение первых 24 часов. Доля HBV02, выделяемая с мочой в течение 24 часов после введения дозы, увеличивалась с увеличением уровня дозы. Вероятно, это произошло из-за того, что скорость поглощения HBV02 печенью ASGPR намного превышает почечную элиминацию (смотри Agarwal et. Al, 2020, выше) и отражает большее, чем пропорциональное дозе увеличение HBV02 в плазме. Почечный клиренс HBV02 приблизился к скорости клубочковой фильтрации.

Данные предварительные данные показывают, что HBV02 продемонстрировал подходящие PK свойства на здоровых добровольцах.

vii. Эффективность-результаты частей В и С

Предварительные данные получали в В и С на основании данных о 24 пациентах с хроническим ВГВ на NRTI, которые получали HBV02; и 8 пациентов с хронической ВГВ на NRTI, которые получали плацебо. Первоначальные данные продемонстрировали существенное снижение HBsAg у пациентов в дозах от 20 мг до 200 мг.

Биологическую активность HBV02 оценивали по снижению HBsAg. Активность HBV02 до 16 недели в 200 мг группах части В, HBeAg-отрицательных, и части С, HBeAg-положительных, показана на фигурах 21А и 21В. Для частей В и С средние базовые уровни HBsAg составляли 3,3 log₁₀ МЕ/мл и 3,9 log₁₀ МЕ/мл, соответственно. Среднее снижение HBsAg у HBeAg-отрицательных и HBeAg-положительных субъектов на 16

неделе составило $1,5 \log_{10}$, или приблизительно 32-кратное снижение. Снижение, наблюдаемое для HBsAg, на 16 неделе было в диапазоне от $0,97 \log_{10}$ до $2,2 \log_{10}$, или приблизительно от девяти до 160-кратное снижение после введения двух доз HBV02 по 200 мг с интервалом в четыре недели. Средний уровень HBsAg на 16 неделе составил 314 МЕ/мл, при этом половина пациентов достигло значений HBsAg <100 МЕ/мл и 5/6 достигло значений HBsAg <1000 МЕ/мл.

Изменение HBsAg относительно исходного значения до 16-й недели в зависимости от дозы показано на фигуре 22. Процент пациентов с уровнем HBsAg <100 МЕ/мл на 24-й неделе составлял 33% для пациентов, получавших 20 мг HBV02, 44% для пациентов, получавших 50 мг HBV02, 50% для пациентов, получающих 100 мг HBV02, и 50% для пациентов, получающих 200 мг HBV02. Индивидуальное максимальное изменение HBsAg относительно исходного значения показано на фигуре 23. Аналогичное снижение наблюдали у HBeAg-положительных и HBeAg-отрицательных пациентов.

На 24 неделе среднее изменение HBsAg, наблюдаемое у пациентов, которым вводили HBV02 в дозах 20 мг, 50 мг, 100 мг и 200 мг, составило $-0,76 \log_{10}$, $-0,93 \log_{10}$, $-1,23 \log_{10}$ и $-1,43 \log_{10}$, соответственно. Все 6 пациентов, получавших 2 дозы по 200 мг, достигали $\geq 1,0 \log_{10}$ снижения HBsAg. Индивидуальное изменение HBsAg относительно исходного значения на 24 неделе показано на фигуре 24, что указывает на дозозависимую устойчивость снижения HBsAg. Данные результаты показывают, что HBV02 хорошо переносится, без каких-либо признаков нарушения безопасности. Дозозависимые снижения HBsAg у HBeAg-отрицательных и HBeAg-положительных пациентов наблюдали в диапазоне доз от 20 до 200 мг HBV02 (введены 2 дозы), которые сохранялись при более высоких дозах, по меньшей мере, в течение 6 месяцев. Аналогичные снижения HBsAg наблюдали как у HBeAg-отрицательных, так и у HBeAg-положительных пациентов, демонстрируя, что HBV02 может снижать HBsAg у пациентов, независимо от стадии их заболевания. Все пациенты, получившие 2 дозы по 200 мг, достигли ≥ 1 - \log_{10} снижения HBsAg, и на 24-й неделе среднее снижение HBsAg составило $-1,43 \log_{10}$. В целом, данные результаты подтверждают потенциал HBV02 в качестве основы для конечной схемы лечения, направленной на функциональное излечение хронической ВГВ инфекции. В частности, способность HBV02 приводить к значительному снижению HBsAg уже после двух доз предполагает, что HBV02 потенциально может играть важную роль в функциональном излечении хронического ВГВ.

Хотя конкретные варианты осуществления проиллюстрированы и описаны, легко понять, что различные варианты осуществления, описанные выше, можно объединить, чтобы предоставить дополнительные варианты осуществления, и что в них могут быть внесены различные изменения, не выходящие за рамки сущности и объема настоящего изобретения.

Все патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на патенты США, зарубежные патенты, заявки на иностранные патенты и непатентные публикации, упомянутые в настоящем изобретении или перечисленные в таблице данных заявки,

включая предварительные заявки на патент США № 62/846927, поданную 13 мая 2019 г., 62/893646, поданную 29 августа 2019 г., 62/992785, поданную 20 марта 2020 г., 62/994177, поданную 24 марта 2020 г., и 63/009910, поданную 14 апреля 2020 г., включены в настоящее изобретение с помощью ссылки в их целостность, если явно не указано иное. Аспекты вариантов осуществления можно изменять, если необходимо использовать концепции различных патентов, заявок и публикаций, чтобы предоставить еще дополнительные варианты осуществления.

Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты осуществления в свете вышеприведенного подробного описания. В общем, в следующей формуле изобретения применяемые термины не должны толковаться как ограничение формулы конкретными вариантами осуществления, описанными в описании и формуле изобретения, но должны толковаться как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, для которых формула изобретения является основанием. Соответственно, формула изобретения не ограничивается настоящим изобретением.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения хронической инфекции ВГВ у нуждающегося субъекта, включающий: введение субъекту миРНК, где миРНК содержит смысловую цепь, содержащую 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:6),

где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf, и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой аденозин-гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA);

s представляет собой фосфортиоатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролин.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий введение субъекту пегилированного интерферона-альфа (PEG-IFN α).

3. Способ по п.2, где миРНК и PEG-IFN α вводят пациенту в течение того же периода времени.

4. Способ по п.2-3, где миРНК вводят субъекту в течение периода времени перед введением субъекту PEG-IFN α .

5. Способ по п.2-3, где PEG-IFN α вводят субъекту в течение периода времени перед введением субъекту миРНК.

6. Способ по п.1, где субъекту вводят PEG-IFN α перед введением миРНК.

7. Способ по п.1 или 6, где субъекту вводят PEG-IFN α в течение того же периода времени, в течение которого субъекту вводят миРНК.

8. Способ по п.1, 6 или 7, где субъекту затем вводят PEG-IFN α .

9. Способ по любому из пп. 1-8, дополнительно включающий введение субъекту нуклеозидного/нуклеотидного ингибитора обратной транскриптазы (NRTI).

10. Способ по любому из пп. 1-8, где субъекту вводят NRTI перед введением миРНК.

11. Способ по п.10, где субъекту вводят NRTI в течение по меньшей мере 2 месяцев или по меньшей мере 6 месяцев перед введением миРНК.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где субъекту вводят NRTI в течение того же периода времени, в течение которого субъекту вводят миРНК.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где субъекту затем вводят NRTI.

14. миРНК для применения в лечении хронической инфекции ВГВ у субъекта, где миРНК содержит смысловую цепь, содержащую 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:6),

где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-

метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фторадеозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой аденозин-гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA);

s представляет собой фосфориоатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол.

15. миРНК для применения по п.14, где субъекту также вводят PEG-IFN α .

16. миРНК для применения по п.15, где миРНК и PEG-IFN α вводят пациенту в течение того же периода времени.

17. миРНК для применения по п.15 или 16, где миРНК вводят субъекту в течение периода времени до введения субъекту PEG-IFN α .

18. миРНК для применения по п.15 или 16, где PEG-IFN α вводят субъекту в течение периода времени перед введением субъекту миРНК.

19. миРНК для применения по п.15 или 16, где субъекту вводят PEG-IFN α перед введением миРНК.

20. миРНК для применения по п.15, 16 или 19, где субъекту вводят PEG-IFN α в течение того же периода времени, в течение которого субъекту вводят миРНК.

21. миРНК для применения по п.15-20, где субъекту затем вводят PEG-IFN α .

22. миРНК для применения по любому из пп. 14-21, где субъекту также вводят NRTI.

23. миРНК для применения по любому из пп. 14-22, где субъекту вводят NRTI перед введением миРНК.

24. миРНК для применения по любому из пп. 14-23, где субъекту вводят NRTI в течение по меньшей мере 2 месяцев или по меньшей мере 6 месяцев перед введением миРНК.

25. миРНК для применения по любому из пп. 14-24, где субъекту вводят NRTI в течение того же периода времени, в течение которого субъекту вводят миРНК.

26. миРНК для применения по любому из пп. 14-25, где субъекту затем вводят NRTI.

27. Применение миРНК в получении лекарственного средства для лечения хронической инфекции ВГВ, где миРНК содержит смысловую цепь, содержащую 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:6),

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фторадеозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA);

s представляет собой фосфортиоатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканойл]-4-гидроксипролинол.

28. Применение миРНК и PEG-IFN α в получении лекарственного средства для лечения хронической инфекции ВГВ, где миРНК содержит смысловую цепь, содержащую 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:6),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат, и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA);

s представляет собой фосфортиоатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканойл]-4-гидроксипролинол.

29. Применение миРНК, PEG-IFN α и NRTI в получении лекарственного средства для лечения хронической инфекции ВГВ, где миРНК содержит смысловую цепь, содержащую 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:6),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат, и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA);

s представляет собой фосфортиоатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканойл]-4-гидроксипролинол.

30. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 1-29, где доза миРНК составляет 0,8 мг/кг, 1,7 мг/кг, 3,3 мг/кг, 6,7 мг/кг или 15 мг/кг.

31. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 1-30, где доза миРНК составляет 20 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 450 мг.

32. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 1-31, где миРНК вводят раз в неделю или вводят более одной дозы, причем каждая доза отделена 2, 3 или 4 неделями.

33. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 1-32, где вводят две, три, четыре, пять, шесть или более доз миРНК, причем каждая доза

отделена 1, 2, 3 или 4 неделями.

34. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 1-33, где способ включает:

(а) введение субъекту двух или более доз по меньшей мере 200 мг миРНК, содержащей смысловую цепь, содержащую 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:5), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:6),

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат, и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA);

s представляет собой фосфортиоатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол; и

(b) введение субъекту нуклеозидного/нуклеотидного ингибитора обратной транскриптазы (NRTI);

где субъект является HBeAg отрицательным или HBeAg положительным.

35. Способ, композиция для применения или применение по п.34, где способ дополнительно включает введение субъекту пегилированного интерферона-альфа (PEG-IFN α).

36. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 1-35, где вводят шесть 200-мг доз миРНК.

37. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 1-35, где вводят две 400-мг дозы миРНК.

38. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 1-37, где миРНК вводят подкожной инъекцией.

39. Способ, композиция для применения или применение по п.38, где введение миРНК включает введение 1, 2, или 3 подкожных инъекций на дозу.

40. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 2-39, где доза PEG-IFN α составляет 50 мкг, 100 мкг, 150 мкг или 200 мкг.

41. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 2-13, 15-26 и 28-40, где PEG-IFN α вводят раз в неделю.

42. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 2-13, 15-26 и 28-40, где PEG-IFN α вводят подкожной инъекцией.

43. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 9-13, 22-26 и 29-42, где NRTI представляет собой тенофовир, тенофовир дизопроксилфумарат (TDF), тенофовир алафенамид (TAF), ламивудин, адефовир, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин, AGX-1009, эмтрицитабин (FTC), клебудин, ритонавир,

дипивоксил, лобукавир, фамвир, N-ацетил-цистеин (NAC), PC1323, терадигм-ВГВ, тимозин-альфа, ганцикловир, безифовир (ANA-380/LB-80380) или тенофовир-эксалиадес (TLX/CMX157).

44. Способ, композиция для применения или применение по п.43, где NRTI представляет собой энтекавир (ETV).

45. Способ, композиция для применения или применение по п.43, где NRTI представляет собой тенофовир.

46. Способ, композиция для применения или применение по п.43, где NRTI представляет собой ламивудин.

47. Способ, композиция для применения или применение по п.43, где NRTI представляет собой адефовир или адефовир дипивоксил.

48. Способ, композиция для применения, или use по любому из пп. 1-47, где субъект является HBeAg отрицательным.

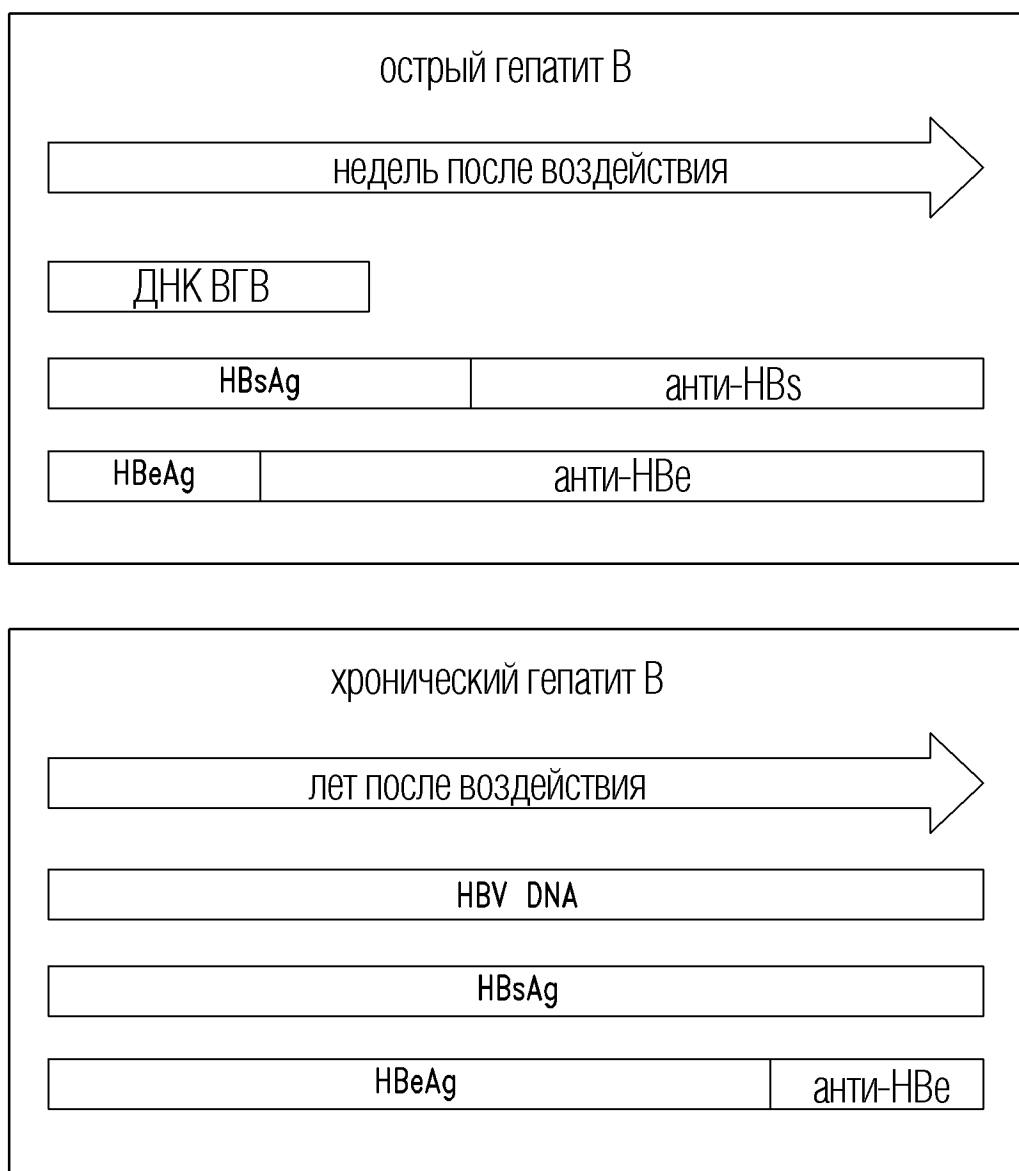
49. Способ, композиция для применения или применение по любому из пп. 1-47, где субъект является HBeAg положительным.

50. Набор, содержащий:

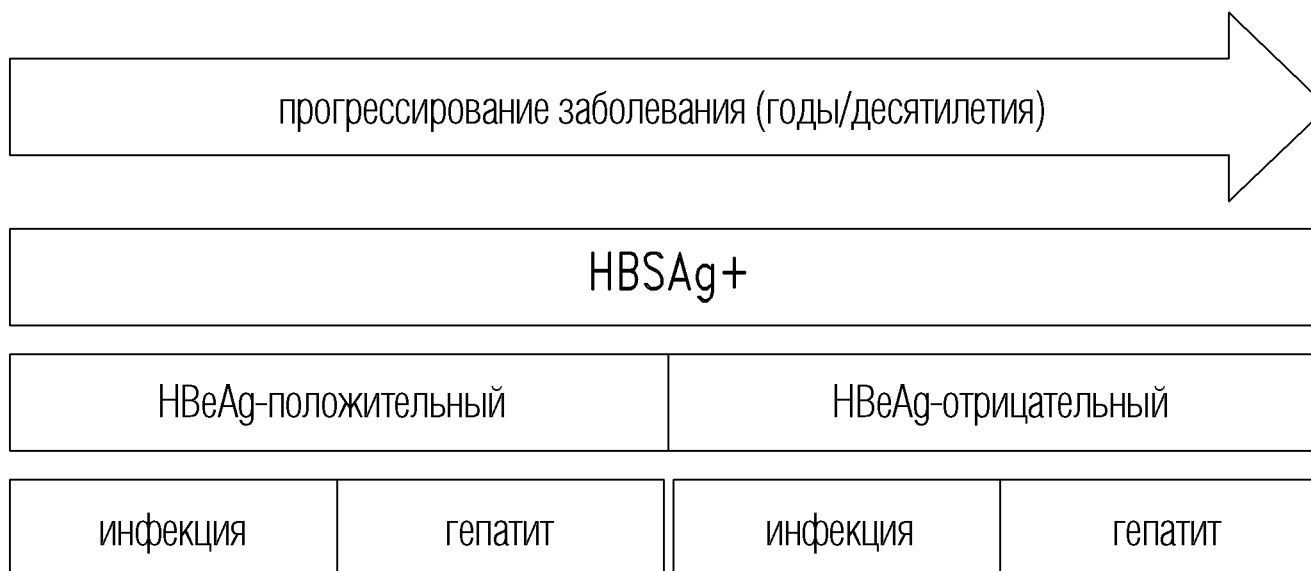
фармацевтическую композицию, содержащую миРНК по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый эксципиент; и

фармацевтическую композицию, содержащую PEG-IFN α и фармацевтически приемлемый эксципиент.

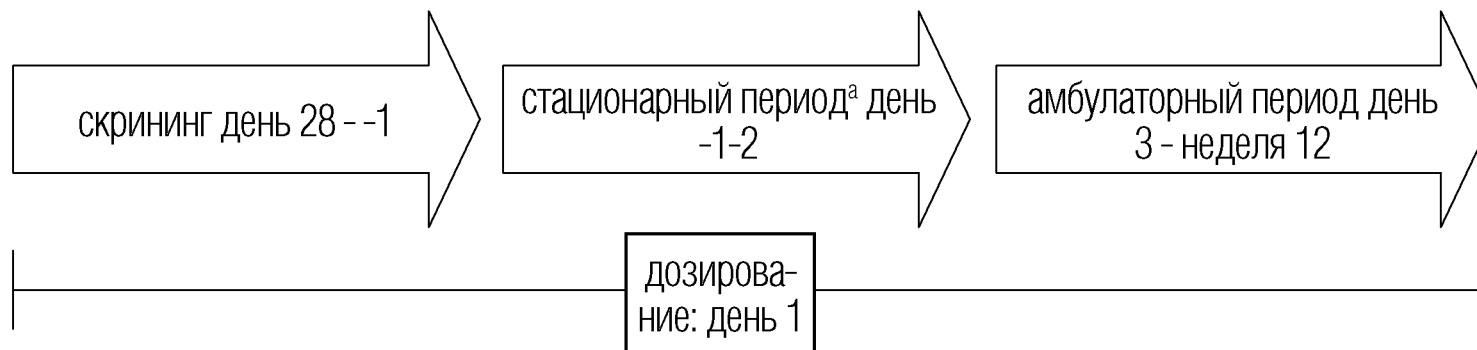
51. Набор по п.50, дополнительно содержащий NRTI и фармацевтически приемлемый эксципиент.



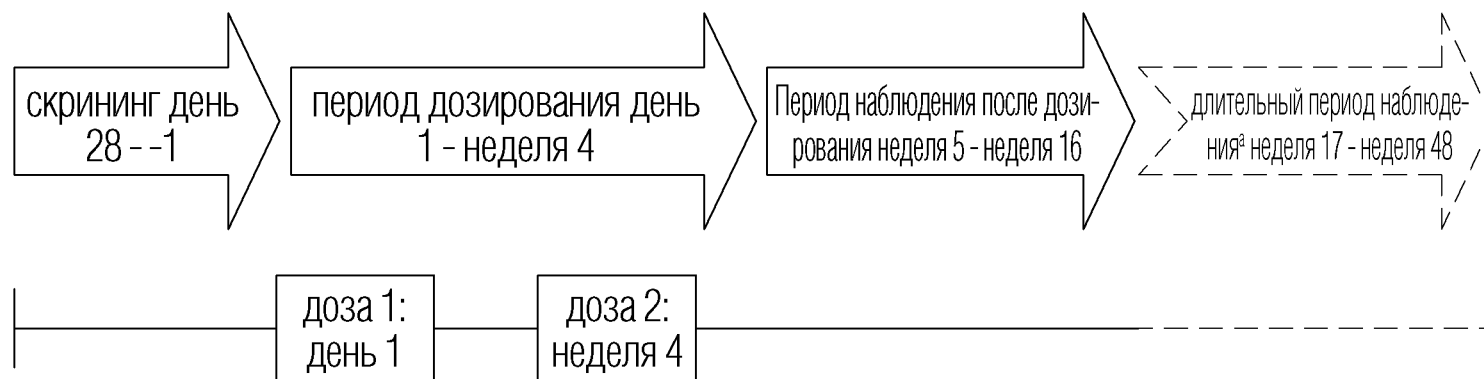
ФИГ. 1



ФИГ. 2

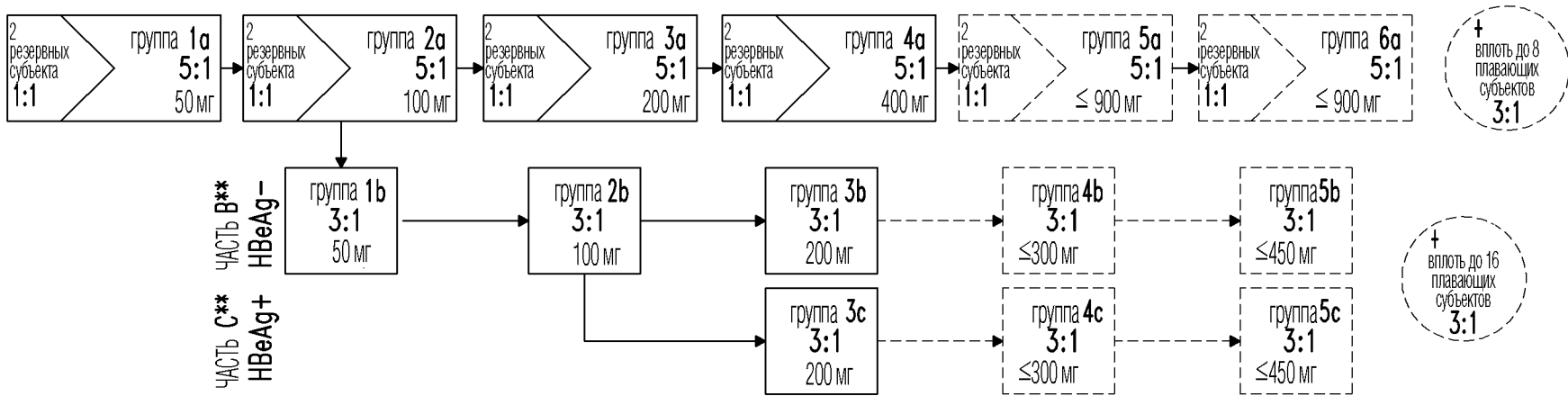


ФИГ. 3

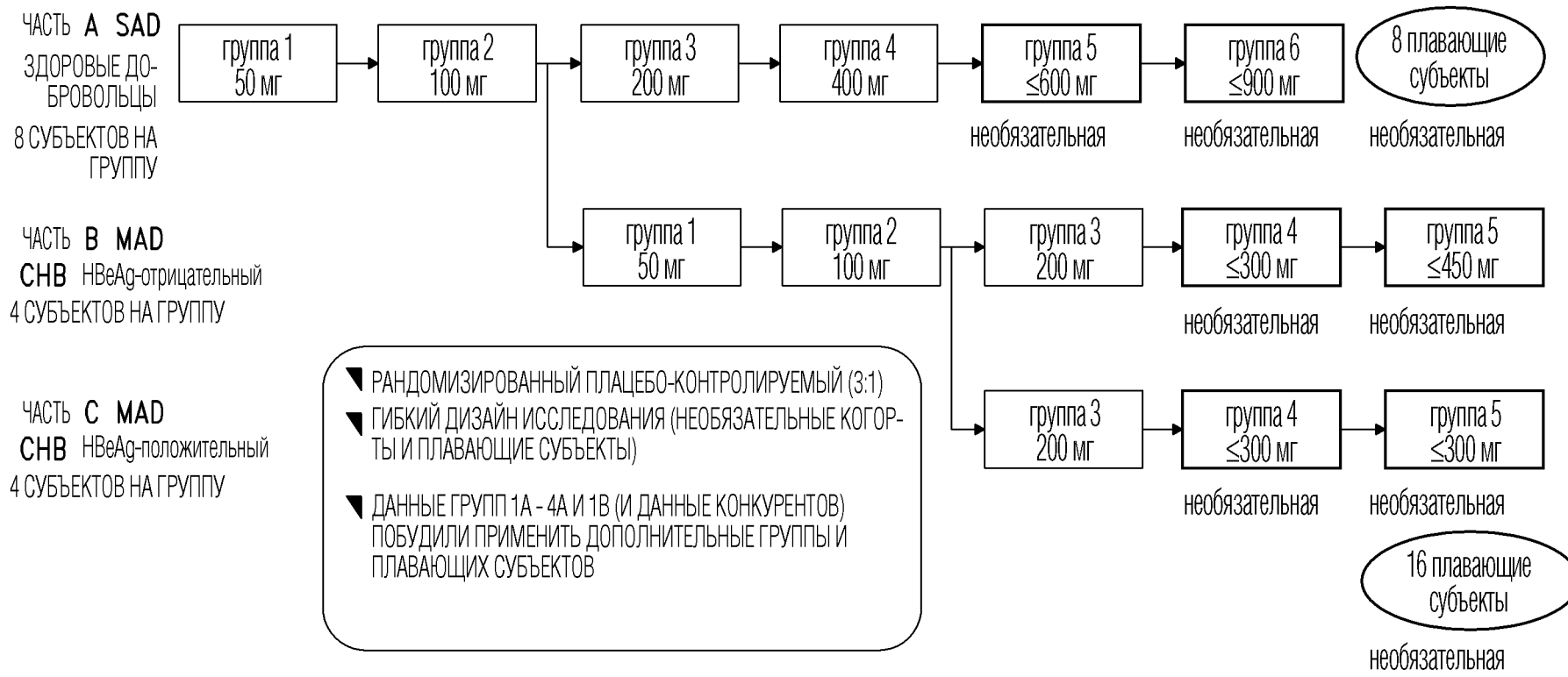


ФИГ. 4

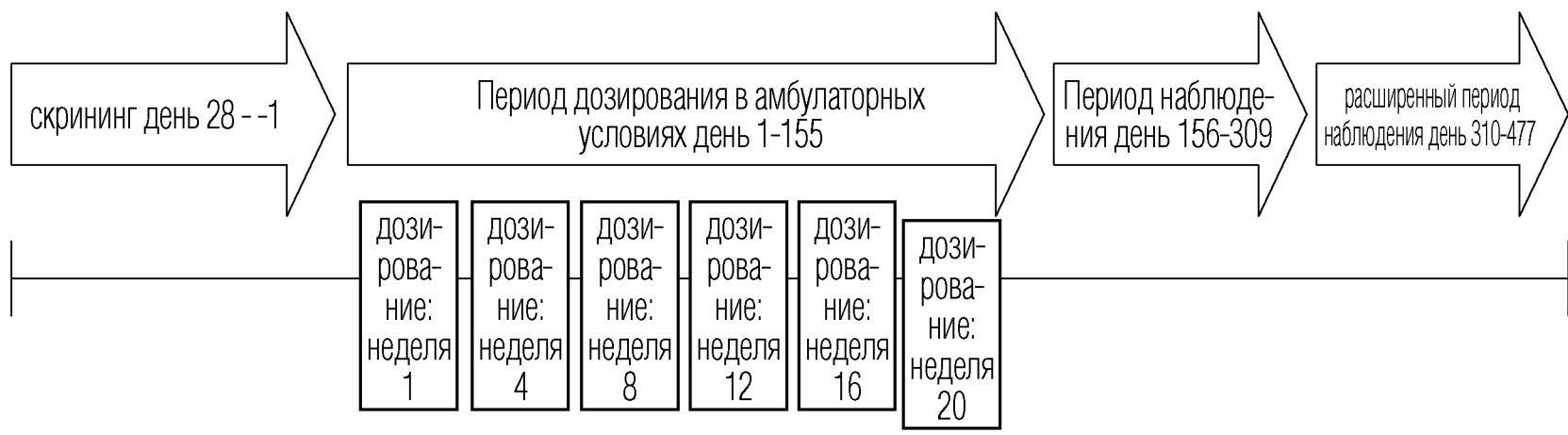
ЧАСТЬ В/С MAD (n=48*) ЧАСТЬ А SAD (n=56*)



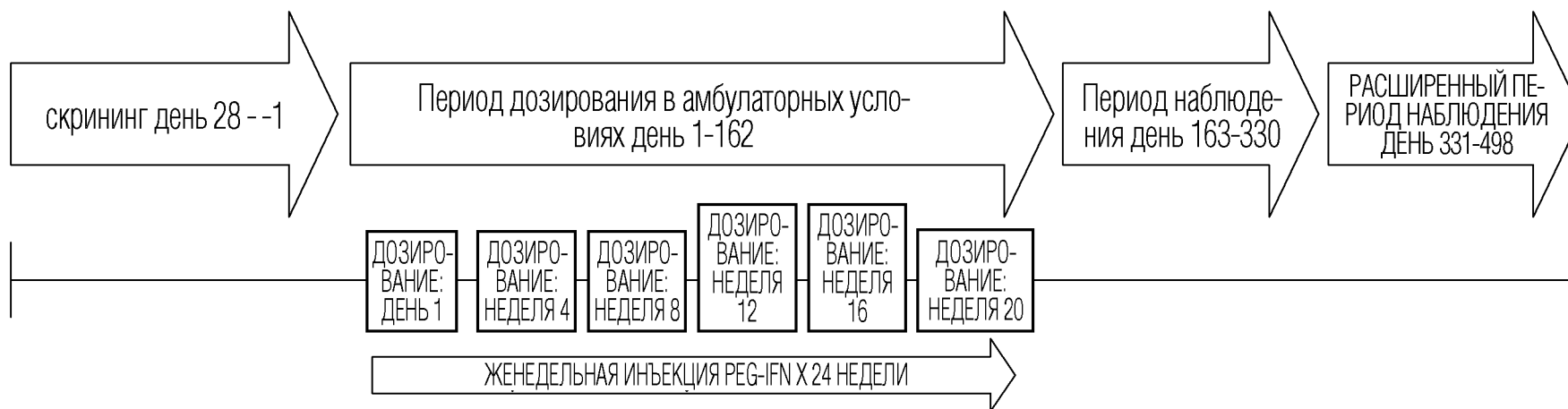
ФИГ. 5А



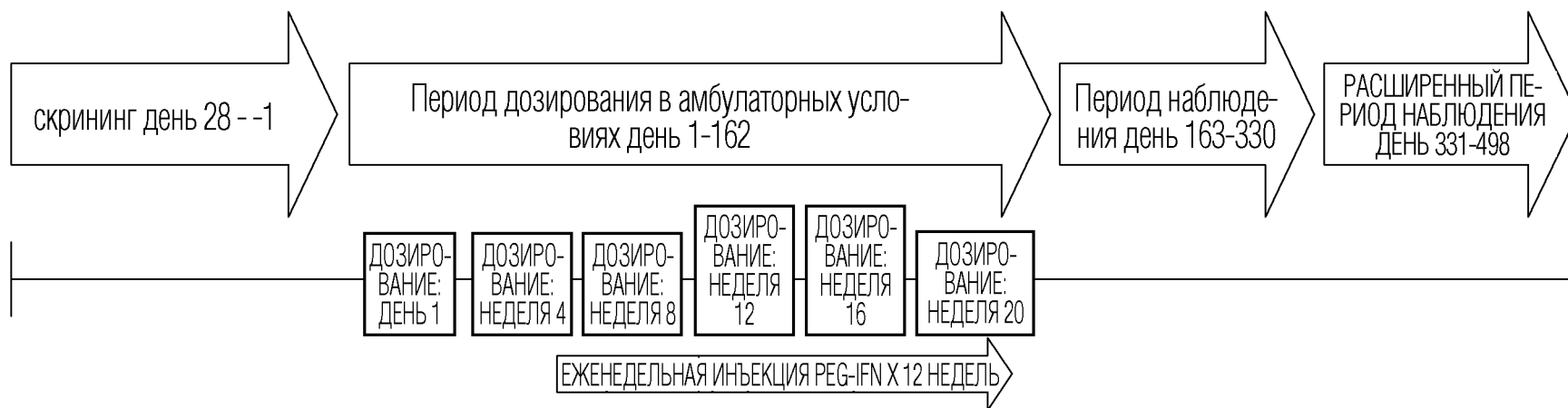
ФИГ. 5В



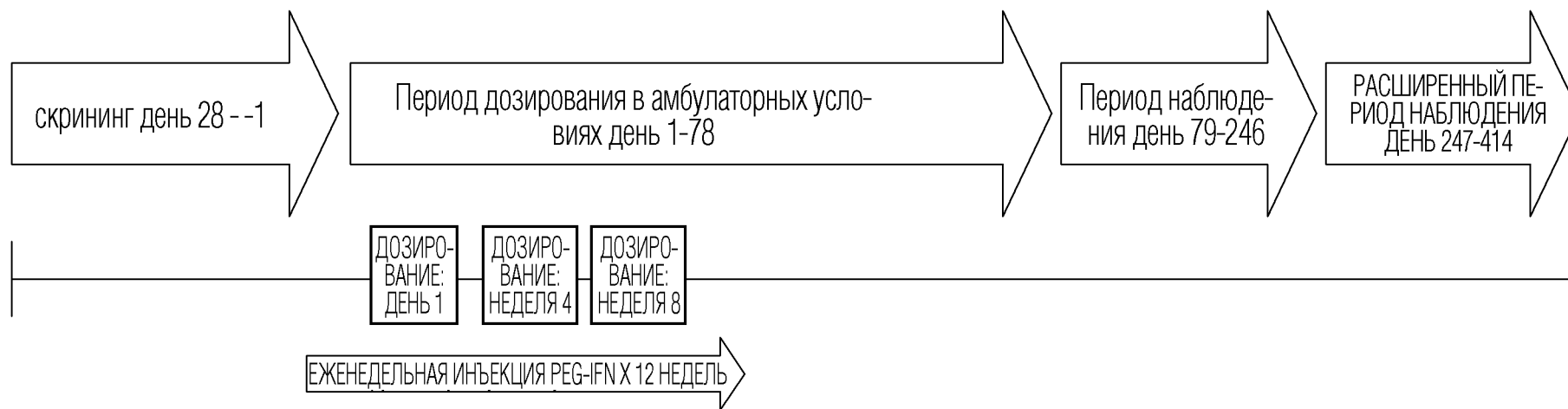
ФИГ. 6А



ФИГ. 6В

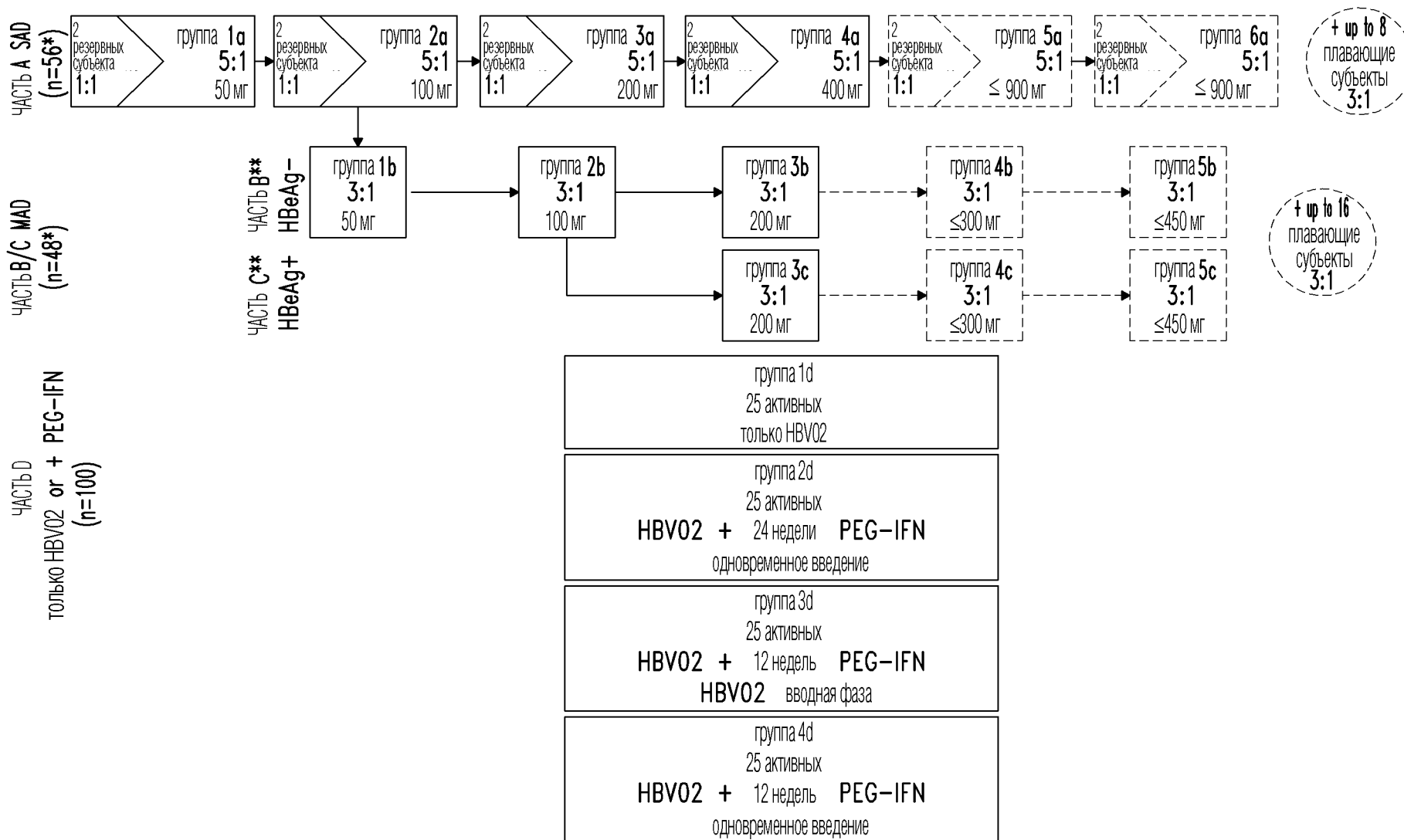


ФИГ. 6С

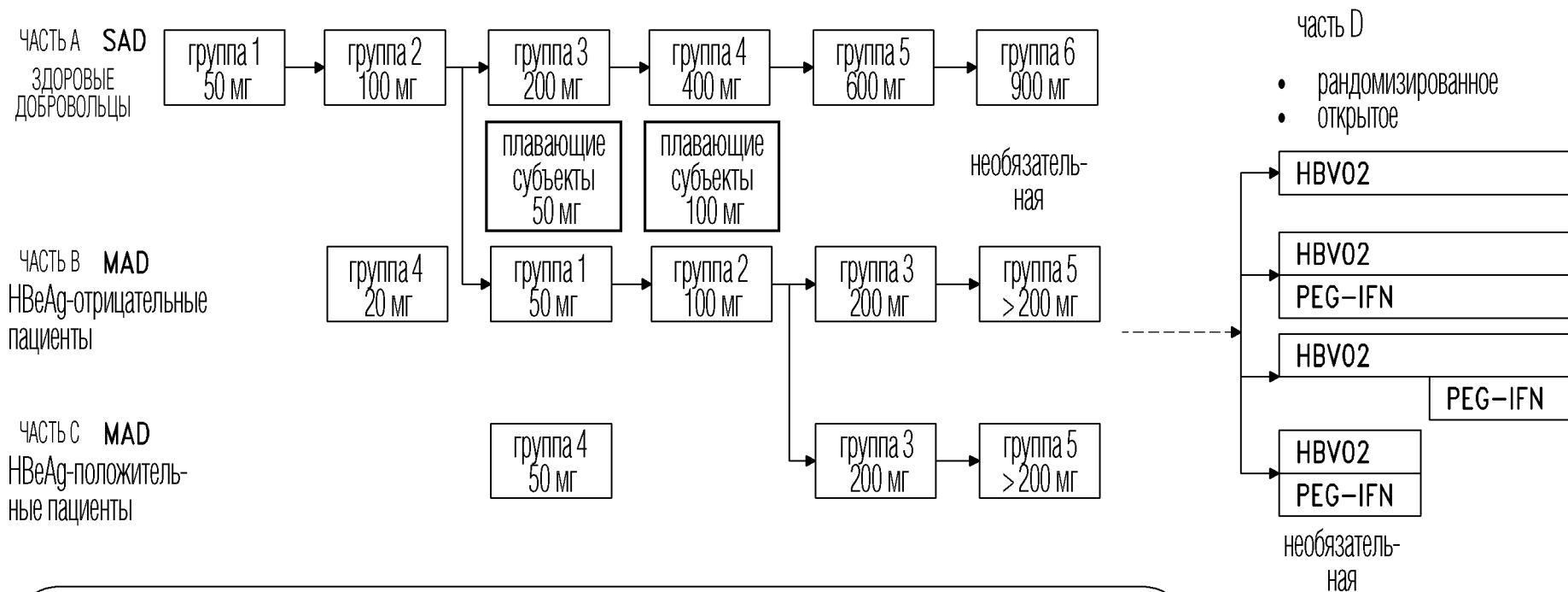


10/38

ФИГ. 6D



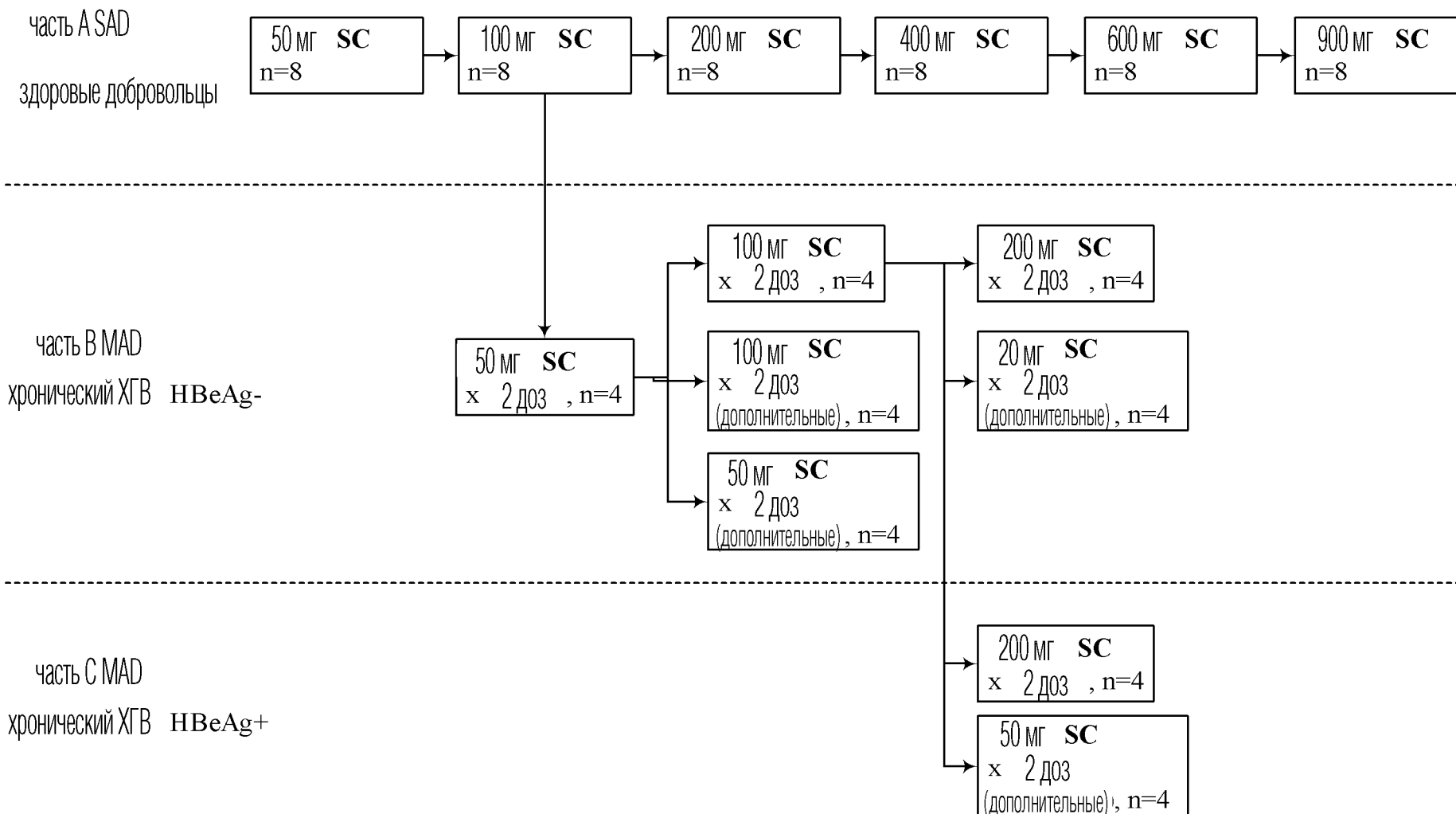
ФИГ. 7А



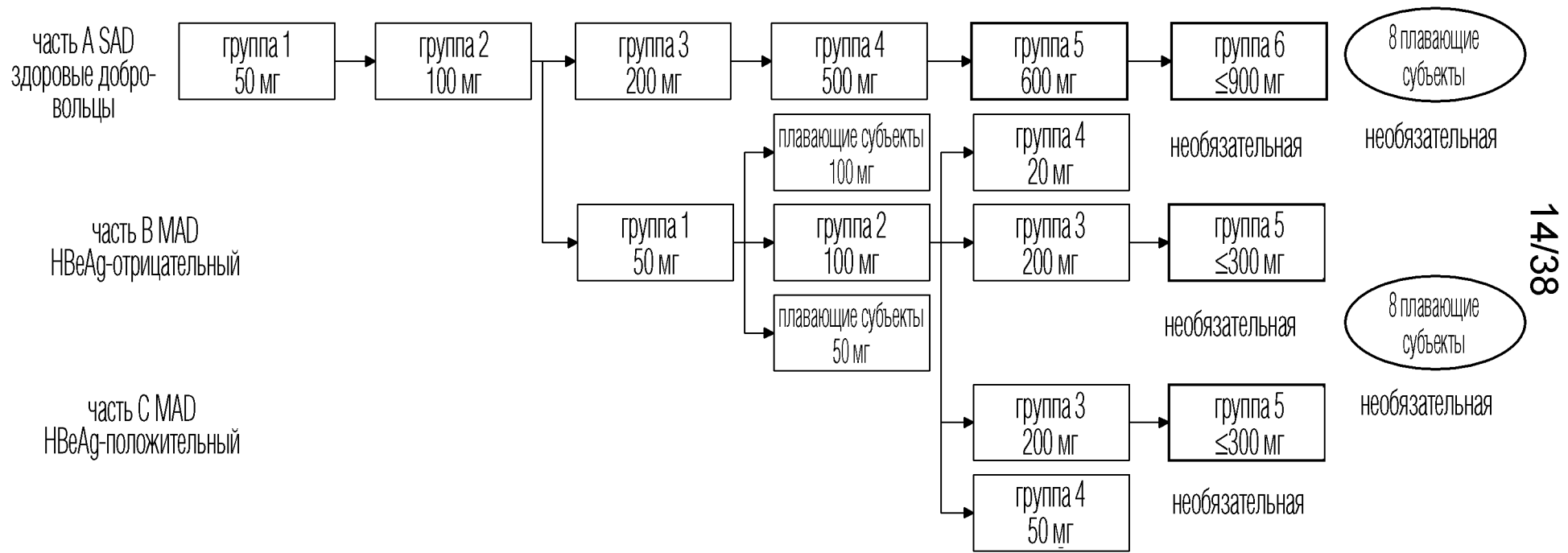
▼ часть D

- Уровень дозы HBV02 и количество доз (до 6 ежемесячных доз) будут определяться на основе данных из частей В/С
- Еженедельные подкожные инъекции PEG-IFN в течение 24 или 12 недель
- 25 субъектов/группа: пациенты с ХГВ без цирроза, принимающие NRTI
- Цель: 20 HBsAg-отрицательных и 5 HBsAg-положительных субъектов на группу

ФИГ. 7В



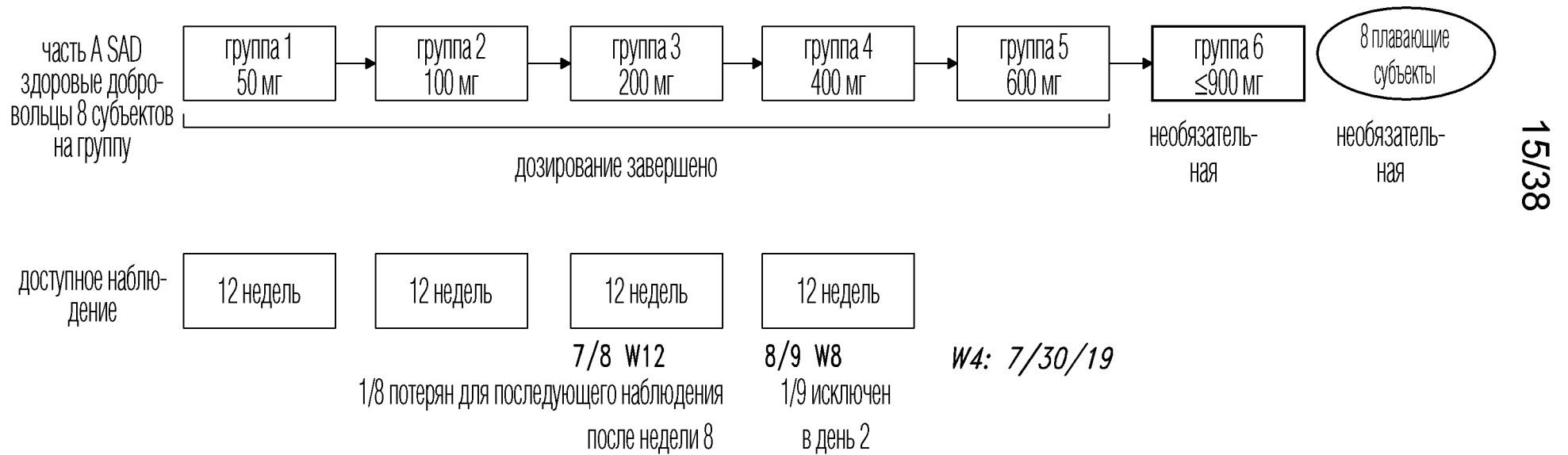
ФИГ. 8



14/38

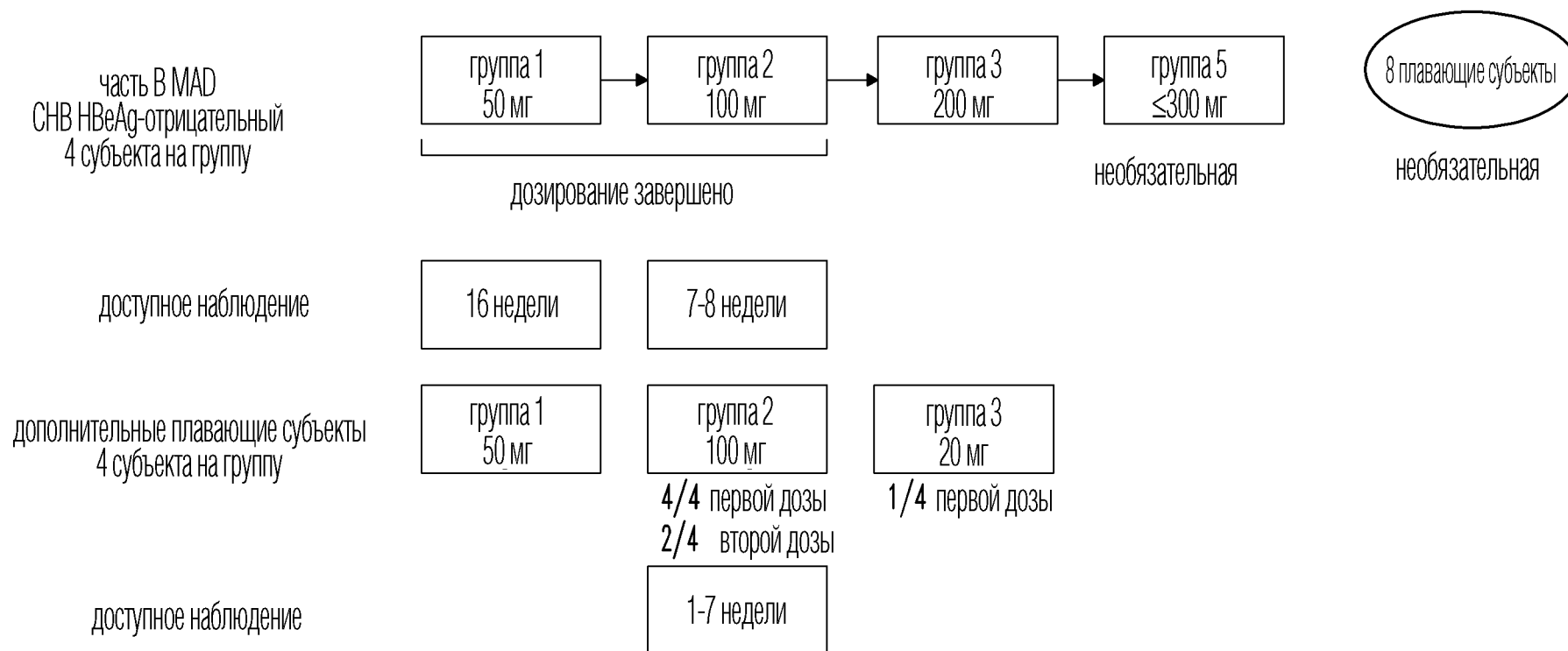
ФИГ. 9А

▼ Клинические исследования проведены в Окленде в Новой Зеландии



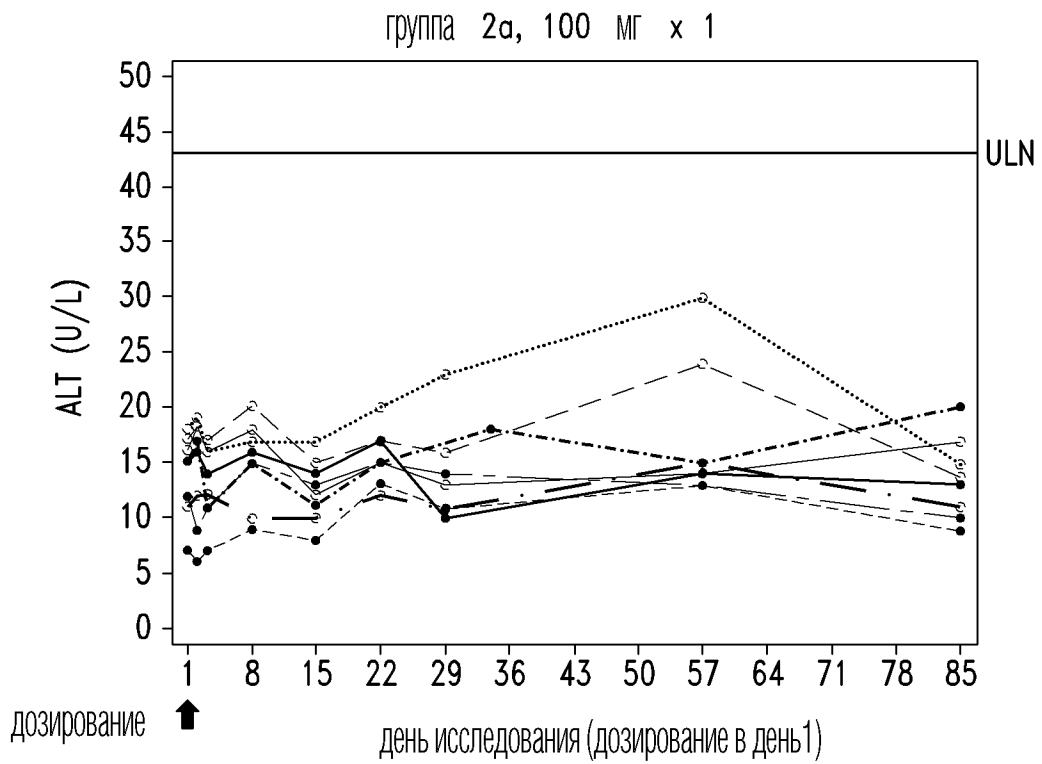
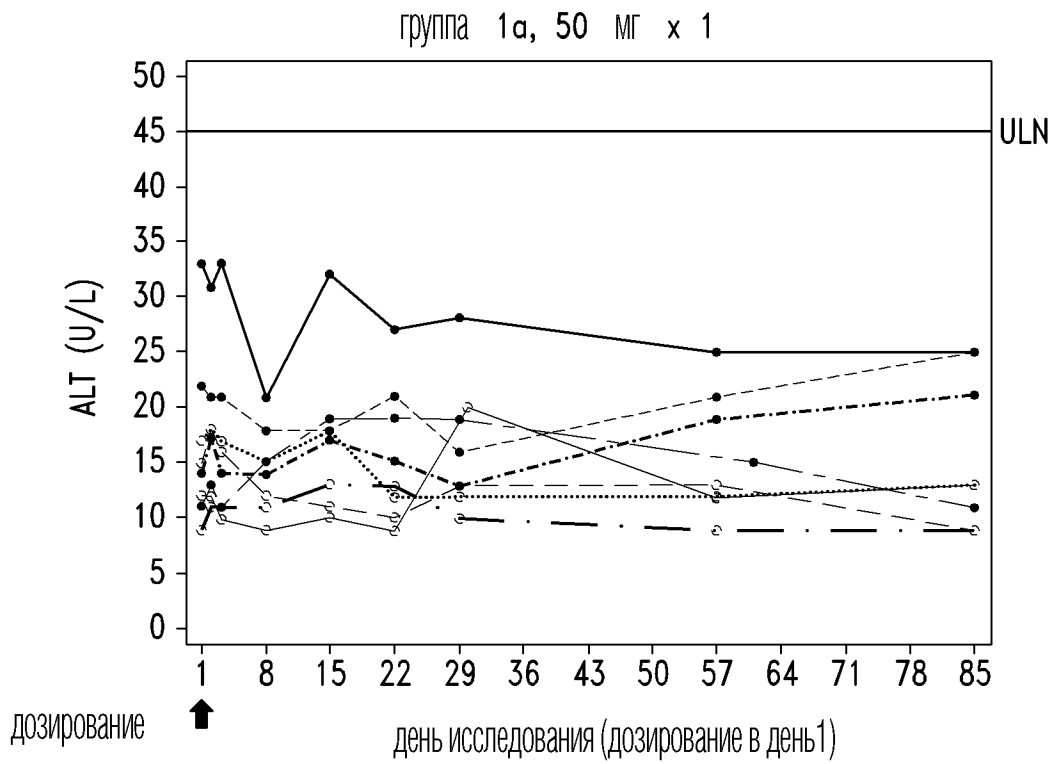
ФИГ. 9В

- Проведены в 14 местах в 5 странах: Новая Зеландия, Австралия, Гонконг, Таиланд, Южная Корея



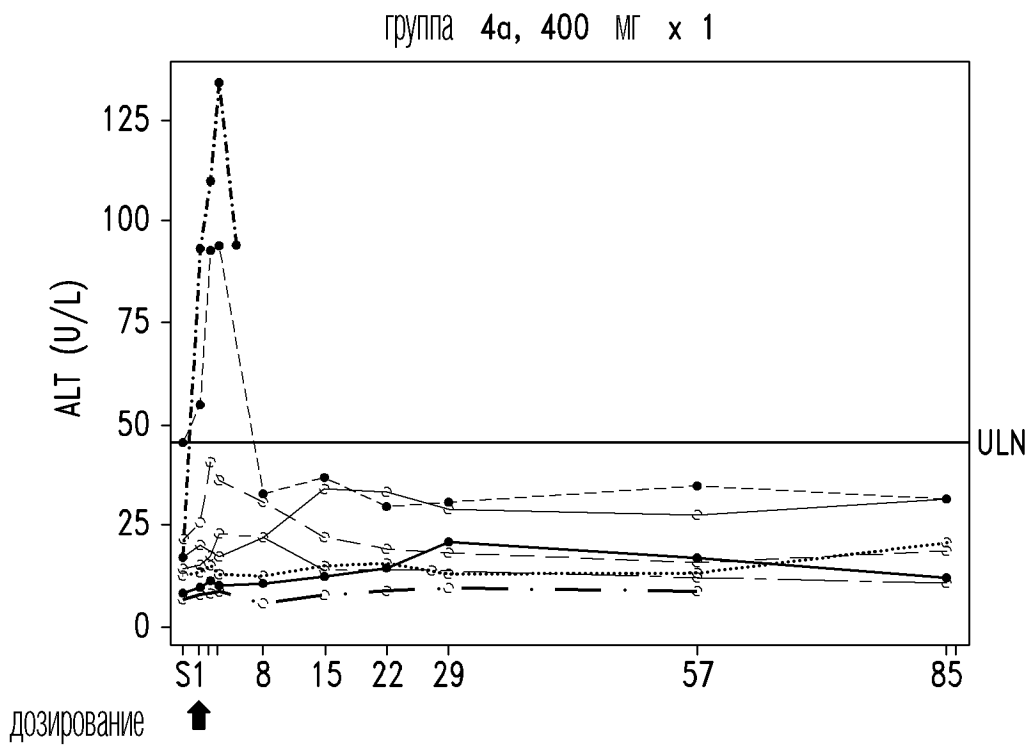
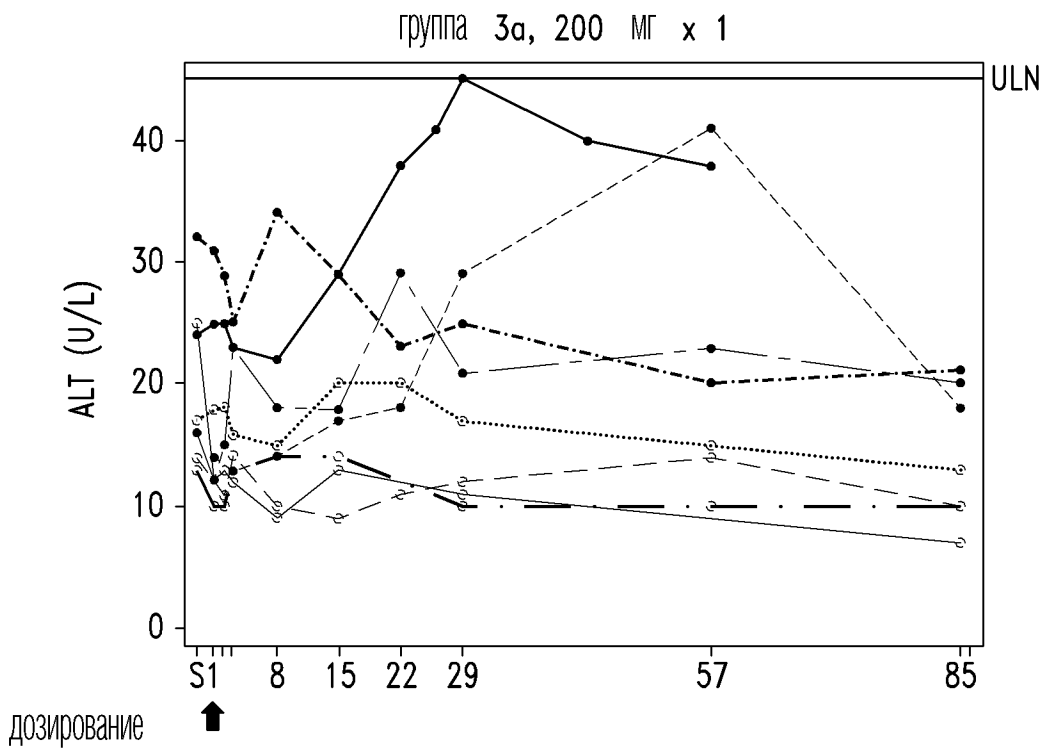
ФИГ. 9С

17/38



ФИГ. 10А

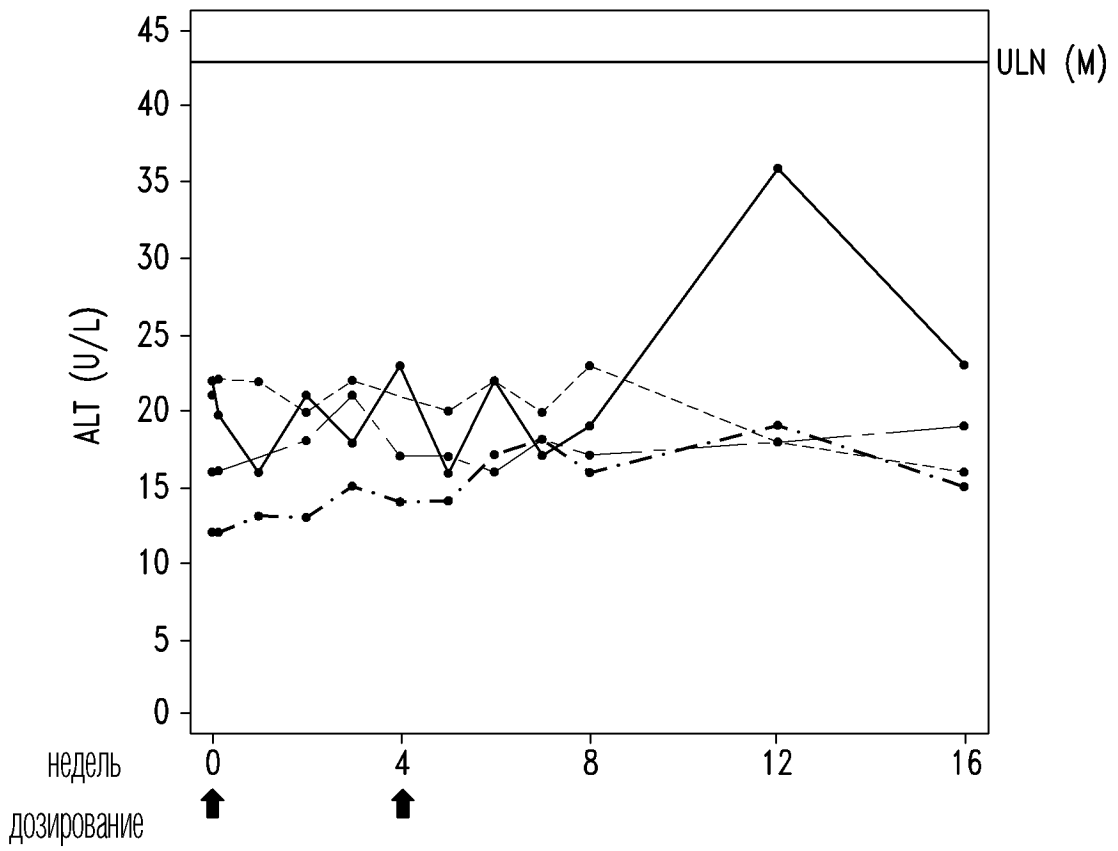
18/38



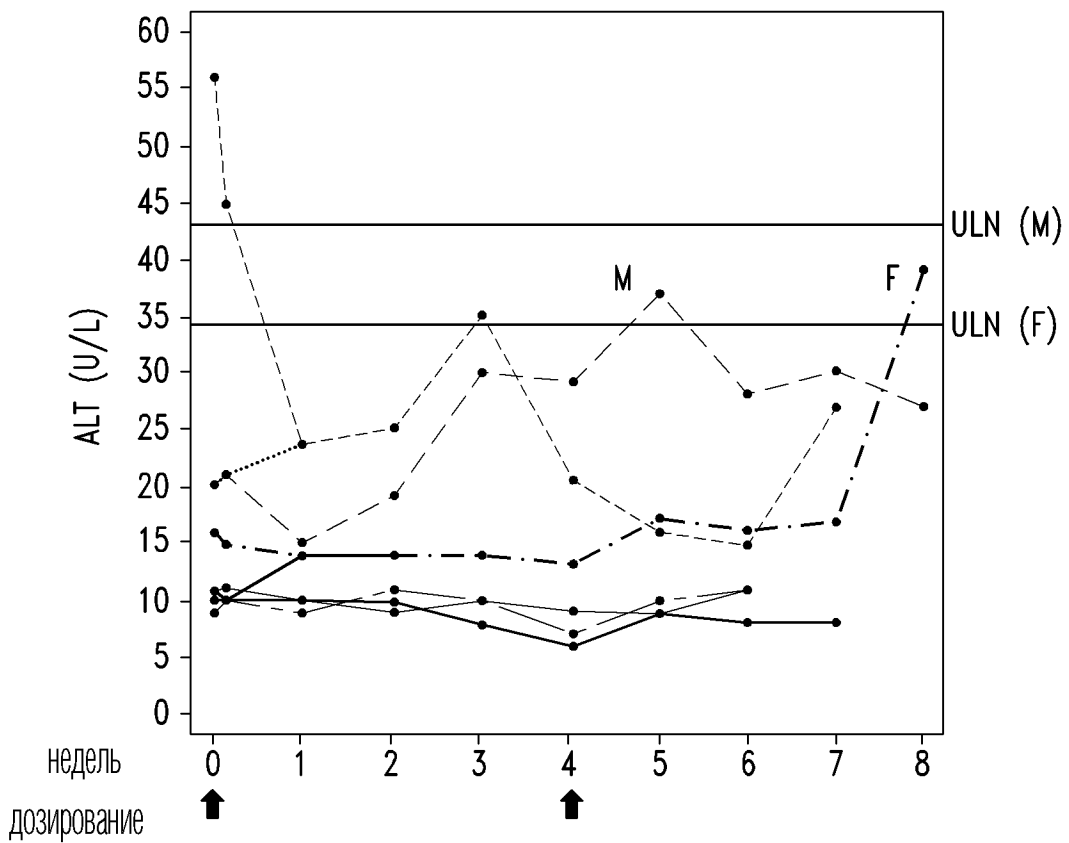
ФИГ. 10В

19/38

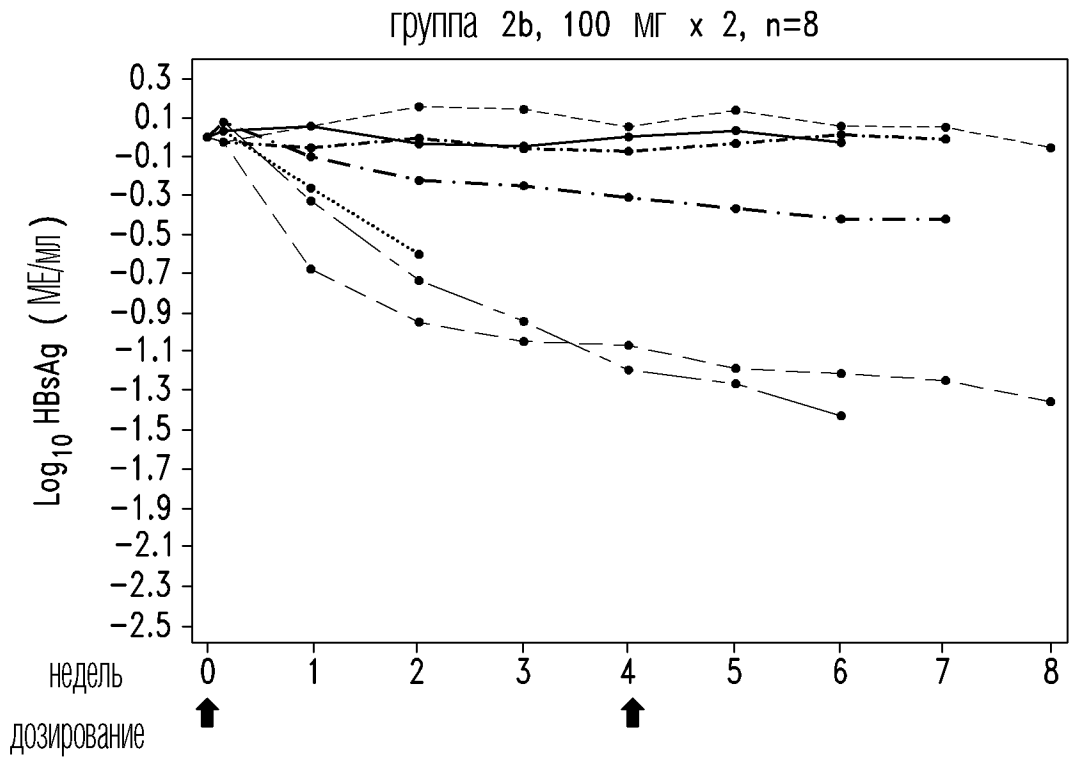
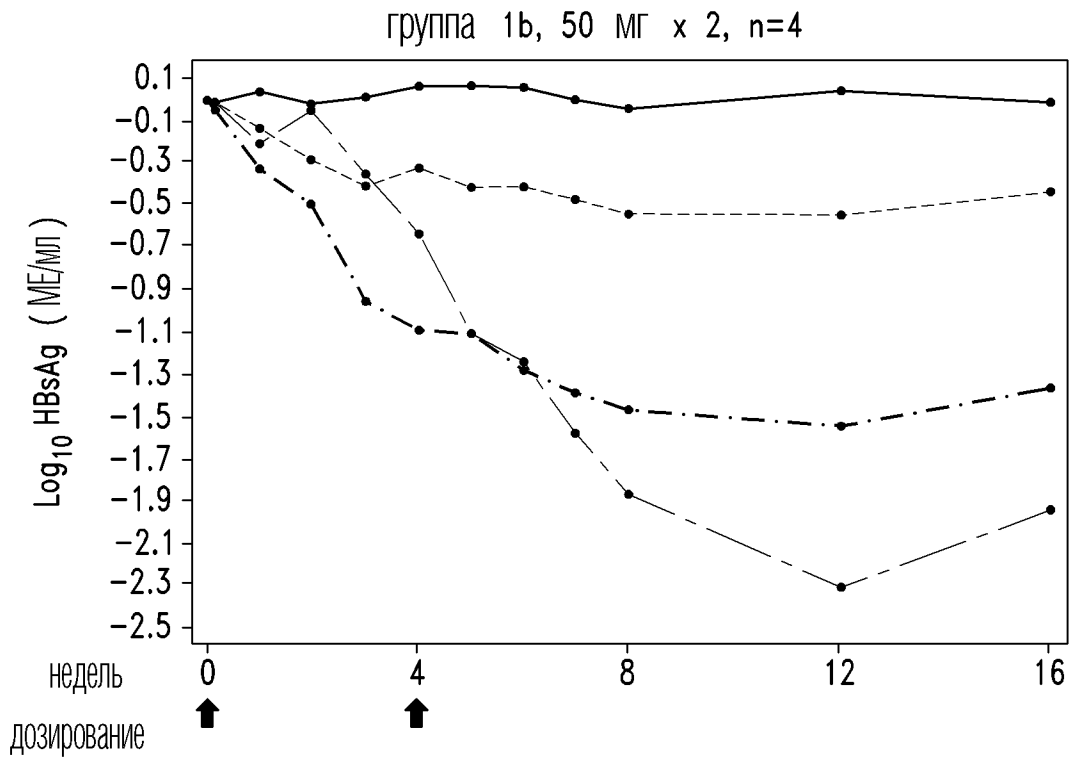
группа 1b, 50 мг x 2, n=4



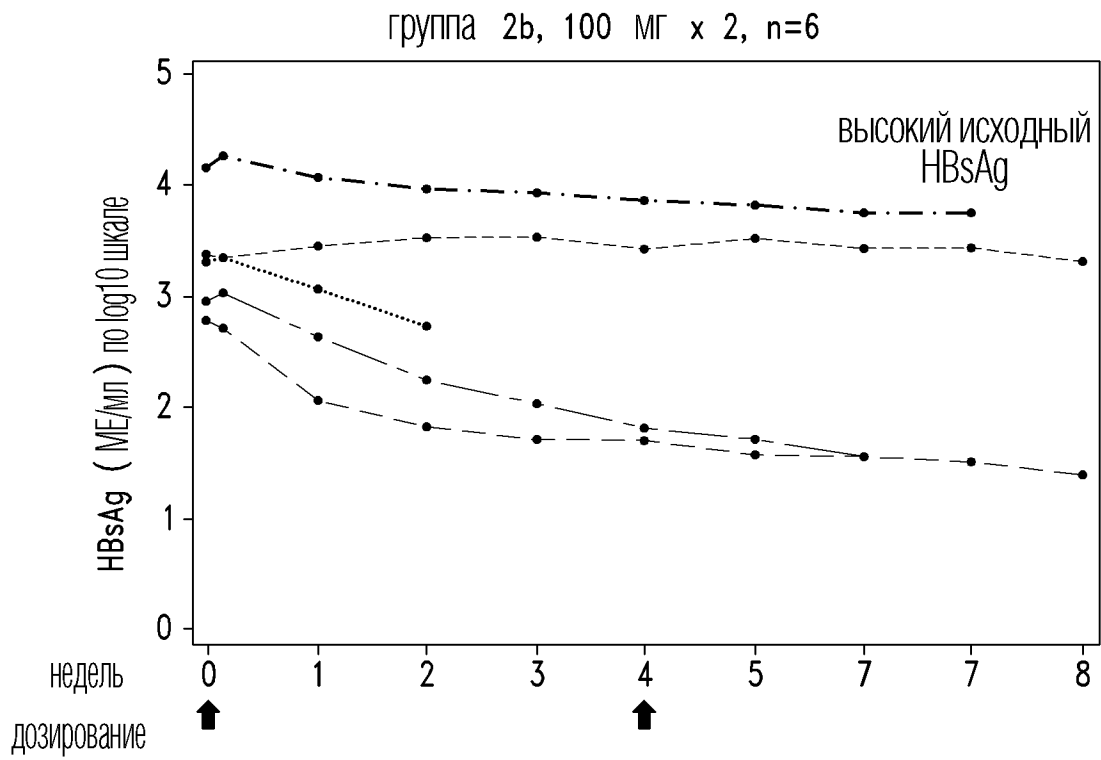
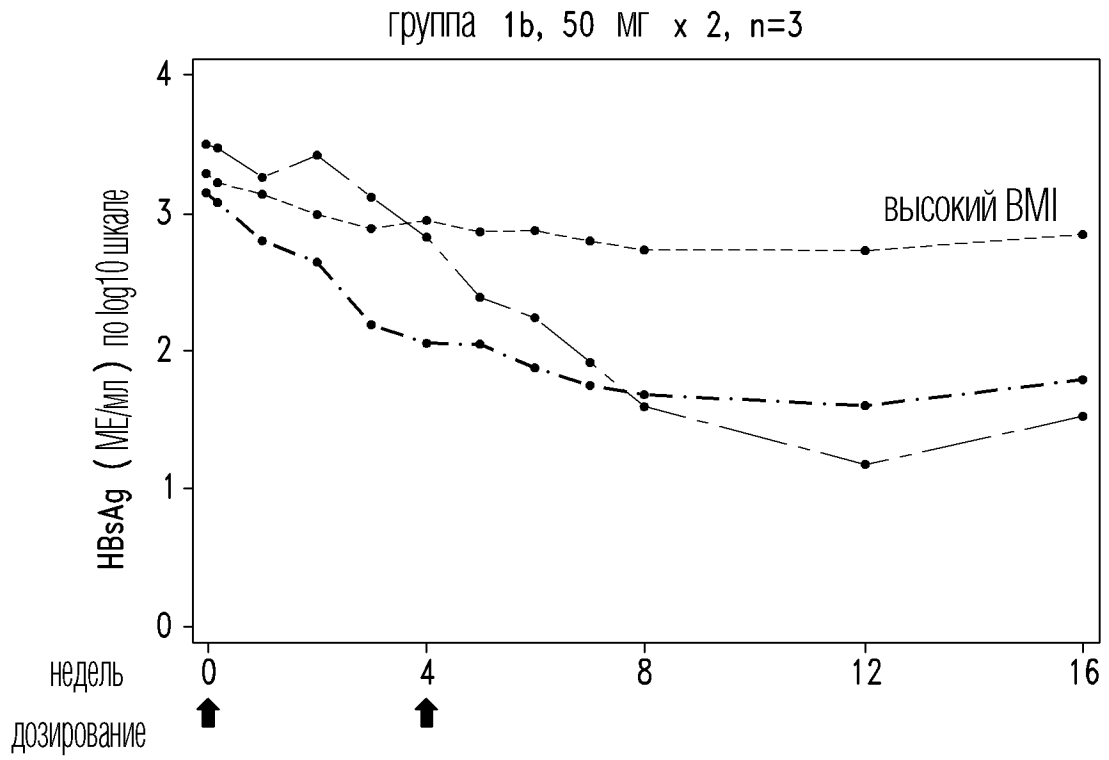
группа 2b, 100 мг x 2, n=8



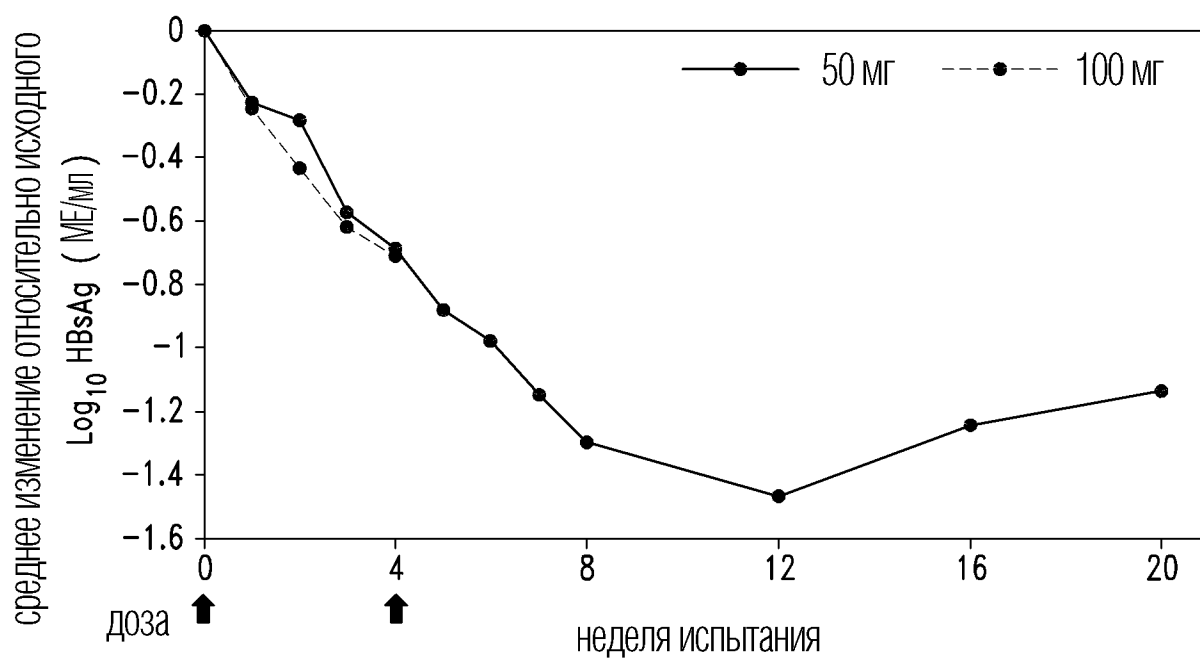
ФИГ. 11



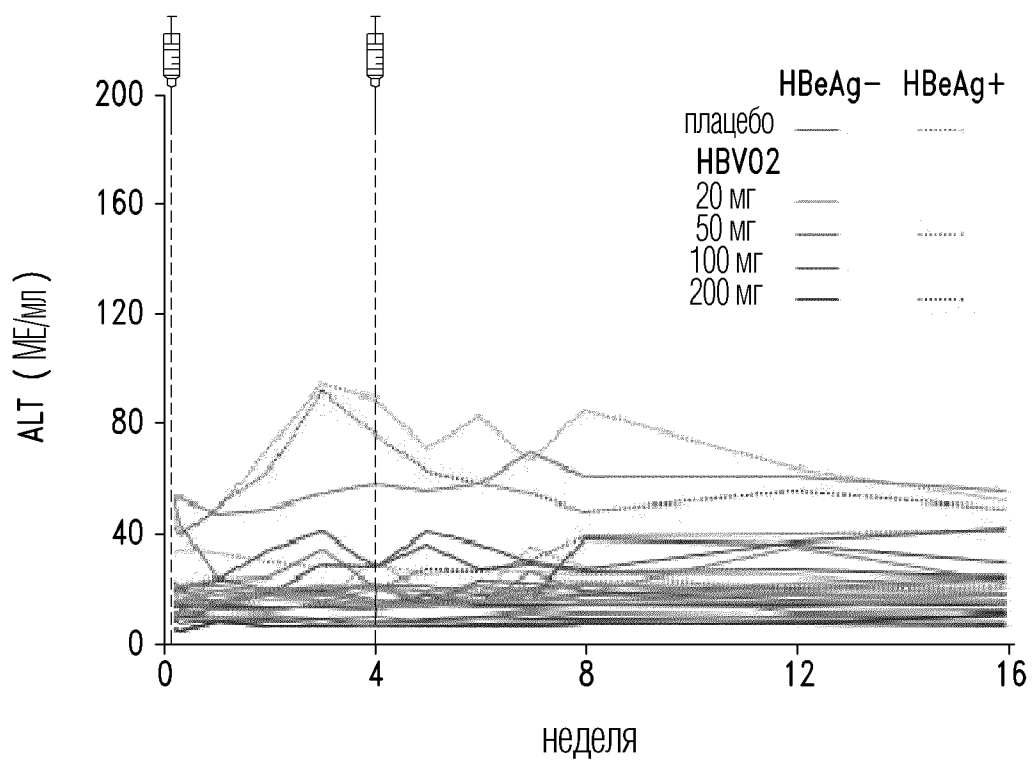
ФИГ. 12А



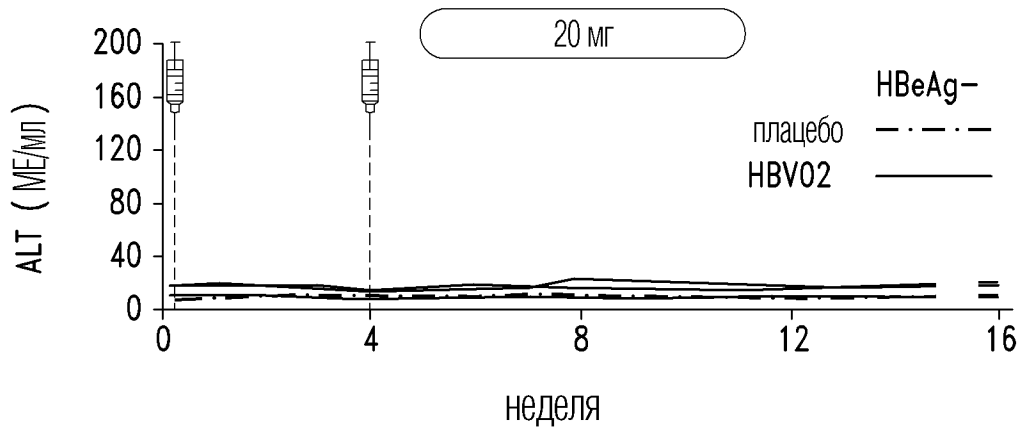
ФИГ. 12В



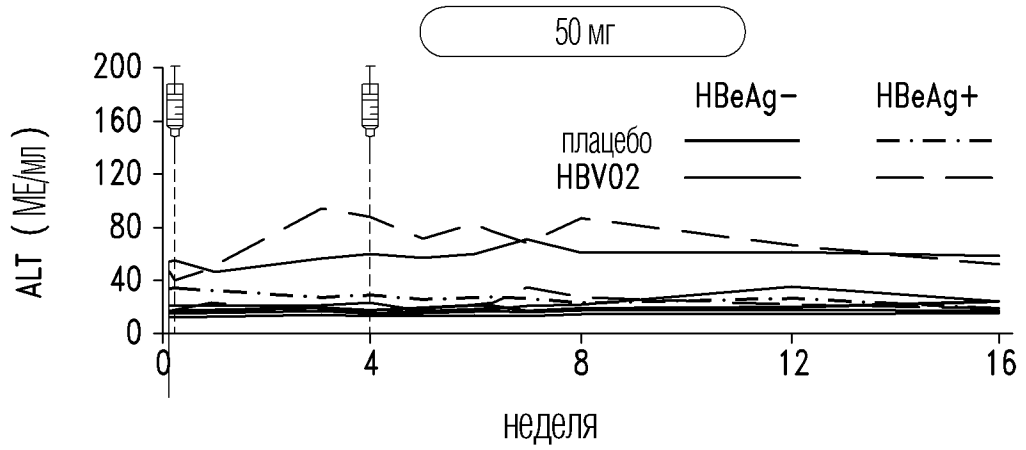
ФИГ. 12С



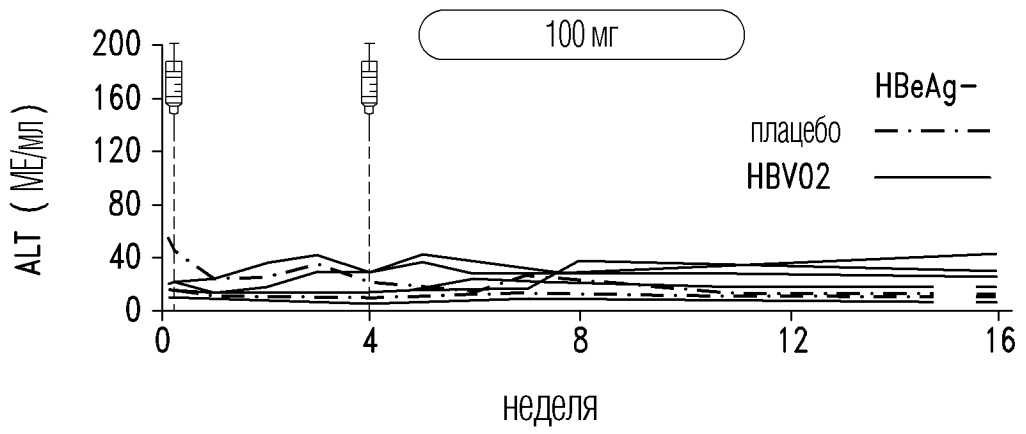
ФИГ. 13А



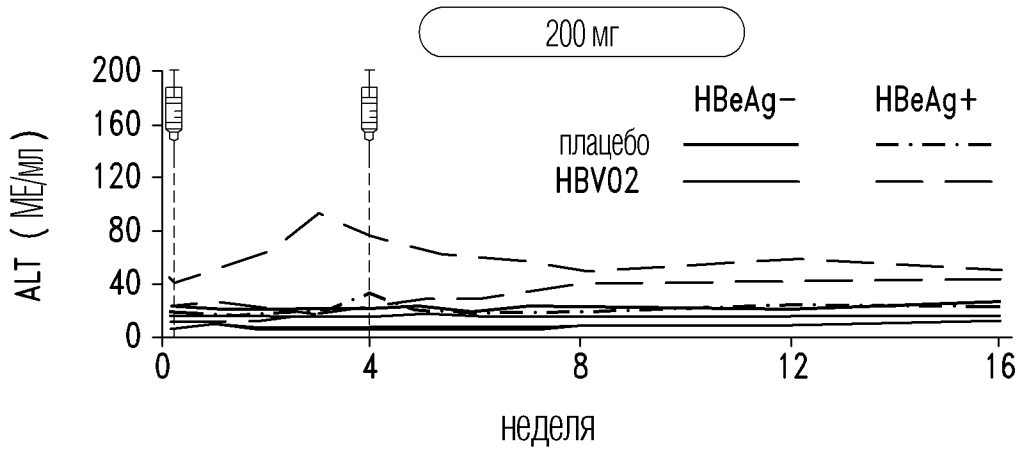
ФИГ. 13В



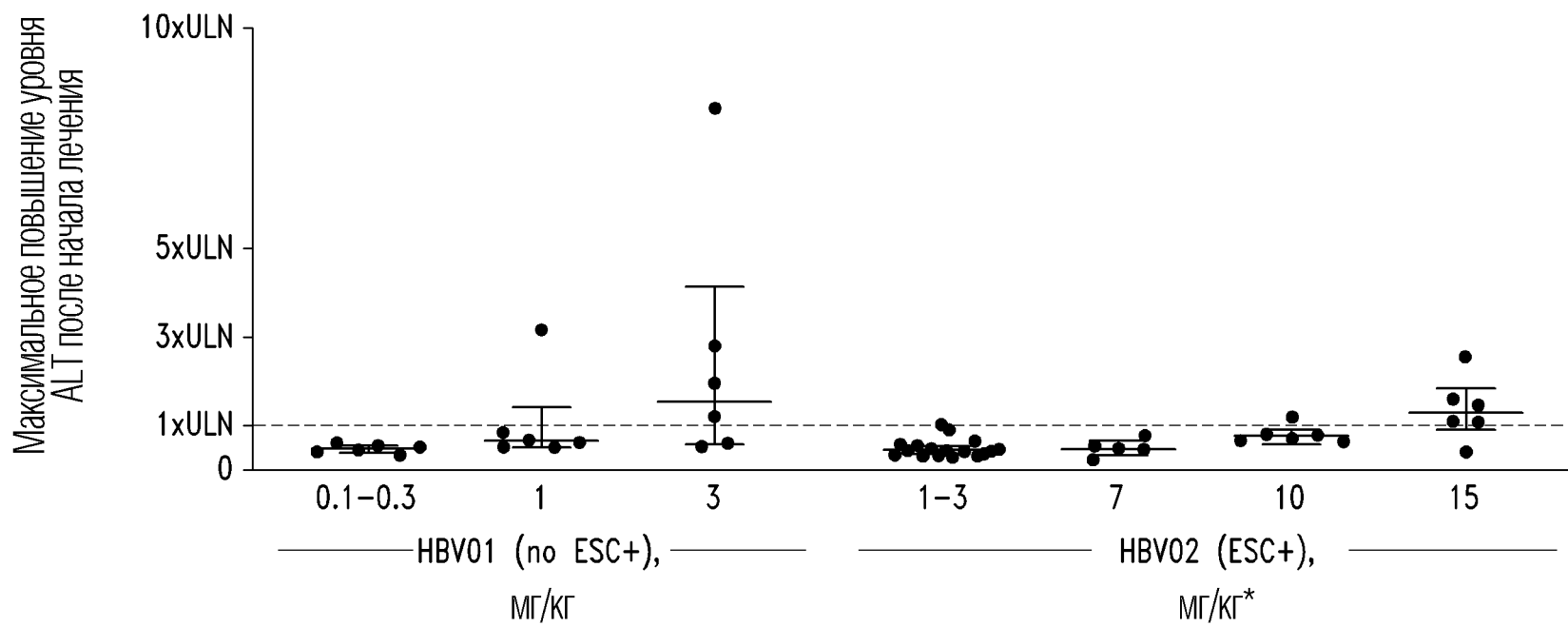
ФИГ. 13С



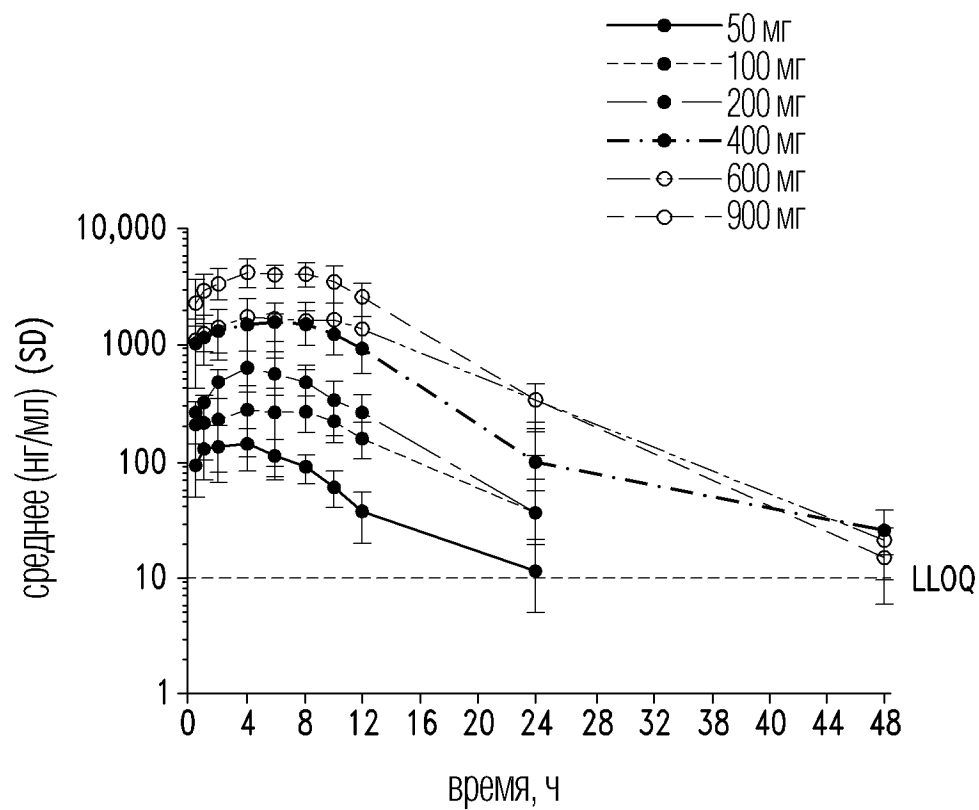
ФИГ. 13D



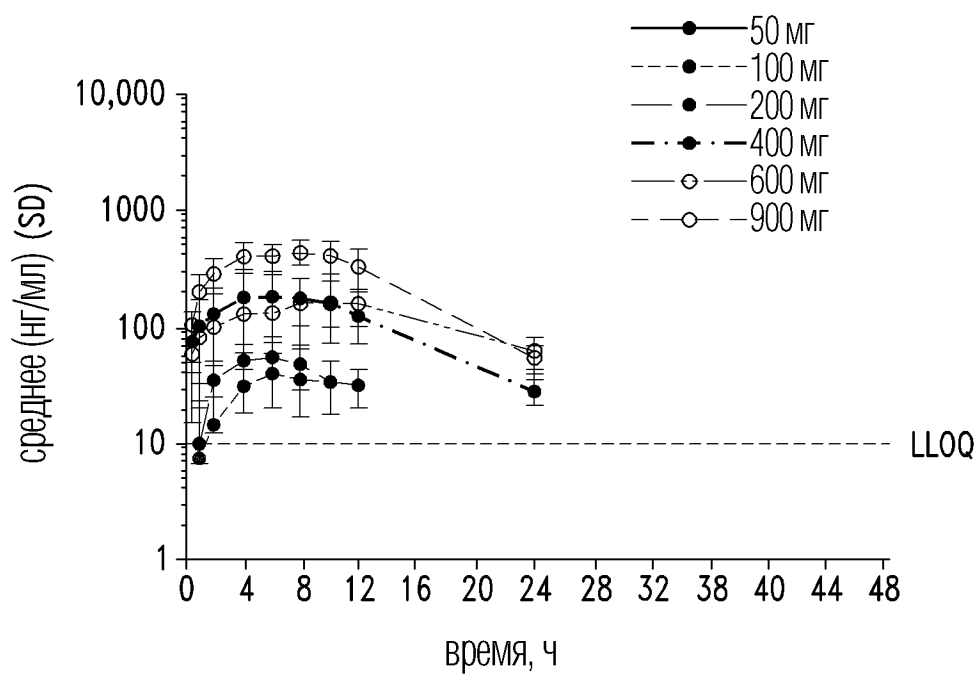
ФИГ. 13E



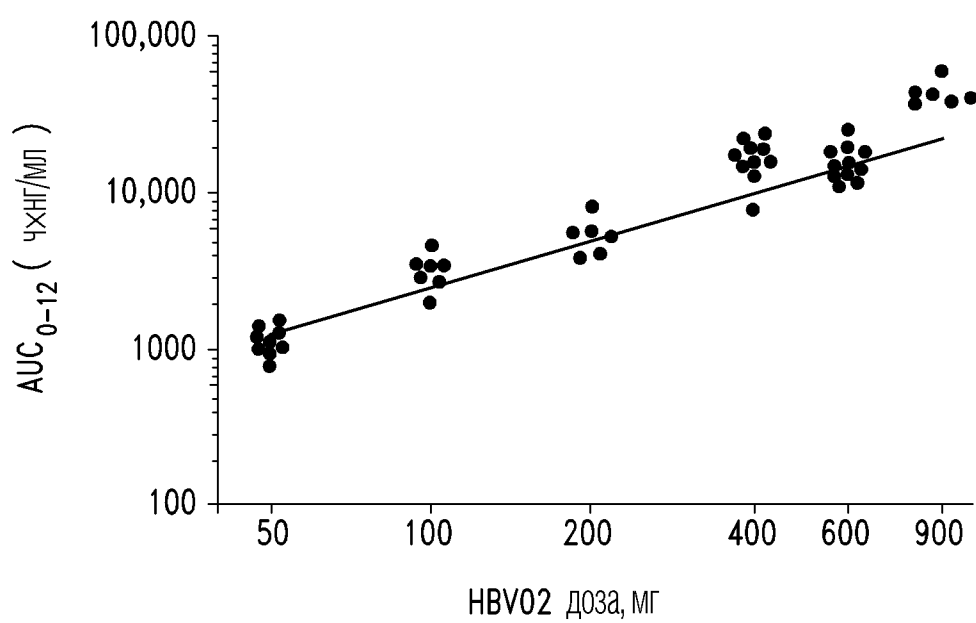
ФИГ. 14



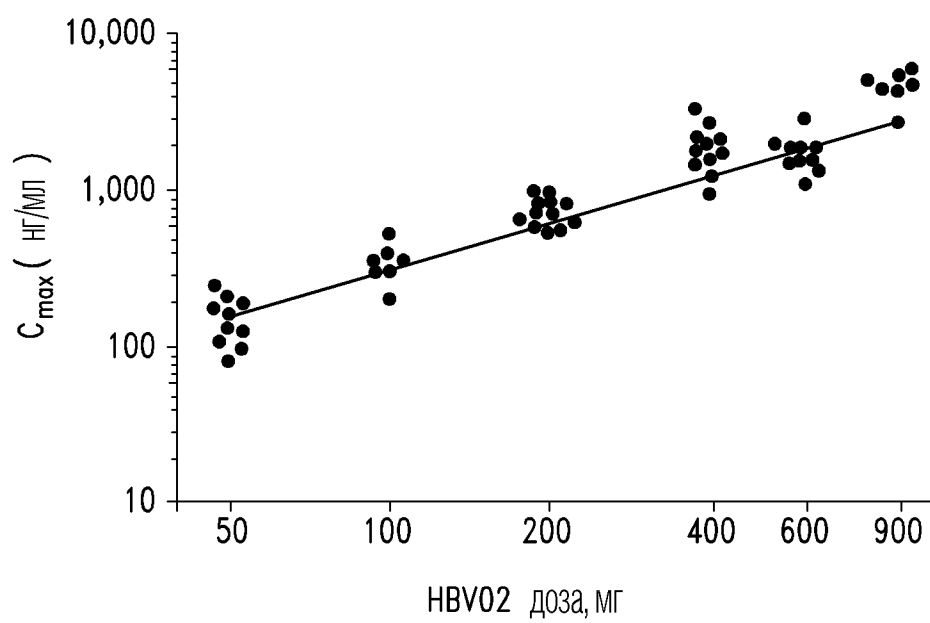
ФИГ. 15А



ФИГ. 15В

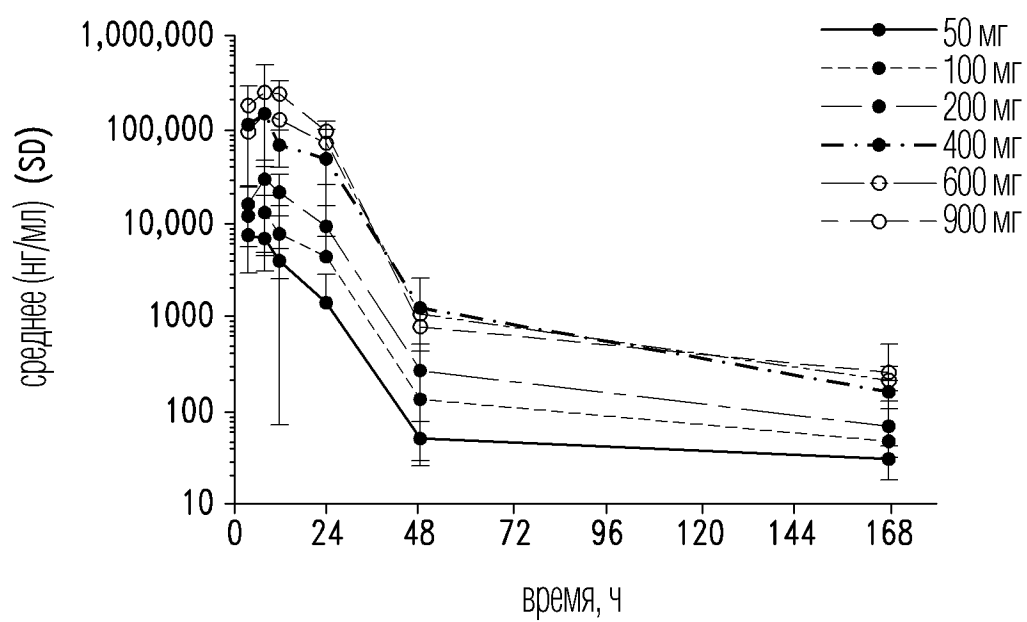


ФИГ. 16

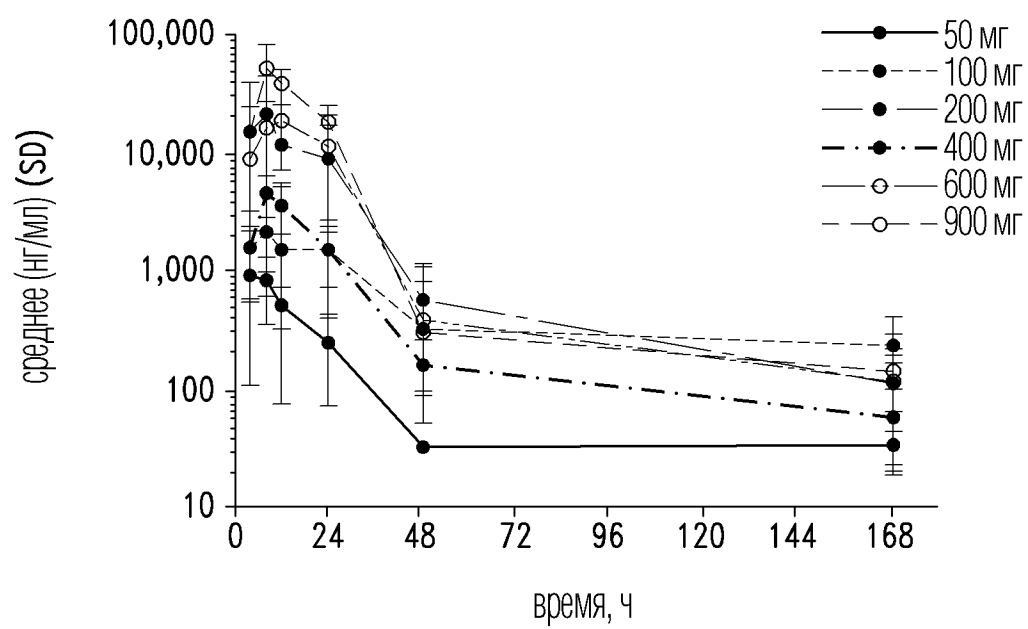


ФИГ. 17

	50 мг n=6	100 мг n=5 ^a	200 мг n=6	400 мг n=7 ^b	600 мг n=6	900 мг n=6
HBV02						
AUC ₀₋₁₂ , ЧХНГ/МЛ	1200 (24.6)	3230 (32.5)	5480 (28.2)	16800 (32.9)	17700 (30.9)	44300 (17.9)
AUC _{last} , ЧХНГ/МЛ	1260 (21.2)	3700 (31.9)	6570 (17.6)	21400 (25.9)	28000 (27.0)	59000 (15.5)
C _{max} , НГ/МЛ	155 (42.1)	355 (32.9)	711 (29.2)	1940 (41.2)	1830 (33.5)	5014 (12.6)
T _{max} , ч	4.00 (1.00, 4.00)	4 (4.00, 6.00)	5.00 (4.00, 6.50)	8.00 (4.00, 8.00)	7.00 (5.50, 10.0)	4.00 (3.50, 8.50)
T _{last} , ч	12.0 (12.0, 15.0)	12.0 (12.0, 24.0)	24.0 (21.0, 24.0)	24.0 (24.0, 24.0)	24.0 (24.0, 48.0)	24.0 (24.0, 48.0)
AS(N-1)3' HBV02						
AUC ₀₋₁₂ , ЧХНГ/МЛ	BLQ	NC	233 (27.3)	871 (47.2)	726 (52.4)	2030 (23.3)
AUC _{last} , ЧХНГ/МЛ	BLQ	205 (186) ^c	475 (31.2)	2253 (39.2)	2670 (54.7)	6380 (23.4)
C _{max} , НГ/МЛ	BLQ	26.3 (168) ^c	62.4 (28.2)	234 (52.2)	177 (55.9)	515 (20.6)
T _{max} , ч	NC	6.00 (5.00, 6.00) ^c	6.00 (4.00, 6.50)	8.00 (4.00, 10.0)	10.0 (8.00, 10.0)	8.00 (4.00, 10.0)
T _{last} , ч	NC	8.00 (6.00, 9.00) ^c	12.0 (10.0, 10.0)	12.0 (12.0, 24.0)	24.0 (21.0, 24.0)	24.0 (24.0, 24.0)
MR _{Cmax}	NC	0.074 ^c	0.088	0.121	0.097	0.103
MR _{AUC0-12}	NC	NC	0.094	0.115	0.090	0.110



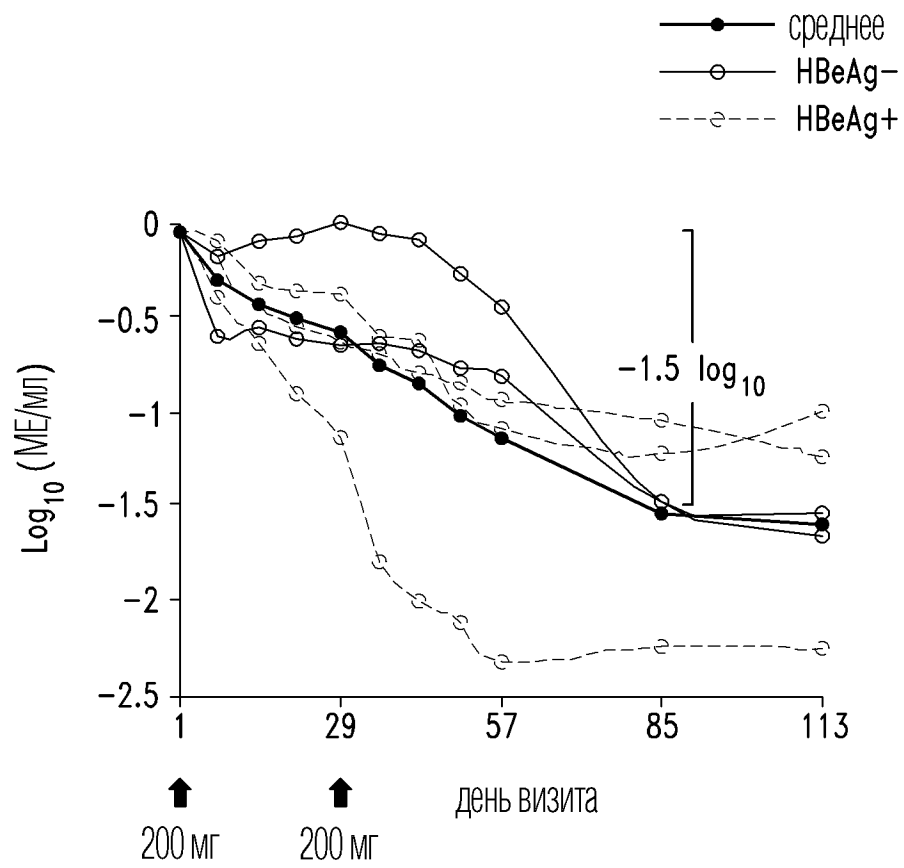
ФИГ. 19А



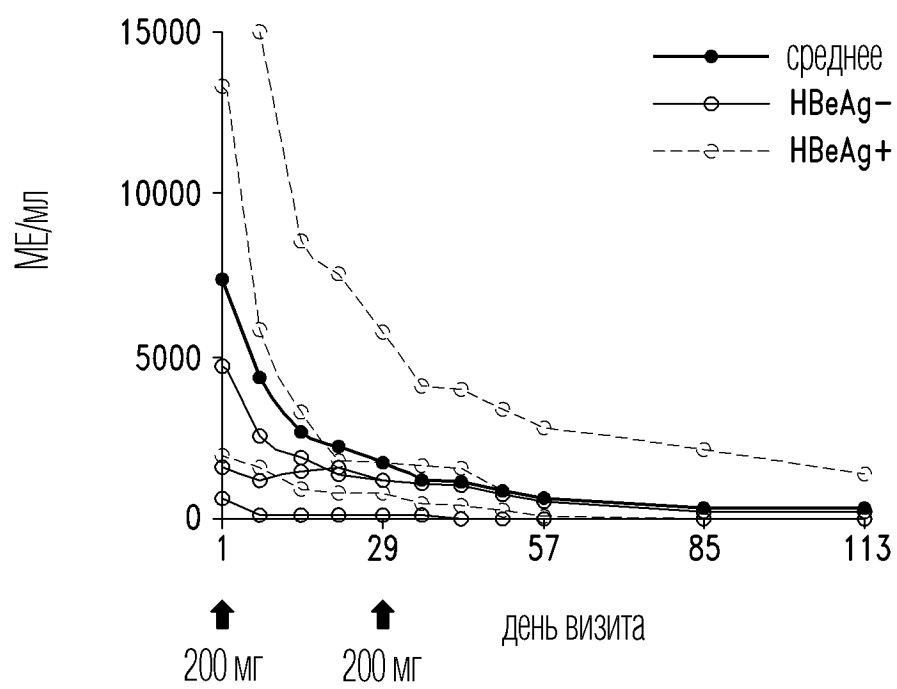
ФИГ. 19В

	50 мг n=6	100 мг n=5 ^a	200 мг n=6	400 мг n=7 ^b	600 мг n=6	900 мг n=6
HBV02						
AUC ₀₋₂₄ , ЧХНГ/мл	1360 (15.8) ^c	4080 (29.1) ^c	6920 (26.9)	21100 (26.8)	26700 (29.4)	57400 (15.9)
CL _{R/F} , л/ч	6.21 (16.4)	5.32 (22.4)	6.71 (11.9)	5.24 (17.8)	7.28 (20.2)	7.22 (19.1)
моча fe ₀₋₂₄ , %	17.0 (18.8)	18.3 (34.0)	23.2 (18.7)	27.6 (26.0)	32.3 (36.1)	46.1 (20.6)
AS(N-1)3' HBV02						
AUC ₀₋₂₄ , ng*h/mL	BLQ	NC	683 (28.3)	2629 (45.3)	3090 (36.8)	6380 (23.4)
CL _{R/F} , л/ч	NC	NC	21.4 (17.2)	15.4 (31.3)	17.7 (22.3)	21.7 (8.94)
моча fe ₀₋₂₄ , %	1.95 (24.8)	4.20 (54.8)	3.31 (20.1)	4.62 (26.5)	4.15 (55.6)	6.96 (21.1)

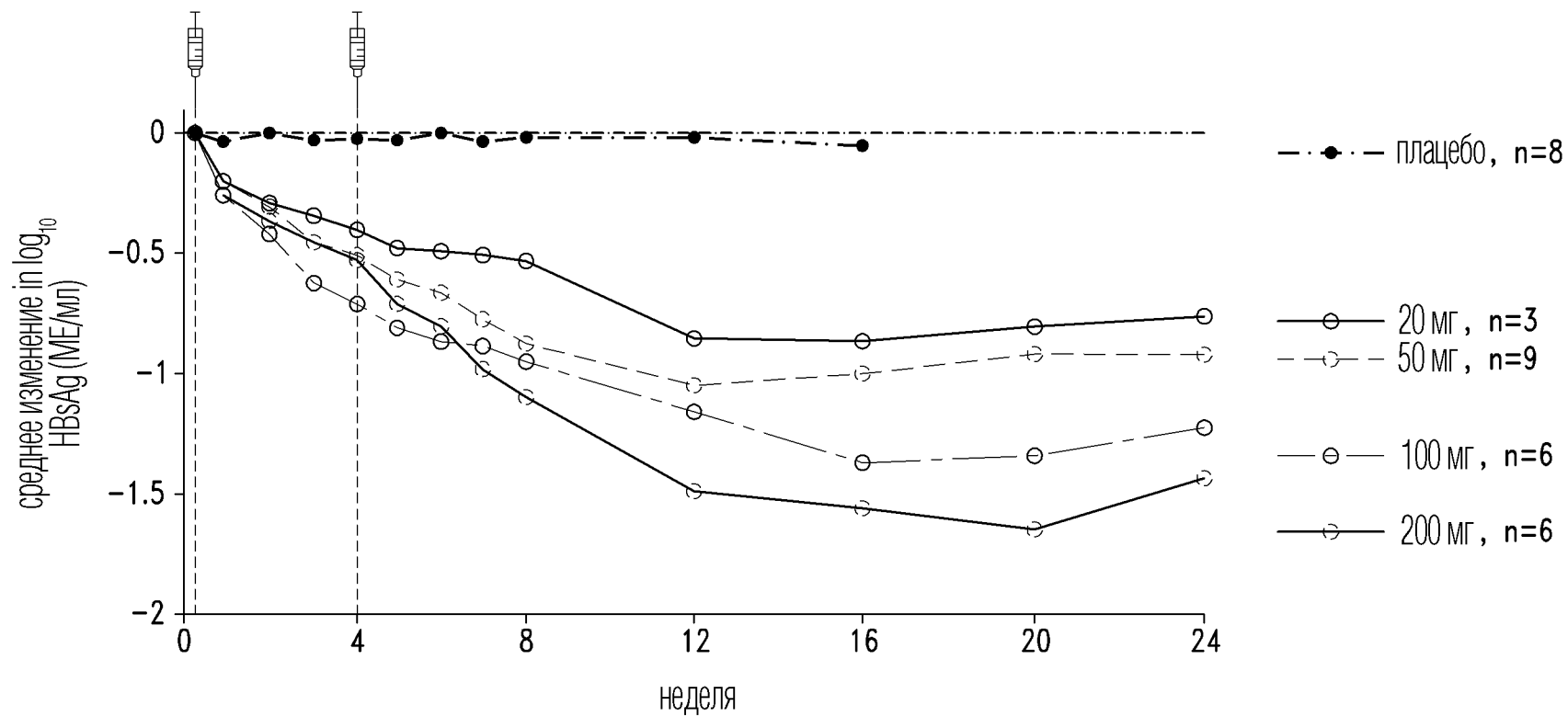
ФИГ. 20



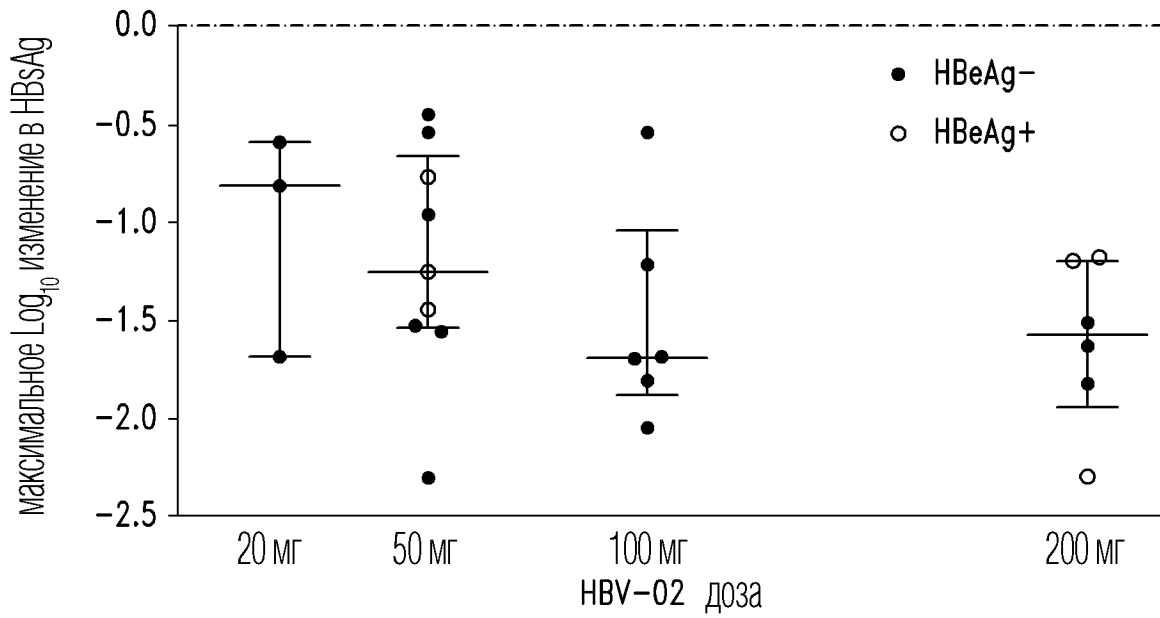
ФИГ. 21А



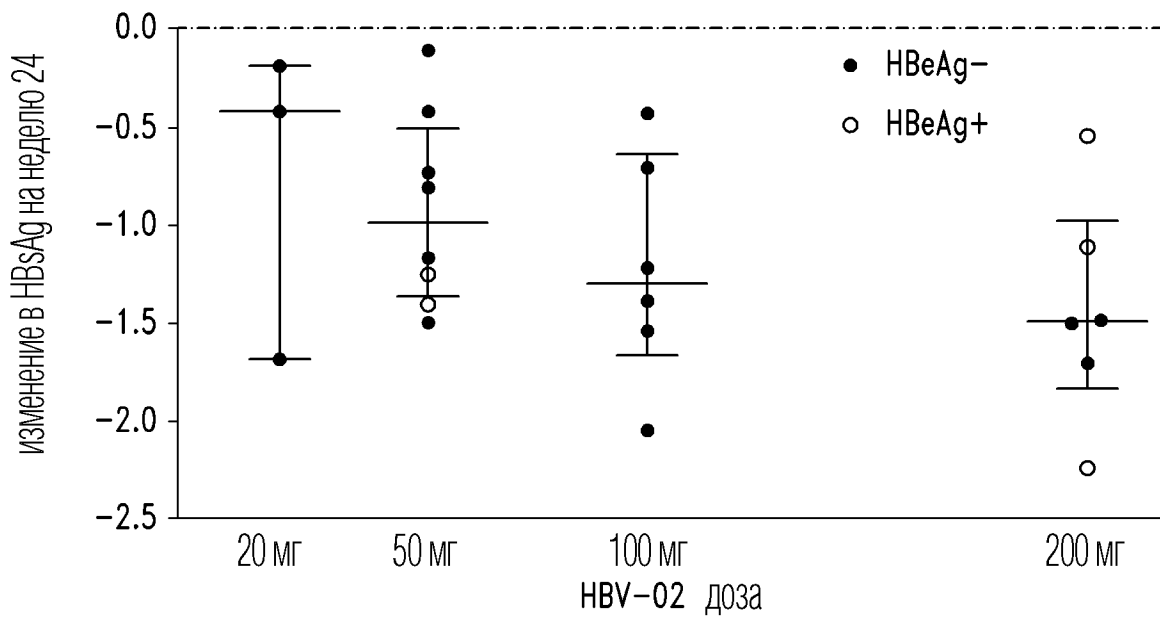
ФИГ. 21В



ФИГ. 22



ФИГ. 23



ФИГ. 24