

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193147** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.04.27

(51) Int. Cl. *A61K 31/7088* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.05.29

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ХИМЕРНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/855,793; 62/937,760; 62/943,532

(32) 2019.05.31; 2019.11.19; 2019.12.04

(33) US

(86) PCT/US2020/035212

(87) WO 2020/243490 2020.12.03

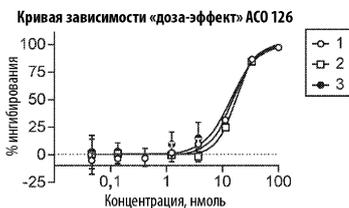
(88) 2021.01.21

(71) Заявитель:
АЛИГОС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
**Бейгельман Леонид, Пандей
Раджендра К., Раджванши Вивек
Кумар, Смит Дэвид Бернад, Хун
Цзинь (US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение включает антисмысловые олигонуклеотиды, включая химерные антисмысловые олигонуклеотиды, а также способы получения и применения, например, против ВГВ.



A1

202193147

202193147

A1

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ХИМЕРНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет Предварительной заявки на патент США № 62/943532, поданной 4 декабря 2019 г., Предварительной заявки на патент США №62/937760, поданной 19 ноября 2019 г. и Предварительной заявки на патент США №62/855793, поданной 31 мая 2019 г., раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Около 300 миллионов людей по всему миру имеют хроническую инфекцию ВГВ. Потеря поверхностного антигена вируса гепатита В, ключевой аспект «функционального излечения», является целью многих новых способов лечения. Было показано, что антисмысловые олигонуклеотиды представляют собой эффективный способ воздействия для снижения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В на животных моделях и клинические исследования с данными молекулами продолжаются.

[0003] Тем не менее, способы лечения ВГВ с использованием антисмысловых олигонуклеотидов по-прежнему имеют такие недостатки, как, например, расщепление нуклеазой и токсичность для печени. Таким образом, в данной области существует потребность в разработке антисмысловых олигонуклеотидов с большей устойчивостью к разложению нуклеазой и улучшенным профилем безопасности для печени.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее раскрытие относится к соединениям и композициям, содержащим олигонуклеотиды, и их применению для предупреждения или лечения заболеваний и состояний, например, гепатита В (ВГВ).

[0005] Некоторые варианты осуществления включают способ лечения субъекта, инфицированного вирусом гепатита В (ВГВ), включающий введение субъекту первого антисмыслового олигонуклеотида (АСО) и второго АСО, при этом каждый из первого и второго АСО независимо содержат 14-22 нуклеотидных фрагментов, и каждый из первого и второго АСО независимо содержат следующее: (а) центральная область (В'), содержащая 6 или более смежных нуклеозидов ДНК, (b) область боковой 5'-ветви (А'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов, и (с) область боковой 3'-ветви (С'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов, причем первый АСО

комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК в первой Х-области или первой S-области ВГВ, а второй АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК во второй Х-области или второй S-области ВГВ.

[0006] В некоторых вариантах осуществления способ лечения субъекта, инфицированного вирусом гепатита В (ВГВ), включает введение субъекту первого антисмыслового олигонуклеотида (АСО), причем первый АСО содержит 14-22 нуклеотидных фрагментов, и первый АСО содержит следующее: (а) центральная область (В'), содержащая 6 или более смежных нуклеозидов ДНК, (b) область боковой 5'-ветви (А'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов, и (с) область боковой 3'-ветви (С'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов, причем первый АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК в первой Х-области или первой S-области ВГВ. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту второго АСО, причем второй АСО содержит 14-22 нуклеотидных фрагментов, и второй АСО содержит следующее: (а) центральная область (В'), содержащая 6 или более смежных нуклеозидов ДНК, (b) область боковой 5'-ветви (А'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов, и (с) область боковой 3'-ветви (С'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов, и второй АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК в первой Х-области или первой S-области ВГВ.

[0007] В некоторых вариантах осуществления область боковой 5'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО содержит 2-6 соединенных фосфотиоатом закрытых нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления область боковой 5'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО содержит 2-6 соединенных фосфотиоатом 2'-замещенных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления область боковой 5'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО содержит по меньшей мере один закрытый нуклеозид и по меньшей мере один 2'-замещенный нуклеозид, причем закрытый нуклеозид и 2'-замещенный нуклеозид соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления область боковой 5'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО дополнительно содержит нуклеозид РНК или нуклеозид ДНК, причем нуклеозид РНК и нуклеозид ДНК не являются закрытыми нуклеозидами или 2'-замещенными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два нуклеозида области боковой 5'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеозидов

области боковой 5'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления область боковой 3'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО содержит 2-6 соединенных фосфотиоатом закрытых нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления область боковой 3'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО содержит 2-6 2'-замещенных соединенных фосфотиоатом нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления область боковой 3'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО содержит по меньшей мере один закрытый нуклеозид и по меньшей мере один 2'-замещенный нуклеозид, причем закрытый нуклеозид и 2'-замещенный нуклеозид соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления область боковой 3'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО дополнительно содержит нуклеозид РНК или нуклеозид ДНК, причем нуклеозид РНК и нуклеозид ДНК не являются закрытыми нуклеозидами или 2'-замещенными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два нуклеозида области боковой 3'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеозидов области боковой 3'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления центральная область по меньшей мере одного из первого и второго АСО содержит по меньшей мере 5 смежных соединенных фосфотиоатом нуклеозидов ДНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеозидов центральной области по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления нуклеозид ДНК центральной области по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединен с нуклеозидом области боковой 5'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления нуклеозид ДНК центральной области по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединен с нуклеозидом области боковой 3'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления центральная область по меньшей мере одного из каждого из первого и второго АСО независимо содержит 8-10 смежных соединенных фосфотиоатом нуклеозидов ДНК. В некоторых вариантах осуществления закрытые нуклеозиды выбраны из LNA, scpBNA, AmNA (N-H), AmNA (N-Me), GuNA, GuNA (N-R), причем R выбран из Me, Et, *i*-Pr, *t*-Bu и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления второй АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК во второй X-области ВГВ. В некоторых вариантах осуществления

второй АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК в S-области ВГВ. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй АСО дополнительно содержит нацеливающую группу. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа содержит фрагмент GalNAc. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго АСО независимо содержат 14-18 нуклеотидных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления первый и второй АСО вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления первый и второй АСО вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой взрослого человека. В некоторых вариантах осуществления лечение включает снижение вирусной нагрузки ВГВ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления лечение включает снижение уровня антигена вируса у субъекта. В некоторых вариантах осуществления первый АСО содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей, приведенных в таблицах 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19. В некоторых вариантах осуществления второй АСО содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей, приведенных в таблицах 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19. В некоторых вариантах осуществления первый АСО содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 2-428. В некоторых вариантах осуществления второй АСО содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 2-428. В некоторых вариантах осуществления первый АСО представляет собой АСО 120 или АСО 121. В некоторых вариантах осуществления второй АСО представляет собой АСО 120 или АСО 121.

[0008] Некоторые варианты осуществления включают фармацевтическую композицию, содержащую первый антисмысловый олигонуклеотид (АСО) и второй АСО, причем каждый из первого и второго АСО независимо содержит 14-22 нуклеотидных фрагментов, и каждый из первого и второго АСО независимо содержит следующее: (а) центральная область (В'), содержащая 6 или более смежных нуклеозидов ДНК, (b) область боковой 5'-ветви (А'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов, и (с) область боковой 3'-ветви (С'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов, причем первый АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК в первой Х-области или первой S-области ВГВ, а второй АСО комплементарен или

гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК во второй Х-области или S-области ВГВ. В некоторых вариантах осуществления область боковой 5'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО дополнительно содержит нуклеозид РНК или нуклеозид ДНК, причем нуклеозид РНК и нуклеозид ДНК не являются закрытыми нуклеозидами или 2'-замещенными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеозидов области боковой 5'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления область боковой 3'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО дополнительно содержит нуклеозид РНК или нуклеозид ДНК, причем нуклеозид РНК и нуклеозид ДНК не являются закрытыми нуклеозидами или 2'-замещенными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеозидов области боковой 3'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 нуклеозидов центральной области по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления нуклеозид ДНК центральной области по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединен с нуклеозидом области боковой 5'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления нуклеозид ДНК центральной области по меньшей мере одного из первого и второго АСО соединен с нуклеозидом области боковой 3'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО фосфотиоатным линкером.

[0009] Другие варианты осуществления включают антисмысловой олигонуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей, приведенных в таблице 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19. В некоторых вариантах осуществления АСО дополнительно содержит нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит фрагмент GalNAc. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит три последовательных фрагмента GalNAc, прикрепленных посредством линкера.

[0010] Другие варианты осуществления включают антисмысловой олигонуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 2-428. В некоторых вариантах осуществления АСО дополнительно содержит нацеливающий фрагмент. В некоторых

вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит фрагмент GalNAc. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит три последовательных фрагмента GalNAc, прикрепленных посредством линкера.

[0011] Дополнительные варианты осуществления включают способ лечения субъекта, инфицированного вирусом гепатита В (ВГВ), включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества одного или более АСО по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[0012] Некоторые варианты осуществления включают способы по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающие введение пациенту дополнительного средства для лечения ВГВ, такого как аналог нуклеотида, модулятор сборки капсида или другой олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство для лечения ВГВ выбрано из группы, включающей STOPS™ ALG-010133, модулятор сборки капсида ALG-000184, рекомбинантный интерферон альфа 2b, IFN-a, PEG-IFN-a-2a, ламивудин, телбивудин, адефовир дипивоксил, клевудин, энтекавир, тенофовир алафенамид, тенофовир дизопроксил, NVR3-778, BAY41-4109, JNJ-632, JNJ-3989 (ARO-ВГВ), RG6004, GSK3228836, REP-2139, REP-2165, AB-729, VIR-2218, DCR-ВГБС, JNJ-6379, GLS4, ABI-H0731, JNJ-440, NZ-4, RG7907, EDP-514, AB-423, AB-506, ABI-H03733 и ABI-H2158. В некоторых вариантах осуществления фрагмент GalNAc включает один фрагмент GalNAc или три последовательных фрагмента GalNAc, прикрепленных посредством линкеров, причем фрагмент GalNAc представляет собой GalNAc-4 или GalNAc-6.

[0013] Некоторые варианты осуществления включают способы по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем пациента лечили дополнительным средством для лечения ВГВ, таким как аналог нуклеотида, модулятор сборки капсида или другой олигонуклеотид.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0014] На **фиг. 1А** показаны кривые зависимости «доза-эффект» для АСО 126 в клетках HepG2.215 из трех экспериментов.

[0015] На **фиг. 1В** показаны кривые зависимости «доза-эффект» для АСО 120 в клетках HepG2.215 из трех экспериментов.

[0016] На **фиг. 1С** показаны кривые зависимости «доза-эффект» для АСО 124 в клетках HepG2.215 из трех экспериментов.

[0017] На **фиг. 2А** показаны кривые зависимости «доза-эффект» для АСО 127 в клетках HepG2.215 из трех экспериментов.

[0018] На **фиг. 2В** показаны кривые зависимости «доза-эффект» для АСО 121 в клетках НерG2.215 из трех экспериментов.

[0019] На **фиг. 2С** показаны кривые зависимости «доза-эффект» для АСО 125 в клетках НерG2.215 из трех экспериментов.

[0020] На **фиг. 3А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита в сыворотке крови от мышей с ВГВ, обработанных АСО 120.

[0021] На **фиг. 3В** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей с ВГВ, обработанных АСО 121.

[0022] На **фиг.3С** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей с ВГВ, обработанных АСО 120.

[0023] На **фиг. 3D** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей с ВГВ, обработанных АСО 121.

[0024] На **фиг. 4А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей с ВГВ, обработанных АСО 121 или АСО 120.

[0025] На **фиг. 4В** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей с ВГВ, обработанных АСО 121 или АСО 120.

[0026] На **фиг. 4С** показан график изменения поверхностный антиген вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей с ВГВ, обработанных (i) комбинацией АСО 121 и АСО 120; или (ii) АСО 123 в качестве единственного средства.

[0027] На **фиг. 4D** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей с ВГВ, обработанных (i) комбинацией АСО 121 и АСО 120; или (ii) АСО 123 в качестве единственного средства.

[0028] На **фиг. 5А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 1x5 мг/кг АСО 128, АСО 129 или АСО 120.

[0029] На **фиг. 5В** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 128, АСО 129 или АСО 120 раз в 3 дня.

[0030] На **фиг. 5С** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 128, АСО 129 или АСО 120 раз в 3 дня.

[0031] На **фиг. 6А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 1x5 мг/кг АСО 130.

[0032] На **фиг. 6В** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 130 раз в 3 дня.

[0033] На **фиг. 6С** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 130 раз в 3 дня.

[0034] На **фиг. 7А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 131 раз в 3 дня.

[0035] На **фиг. 7В** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 131 раз в 3 дня.

[0036] На **фиг. 8А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 121 раз в 3 дня.

[0037] На **фиг. 8В** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 121 раз в 3 дня.

[0038] На **фиг. 9А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных одной дозой АСО 120, АСО 131 и комбинаций АСО 120 и АСО 131 при массовом отношении 1:1, 2:1 и 3:1.

[0039] На **фиг. 9В** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных одной дозой АСО 120, АСО 121 и комбинаций АСО 120 и АСО 121 при массовом отношении 1:1, 2:1 и 3:1.

[0040] На **фиг. 10А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 133-136 и 137А раз в неделю.

[0041] На **фиг. 10В** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 133-136 и 137А раз в неделю.

[0042] На **фиг. 11А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 138 или 153 раз в неделю.

[0043] На **фиг. 11В** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 138 или 153 раз в неделю.

[0044] На **фиг. 12А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 132А или 137А раз в неделю.

[0045] На **фиг. 12В** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 132А или 137А раз в неделю.

[0046] На **фиг. 13А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 140-142 раз в 3 дня.

[0047] На **фиг. 13В** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 140-142 раз в 3 дня.

[0048] На **фиг. 14А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 143, 144, 145А или 146 раз в 3 дня.

[0049] На **фиг. 14В** показан график АЛТ в сыворотке крови мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 143, 144, 145А или 146 раз в 3 дня.

[0050] На **фиг. 15А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 148-150 раз в 3 дня.

[0051] На **фиг. 15В** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 148-150 раз в 3 дня.

[0052] На **фиг. 16А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 151-154 раз в неделю.

[0053] На **фиг. 16В** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 151-154 раз в неделю.

[0054] На **фиг. 17А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 147, 155 или 156 раз в 3 дня.

[0055] На **фиг. 17В** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 147, 155 или 156 раз в 3 дня.

[0056] На **фиг. 18А** показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 157-159 раз в 3 дня.

[0057] На **фиг. 18В** показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 157-159 раз в 3 дня.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0058] Настоящее раскрытие направлено на модифицированные антисмысловые олигонуклеотиды и фармацевтические композиции модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов. Настоящее раскрытие также направлено на способы применения и получения антисмысловых олигонуклеотидов и фармацевтических композиций.

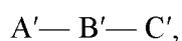
[0059] Соединения по настоящему раскрытию

[0060] Соединения по настоящему раскрытию включают модифицированные антисмысловые олигонуклеотиды (АСО). В некоторых вариантах осуществления АСО содержит 14-22

нуклеотидных фрагментов, например, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотидных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления АСО представляет собой химерный олигонуклеотид, который содержит три области: область боковой 5'-ветви (А'), содержащую модифицированные нуклеотиды; центральную область (В'), содержащую нуклеотиды различного типа из боковых ветвей, например, нуклеотиды, способные индуцировать отщепление РНазы Н; и область боковой 3'-ветви (С'), содержащую модифицированные нуклеотиды.

[0061] В некоторых вариантах осуществления область боковой 5'-ветви и область боковой 3'-ветви содержат 2-6 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. Один или более из данных нуклеотидов модифицированы (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов модифицированы). С другой стороны, центральная область может содержать 6 или более смежных нуклеозидов ДНК, соединенных межнуклеотидными связями фосфодиэфира или тиофосфата («ps»). В других вариантах осуществления центральная область включает один или более модифицированных нуклеотидов. Например, центральная область может включать один или более модифицированных нуклеотидов, причем центральная область способна индуцировать отщепление РНазы Н. В некоторых вариантах осуществления центральная область включает один или более модифицированных нуклеотидов с модифицированным нуклеиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления центральная область содержит 6, 7, 8, 9, 10 или 11 смежных нуклеозидов ДНК. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 нуклеозидов ДНК в центральной области модифицированы.

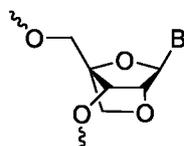
[0062] Таким образом, в некоторых аспектах соединения химерного олигонуклеотида АСО по настоящему раскрытию включают соединения формулы (I):



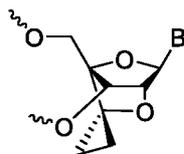
причем каждый из А' и С' независимо содержит 2-6 нуклеотидов, при этом один или более из них представляют собой модифицированный нуклеотид, В' содержит 6 или более смежных нуклеозидов ДНК, соединенных межнуклеотидными связями фосфодиэфира или тиофосфата. В некоторых вариантах осуществления В' содержит один или более модифицированных нуклеозидов ДНК. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид выбран из закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеозид ДНК выбран из закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов.

[0063] В определенных аспектах количество нуклеотидов и/или нуклеозидов в A', B' и C' выбраны из следующей группы (A':B':C'): (2:10:2), (2:10:3), (2:10:4), (2:10:5), (3:10:2), (3:10:3), (3:10:4), (3:10:5), (4:10:2), (4:10:3), (4:10:4), (4:10:5), (5:10:2), (5:10:3), (5:10:4), (5:10:5), (2:9:2), (2:9:3), (2:9:4), (2:9:5), (3:9:2), (3:9:3), (3:9:4), (3:9:5), (4:9:2), (4:9:3), (4:9:4), (4:9:5), (5:9:2), (5:9:3), (5:9:4), (5:9:5), (2:8:2), (2:8:3), (2:8:4), (2:8:5), (3:8:2), (3:8:3), (3:8:4), (3:8:5), (4:8:2), (4:8:3), (4:8:4), (4:8:5), (5:8:2), (5:8:3), (5:8:4), (5:8:5), (2:7:2), (2:7:3), (2:7:4), (2:7:5), (3:7:2), (3:7:3), (3:7:4), (3:7:5), (4:7:2), (4:7:3), (4:7:4), (4:7:5), (5:7:2), (5:7:3), (5:7:4), (5:7:5), (2:6:2), (2:6:3), (2:6:4), (2:6:5), (3:6:2), (3:6:3), (3:6:4), (3:6:5), (4:6:2), (4:6:3), (4:6:4), (4:6:5), (5:6:2), (5:6:3), (5:6:4), (5:6:5).

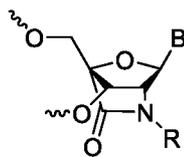
[0064] В некоторых вариантах осуществления область боковой 5'-ветви содержит один или более закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления область боковой 3'-ветви содержит один или более закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления центральная область содержит один или более закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов. Закрытый нуклеозид может содержать мостик между положениями 4' и 2' сахара, причем мостик содержит 2-4 необязательно замещенных атомов. Например, нуклеозид LNA представляет собой следующее:



. Другие иллюстративные закрытые нуклеозиды включают следующее:

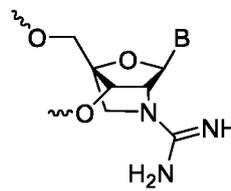


(ScpBNA или «ср»);

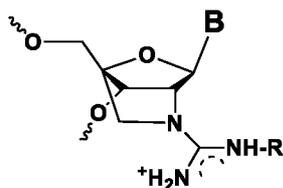


(AmNA), причем R представляет собой H или

алкил (или AmNA(N-Me)), если R представляет собой алкил);



(GuNA); или



GuNA(N-R), R = Me, Et, *i*-Pr, *t*-Bu.

В определенных вариантах осуществления все

нуклеозиды в области боковой 5'-ветви представляют собой закрытые нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления все нуклеозиды в области боковой 3'-ветви представляют собой закрытые нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления область боковой 3'-ветви содержит LNA и один или два нуклеозида, выбранных из ScpBNA, AmNA и GuNA. В некоторых вариантах осуществления вся область боковой 5'-ветви представляет собой LNA, а область боковой 3'-ветви содержит LNA и один или два нуклеозида, выбранные из ScpBNA, AmNA и GuNA. Другие нуклеотиды включены в PCT/JP2010/068409, PCT/JP2013/075370, PCT/JP2015/054308, PCT/JP2018/006061 и/или PCT/JP2018/006062, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

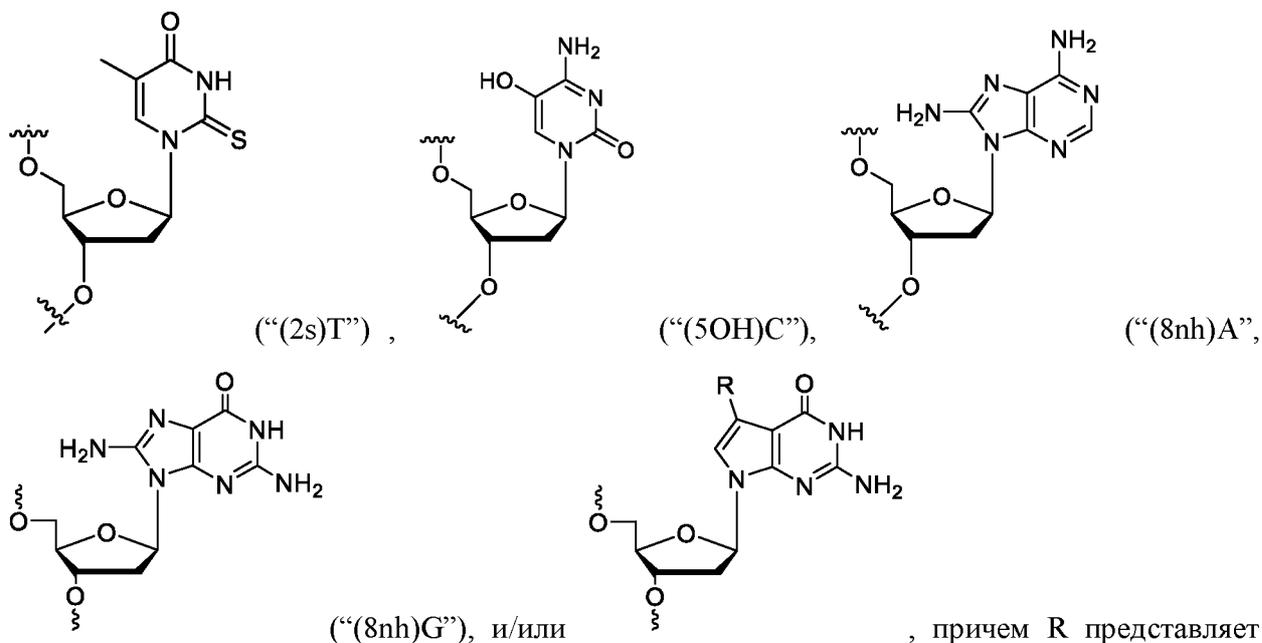
[0065] В некоторых вариантах осуществления область боковой 5'-ветви АСО содержит 2-6 соединенных фосфотиоатом закрытых нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления область боковой 5'-ветви содержит 2-6 соединенных фосфотиоатом 2'-замещенных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления область боковой 5'-ветви содержит по меньшей мере один закрытый нуклеозид и по меньшей мере один 2'-замещенный нуклеозид, причем закрытый нуклеозид и 2'-замещенный нуклеозид соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления область боковой 5'-ветви дополнительно содержит нуклеозид РНК или нуклеозид ДНК, причем нуклеозид РНК и нуклеозид ДНК не являются закрытыми нуклеозидами или 2'-замещенными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два нуклеозида области боковой 5'-ветви соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеозидов области боковой 5'-ветви соединены фосфотиоатным линкером.

[0066] В некоторых вариантах осуществления область боковой 3'-ветви АСО содержит 2-6 соединенных фосфотиоатом закрытых нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления область боковой 3'-ветви содержит 2-6 соединенных фосфотиоатом 2'-замещенных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления область боковой 3'-ветви содержит по меньшей мере один закрытый нуклеозид и по меньшей мере один 2'-замещенный нуклеозид, причем закрытый нуклеозид и 2'-замещенный нуклеозид соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления область боковой 3'-ветви дополнительно содержит нуклеозид РНК или нуклеозид ДНК, причем нуклеозид РНК и нуклеозид ДНК не являются закрытыми нуклеозидами или 2'-замещенными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два нуклеозида области боковой 3'-ветви соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере

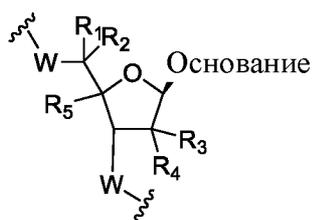
мере 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеозидов области боковой 3'-ветви соединены фосфотиоатным линкером.

[0067] В определенных вариантах осуществления один или более нуклеотидов в области боковой 5'-ветви и/или область боковой 3'-ветви содержат межнуклеотидную связь тиофосфата. В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды в области боковой 5'-ветви содержат межнуклеотидную связь тиофосфата. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в области боковой 3'-ветви содержат межнуклеотидную связь тиофосфата.

[0068] В некоторых вариантах осуществления центральная область включает один или более модифицированных нуклеотидов с модифицированным нуклеиновым основанием. Например, центральная область может включать один или более модифицированных нуклеотидов, имеющих защищенную или незащищенную версию следующего:



, причем R представляет собой галоген или $R'-C\equiv C-$; и R' представляет собой C_{6-12} арил, 5-12-членный гетероарил, гидрокси- C_{1-6} алкил или C_{1-7} алканоилокси. В некоторых вариантах осуществления центральная область включает один модифицированный нуклеотид (например, (2s)T или (5OH)C) у 1^{го}, 2^{го}, 3^{го} или 4^{го} положения гэта нуклеозида (от 5'-конца). В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид находится у 3^{го} положения гэта нуклеозида (от 5'-конца). В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид представляет собой нуклеотид, имеющий следующую структуру:



причем

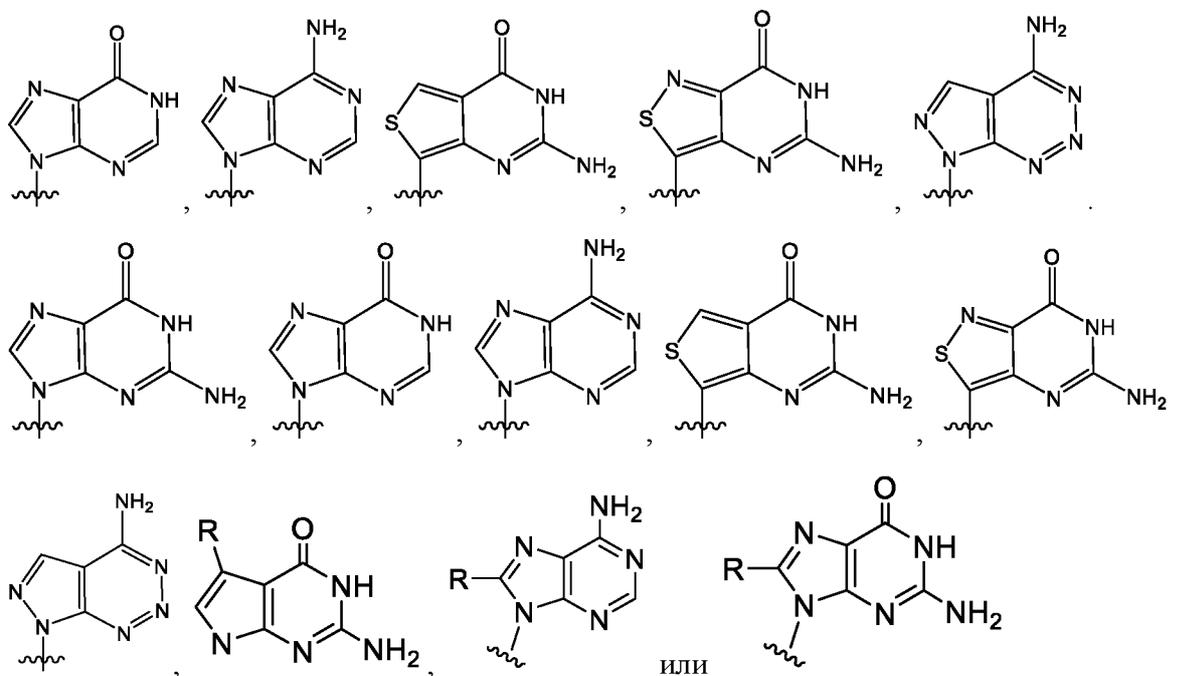
W независимо представляет собой O, N или S;

R₁, R₂ и R₅ независимо представляют собой H или D;

R₃ представляет собой H или F;

R₄ представляет собой F или OCH₃; и

основание представляет собой



причем

R представляет собой галоген или R'-C≡C-; и

R' представляет собой C₆₋₁₂арил, 5-12-членный гетероарил, гидрокси-C₁₋₆алкил или C₁₋₇алканоилокси.

В некоторых вариантах осуществления C₁₋₇алканоил включает без ограничения формил, ацетил, этилкарбонил, н-пропилкарбонил, изопропилкарбонил, н-бутилкарбонил, изобутилкарбонил, трет-бутилкарбонил, н-пентилкарбонил, и н-гексилкарбонил. Другие

модифицированные нуклеотиды включают представленные в РСТ/JP2018/006061, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0069] В контексте данного документа, если не указано иное, «арил» относится к карбоциклическому (полностью углеродному) кольцу, которое имеет полностью делокализованную систему пи-электронов. «Арильная» группа может состоять из двух или более конденсированных колец (колец, которые имеют два соседних атома углерода). Если арил представляет собой конденсированную кольцевую систему, тогда кольцо, которое связано с остальной частью молекулы, имеет полностью делокализованную систему пи-электронов. Другое(-ие) кольцо(-а) в конденсированной кольцевой системе может(могут) иметь полностью делокализованную систему пи-электронов или не иметь ее. Примеры арильных групп включают без ограничения радикалы бензола, нафталина и азулена.

[0070] В контексте данного документа, если не указано иное, «гетероарил» относится к кольцу, которое имеет полностью делокализованную систему пи-электронов и содержит один или более гетероатомов (например, от одного до трех гетероатомов, или от одного до четырех гетероатомов, или от одного до пяти гетероатомов), независимо выбранных из группы, включающей азот, кислород и серу в кольце. «Гетероарильная» группа может состоять из двух или более конденсированных колец (колец, которые имеют два соседних атома углерода). Если гетероарил представляет собой конденсированную кольцевую систему, тогда кольцо, которое связано с остальной частью молекулы, имеет полностью делокализованную систему пи-электронов. Другое(-ие) кольцо(-а) в конденсированной кольцевой системе может(могут) иметь полностью делокализованную систему пи-электронов или не иметь ее. Примеры гетероарильных колец включают без ограничения фуран, тиофен, пиррол, оксазол, тиазол, имидазол, пиразол, изоксазол, изотиазол, тиазол, тиadiaзол, пиридин, пиридазин, пиримидин, пиразин и тиазин.

[0071] В некоторых вариантах осуществления центральная область АСО содержит по меньшей мере 5 смежных соединенных фосфотиоатом нуклеозидов ДНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеозидов центральной области соединены фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления нуклеозид ДНК центральной области соединен с нуклеозидом области боковой 5'-ветви фосфотиоатным линкером. В некоторых вариантах осуществления нуклеозид ДНК центральной области соединен с нуклеозидом области боковой 3'-ветви фосфотиоатным линкером. В некоторых

вариантах осуществления центральная область содержит 8-10 смежных соединенных фосфотиоатом нуклеозидов ДНК.

[0072] В некоторых вариантах осуществления АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК, которая начинается в X-области ВГВ или в S-области ВГВ. Вирусная мишень может, например, начинаться у 5'-конца целевой области в соответствии с КС315400.1 (генотип В, «gt В») или в любом из генотипов А, С или D. Специалисту будет понятно положение ВГВ, например, в соответствии с описанием в Wing-Kin Sung, et al., *Nature Genetics* 44:765 (2012). В некоторых вариантах осуществления S-область определяется как область от начала малого S-белка (в изоляте генотипа В КС315400.1, положение #155) до начала X-белка (в изоляте генотипа В КС315400.1, положение #1373). В некоторых вариантах осуществления X-область определяется как область от начала малого X-белка (в изоляте генотипа В КС315400.1, положение #1374) до начала DR2 (в изоляте генотипа В КС315400.1, положение #1603).

[0073] В некоторых вариантах осуществления АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК, которая содержит, состоит из или по существу состоит по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 смежных нуклеотидов в положениях 100-800 или 1050-1700 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК, которая содержит, состоит из или по существу состоит из 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12 или 7-11 смежных нуклеотидов в положениях 100-800 или 1050-1700 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК, которая содержит, состоит из или по существу состоит по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 смежных нуклеотидов в положениях 180-280, 300-450, 650-775, 1125-1300 или 1400-1650 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК, которая содержит, состоит из или по существу состоит по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 смежных нуклеотидов в положениях 180-215, 230-270, 350-420, 675-730, 1165-1210, 1245-1290, 1400-1480 или 1500-1630 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК, которая содержит, состоит из или по существу состоит по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 смежных нуклеотидов, начиная с положения 191, 245, 246, 276, 376, 377, 381, 383, 694, 700, 1182, 1261, 1262, 1408, 1410, 1426, 1431, 1432, 1433, 1435, 1438, 1441, 1443, 1513,

1516, 1517, 1518, 1519, 1520, 1521, 1522, 1527, 1559, 1575, 1576, 1577, 1580, 1581, 1582 или 1589 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления АСО идеально комплементарен вирусной целевой последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления существует не более 5, 4, 3, 2 или 1 несоответствия между АСО и вирусной целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления существует не более 2 несоответствий между АСО и вирусной целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления существует не более 1 несоответствия между АСО и вирусной целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления несоответствие находится в боковой ветви АСО. В некоторых вариантах осуществления несоответствие находится в 5'-боковой ветви АСО. В некоторых вариантах осуществления несоответствие находится в 3'-боковой ветви АСО. В некоторых вариантах осуществления несоответствие находится в центральной области АСО.

[0074] В некоторых вариантах осуществления центральная область комплементарна или гибридизована с вирусной целевой последовательностью РНК, которая содержит, состоит из или по существу состоит по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 смежных нуклеотидов в положениях 100-800 или 1050-1700 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления центральная область комплементарна или гибридизована с вирусной целевой последовательностью РНК, которая содержит, состоит из или по существу состоит из 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12 или 7-11 смежных нуклеотидов в положениях 100-800 или 1050-1700 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления центральная область комплементарна или гибридизована с вирусной целевой последовательностью РНК, которая содержит, состоит из или по существу состоит по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 смежных нуклеотидов в положениях 180-280, 300-450, 650-775, 1125-1300 или 1400-1650 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления центральная область комплементарна или гибридизована с вирусной целевой последовательностью РНК, которая содержит, состоит из или по существу состоит по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 смежных нуклеотидов в положениях 180-215, 230-270, 350-420, 675-730, 1165-1210, 1245-1290, 1400-1480 или 1500-1630 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления центральная область комплементарна или гибридизована с вирусной целевой последовательностью РНК, которая содержит, состоит из или по существу состоит по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 смежных нуклеотидов, начиная с положения 191, 245, 246, 276, 376, 377, 381, 383, 694, 700, 1182, 1261, 1262, 1408, 1410, 1426, 1431, 1432, 1433, 1435, 1438, 1441, 1443, 1513, 1516, 1517, 1518, 1519, 1520, 1521, 1522, 1527,

1559, 1575, 1576, 1577, 1580, 1581, 1582 или 1589 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления центральная область идеально комплементарна вирусной целевой последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления существует не более 5, 4, 3, 2 или 1 несоответствия между центральной областью и вирусной целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления существует не более 2 несоответствий между центральной областью и вирусной целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления существует не более 1 несоответствия между центральной областью и вирусной целевой последовательностью.

[0075] Следующие определенные последовательности в таблице 1 входят в объем настоящего раскрытия. В контексте данного документа, ln = закрытая нуклеиновая кислота (LNA); lnA = закрытая нуклеиновая кислота (LNA) A; ln(5m)C = закрытая нуклеиновая кислота (LNA)-5-метил C; lnG= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) G; lnT= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) T; (5m)C=5-метил-C; mA = 2-*O*-метокси A; mU = 2-*O*-метокси U; (8nh)A = 8-амино A; (8nh)G = 8-амино G; (2s)T = 2-тио T; (5-OH)C= 5-гидрокси C; cp = scp = циклопропил; cpC = scpC = циклопропил C; cpG = scpG= циклопропил G; cpT = scpT = циклопропил T; ps = фосфотиоатные связи. «Положение в геноме ВГВ» описывает 5'-конец целевой области в соответствии с КСЗ15400.1 (генотип В).

Таблица 1. Иллюстративные АСО			
SEQ ID NO.	АСО #	Положение в длине генома ВГВ_структуры_химерного олигонуклеотида	Последовательности [5'-3']
2	1	1527_16mer_3-10-3	5'ln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpslnGpslnTpslnG 3'
3	2	1559_15mer_4-8-3	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnGps(5m)CpsApsGpsApsTpsGpsApsGpslnApslnApslnG 3'
4	3	1576_16mer_4-8-4	5'lnApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnG 3'
5	4	1432_17mer_4-10-3	5'lnGpslnGpslnApslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
6	5	1582_16mer_3-10-3	5'lnGpslnApslnGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApslnGpslnTpslnG 3'
7	6	1522_15mer_3-8-4	5'lnApslnApslnGpsApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpslnGpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)C 3'
8	7	1432_16mer_4-9-3	5'lnGpslnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'

9	8	1527_17mer_4-10-3	5'In(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpslnGpslnTpslnG 3'
10	9	1431_17mer_3-10-4	5'InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
11	10	1580_15mer_3-9-3	5'InGpslnTpslnGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'
12	11	1589_15mer_2-10-3	5'In(5m)CpslnGpslnTpsGps(5m)CpsApsGpsApsGpsGpsTpsGpslnApslnApslnG 3'
13	12	1435_15mer_3-8-4	5'InGpslnGpslnGpsApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGpsln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnA 3'
14	13	1432_17mer_4-8-5	5'InGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
15	14	1431_15mer_3-9-3	5'InTpslnTpsln(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
16	15	1432_17mer_4-9-4	5'InGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
17	16	1527_16mer_3-9-4	5'In(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApslnGpslnGpslnTpslnG 3'
18	17	1513_15mer_3-9-3	5'InGpsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpsTpsGpsGpsTpsln(5m)CpslnGpslnG 3'
19	18	245_17mer_4-10-3	5'In(5m)CpslnApsln(5m)Cpsln(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApsGpslnAps(5m)CpslnT 3'
20	19	1426_15mer_3-8-4	5'In(5m)CpslnGps(5m)CpsGpsAps(5m)CpsGpsGpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnTpslnA 3'
21	20	377_17mer_4-8-5	5'InApslnApslnApsln(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApslnT 3'
22	21	1516_15mer_3-10-2	5'InGpslnGpslnTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpsTpsGpslnGpslnT 3'
23	22	1575_16mer_3-10-3	5'InApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
24	23	1580_16mer_3-9-4	5'InGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'
25	24	1261_15mer_3-8-4	5'In(5m)CpslnGpsln(5m)CpsApsGpsTpsApsTpsGpsGpsApslnTpsln(5m)CpslnGpslnG 3'
26	25	1519_16mer_3-10-3	5'InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'
27	26	1433_17mer_5-8-4	5'InGpslnGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpslnGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
28	27	1433_15mer_3-8-4	5'InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpslnAps(5m)CpslnG 3'
29	28	1431_17mer_4-10-3	5'InGpslnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
30	29	1518_16mer_3-10-3	5'InApslnGpslnApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpslnGpslnTpslnG 3'
31	30	1431_17mer_4-9-4	5'InGpslnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
32	31	1520_15mer_3-8-4	5'InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnG 3'
33	32	1519_17mer_3-10-4	5'InApslnGpslnApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'
34	33	1581_16mer_3-10-3	5'InApslnGpslnGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)C 3'

35	34	1575_15mer_3-10-2	5'InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'
36	35	1438_15mer_3-9-3	5'ln(5m)CpslnGps(5m)CpsGpsGpsGpsApsTpsTps(5m)CpsApsGpsln(5m)CpslnGpsln(5m)C 3'
37	36	1520_15mer_3-10-2	5'lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnG3'
38	37	1520_17mer_4-10-3	5'lnApslnApslnGpslnApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)CpslnG 3'
39	38	1517_15mer_3-9-3	5'lnApslnGpslnGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpslnTpslnGpslnG 3'
40	39	1262_15mer_3-8-4	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnGps(5m)CpsApsGpsTpsApsTpsGpsGpslnApslnTpsln(5m)CpslnG 3'
41	40	246_17mer_3-10-4	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnAps(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'
42	41	191_16mer_3-9-4	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'
43	42	1441_15mer_3-8-4	5'lnGpslnTpsln(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsGpsGpsGpsApsTpslnTpsln(5m)CpslnApslnG 3'
44	43	1443_17mer_3-10-4	5'lnGpslnGpslnTps(5m)CpsGpsTps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsGpsGpsGpslnApslnTpslnTpsln(5m)C 3'
45	44	1408_17mer_4-10-3	5'lnApsln(5m)CpslnApslnApsApsGpsAps(5m)CpsGpsTps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnG 3'
46	45	1433_16mer_4-9-3	5'lnGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
47	46	1432_17mer_3-10-4	5'lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
48	47	1433_16mer_3-10-3	5'lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
49	48	246_17mer_4-10-3	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'
50	49	1575_16mer_4-9-3	5'lnApslnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
51	50	1576_15mer_4-8-3	5'lnApslnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnG 3'
52	51	1580_16mer_3-10-3	5'lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'
53	52	1576_15mer_3-10-2	5'lnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnG 3'
54	53	191_16mer_4-8-4	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'
55	54	1435_15mer_3-9-3	5'lnGpslnGpslnGpsApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnA 3'
56	55	1518_15mer_3-9-3	5'lnGpslnApslnGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpslnGpslnTpslnG 3'
57	56	1581_16mer_4-9-3	5'lnApslnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)C 3'
58	57	694_17mer_4-9-4	5'lnGpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)CpsTpsAps(5m)CpsGpsApsAps(5m)Cps(5m)CpsApsln(5m)CpslnTpslnGpslnA 3'
59	58	377_15mer_4-8-3	5'lnApsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpsApslnT 3'
60	59	383_17mer_4-10-3	5'lnApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsln(5m)CpslnApslnG 3'

61	60	1432_15mer_4-8-3	5'InApslnTpslnTpsln(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
62	61	1408_15mer_2-10-3	5'InApslnApsApsGpsGpsAps(5m)CpsGpsTps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnG 3'
63	62	1522_15mer_3-9-3	5'InApslnApslnGpsApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)Cps 3'
64	63	1432_15mer_3-8-4	5'InApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3
65	64	383_17mer_4-8-5	5'InApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'
66	65	1410_15mer_4-8-3	5'InApsln(5m)CpslnApslnApsApsGpsGpsAps(5m)CpsGpsTps(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)CpslnG 3'
67	66	1581_15mer_3-10-2	5'InGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)C 3'
68	67	376_17mer_4-10-3	5'InApslnApsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnApslnTpsln(5m)C 3'
69	68	377_17mer_4-9-4	5'InApslnApslnApsln(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApslnT 3'
70	69	377_15mer_3-8-4	5'InApsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApslnT 3'
71	70	1582_15mer_3-10-2	5'InApslnGpslnGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnG 3'
72	71	377_16mer_3-10-3	5'InApslnApsln(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApslnT 3'
73	72	1576_16mer_4-9-3	5'InApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnG 3'
74	73	381_17mer_5-8-4	5'InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'
75	74	1580_16mer_4-9-3	5'InGpslnGpslnTpslnGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'
76	75	694_17mer_3-10-4	5'InGpsln(5m)Cpsln(5m)Cps(5m)CpsTpsAps(5m)CpsGpsApsAps(5m)Cps(5m)CpsApsln(5m)CpslnTpslnGpslnA 3'
77	76	1261_15mer_3-10-2	5'In(5m)CpslnGpsln(5m)CpsApsGpsTpsApsTpsGpsGpsApsTps(5m)CpslnGpslnG 3'
78	77	1518_15mer_3-10-2	5'InGpslnApslnGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpslnTpslnG 3'
79	78	383_17mer_4-9-4	5'InApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'
80	79	383_17mer_3-10-4	5'InApslnTpslnGpsApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'
81	80	377_17mer_4-10-3	5'InApslnApslnApsln(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApslnT 3'
82	81	1521_16mer_4-9-3	5'InApslnApslnGpslnApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)C 3'
83	82	1577_15mer_3-10-2	5'InApslnApslnGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)C 3'
84	83	1182_15mer_3-8-4	5'InGpslnTpslnTpsGps(5m)CpsGpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpslnApslnApslnApsln(5m)C 3'
85	84	700_17mer_3-10-4	5'InGpslnGpslnGpsApsApsApsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsTpsAps(5m)CpslnGpslnApslnApsln(5m)C 3'
86	85	383_17mer_5-8-4	5'InApslnTpslnGpslnApslnTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'

87	86	1576_16mer_4-8-4	5'lnApslnApslnGps(5m)AmCpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnG 3'
88	87	1576_16mer_4-8-4	5'lnApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsApsln(5m)CpsAmApsln(5m)CpslnG 3'
89	88	1576_16mer_4-8-4	5'lnApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)AmCpslnApsln(5m)CpslnG 3'
90	89	1575_16mer_3-10-3	5'ScpApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
91	90	1575_16mer_3-10-3	5'lnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpssepG 3'
92	91	383_17mer_4-8-5	5'ScpApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)CpsGpsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps lnApslnG 3'
93	92	383_17mer_4-8-5	5'lnApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)CpsGpsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps lnApsScpG 3'
94	93	383_17mer_4-8-5	5'lnApsScpTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'
95	94	1527_16mer_3-10-3	5'ln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsApslnGpsScpTpslnG 3'
96	9A	1431_17mer_3-10-4	5'lnGpslnApssepTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
97	9B	1431_17mer_3-10-4	5'mU-lnGpslnApssepTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
98	9C	1431_17mer_3-10-4	5'mU-lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps ln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
99	25A	1519_16mer_3-10-3	5'lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'
100	25B	1519_16mer_3-10-3	5'lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsAmT 3'
101	25C	1519_16mer_3-10-3	5'lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsAm(5m)CpslnGpslnT 3'
102	25D	1519_16mer_3-10-3	5'lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpssepT 3'
103	25E	1519_16mer_3-10-3	5'lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)scpCpslnGpslnT 3'
104	25F	1519_16mer_3-10-3	5'mU-lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps ln(5m)CpslnGpslnT 3'
105	25G	1519_16mer_3-10-3	5'mU-lnGpslnApslnGpsAps(8nh)GpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpssep(5m)CpslnGpslnT 3'
106	47A	1433_16mer_3-10-3	5'lnGpslnGpslnAps(2s)TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
107	47B	1433_16mer_3-10-3	5'lnGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
108	47C	1433_16mer_3-10-3	5'lnGpslnGpslnApsTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
109	47D	1433_16mer_3-10-3	5'mU-lnGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
110	47E	1433_16mer_3-10-3	5'mU-lnGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApssep(5m)CpslnG 3'

111	47F	1433_16mer_3-10-3	5'mU- lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps Gps lnApsln(5m)CpslnG 3'
112	73A	381_17mer_5-8-4	5'lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsG ps(5m)CpslnApslnGpslnAps(5m)C 3'
113	73B	381_17mer_5-8-4	5'mA-lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)C psGps(5m)CpslnApslnGpslnAps(5m)C 3'
114	73C	381_17mer_5-8-4	5'mA-lnGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnAps(5m)C 3'
115	34A	1575_15mer_3-10-2	5'mU- lnGpln(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsA ps (5m)CpslnGpslnG 3'
116	40A	246_17mer_3-10-4	5'mA- ln(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps sTps (5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'
117	23A	1580_16mer_3-9-4	5'mU- lnGpslnGps(5m)CpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsl n (5m)CpslnA 3'

[0076] В некоторых вариантах осуществления АСО содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей, приведенных в таблицах 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19. В некоторых вариантах осуществления АСО представляет собой АСО 120 или АСО 121.

[0077] В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеют последовательность, которая отличается от АСО из таблицы 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19 на один нуклеозид. В других вариантах осуществления АСО имеет последовательность, которая отличается от АСО из таблицы 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19 на 1, 2, 3 или 4 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из таблицы 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19. В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеют последовательность из таблицы 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19, но один Т в центральной области замещен (2s)Т, один С в центральной области замещен (5OH)С и/или один А замещен (8NH)А в центральной области. В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеют последовательность из таблицы 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19, но с одним или двумя ScpBNA, AmNA или GuNA в 5'-боковой части. В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеют последовательность из таблицы 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19, но с одним или двумя ScpBNA, AmNA или GuNA в 3'-боковой части. В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеют последовательность из таблицы 1, 2А,

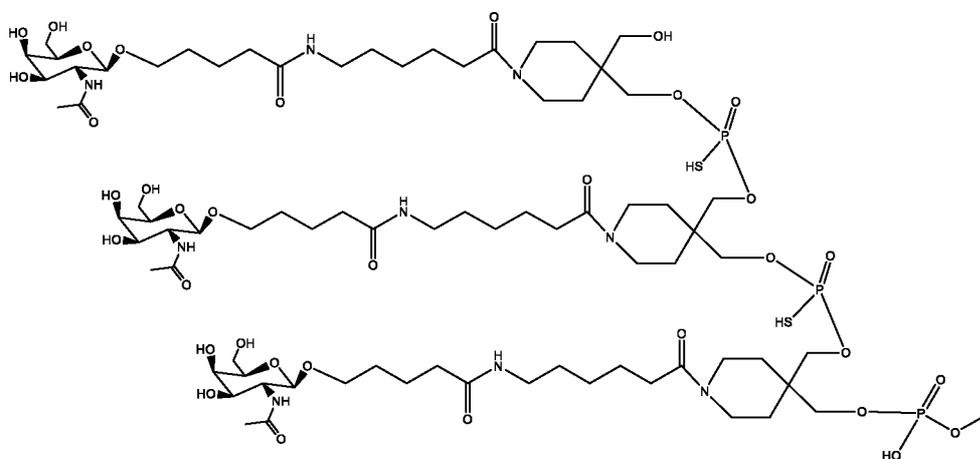
3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19, но с mA или mU, присоединенными к 5'-концу последовательности. В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеет последовательность из таблицы 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19, но с mA или mU, присоединенными к 5'-концу последовательности, которая соединяет производное GalNAc (например, GalNAc4, такой как GalNAc4-(PS)2-p- или GalNAc6, например, GalNAc6-(PS)2-p-), как подробно описано в данном документе.

[0078] В некоторых вариантах осуществления АСО содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 2-428. В некоторых вариантах осуществления АСО содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 400 или 404.

[0079] В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеют последовательность, которая отличается от любого из нуклеотидов в SEQ ID NO: 2-428 на один нуклеозид. В других вариантах осуществления АСО имеет последовательность, которая отличается от любого из нуклеотидов в SEQ ID NO: 2-428 на 1, 2, 3 или 4 нуклеозида. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 2-428. В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеют последовательность любой из SEQ ID NO: 2-428, но один Т в центральной области замещен (2s)Т, один С в центральной области замещен (5OH)С и/или один А замещен (8NH)А в центральной области. В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеют последовательность любой из SEQ ID NO: 2-428, но с одним или двумя ScpBNA, AmNA или GuNA в 5'-боковой части. В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеют последовательность любой из SEQ ID NO: 2-428, но с одним или двумя ScpBNA, AmNA или GuNA в 3'-боковой части. В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеют последовательность любой из SEQ ID NO: 2-428, но с mA или mU, присоединенными к 5'-концу последовательности. В некоторых вариантах осуществления АСО по настоящему раскрытию имеют последовательность любой из SEQ ID NO: 2-428, но с mA или mU, присоединенными к 5'-концу последовательности, которая соединяет производное GalNAc (например, GalNAc4, такой как GalNAc4-(PS)2-p- или GalNAc6, например, GalNAc6-(PS)2-p-), как подробно описано в данном документе.

[0080] Настоящее раскрытие также направлено на дополнительные компоненты, связанные с АСО, например, нацеливающие фрагменты и олигонуклеотиды, модифицированные у одного или более концов.

[0081] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент может содержать углевод, такой как моносахарид, например, *N*-ацетилгалактозамин (GalNAc), дисахариды, трисахариды, тетрасахариды, олигосахариды и полисахариды. В определенных вариантах осуществления нацеливающий фрагмент имеет один или более производных GalNAc, например, два или три производных GalNAc, прикрепленных к АСО посредством одного или более линкеров, необязательно в последовательной структуре. В определенных вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит три последовательных фрагмента GalNAc, прикрепленных посредством линкеров, таких как



[0082] В некоторых вариантах осуществления АСО содержит нацеливающий фрагмент у 5'-конца, 3'-конца или обоих концов АСО.

[0083] В определенных вариантах осуществления АСО модифицирован у одного или более концов посредством винилфосфонатного фрагмента, такого как 5'-винилфосфонатный фрагмент.

[0084] Композиции

[0085] Настоящее раскрытие также охватывает фармацевтические композиции, содержащие АСО по настоящему раскрытию. Один вариант осуществления представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую один или более АСО по настоящему раскрытию, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[0086] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая АСО по настоящему раскрытию, составлена для системного введения посредством парентеральной доставки. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; а также субдермальное введение, например, посредством имплантированного

устройства. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая АСО по настоящему раскрытию, составлена для подкожной (п/к) или внутривенной (в/в) доставки. Составы для парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие фармацевтически приемлемые добавки, что будет понятно специалисту в данной области. Для внутривенного применения, общую концентрацию растворенных веществ можно контролировать для получения изотонического препарата.

[0087] Фармацевтические композиции, содержащие АСО по настоящему раскрытию, подходят для лечения заболевания или расстройства, например, связанного с экспрессией или активностью гена ВГВ.

[0088] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит первый АСО по настоящему раскрытию, который комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК в первой Х-области ВГВ, и второй АСО по настоящему раскрытию, который комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК во второй Х-области или S-области ВГВ, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Если фармацевтическая композиция содержит два или более АСО, АСО могут присутствовать в различных количествах. Например, в некоторых вариантах осуществления массовое отношение первого АСО ко второму АСО составляет от 1:4 до 4:1, например, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 или 4:1. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение первого АСО ко второму АСО составляет от 1:4 до 4:1, например, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 или 4:1.

[0089] Способы применения

[0090] Один аспект настоящей методики включает способы лечения субъекта, у которого диагностировано, подозревается, что он имеет или находится в группе риска заражения ВГВ и/или расстройства, связанного с ВГВ. В терапевтических вариантах применения, композиции, содержащие один или более АСО в соответствии с настоящей методикой, вводят субъекту, у которого подозревают или который уже страдает таким заболеванием (как, *например*, устойчивость кнкДНК ВГВ, наличие антигена ВГВ (*например*, поверхностного антигена вируса гепатита В и/или капсульного антигена гепатита В) в сыворотке крови и/или печени субъекта или повышенные уровни вирусной нагрузки ВГВ), в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичной остановки симптомов заболевания, включая их осложнения и промежуточные патологические фенотипы в развитии болезни.

[0091] Субъекты, страдающие от инфекции ВГВ и/или связанного с ВГВ расстройства, могут быть идентифицированы посредством любого одного или комбинации диагностических или прогностических анализов, известных в данной области. Например, типичные симптомы инфекции ВГВ и/или связанного с ВГВ расстройства включают без ограничения следующее: наличие кнкДНК ВГВ в печени, присутствие антигена ВГВ в сыворотке крови и/или печени (например, поверхностного антигена вируса гепатита В и/или капсульного антигена гепатита В), повышенная АЛТ, повешенная АЛТ, отсутствие или низкий уровень антител к ВГВ, повреждение печени, цирроз, дельта-гепатит, острый гепатит В, острый фульминантный гепатит В, хронический гепатит В, фиброз печени, терминальная стадия заболевания печени, гепатоклеточная карцинома, сывороточно-подобный синдром, анорексия, тошнота, рвота, субфебрильная температура тела, боль в мышцах, утомляемость, *disordered gustatory acuity* нарушение остроты вкуса и обонятельных ощущений (отвращение к пище и сигаретам), боль в правом верхнем квадранте и эпигастрии (периодическая, от легкой до умеренной), печеночная энцефалопатия, сонливость, нарушения сна, спутанность сознания, кома, асцит, желудочно-кишечное кровотечение, коагулопатия, желтуха, гепатомегалия (умеренно увеличенная мягкая печень), спленомегалия, ладонная эритема, паутинные невусы, мышечное истощение, звездчатая гемангиома, васкулит, кровотечение из варикозно расширенных вен, периферический отек, гинекомастия, атрофия яичек, коллатеральные вены брюшной полости (*saput medusa*), высокий уровень аланин-аминотрансферазы (АЛТ) и аспартат-аминотрансферазы (АСТ) (в диапазоне 1000-2000 МЕ/мл), уровни АЛТ, превышающие уровни АСТ, повышенные уровни гамма-глутамилтранспептидаза (ГТГ) и/или щелочной фосфатазы (ЩФ), снижение уровня альбумина, повышение уровня сывороточного железа, лейкопения (т.е. гранулоцитопения), лимфоцитоз, повышенная скорость оседания эритроцитов (СОЭ), сокращение выживаемости эритроцитов, гемолиз, тромбоцитопения, продление международного нормализационного отношения (МНО), наличие ДНК ВГВ в сыворотке крови, повышение уровня аминотрансфераз (более 5 раз ВГН), повышение уровня билирубина, удлинение протромбинового времени (ПВ), гиперглобулинемия, наличие тканеспецифических антител, таких как антитела к гладким мышцам (ASMA) или антинуклеарные антитела (ANA), наличие тканеспецифических антител, таких как антитела к щитовидной железе, повышенный уровень ревматоидного фактора (РФ), гипербилирубинемия, низкое количество тромбоцитов и лейкоцитов, уровни АСТ, превышающие уровни АЛТ, лобулярное воспаление, сопровождающееся дегенеративными и регенеративными гепатоцеллюлярными изменениями и преимущественно центрилобулярным некрозом.

[0092] В некоторых вариантах осуществления у субъектов, подвергающихся лечению композицией АСО по настоящей методике, проявляется улучшение или устранение одного или нескольких из следующих состояний или симптомов: наличие кнкДНК ВГВ в печени, наличие антигена ВГВ в сыворотке крови и/или печени (например, поверхностного антигена вируса гепатита В и/или капсульного антигена гепатита В), отсутствие или низкий уровень антител к ВГВ, поражение печени, цирроз печени, дельта-гепатит, острый гепатит В, острый фульминантный гепатит В, хронический гепатит В, фиброз печени, терминальная стадия заболевания печени, гепатоцеллюлярная карцинома, синдром сывороточной болезни, анорексия, тошнота, рвота, субфебрильная температура, миалгия, утомляемость, нарушение остроты вкуса и ощущения запаха (отвращение к пище и сигаретам), боль в правом верхнем квадранте и 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, звездчатая невусы, мышечное истощение, звездчатые ангиомы, васкулит, кровотечение из варикозно расширенных вен, периферические отеки, гинекомастия, атрофия яичек, коллатеральные вены живота (caput medusa), уровни АЛТ, превышающие уровни АСТ, лейкопения (т.е. гранулоцитопения), снижение уровня альбумина, повышение уровня сывороточного железа, лимфоцитоз, повышение скорости оседания эритроцитов (СОЭ), сокращение выживаемости эритроцитов, гемолиз, тромбоцитопения, увеличение международного нормализованного отношения (МНО), наличие ДНК ВГВ в сыворотке крови, пролонгированное протромбиновое время (ПВ), гиперглобулинемия, наличие тканеспецифических антител, таких как антитела против гладких мышц (ASMA) или антинуклеарные антитела (ANA), наличие тканеспецифических антител, таких как антитела к щитовидной железе, гипербилирубинемия, низкий уровень тромбоцитов и лейкоцитов, уровни АСТ, превышающие уровни АЛТ, лобулярное воспаление, сопровождающееся дегенеративными и регенеративными гепатоцеллюлярными изменениями, и преимущественно центрилобулярный некроз.

[0093] В настоящем раскрытии представлен способ лечения субъекта, у которого диагностировано или подозревается наличие инфекции ВГВ и/или связанного с ВГВ расстройства, включающий введение субъекту эффективного количества композиции АСО по настоящей методике. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту первого АСО по настоящему раскрытию и второго АСО по настоящему раскрытию, причем первый АСО комплементарен или гибризован с вирусной целевой

последовательностью РНК в первой X-области ВГВ, и второй АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК во второй X-области или S-области ВГВ. В некоторых вариантах осуществления второй АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК во второй X-области ВГВ. В других вариантах осуществления второй АСО комплементарен или гибридизован с вирусной целевой последовательностью РНК в S-области ВГВ.

[0094] АСО по настоящему раскрытию можно применять для лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту любого из АСО, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту любой композиции, раскрытой в данном документе.

[0095] Введение АСО можно осуществлять посредством способов, известных в данной области. В некоторых вариантах осуществления АСО вводят посредством подкожной (п/к) или внутривенной (в/в) доставки. Препараты (*например*, АСО или композиции) по настоящему раскрытию можно доставлять перорально, парентерально, наружно или ректально. Разумеется, они доставляются в формах, подходящих для каждого пути введения. Например, их вводят в виде таблеток или капсул, введения посредством инъекции, инфузии или ингаляции; наружно в виде лосьона или мази; и ректально в виде суппозиториев. В некоторых вариантах осуществления предпочтительно подкожное введение.

[0096] Выражения «парентеральное введение» и «вводимый парентерально» в контексте настоящего описания означают способы введения, отличные от энтерального и наружного введения, обычно посредством инъекции, и включают без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную и внутригрудинную инъекцию и инфузию.

[0097] Выражения «системное введение», «вводимый системно», «периферическое введение» и «вводимый периферически» в контексте настоящего описания означают введение соединения, лекарственного средства или другого материала способом, отличным от непосредственного введения в центральную нервную систему, так что они попадают в организм пациента и, таким образом, подвергается метаболизму и другим подобным процессам, например, подкожное введение.

[0098] Данные соединения можно вводить людям и другим животным для лечения любым подходящим способом введения, включая пероральное, назальное, например, с помощью спрея, ректальное, интравагинальное, парентеральное, интрацестеральное и наружное введение, в виде порошков, мазей или капель, в том числе буккально и сублингвально.

[0099] Независимо от выбранного пути введения соединения (например, АСО) по настоящему раскрытию, которые можно применять в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции по настоящему раскрытию, составляют в фармацевтически приемлемые лекарственные формы посредством обычных способов, известных специалистам в данной области.

[0100] Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему раскрытию могут варьировать для получения количества активного ингредиента, которое эффективно для достижения необходимого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсичности для пациента.

[0101] Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного соединения (например, АСО) по настоящему раскрытию или его сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выведения или метаболизма конкретного применяемого соединения, скорости и степени абсорбции, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в сочетании с конкретным применяемым соединением, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и предыдущей истории болезни пациента, проходящего лечение, и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

[0102] Врач или ветеринар, обладающий обычными навыками в данной области, может легко определить и прописать эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать вводить дозы соединений (например, АСО) по настоящему описанию, применяемых в фармацевтической композиции, с уровней ниже требуемых для достижения необходимого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до тех пор, пока не будет достигнут необходимый эффект.

[0103] В целом, подходящей суточной дозой соединения (например, АСО) по настоящему раскрытию является количество соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для оказания терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно зависит от факторов, описанных выше. Предпочтительно, соединения вводят в дозировке от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг, более предпочтительно от

приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг, еще более предпочтительно от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят в дозировке от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг или от 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят в дозировке, равной или превышающей 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 или 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят в дозировке, равной или превышающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят в дозировке, равной или превышающей 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 или 15 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения равна или превышает 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 или 100 мг.

[0104] При необходимости эффективную суточную дозу активного соединения (например, АСО) можно вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более доз или субдоз, вводимых отдельно с соответствующими интервалами в течение суток, необязательно, в стандартных лекарственных формах. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 раз. Предпочтительная дозировка представляет собой одно введение в сутки. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят каждые 3 дня. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 недель. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят каждый месяц. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 месяцев. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят по

7, 8, 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, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 или 70 недель. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят по меньшей мере один раз каждые две недели в течение периода по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 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, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 или 70 месяцев. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят по меньшей мере один раз каждые четыре недели в течение периода по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 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, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 или 70 недель. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят по меньшей мере один раз каждые четыре недели в течение периода по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 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, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 или 70 месяцев.

[0105] Субъект в описанных способах может представлять собой млекопитающее, и он включает людей и отличных от людей млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека, такого как взрослый человек.

[0106] Некоторые варианты осуществления включают способ лечения вируса ВГВ у субъекта, инфицированного вирусом, включающий введение терапевтически эффективного количества одного или более АСО по настоящему раскрытию или композиции по настоящему раскрытию субъекту, нуждающемуся в этом, снижая таким образом вирусную нагрузку вируса у субъекта и/или снижая уровень антигена вируса у субъекта. АСО может быть комплементарным или гибридизироваться с частью целевой РНК в вирусе, например, второй X-области и/или S-области ВГВ.

[0107] В некоторых вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид, описанный в данном документе, можно применять в комбинации с одним или более дополнительных средств для лечения и/или ингибирования репликации ВГВ и/или ВГD. Если соединения (*например*, АСО), описанные в данном документе, вводят совместно с дополнительным средством, эффективное количество может быть меньше, чем при введении соединения отдельно. Дополнительные средства включают без ограничения аналоги интерферона, нуклеозид/нуклеотид, модуляторную сборку капсида (СAМ), siRNA, другие АСО, полимеры нуклеиновых кислот или полимеры олигонуклеотидов, ингибирующие

транспорт S-антигена (NAP или STOP), ингибитор проникновения в клетку и/или иммуномодулятор малых молекул. Примеры дополнительных средств включают ALG-010133, ALG-000184, рекомбинантный интерферон альфа 2b, IFN- α , PEG-IFN- α -2a, ламивудин, телбивудин, адефовир дипивоксил, клевудин, энтекавир, тенофовир алафенамид, тенофовир дизопроксил, NVR3-778, BAY41-4109, JNJ-632, JNJ-3989 (ARO-ВГВ), RG6004, GSK3228836, REP-2139, REP-2165, AB-729, VIR-2218, DCR-ВГВS, JNJ-6379, GLS4, ABI-H0731, JNJ-440, NZ-4, RG7907, EDP-514, AB-423, AB-506, ABI-H03733 и ABI-H2158. В некоторых вариантах осуществления любой из АСО, раскрытых в данном документе, вводят совместно с одним из STOP. Иллюстративные STOP описаны в Международной публикации №WO2020/097342 и Публикации патентного документа США №2020/0147124, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления STOP представляет собой ALG-010133. В некоторых вариантах осуществления любой из АСО, раскрытых в данном документе, вводят совместно с тенофовиром. В некоторых вариантах осуществления любой из АСО, раскрытых в данном документе, вводят совместно с САМ. Иллюстративные САМ описаны в Berke et al., *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(8):e00560-17, Klumpp, et al., *Gastroenterology*, 2018, 154(3):652-662.e8, Международных заявках на патент №№ PCT/US2020/017974, PCT/US2020/026116 и PCT/US2020/028349 и заявках на патент США №№ 16/789298, 16/837515 и 16/849851, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления САМ представляет собой ALG-000184, ALG-001075, ALG-001024, JNJ-632, BAY41-4109 или NVR3-778. В некоторых вариантах осуществления АСО и дополнительное средство вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления АСО и дополнительное средство вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления АСО вводят перед введением дополнительного средства. В некоторых вариантах осуществления АСО вводят после введения дополнительного средства.

[0108] Определения

[0109] Некоторые диапазоны представлены в данном документе с числовыми значениями, которым предшествует термин «приблизительно». Термин «приблизительно» применяется в данном документе для обеспечения буквального подтверждения точного числа, которому он предшествует, а также числа, которое близко или приблизительно к числу, которому предшествует термин. При определении того, является ли число близким или приблизительно конкретным указанным числом, близкое или приближающееся непрочитанное число

может быть числом, которое в контексте, в котором оно представлено, обеспечивает существенный эквивалент конкретно указанного числа.

[0110] Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, также можно применять на практике или при испытании настоящего изобретения, ниже описаны иллюстративные способы и материалы.

[0111] Если представлен диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение, вплоть до десятой единицы нижнего предела, если контекст явно не диктует иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим заявленным или промежуточным значением в указанный диапазон входит в объем настоящего изобретения. Верхний и нижний пределы данных меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также подпадают под действие настоящего изобретения, с учетом любых специально исключенных ограничений в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из данных включенных пределов, также включены в настоящее изобретение.

[0112] Настоящее раскрытие не ограничивается конкретными описанными вариантами осуществления, так как они могут варьировать. Также следует понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[0113] Как будет очевидно специалистам в данной области после прочтения настоящего раскрытия, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет дискретные компоненты и особенности, которые можно легко отделить или объединить с особенностями любого из нескольких других вариантов осуществления без отклонения от объема или сущности настоящего изобретения. Любой изложенный способ можно выполнять в порядке перечисления событий или в любом другом логически возможном порядке.

[0114] Все публикации и патенты, процитированные в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были специально и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки и включены в настоящий документ посредством ссылки для раскрытия и описания способов

и/или материалов, в связи с которыми цитируются данные публикации. Цитирование любой публикации предназначено для ее раскрытия до даты подачи и не должно толковаться как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать такую публикацию задним числом на основании предшествующего изобретения. Кроме того, указанные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут потребовать независимого подтверждения.

[0115] Примеры

[0116] Следующие ниже примеры иллюстрируют определенные варианты осуществления настоящего раскрытия для облегчения практического применения раскрытия квалифицированным специалистом. Соответственно, примеры никоим образом не рассматриваются как ограничивающие объем настоящего раскрытия.

[0117] Пример 1: Синтез АСО

[0118] Последовательности химерного олигонуклеотида АСО

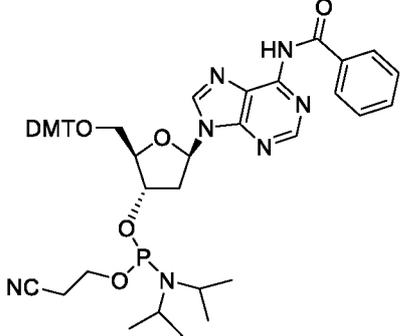
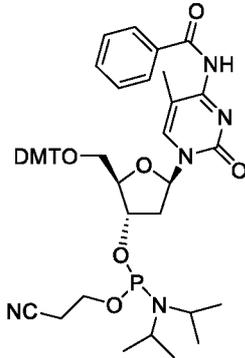
ДНК, 2'-O-Me, 2'-MOE и фосфорамидитовые мономеры LNA были закуплены из коммерчески доступных источников (Hongene Biotech USA Inc.). Все мономеры сушили в вакуумном эксикаторе с осушителями. (P₂O₅, КТ 24 ч.). Прикрепленные универсальные твердые опоры (CPG) получали от корпорации ChemGenes. Химические вещества и растворители для рабочего процесса синтеза были приобретены из коммерческих источников VWR/Sigma и их применяли без какой-либо очистки или обработки. Растворитель (ацетонитрил) и растворы (амидит и активатор) во время синтеза хранили над молекулярными ситами.

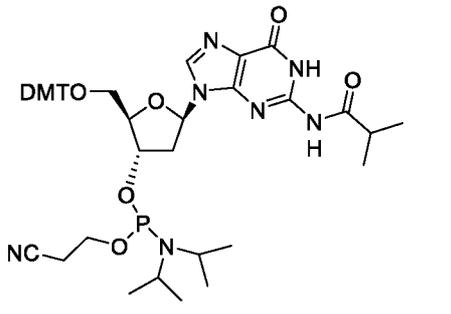
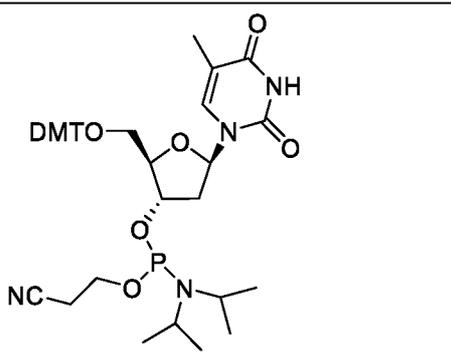
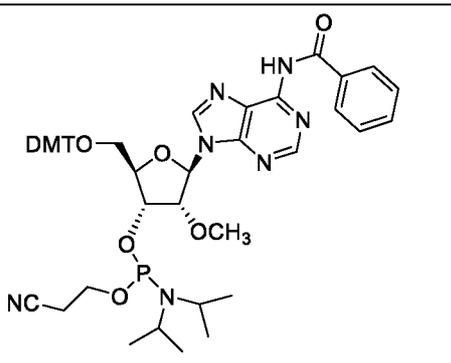
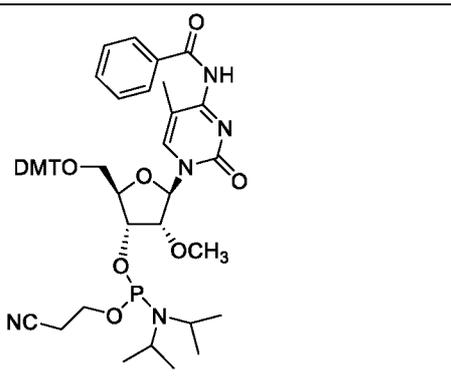
[0119] Контрольная и целевая олигонуклеотидная последовательность были синтезированы на синтезаторе Expedite 8909 с использованием стандартного цикла, написанного производителем, с модификациями нескольких стадий ожидания и модифицированных стадий связывания. Твердая подложка представляла собой стекло с регулируемыми порами, а мономеры содержали стандартные защитные группы. Каждый химерный олигонуклеотид был индивидуально синтезирован с использованием коммерчески доступных 5'-O-(4,4'-диметокситриил)-3'-O-(2-цианоэтил-N, N-диизопропила) ДНК, 2'-OMe, 2'-MOE и или фосфорамидитовых мономеров LNA 6-N-бензоиладенозина (A^{Bz}), 4-N-ацетилцитидина (C^{Ac}), 2-N-изобутирилгуанозин (G^{iBu}) и уридин (U) или тимидин (T), в соответствии со стандартными протоколами твердофазного синтеза фосфорамидита. Фосфорамидит 2'-O-Me-2,6-диаминопурин был приобретен у Glen Research. Фосфорамидиты получали в виде 0,1 М растворов в безводном ацетонитриле. 5-этилтиотетразол применяли в качестве активатора, 3% дихлоруксусную кислоту в дихлорметане применяли для детритилирования, уксусный

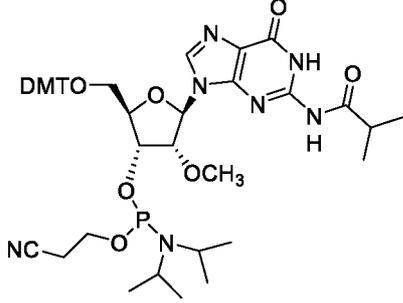
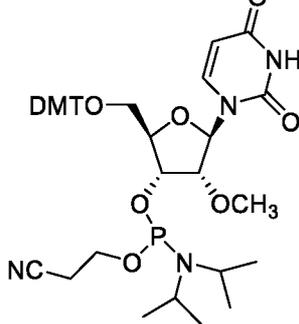
ангидрид в THF и 16% *N*-метилимидазол в THF применяли для кэпирования, и DDTT ((диметиламино-метилен) амино)-3Н-1,2,4-дитиазолин-3-тион применяли в качестве средства передачи серы для синтеза фосфотиоатов олигорибонуклеотида. Расширенное связывание 0,1 М раствора фосфорамидита в CH₃CN в присутствии активатора в виде 5-(этилтио)-1*H*-тетразола в твердый связанный олигонуклеотид с последующим расширенным кэпированием, окислением и снятием защиты с получением модифицированных олигонуклеотидов. Эффективность ступенчатого связывания всех модифицированных фосфорамидитов составила более 98,5%.

[0120] Снятие защиты и отщепление от твердого носителя достигали с использованием смеси аммиака и метаминна (1: 1, АМА) в течение 15 мин. при 65°C, если применяли универсальный линкер, снятие защиты оставляли на 90 мин. при 65°C или твердые носители нагревали с водным раствором аммиака (28%) при 55°C в течение 8 часов для снятия защиты с лабильных оснований защитных групп.

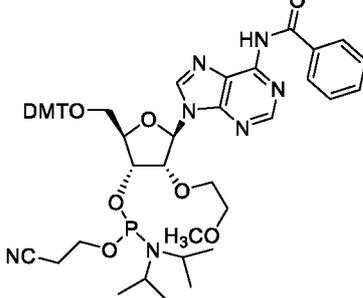
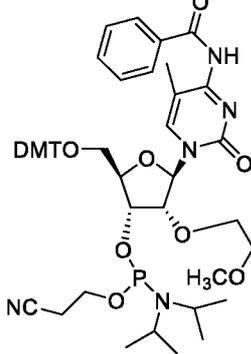
[0121] После фильтрования для удаления твердого носителя раствор для снятия защиты удаляли под вакуумом в центробежном испарителе GeneVac.

Фосфорамидит dA	
Фосфорамидит (5-Me)-dC	

Фосфорамидит dG	
Фосфорамидит dT	
Фосфорамидит 2'-ОМе-А	
Фосфорамидит 2'-ОМе-(5m)C	

Фосфорамидит 2'-ОМе-G	
Фосфорамидит 2'-ОМе-U	

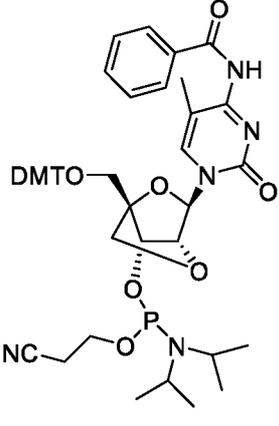
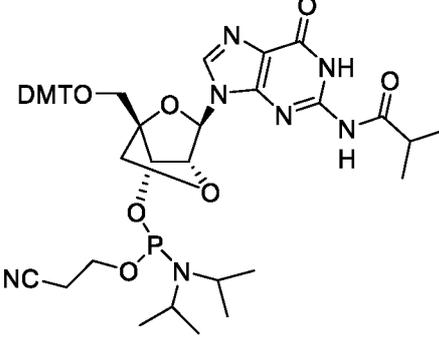
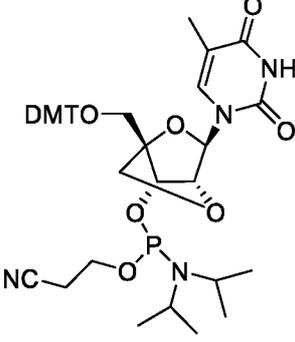
Фосфорамидиты 2'-МОЕ

Фосфорамидит 2'-МОЕ-A	
Фосфорамидит 2'-МОЕ (5m) C	

Фосфорамидит 2'-МОЕ-G	
Фосфорамидит 2'-МОЕ-T	

Фосфорамидит закрытой нуклеиновой кислоты (LNA)

Фосфорамидит LNA-A	
--------------------	--

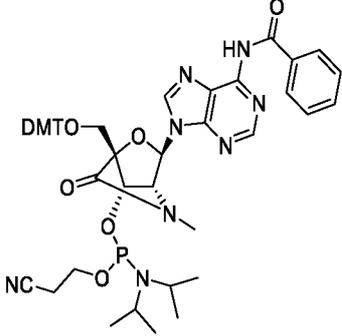
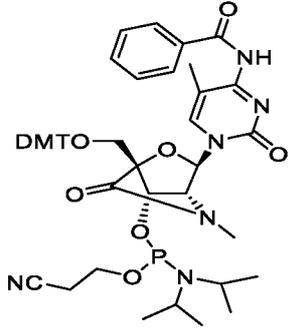
Фосфорамидит LNA(5m) C	
Фосфорамидит LNA-G	
Фосфорамидит LNA-T	

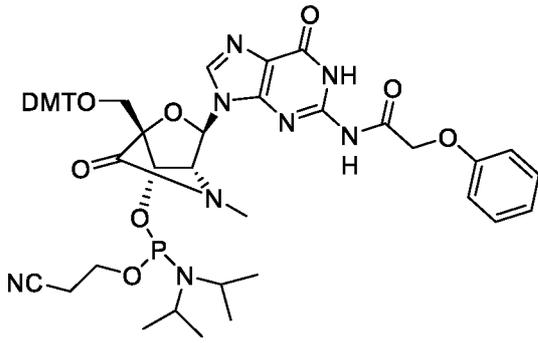
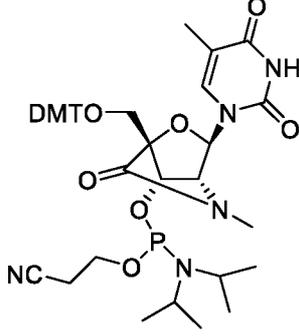
[0122] Последовательности модифицированного химерного олигонуклеотида

[0123] AmNA (N-Me)-T, AmNA (N-Me)-4-*N*-бензоил (5m) цитидин ((5m) C^{Bz}), AmNA (N-Me)-4-*N*-бензоилцитидин (A^{Bz}), и AmNA (N-Me)-2-*N*-рас (G^{pac}) приобретали от Luxna Biotech, тогда как фосфорамидитовые мономеры scr-BNA-T, scr-BNA-6-*N*-бензоиладенозина (A^{Bz}), scr-BNA-4-*N*-бензоил-5 метилцитидина ((5m) C^{Bz}), scr-BNA-2-*N*-гуанозина (G^{ibu}) синтезировали в соответствии с процедурой, описанной в ссылках (Takao Yamaguchi, Masahiko Horiba and Satoshi Obika; *Chem. Commun.*, 2015, 51, 9737-9740 ; Masahiko Horiba, Takao Yamaguchi, and Satoshi Obika; *Journal of Organic Chemistry*, 2016, 81, 11000-11008). Все мономеры сушили в

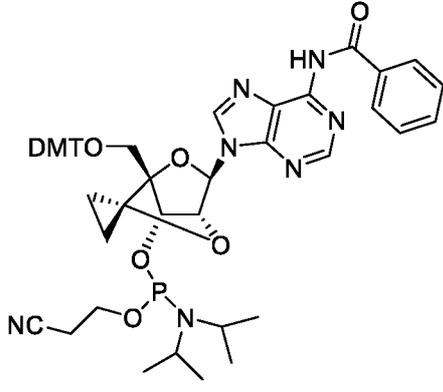
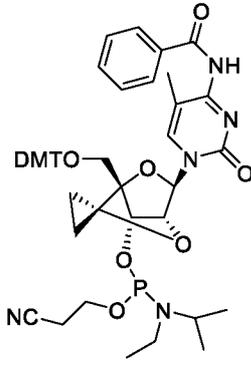
вакуумном эксикаторе с осушителями (KOH и P₂O₅, при комнатной температуре в течение 24 часов). В случае модификаций AmNA (N-Me)-PS-DNA-PS и scr-BNA-PS-DNA-PS, синтез осуществлялся в масштабе 1 мкмоль в направлении от 3' до 5' с фосфорамидитовыми мономерами, разведенными до концентрации 0,12 моль в безводном CH₃CN в присутствии 0,3 моль активатора в виде 5-(бензилтио)-1H-тетразола (время сочетания 16 мин.) в твердый связанный олигонуклеотид с последующим блокированием, окислением и снятием защиты с получением модифицированных олигонуклеотидов. Эффективность ступенчатого связывания всех модифицированных фосфорамидитов составила более 97%. DDTT (диметиламино-метилен)амино)-3H-1,2,4-дитиазолин-3-тион применяли в качестве средство передачи серы для синтеза фосфотиоатов олигорибонуклеотида. Твердые носители, содержащие олигонуклеотид, промывали 20%-ным раствором DEA в ацетонитриле в течение 15 мин., затем колонку тщательно промывали MeCN. Носитель нагревали при 65°C со смесью диизопропиламин:вода:метанол (1:1:2) в течение 8 ч. в тепловом блоке для отщепления от носителя и снятия защиты лабильных оснований защитных групп.

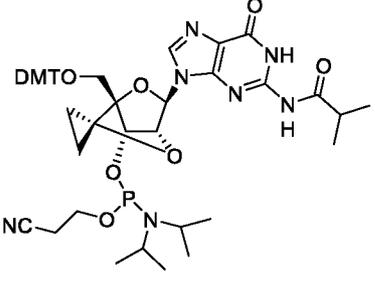
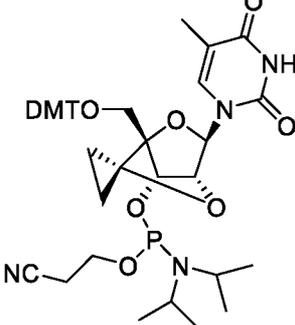
Мономеры AmNA (N-Me)

Фосфорамидит AmNA-NCH ₃ -A	
Фосфорамидит AmNA-NCH ₃ -(5m)C	

Фосфорамидит AmNA-NCH ₃ -G	
Фосфорамидит AmNA-NCH ₃ -T	

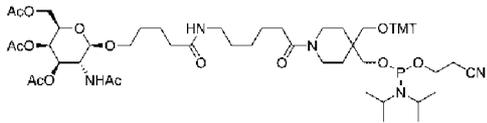
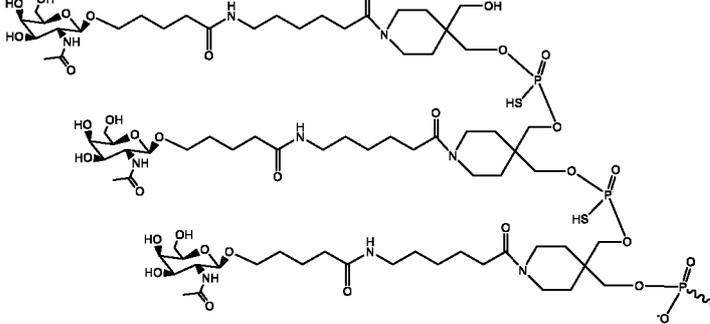
Мономеры scp-BNA

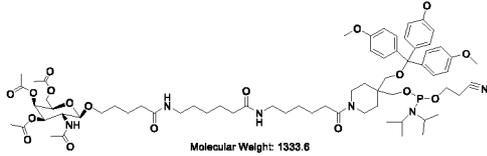
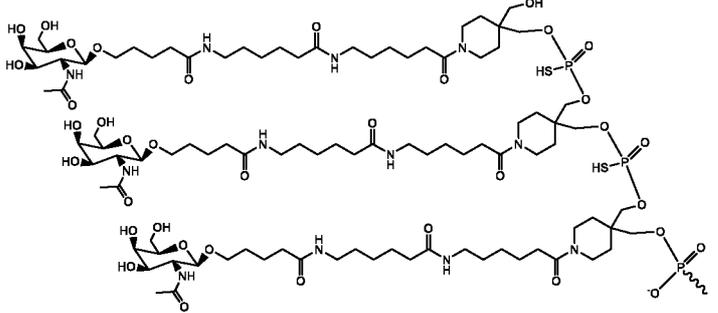
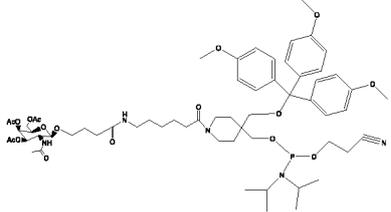
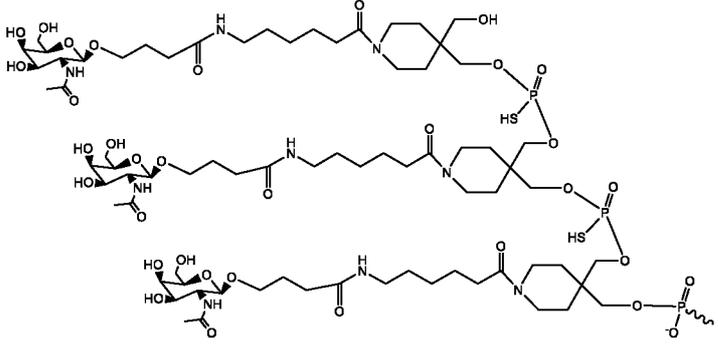
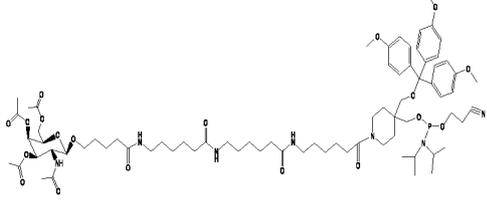
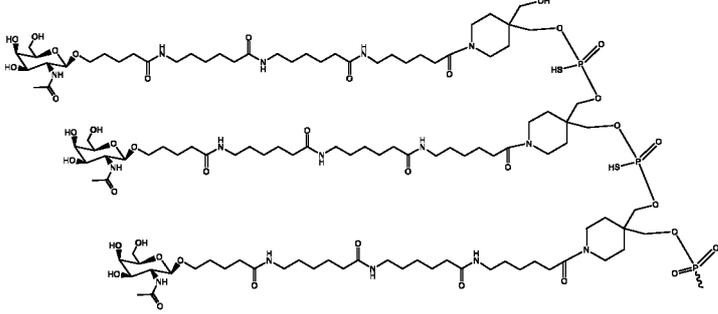
Фосфорамидит scp-BNA-A	
Фосфорамидит scp-BNA-(5m)C	

Фосфорамидит scr-BNA-G	
Фосфорамидит scr-BNA-T	

[0124] Конъюгированные с 5' и 3'-GalNAc олигонуклеотиды были синтезированы с фрагментами GalNAc различной длины, например, как описано ниже. GalNAc3, GalNAc4, GalNAc5 и GalNAc6 конъюгировали с олигонуклеотидами во время синтеза с 1, 2 или 3 частями таким же образом, как описано ниже. Следующие фрагменты GalNAc, такие как GalNAc-1 и GalNAc-2, которые были ранее описаны в данном документе, также применяют для образования 5' и 3'-GalNAc с использованием конъюгации после синтеза.

Фосфорамидиты GalNAc

Составные блоки GalNAc	После прикрепления к олигомерам (номенклатура)
<p>Фосфорамидит GalNAc-3</p> 	

	(GalNAc3-(PS)2-p)
<p>Фосфорамидит GalNAc-4</p>  <p>Molecular Weight: 1333.6</p>	 <p style="text-align: center;">(GalNAc4-(PS)2-p)</p>
<p>Фосфорамидит GalNAc-5</p> 	 <p style="text-align: center;">(GalNAc5-(PS)2-p)</p>
<p>Фосфорамидит GalNAc-6</p> 	 <p style="text-align: center;">(GalNAc6-(PS)2-p)</p>

[0125] Количественное определение неочищенного олигомера или анализ сырья

[0126] Образцы растворяли в деионизированной воде (1,0 мл) и количественно определяли следующим образом: Вначале гашение выполнял только с водой на УФ-спектрофотометре Nanodrop. Приборы NanoDrop могут измерять широкий диапазон концентраций нуклеиновых кислот за счет применения нескольких длин пути. Наиболее точные результаты количественного определения могут быть достигнуты посредством измерения разбавленных олигонуклеотидов с оптической плотностью при 260 нм. Неочищенный материал хранят при -20°C.

[0127] Анализ неочищенного материала посредством ВЭЖХ/ЖХ-МС

[0128] 0,1 OD неочищенных проб применяли для МС-анализа неочищенного продукта. После подтверждения данных по анализу неочищенного продукта посредством ЖХ-МС осуществляли стадию очистки.

[0129] Очистка посредством ВЭЖХ

[0130] Фосфодиэфир (PO), фосфотиоат (PS) и химерные модифицированные олигонуклеотиды очищали посредством анионообменного способа ВЭЖХ. Буферы представляли собой 20 ммоль фосфата натрия в 10 % CH₃CN, pH 8,5 (буфер А) и 20 ммоль фосфата натрия в 10% CH₃CN, 1,8 моль NaBr, pH 8,5 (буфер В). Фракции, содержащие олигонуклеотиды полной длины, объединяли, обессоливали и лиофилизировали.

[0131] Конъюгированные с липидами олигонуклеотиды очищали посредством насадочной колонки с обращенной фазой RPC-Source15 собственного производства. Буферы представляли собой 20 ммоль ацетата натрия в 10% CH₃CN, (буфер А) и CH₃CN (буфер В). Фракции, содержащие олигонуклеотиды полной длины, объединяли, обессоливали и лиофилизировали.

[0132] Обессоливание очищенного олигомера

[0133] Затем очищенный сухой олигомер обессоливали с использованием Sephadex G-25 M (Amersham Biosciences). Картридж трижды кондиционировали с использованием 10 мл деионизированной воды. Очищенный олигонуклеотид, тщательно растворенный в 2,5 мл деионизированной воды, наносили на картридж с очень медленным элюированием по каплям. Не содержащий соли олигомер элюировали 3,5 мл деионизированной воды непосредственно во флакон с завинчивающейся крышкой.

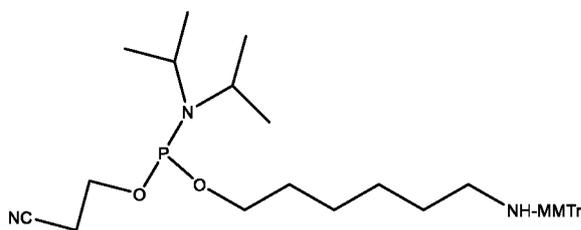
[0134] Окончательный анализ посредством ВЭЖХ и электрораспылительной ЖХ/МС

[0135] Примерно 0,10 OD олигомера растворяют в воде, а затем переносят в специальные флаконы для анализа IEX-ВЭЖХ и ЖХ/МС. Посредством аналитических ВЭЖХ и ЭР ЖХ-МС была установлена целостность химерных олигонуклеотидов.

[0136] Конъюгация сложных эфиров GalNAc с олигонуклеотидами после синтеза

[0137] Синтез прекурсора 5'-С6-амино

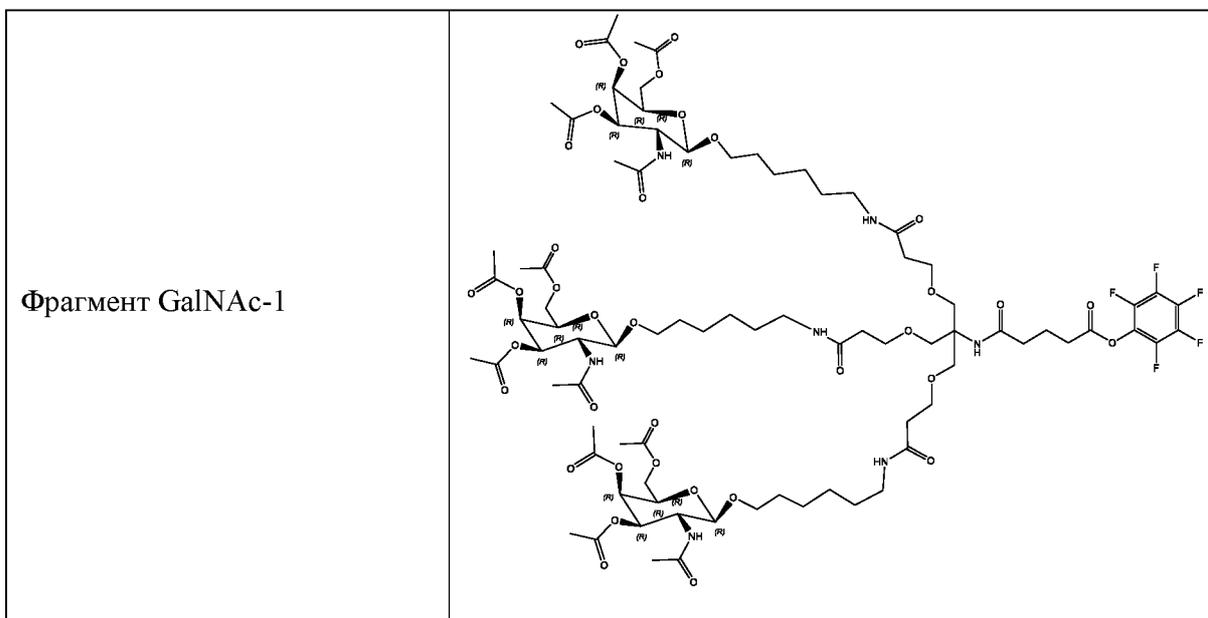
[0138] Последовательности синтезировали при шкале 10 мкмоль с использованием универсального держателя (загрузка 65 мкмоль/г). На 5'-конце для введения линкера С6-NH₂ 6-(4-монометокситритиламино)гексил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидит в 0,1 моль ацетонитрила применяли со временем сочетания 10 мин. Содержащие олигонуклеотид твердые опоры нагревали при комнатной температуре с водным раствором аммиака/метиламина (1:1) в течение 3 ч. В смесителе для отщепления от опоры и снятия защиты с лабильных защитных групп основания. После очистки ИЕХ и обессоливания модифицированный С6-NH₂ АСО применяли для осуществления конъюгации после синтеза.

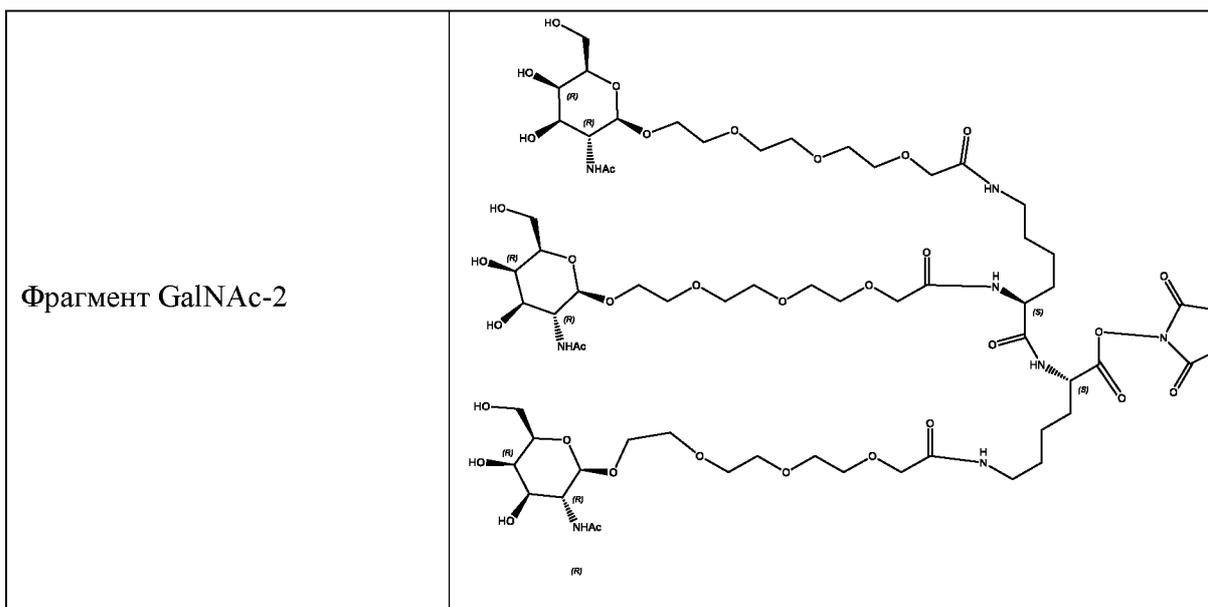


5'-амино-модификатор С6

6-(4-монометокситритиламино)гексил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидит

Сложный эфир GalNAc для конъюгации





[0139] Конъюгация после синтеза 5'-GalNAc

[0140] Модифицированные 5'-C6-NH₂ последовательности растворяли в 0,2 моль натрийбикарбонатного буфера, pH 8,5 (0,015 ммоль) и добавляли 5-7 молярных эквивалентов сложного эфира GalNAc, растворенного в DMSO. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Образец анализировали для подтверждения наличия каких-либо непрореагировавших amino-модифицированных АСО. К этому добавляли водный аммиак (28 мас.%) (5 × реакционный объем) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2-3 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, остаток растворяли в воде и очищали с помощью ВЭЖХ на колонке с сильным анионитом.

[0141] Пример 2. Протокол анализа высвобождения поверхностного антигена вируса гепатита В (НepG2.2.15)

[0142] Клетки НepG2.2.15 (стабильная клеточная линия с четырьмя интегрированными геномами ВГВ) поддерживали в среде DMEM с 10% фетальной телячьей сывороткой (FBS) и 1% пенициллина/стрептомицина, 1% глутамина, 1% заменимых аминокислот, 1% пирувата натрия и 250 мкг/мл G418. Клетки поддерживали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для анализа высвобождения поверхностного антигена вируса гепатита В, получали среду для анализа: DMEM с 5% фосфатно-солевого буферного раствора, 1% пенициллина/стрептомицина, 1% глутамина и 1% DMSO. За день до анализа трипсинизированные клетки НepG2.2.15 один раз промывали аналитической средой, центрифугировали при 250 г × 5 мин., ресуспендировали в аналитической среде и посевные клетки в количестве 50000/лунка в аналитической среде в 96-

луночных планшетах, покрытых коллагеном. На следующий день АСО разбавляли Opti-MEM, 9-pt, 3-кратное разведение, и Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen) разбавляли согласно инструкции производителя. Разведение АСО и разведение RNAiMAX смешивали, оставляли при комнатной температуре на 5 минут и добавляли по 15 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета. Планшеты оставляли при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе на 5 дней. После инкубации супернатант собирали и измеряли в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В с помощью набора для ELISA (Diasino). Жизнеспособность клеток измеряли с помощью CellTiter-Glo (Promega). EC₅₀, концентрацию лекарственного средства, необходимую для снижения секреции поверхностного антигена вируса гепатита В на 50% по сравнению с контролем необработанных клеток, рассчитывали с использованием Prism Graphpad. CC₅₀, концентрация лекарственного средства, необходимая для снижения жизнеспособности клеток на 50% по сравнению с контролем необработанных клеток, рассчитывали с помощью того же программного обеспечения.

[0143] Полученные значения EC₅₀ и CC₅₀ для соединений в таблице 1 представлены в следующей таблице 2. Значения EC₅₀ являются следующими: А: < 0,1 нмоль, В: 0,1 нмоль - 1 нмоль, С: 1 - 10 нмоль.

Таблица 2. Анализ высвобождения поверхностного антигена вируса гепатита В		
АСО #	Анализ высвобождения EC₅₀ поверхностного антигена вируса гепатита В HepG2.2.15	Жизнеспособность клеток HepG2.2.15 CC₅₀ нмоль
1	А	более 10
2	А	более 10
3	А	более 10
4	А	более 10
5	В	более 10
6	В	более 10
7	В	более 10
8	В	более 10
9	В	более 10
10	В	более 10
11	В	более 10
12	В	более 10
13	В	более 10
14	В	более 10
15	В	более 10
16	В	более 10
17	В	более 10
18	В	более 10
19	В	более 10

Таблица 2. Анализ высвобождения поверхностного антигена вируса гепатита В		
АСО #	Анализ высвобождения ЕС₅₀ поверхностного антигена вируса гепатита В НерG2.2.15	Жизнеспособность клеток НерG2.2.15 СС₅₀ нмоль
20	В	более 10
21	В	более 10
22	В	более 10
23	В	более 10
24	В	более 10
25	В	более 10
26	В	более 10
27	В	более 10
28	В	более 10
29	В	более 10
30	В	более 10
31	В	более 10
32	В	более 10
33	В	более 10
34	В	более 10
35	В	более 10
36	В	более 10
37	В	более 10
38	В	более 10
39	В	более 10
40	В	более 10
41	В	более 10
42	В	более 10
43	В	более 10
44	В	более 10
45	В	более 10
46	В	более 10
47	В	более 10
48	В	более 10
49	В	более 10
50	В	более 10
51	В	более 10
52	В	более 10
53	С	более 10
54	С	более 10
55	С	более 10
56	С	более 10
57	С	более 10
58	С	более 10
59	С	более 10
60	С	более 10
61	С	более 10
62	С	более 10
63	С	более 10
64	С	более 10
65	С	более 10
66	С	более 10

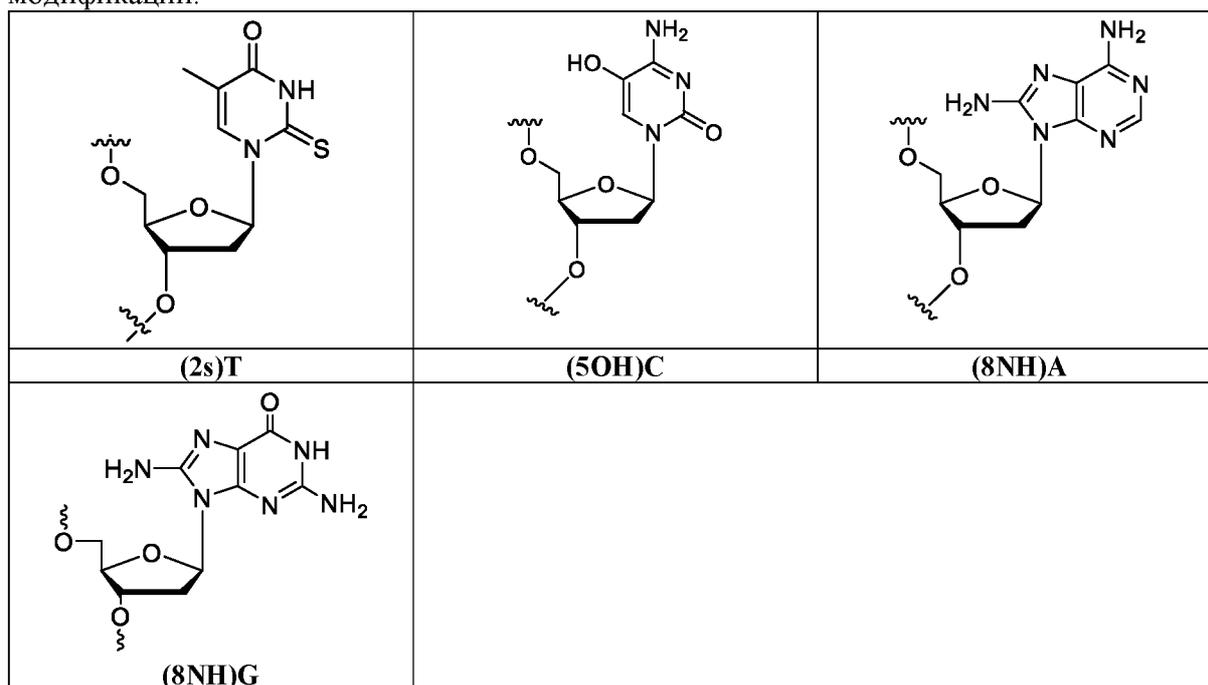
АСО #	Анализ высвобождения ЕС₅₀ поверхностного антигена вируса гепатита В HepG2.2.15	Жизнеспособность клеток HepG2.2.15 СС₅₀ нмоль
67	С	более 10
68	С	более 10
69	С	более 10
70	С	более 10
71	С	более 10
72	С	более 10
73	С	более 10
74	С	более 10
75	С	более 10
76	С	более 10
77	С	более 10
78	С	более 10
79	С	более 10
80	С	более 10
81	С	более 10
82	С	более 10
83	С	более 10
84	С	более 10
85	С	более 10
86	С	более 10
87	С	более 10
88	С	более 10
89	В	более 10
90	С	более 10
91	С	более 10
92	В	более 10
93	С	>10
94	С	>10

Таблица 2А. Логарифм снижения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови (максимальное снижение уровня) с 1x5 мг/кг

SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность 5'-3'	Расположение, длина и структура	Уровень поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови
118	116	5'lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	1432_17mer_3-10-4	В

119	117	5'lnGpslnGpslnAps TpsTps(5m)Cps ApsGps(5m)CpsGps (5m)Cps(5m)Cps GpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1580_16m er_3-10-3	B
120	118	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps (5m)CpsAps(5m)Cps GpsApsGps Tps(5m)CpsTps ApslnGpslnApsln(5m)C 3'	1576_17m er_4-10-3	B
121	119	5'lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps (5m)CpsGps(5m)C ps(5m)Cps Gps(5m)CpsCpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	1431_17m er_5-8-4	C

В таблице 2А выделенные жирным шрифтом нуклеозиды содержат следующие модификации:



[0144] Пример 3. Испытание ACO GalNac в мышинной модели AAV-ВГВ

[0145] AAV/ВГВ представляет собой рекомбинантный AAV, несущий воспроизводимый геном ВГВ. Используя преимущество высокой гепатотропности генотипа 8 AAV, геном ВГВ может быть эффективно доставлен в клетки печени мыши. Заражение иммунокомпетентных мышей AAV/ВГВ может привести к долговременной ВГВ-виремии, которая имитирует хроническую ВГВ-инфекцию у пациентов. Модель AAV/ВГВ применяют для оценки in vivo активности различных типов средство против ВГВ. Мышей инфицировали AAV-ВГВ в день - 28 исследования. Испытуемые препараты или отрицательный контроль (PBS) вводили подкожно (если не указано иное) в виде однократной дозы в день 0 при 5 мг/кг или однократной дозы в день 0 при 10 мг/кг; или 3x10 мг/кг 1 раз в неделю (раз в неделю); или 3x10мг/кг каждые 3 дня (раз в 3 дня); или 5x10 мг/кг раз в 3 дня; или 6 доз по 3 мг/кг в дни 0, 3, 7, 14, 21, 28; или 6 доз по 10 мг/кг в дни 0, 3, 7, 14, 21, 28. Серийные образцы крови брали

каждые 5 дней в день 0, 5, 10 и 15; или более длительная продолжительность в зависимости от дизайна каждого исследования. Сывороточный антиген S ВГВ (поверхностный антиген вируса гепатита В), антиген Е (капсульный антиген гепатита В) и АЛТ анализировали посредством следующих способов:

Параметры	Оборудование	Реагент
Поверхностный антиген вируса гепатита В	ARCHITECT i2000 (Abbott Laboratories, Lake Bluff, IL, USA)	Набор реагентов поверхностного антигена вируса гепатита В (Abbott Ireland Diagnostics Division, Finisklin Business Park Sligo, IRL) Каталог: 6C36/08P08
Капсульный антиген гепатита В	ARCHITECT i2000 (Abbott Laboratories, Lake Bluff, IL, USA)	Набор реагентов капсульного антигена гепатита В (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, GER) Каталог: 6C32/07P64
Аланинаминотрансфераза (АЛТ)	Химический анализатор Roche Cobas 6000 c501 (Roche Diagnostics, Mannheim, GER)	Аланинаминотрансфераза в соответствии с IFCC (Roche Diagnostics, Mannheim, GER) Каталог: ACN 685

[0146] Полученное максимальное снижение \log_{10} уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови в ходе исследования представлено в следующей таблице, причем А снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В $\geq 1 \log_{10}$, В представляет собой снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В $0,5 - 1 \log_{10}$, и С представляет собой снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В $< 0,5 \log_{10}$

Таблица 3. Снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В Log (максимальное снижение уровня) для мышей, обработанных 1x5 мг/кг АСО				
SEQ ID No.	АСО #	Последовательность 5'-3'	Расположение, длина и структура	Уровень поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови
122	95	5'-GalNAc1-C6-p-InGpslnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	1432_16mer_4-9-3	B
123	96	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnTpslnGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	1580_15mer_3-+9-+3	C
124	97	5'-GalNAc1-C6-p-InApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)mCpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1576_16mer_4-8-4	B
125	98	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	1431_17mer_3-10-4	A
126	99	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApslnGpslnTpslnG 3'	1582_16mer_3-10-3	B
127	100	5'-GalNAc3-(PS)2-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnAps(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	246_17mer_3-10-4	A
128	101	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'	1575_15mer_3-10-2	B
129	102	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	1432_17mer_4-9-4	C
130	103	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)C 3'	1581_15mer_3-10-2	B
131	104	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnG 3'	1576_15mer_3-10-2	B
132	105	5'-GalNAc3-(PS)2-p--InApslnGpslnGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnG 3'	1582_15mer_3-10-2	A
133	106	5'-GalNAc5-(PS)2-p-po-InApslnGpslnGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpslnTpslnGpslnG 3'	1517_15mer_3-9-3	A
134	107	5'-GalNAc1-C6-p-CA-InGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1433_16mer_3-10-3	A

Таблица 3. Снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В Log (максимальное снижение уровня) для мышей, обработанных 1x5 мг/кг АСО				
SEQ ID No.	АСО #	Последовательность 5'-3'	Расположение, длина и структура	Уровень поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови
135	108	5'-GalNAc1-C6-p-CA- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'	1519_16mer_3-10-3	A
136	109	5'-GalNAc1-C6-p-CA- lnApslnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)C 3'	1581_16mer_4-9-3	A
137	110	5'-GalNAc1-C6-p-CA- lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	1580_16mer_3-9-4	A
138	111	5'-GalNAc1-C6-p-CA- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'	191_16mer_4-8-4	A
139	112	5'-GalNAc1-C6-p-CA- lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	381_17mer_5-8-4	A
140	113	5'-GalNAc1-C6-p-CA- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	246_17mer_4-10-3	A
141	114	5'-GalNAc1-C6-p-CA- ln(5m)CpslnApsln(5m)Cpsln(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApsGpslnApsln(5m)CpslnT 3'	245_17mer_4-10-3	A
142	115	5'-GalNAc1-C6-p-CA- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'	191_16mer_3-9-4	A
143	108A	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'	1519_16mer_3-10-3	
144	108B	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsAmT 3'	1519_16mer_3-10-3	
145	108C	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsAm(5m)CpslnGpslnT 3'	1519_16mer_3-10-3	
146	108D	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpssepT 3'	1519_16mer_3-10-3	
147	108E	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)scpCpslnGpslnT 3'	1519_16mer_3-10-3	

Таблица 3. Снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В Log (максимальное снижение уровня) для мышей, обработанных 1x5 мг/кг АСО				
SEQ ID No.	АСО #	Последовательность 5'-3'	Расположение, длина и структура	Уровень поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови
148	107A	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1433_16mer_3-10-3	
149	107B	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnAps(2s)TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1433_16mer_3-10-3	
150	107C	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1433_16mer_3-10-3	
151	107D	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1433_16mer_3-10-3	
152	107E	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mU-po-InGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1433_16mer_3-10-3	
153	107F	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mU-po-InGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnAps(5m)CpslnG- 3'	1433_16mer_3-10-3	
154	73B-G	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mA-po-InGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnAps(5m)C- 3'	381_17mer_5-8-4	
155	73C-G	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mA-po-InGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnAps(5m)C-3'	381_17mer_5-8-4	
156	121	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mU-po-InGpslnAps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	1431_17mer_3-10-4	
157	9C-G	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mU-po-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	1431_17mer_3-10-4	
158	34A-G	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mU-po-InGpsln(5m)Cps(8nh)ApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG-3'	1575_15mer_3-10-2	
159	23A-G	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mU-po-InGpslnGps(5m)Cps(8nh)ApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG-3'	1580_16mer_3-9-4	
160	25F-G	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mU-po-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT-3'	1519_16mer_3-10-3	

9	C	более 10	1431_17mer_3-10-4
50% ACO 8 + 50% ACO 9	A	>10	
ACO #	EC ₅₀ нмоль	CC ₅₀ нмоль	Положение_длина_структура
5	A	более 10	1582_16mer_4-9-3
7	B	более 10	1432_16mer_4-9-3
50% ACO 5 + 50% ACO 7	B (менее 7 отдельно)	>10	
ACO #	EC ₅₀ нмоль	CC ₅₀ нмоль	Положение_длина_структура
40	C	более 10	246_17mer_3-10-4
1	A	более 10	1527_16mer_3-10-3
50% ACO 40 + 50% ACO 1	A (менее 1 отдельно)	10	

[0149] Пример 5. Испытание модифицированного ACO в мышинной модели AAV-ВГВ с модификацией точек

[0150] ACO с химическими структурами LNA и BNA были синтезированы на синтезаторах ABI 394 и Expedite 8909 с использованием стандартной фосфодитной химии. Скрининг LNA-ACO in vitro проводили в клетках HepG2.2.15 с использованием анализа высвобождения поверхностного антигена вируса гепатита В. Для конъюгации N-ацетилгалактозамина (GalNac) выбирали сильнодействующие LNA-содержащие ACO и протестированы при 3 x 10 мг/кг каждые 3 дня на мышинной модели аденоассоциированного вируса (AAV)-ВГВ. Применяли модификации ветви BNA и по сравнению с его полностью LNA ACO. В таблице 5 показано максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в дозе 3x10 мг/кг раз в неделю по сравнению с ACO 108. В данных содержащих LNA ACO в НВХ-области, нацеленных на все транскрипты ВГВ, включая НВх, однократная замена 5-метил LNA С в ветви на 5-метилспироциклопропиле С улучшала максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В на 0,5 Log₁₀ МЕ/мл при снижении сывороточной аланинаминотрансферазы (АЛТ) в 3 раза.

Таблица 5. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В		
ACO #	Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в дозе 3x10 мг/кг раз в неделю	Макс. АЛТ в дозе 3x10 мг/кг раз в неделю

108A	Снижение 1 log	611 ед./л
108B	Снижение 0,97 log	629 ед./л
108C	Снижение 1,25 log	488 ед./л
108D	Снижение 1,17 log	272 ед./л
108E	Снижение 1,44 log	243 ед./л

[0151] АСО с LNA и/или модифицированными гэпом химическими структурами были синтезированы на синтезаторах ABI 394 и Expedite 8909 с использованием стандартной фосфодитной химии. Скрининг LNA-АСО *in vitro* проводили в клетках HepG2.2.15 с использованием анализа высвобождения поверхностного антигена вируса гепатита В. Для конъюгации N-ацетилгалактозамина (GalNac) выбирали сильнодействующие LNA-содержащие АСО и протестированы при 3 x 10 мг/кг каждые 3 дня на мышинной модели аденоассоциированного вируса (AAV)-ВГВ. Применяли гэп-модификации нуклеиновых оснований и сравнивали с АСО 107. В таблице 6 показан поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir в дозе 3x10 мг/кг раз в неделю по сравнению с АСО 107. В данных НВХ-областях LNA-АСО однократная замена дезокси-Т в промежутке на 2-тио-Т снижает сывороточную АЛТ в 30 раз до нормального уровня, сохраняя при этом активность *in vivo*.

Таблица 6. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В		
АСО #	Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В	Макс. АЛТ
107A	Снижение 0,90 log	596 ед./л
107B	Снижение 0,99 log	168 ед./л
107C	Снижение 0,90 log	29 ед./л
107D	Снижение 1,06 log	380 ед./л
1xPBS	Снижение 0,1 log	28 ед./л

[0152] Пример 6. Испытание GalNac АСО на мышинной модели AAV-ВГВ при однократной дозе 1x5 мг/кг

[0153] АСО испытывали в дозе 1 x 5 мг/кг на мышинной модели аденоассоциированного вируса (AAV)-ВГВ. Данный режим дозирования в основном предназначен для ранжирования

активности АСО in vivo. Несмотря на то, что авторы настоящего изобретения могли бы устранить небольшое количество очень токсичных АСО в печени с повышением уровня АЛТ на 1x5 мг/кг, для большинства АСО требуется более строгий режим дозирования для дифференцирования токсичности печени. Результирующее максимальное снижение log₁₀ уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке и кратное изменение АЛТ во время исследования представлены в таблице 7, причем А представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $\geq 1 \log_{10}$, В представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В 0,5 – 1 log₁₀, и С представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $< 0,5 \log_{10}$, и X ≤ 3 -кратное значение АЛТ контроля в виде несущей среды, что считается нормальным, Y составляет 3-кратное - 30-кратное значение АЛТ контроля в виде несущей среды, и Z составляет ≥ 30 -кратное значение АЛТ контроля в виде несущей среды. Как Y, так и Z считаются токсичными для печени.

[0154] Следующие определенные последовательности в таблице 7 входят в объем настоящего раскрытия. В контексте данного документа, ln = закрытая нуклеиновая кислота (LNA); lnA = закрытая нуклеиновая кислота (LNA) A; ln(5m)C = закрытая нуклеиновая кислота (LNA)-5-метил C; lnG= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) G; lnT= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) T; (5m)C=5-метил-C; mA = 2-О-метокси A; mU = 2-О-метокси U; (8nh)A = 8-амино A; (8nh)G = 8-амино G; (2s)T = 2-тио T; cp = scp = циклопропил; cpC = scpC = циклопропил C; cpG = scpG= циклопропил G; cpT = scpT = циклопропил T; ps = фосфотиоатные связи.

Таблица 7. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1 x 5 мг/кг				
SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность	Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log)	АЛТ
164	160	5' -GalNAc6-(PS)2-p-ClnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	B	X
165	161	5' GalNAc1-C6-NH-InGpslnTpslnGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	B	X
166	162	5' GalNAc1-C6-p-InApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X

Таблица 7. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1 x 5 мг/кг				
SEQ ID NO.	ACO #	Последовательность	Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log)	АЛТ
167	163	5' GalNAc3-(PS)2-p- lnGpslnTpslnGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5 m)CpslnA 3'	C	X
168	164	5' GalNAc1-C6-p- lnApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)mCpsApsln (5m)CpslnApsln(5m)CpslnG 3'	B	X
169	165	5' GalNAc1-C6-p- lnGpslnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)C psGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
170	166	5' GalNAc1-C6-p- ln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsGpsApsGpsApslnGp slnGpslnTpslnG 3'	B	X
171	167	5' GalNAc1-C6-p- lnGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)Cps(5m)Cps(5 m)CpslnGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3	C	X
172	168	5'GalNAc3-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApslnGps lnTpslnG 3'	B	Y
173	169	5'-GalNAc3-(PS)2-p- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGp sApsGpslnGpslnTpslnG 3'	C	X
174	170	5'GalNAc3-(PS)2-p- lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps GpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	X
175	171	5'-GalNAc3-(PS)2-p- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnAps(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGp sTps(5m)CpsTpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	A	X
176	172	5'-GalNAc3-(PS)2-p- lnApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5 m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'	C	X
177	173	5'-GalNAc3-(PS)2-p- lnGpsln(5m)Cpsln(5m)C(5m)CpsTpsAps(5m)CpsGpsApsAps(5m)C ps(5m)CpsApslnCpslnTpslnGpslnA 3'	C	X
178	174	5'-GalNAc3-(PS)2-p- lnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)Cps Apsln(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
179	175	5'-GalNAc3-(PS)2-p- ln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsGpsGpsApsTpsTps(5m)CpsApsGpsl n(5m)CpslnGpsln(5m)C 3'	C	X

Таблица 7. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1 x 5 мг/кг				
SEQ ID NO.	ACO #	Последовательность	Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log)	АЛТ
180	176	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
181	177	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnGpslnTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpsTpsGpslnGpslnG 3'	C	X
182	178	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)C 3'	B	X
183	179	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	C	X
184	180	5'-InGpslnApslnGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApslnGpslnTpslnG-p-(PS)2-GalNAc3 3'	C	X
185	181	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnG 3'	B	X
186	182	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InApslnGpslnGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnnG 3'	A	Y
187	183	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpsTpsGpsGpsTpsln(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
188	184	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InApslnGpslnGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpslnTpslnGpslnG 3'	A	Y
189	185	5'-GalNAc3-(PS)2-p-In(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpslnGpslnTpslnG 3'	C	X
190	186	5'-GalNAc3-(PS)2-p-In(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpslnGpslnTpslnG 3'	C	X
191	187	5'-GalNAc4-(PS)2-p-In(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpslnGpslnTpslnG 3'	C	X
192	188	5'-GalNAc4-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	B	X

Таблица 7. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1 x 5 мг/кг				
SEQ ID NO.	ACO #	Последовательность	Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log)	АЛТ
193	189	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InApScpTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'	C	X
194	190	5'-GalNAc2-C6-p-CAInApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'	C	X
195	191	5'-GalNAc2-C6-p-CAInApslnTpslnGpsApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'	C	X
196	192	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	X
197	193	5'-GalNAc6-(PS)2-p-In(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpslnGpslnTpslnG 3'	C	X
198	194	5'-GalNAc6-(PS)2-p-CAInGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	B	X
199	195	5'-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGC-p-(PS)2-GalNAc6-3'	A	X
200	196	5'-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGCA-p-(PS)2-GalNAc6-3'	A	X
201	197	5'-GalNAc4-(PS)2-p-ClnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	B	X
202	198	5'-GalNAc4-(PS)2-p-CAInGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	B	X
203	199	5'-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGC-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
204	200	5'-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGCA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	A	X
205	201	5'-GalNAc6-(PS)2-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	C	X

Таблица 7. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1 x 5 мг/кг				
SEQ ID NO.	ACO #	Последовательность	Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log)	АЛТ
206	202	5'-GalNAc4-(PS)2-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	A	X
207	203	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsepGpslnG 3'	B	X
208	204	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpsln(5m)CpsepGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
209	205	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpsep(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
210	206	5'-GalNAc5-(PS)2-p-cpGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
211	207	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpsep(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsepGpslnG 3'	C	X
212	208	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpsln(5m)CpsepGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsepGpslnG 3'	C	X
213	209	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpsAmG	A	X
214	210	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpsAmGpslnG	A	X
215	211	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpsAmGpslnGpslnG	B	X
216	212	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsam(5m)CpslnGpslnGpslnG	B	X
217	213	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApsamTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG	A	X
218	214	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpsAmApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG	B	X

Таблица 7. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1 x 5 мг/кг				
SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность	Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log)	АЛТ
219	215	5'-GalNAc5-(PS)2-p- AmGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG	A	X
220	216	5'-GalNAc2-C6-p- CAlnGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	C	X
221	217	5'-GalNAc2-C6-p- CAlnApslnApslnGpsApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpslnGpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)C 3'	B	X
222	218	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpscpG 3'	A	X
223	219	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpscpGpslnGpslnG 3'	B	X
224	220	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApscp(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	B	X
225	221	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApscpTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	X
226	222	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpscpApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG	B	X
227	223	5'-GalNAc5-(PS)2-p- cpGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	B	X
228	224	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApscpTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApscp(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	X
229	225	5'-GalNAc5-(PS)2-p- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApscp(5m)C	C	X
230	226	5'-GalNAc5-(PS)2-p- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApscpGpslnApsln(5m)C	B	X
231	227	5'-GalNAc5-(PS)2-p- ln(5m)Cpscp(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C	C	X

Таблица 7. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1 x 5 мг/кг				
SEQ ID NO.	ACO #	Последовательность	Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log)	АЛТ
232	228	5'-GalNAc5-(PS)2-p- cp(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsAps GpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C	C	X
233	229	lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
234	230	5'lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAp s(5m)CpslnGpslnG(5m)C-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
235	231	5'lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAp s(5m)CpslnGpslnGG-p-(PS)2-GalNAc4-3'	C	X
236	232	5'lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAp s(5m)CpslnGpslnGmA-p-(PS)2-GalNAc4-3'	C	X
237	233	5'lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAp s(5m)CpslnGpslnGm(5m)C-p-(PS)2-GalNAc4 3'	C	X
238	234	5'lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAp s(5m)CpslnGpslnGmG-p-(PS)2-GalNAc4 3'	C	X
239	235	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsAps GpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
240	236	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsAp sGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C(5m)C-p-(PS)2- GalNAc4 3'	B	X
241	237	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsAps GpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CG-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
242	238	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsAps GpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CmA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
243	239	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsAp sGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
244	240	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps Gps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
245	241	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps Gps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C(5m)C-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
246	242	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps Gps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CG-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X

Таблица 7. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1 х 5 мг/кг				
SEQ ID NO.	ACO #	Последовательность	Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log)	АЛТ
247	243	5' InGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps Gps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CmU-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
248	244	5'- InGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps Gps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)Cm(5m)C-p-(PS)2-GalNAc4 3'	C	X
249	245	5' InGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps Gps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CmG-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
250	246	5'-GalNAc4-(PS)2-p- InGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps Gps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C	B	X
251	247	5' InGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnG psln(5m)CpslnAmU-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
252	248	InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc6 3'	B	X
253	249	5'- InGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps Gps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-3'	B	X
254	250	5'-GalNAc4-(PS)2-p- mUlnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpsln nGpsln(5m)CpslnA-3'	C	X
255	251	5'-GalNAc4-(PS)2-p- TlnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAp s(5m)CpslnGpslnG-3'	B	X
256	252	5'-GalNAc4-(PS)2-p- mUlnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)Cps Aps(5m)CpslnGpslnG	B	X
257	253	5'-GalNAc6-(PS)2-p- mUlnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)Cps Aps(5m)CpslnGpslnG	C	X
258	254	5'-GalNAc4-(PS)2-p- AlnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cp sGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	B	X
259	255	5'-GalNAc6-(PS)2-p- AlnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cp sGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	B	X

Таблица 7. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1 x 5 мг/кг				
SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность	Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log)	АЛТ
260	256	5'-GalNAc4-(PS)2-p-AIn(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	B	X
261	257	lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGmA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
262	258	5'-lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnTmA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
263	259	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mUlnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG-3'	B	X
264	260	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mUlnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT-3'	B	X
265	261	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mUlnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	A	X
266	262	5'-lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGmU-p-(PS)2-GalNAc4 3'	A	X

[0155] Пример 7. Испытание модифицированного АСО в мышинной модели AAV-ВГВ в дозе 3x10 мг/кг раз в неделю

[0156] АСО испытывали в дозе 3 x 10 мг/кг каждую неделю на мышинной модели аденоассоциированного вируса (AAV)-ВГВ. Данный режим дозирования 3x10 мг/кг раз в неделю является более строгим, чем режим дозирования 1x 5 мг/кг, показанный в предыдущем разделе. Далее можно выбрать сильнодействующий АСО с наименьшим повышением АЛТ. Результирующее максимальное снижение log₁₀ уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке и кратное изменение АЛТ во время исследования представлены в таблице 8, причем А представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $\geq 1 \log_{10}$, В представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В 0,5 – 1 log₁₀, и С представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В < 0,5 log₁₀, и X \leq 3-кратное значение АЛТ контроля в виде несущей среды, что считается

нормальным. Y составляет 3-30-кратную АЛТ контроля в виде несущей среды, и Z ≥ 30-кратную АЛТ контроля в виде несущей среды. Считается, что как Y, так и Z проявляют токсичность для печени, причем Z является более серьезным.

[0157] Следующие определенные последовательности в таблице 8 входят в объем настоящего раскрытия. В контексте данного документа, ln = закрытая нуклеиновая кислота (LNA); lnA = закрытая нуклеиновая кислота (LNA) A; ln(5m)C = закрытая нуклеиновая кислота (LNA)-5-метил C; lnG = закрытая нуклеиновая кислота (LNA) G; lnT = закрытая нуклеиновая кислота (LNA) T; (5m)C = 5-метил-C; mA = 2-О-метокси A; mU = 2-О-метокси U; (8nh)A = 8-амино A; (8nh)G = 8-амино G; (2s)T = 2-тио T; cp = scp = циклопропил; cpC = scpC = циклопропил C; cpG = scpG = циклопропил G; cpT = scpT = циклопропил T; ps = фосфотиоатных связей; p = фосфодиэфирная связь.

Таблица 8. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3x10 мг/кг раз в неделю				
SEQ ID NO	ACO #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
267	263	5'-GalNAc1-C6-p-CpsApslnGpslnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	A	X
268	264	5'-GalNAc1-C6-p-CpsApslnGpslnTpslnGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	A	Y
269	265	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	Y
270	147	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG-3	A	Y
271	266	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnApsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApslnT-3'	A	Z
425	132B	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'	A	Y

Таблица 8. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3x10 мг/кг раз в неделю				
SEQ ID NO	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
426	267A	5'-GalNAc2-C6-p-CAInGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	A	Y
274	268	5'-GalNAc2-C6-p-CAIn(5m)Cpsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'	A	Z
275	269	5'-GalNAc2-C6-p-CAIn(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'	A	Z
276	270	5'-GalNAc2-C6-p-CAInGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	A	X
277	271	5'-GalNAc2-C6-p-CAIn(5m)CpslnApsln(5m)Cpsln(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApsGpslnApsln(5m)CpslnT 3'	A	Z
278	272	5'-GalNAc2-C6-p-CAInApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsln(5m)CpslnApslnG 3'	B	X
427	273A	5'-GalNAc2-C6-p-CAIn(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	A	Y
280	274	5'-GalNAc2-C6-p-CAInGpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)CpsTpsAps(5m)CpsGpsApsAps(5m)Cps(5m)CpsApsln(5m)CpslnTpslnGpslnA 3'	B	X
281	275	5'-GalNAc2-C6-p-CAInApslnApslnApsln(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsApsln(5m)CpslnAln(5m)CpslnApslnT 3'	A	Z
282	276	5'-GalNAc2-C6-p-CAInApslnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)C 3'	A	Y

Таблица 8. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3x10 мг/кг раз в неделю				
SEQ ID NO	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
283	277	5'-GalNAc2-C6-p-CAInGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	A	X
284	151	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG-3'	B	Y
205	201	5'-GalNAc6-(PS)2-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	B	X
285	279	5'-GalNAc2-C6-p-CAInGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsApsCpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'	A	X
286	152	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnAps(2s)TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG-3'	B	Y
287	153	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG-3'	A	X
288	154	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG-3'	A	Y
289	280	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	A	Y
290	281	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnApslnTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	A	X
291	282	5'-GalNAc6-(PS)2-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5oh)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
292	283	5'-GalNAc6-(PS)2-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAp	B	X

Таблица 8. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3x10 мг/кг раз в неделю				
SEQ ID NO	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
		s(5oh)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'		
293	284	ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)Cps(2s)TpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	B	X
294	285	5'-GalNAc2-C6-p-CApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnG-3'	A	Y
295	286	5'-lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
296	287	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'	A	X
297	288	5'-lnGpslnApscpTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
298	289	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG-3'	A	Z
299	290	5'-lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApscp(5m)CpslnG-3'	A	Z
300	136	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpscpT-3'	A	Y
301	137	5'-lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpscp(5m)CpslnGpslnT-3'	A	Y
302	133	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT-3'	A	Y
303	134	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsamT-3'	B	Y

Таблица 8. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3x10 мг/кг раз в неделю				
SEQ ID NO	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
304	135	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsam(5m)CpslnGpslnT-3'	A	Y
305	291	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnApslnGpslnApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnCpslnCpslnGpslnT-3'	A	Y
306	292	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnApsln(5m)CpslnApslnApsApsGpsGpsAps(5m)CpsGpsTps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnG-3'	A	X
307	293	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG-3'	B	X
308	294	5'-GalNAc2-C6-p-CAln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpslnGpslnTpslnG-3'	B	X

[0158] Пример 8. Испытание модифицированного АСО в мышинной модели ААV-ВГВ в дозе 3x10 мг/кг раз в 3 дня

[0159] . АСО испытывали в дозе 3 x 10 мг/кг каждые 3 дня мышинной модели аденоассоциированного вируса (AAV)-ВГВ. Режим дозирования 3x10 мг/кг раз в 3 дня является более строгим, чем 3x10 мг/кг раз в неделю, и в дальнейшем можно выбрать АСО с лучшими терапевтическими показателями. Результирующее максимальное снижение \log_{10} уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке и кратное изменение АЛТ во время исследования представлены в таблице 9, причем А представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $\geq 1 \log_{10}$, В представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $0,5 - 1 \log_{10}$, и С представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $< 0,5 \log_{10}$, и X ≤ 3 -кратное значение АЛТ контроля в виде несущей среды, что считается нормальным. Y составляет 3-30-кратную АЛТ контроля

в виде несущей среды, и $Z \geq 30$ -кратную АЛТ контроля в виде несущей среды. Считается, что как Y, так и Z могут быть токсичными для печени, причем Z является более серьезным.

[0160] Следующие определенные последовательности в таблице 9 входят в объем настоящего раскрытия. В контексте данного документа, In = закрытая нуклеиновая кислота (LNA); InA = закрытая нуклеиновая кислота (LNA) A; In(5m)C = закрытая нуклеиновая кислота (LNA)-5-метил C; InG= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) G; InT= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) T; (5m)C=5-метил-C; mA = 2-О-метокси A; mU = 2-О-метокси U; (8nh)A = 8-амино A; (8nh)G = 8-амино G; (2s)T = 2-тио T; cp = scp = циклопропил; cpC = scpC = циклопропил C; cpG = scpG= циклопропил G; cpT = scpT = циклопропил T; ps = фосфотиоатные связи. «Положение в геноме ВГВ» описывает 5'-конец целевого сайта в соответствии с КС315400.1 (генотип В), что соответствует SEQ ID NO: 1.

Таблица 9. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3x10 мг/кг раз в 3 дня				
SEQ ID No.	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
270	147	5' GalNAc2-C6-p-CAInApsInGpsIn(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsIn(5m)CpsInGpsInG 3'	B	Z
309	295	5' GalNAc6-(PS)2-p-InGpsInApsInTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsIn(5m)CpsInGpsInGpsInG 3'	B	X
244	240	5' InGpsInApsInTpsInApsInApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
310	297	5' InGpsInApsInTpsInApsInApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApscp(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
311	298	5' InGpsIn(5m)CpscpGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsInGpsInGA-p-(PS)2-GalNAc4-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
312	299	5' InGpscp(5m)CpsInGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsInGpsInGA-p-(PS)2-GalNAc4	B	X
313	300	5' cpGpsIn(5m)CpsInGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsInGpsInGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X

Таблица 9. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3х10 мг/кг раз в 3 дня				
SEQ ID No.	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
314	301	5' InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpsepGA 3'	B	X
315	302	5' InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsepGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
316	303	5' InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpsepApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
317	304	5' InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsepApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
318	305	5' InGpslnApslnTpslnApscpApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
319	306	5' InGpslnApscpTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
320	307	5' InGpsln(5m)CpsamGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
321	308	5' InGpsam(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
322	309	5' InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpsamGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
323	310	5' InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsamGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
324	311	5' amGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
325	312	5' InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsam(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
326	313	5' InGpslnApsamTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X

Таблица 9. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3х10 мг/кг раз в 3 дня				
SEQ ID No.	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
327	314	5' amGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
328	315	5' lnGpsamApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
329	316	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApscpGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
330	317	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApscp(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
331	318	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApscpGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
332	319	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApscp(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
333	320	5' ln(5m)Cpscp(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
334	321	5' cp(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
335	322	5' lnGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
336	323	5' lnGpscp(5m)CpslnGpsAps(8nh)ApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
337	324	5' cpGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X

Таблица 9. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3х10 мг/кг раз в 3 дня				
SEQ ID No.	ACO #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
338	325	5' InGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGp slnTpslnGpsc(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
339	326	5' InGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGp slnTpscGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
340	327	5' InGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGp scpTpslnGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
341	328	5' InGpslnGpscTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGp slnTpslnGpsln(5m)CpslnAA	B	X
342	329	5' InGpscGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGp slnTpslnGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
343	330	5' cpGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGp slnTpslnGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
344	331	5' InGpslnApslnTpscApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)C ps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p- (PS)2-GalNAc4 3'	B	X
345	332	5' InGpscApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)C ps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p- (PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
346	333	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)C psGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpscApsln(5m)CA- p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
347	334	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpscApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)C psGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA- p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
348	335	5' cp(5m)Cpsc(5m)CpscApsc(5m)Cps(5m)CpsAps(5m) CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApscGpscApsc(5m)C A-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
349	336	5' InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cp s(5m)CpsGps(5m)CpsamApslnGpslnApsln(5m)CT-p- (PS)2-GalNAc4 3'	B	X
350	337	5' InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cp	B	X

Таблица 9. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3х10 мг/кг раз в 3 дня				
SEQ ID No.	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
		s(5m)CpsGps(5m)CpslnApsamGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'		
351	338	5' lnGpslnApslnTpslnApsamApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
352	339	5' lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpsepAA	B	X
353	340	5' lnGpslnApslnTpsamApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
354	341	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpsamApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
355	342	5' lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsam(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
356	343	5' lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpsamGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
357	344	5' lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsamTpslnGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
358	345	5' lnGpslnGpsamTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
359	346	5' lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpsepGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
360	347	5' lnGpslnGpslnAps(2s)TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApscp(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
361	348	5' lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsepApsln(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
362	349	5' lnGpslnGpsepApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z

Таблица 9. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3х10 мг/кг раз в 3 дня				
SEQ ID No.	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
363	350	5' lnGpscпGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
364	351	5' cpGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
365	352	5' lnGpslnApslnGpsAps(8nh)GpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpscп(5m)CpslnGpslnTA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
366	353	5' lnGpslnApscпTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
367	354	5' lnGpslnApslnGps(8nh)ApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpscп(5m)CpslnGpslnTA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
368	145	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsam(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
369	143	5' ln(5m)Cpsam(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
370	144	5' am(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
371	146	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsam(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
372	355	5' amGpsam(5m)CpsamGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsamGpsamGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
373	356	5' lnGpslnApscпTpslnApslnApsAps(8nh)Aps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
374	357	5' lnGpsln(5m)CpscпGpsAps(8nh)ApsGpsTpsGps(5m)Cps	B	Y

Таблица 9. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 3x10 мг/кг раз в 3 дня				
SEQ ID No.	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
		Aps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'		
375	358	5' lnGpslnApslnGpsApsGps(8nh)GpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsep(5m)CpslnGpslnTA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
376	359	5' GalNAc4-(PS)2-p- mUlnGpsep(5m)CpslnGpsAps(8nh)ApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG	B	Y
377	156	5' lnGpslnGpslnApsTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsep(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
428	155A	5' lnGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsep(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X

[0161] Пример 9. Испытание модифицированного АСО в мышинной модели ААV-ВГВ

[0162] В данном примере оценивают терапевтический индекс АСО с использованием режима дозирования 5x10 мг/кг. АСО испытывали в дозе 3 x 10 мг/кг каждые 3 дня мышинной модели аденоассоциированного вируса (AAV)-ВГВ. Результирующее максимальное снижение log₁₀ уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке и кратное изменение АЛТ во время исследования представлены в таблице 10, причем А представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $\geq 1 \log_{10}$, В представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $0,5 - 1 \log_{10}$, и С представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $< 0,5 \log_{10}$, и X ≤ 3 -кратное значение АЛТ контроля в виде несущей среды, что считается нормальным. Y составляет 3-30-кратную АЛТ контроля в виде несущей среды, и Z ≥ 30 -кратную АЛТ контроля в виде несущей среды. Как Y, так и Z проявляют токсичность для печени, при этом Z является более тяжелым.

[0163] На фиг. 3А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови для АСО 120. На фиг. 3В показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови для АСО 121. На фиг. 3С показан график АЛТ в сыворотке крови для АСО 120. На фиг. 3D показан график АЛТ в

сыворотке крови для АСО 121. Данные результаты демонстрируют, что модификации Lухпа Chemistry снижали или устраняли АЛТ, сохраняя при этом эффективность in vivo.

[0164] Следующие определенные последовательности в таблице 10 входят в объем настоящего раскрытия. В контексте данного документа, ln = закрытая нуклеиновая кислота (LNA); lnA = закрытая нуклеиновая кислота (LNA) A; ln(5m)C = закрытая нуклеиновая кислота (LNA)-5-метил C; lnG= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) G; lnT= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) T; (5m)C=5-метил-C; mA = 2-О-метокси A; mU = 2-О-метокси U; (8nh)A = 8-амино A; (8nh)G = 8-амино G; (2s)T = 2-тио T; cp = scp = циклопропил; cpC = scpC = циклопропил C; cpG = scpG= циклопропил G; cpT = scpT = циклопропил T; ps = фосфотиоатные связи.

Таблица 10. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 5x10 мг/кг раз в 3 дня				
SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
270	147	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG-3'	A	Z
276	270	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	A	X
379	361	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpsln(5m)CpslnGps(8nh)ApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG-3'	A	X
380	362	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5oh)CpslnGpslnG-3'	A	Y
381	363	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpsln(5m)CpslnGpsAps(8nh)ApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG-3'	A	Y
382	364	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnGpslnTps(8nh)GpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA-3'	A	X
383	365	5'-GalNAc2-C6-p-lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGmG-3'	A	Y
384	366	5'-GalNAc2-C6-p-ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CmG-3'	A	X
385	367	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	Y

Таблица 10. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 5x10 мг/кг раз в 3 дня				
SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
386	368	5'-GalNAc2-C6-p-CAInGpslnApslnTpslnApslnApsAps(8nh)Aps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
387	369	5'-GalNAc2-C6-p-CAInGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
388	370	5'-GalNAc2-C6-p-CAIn(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5oh)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
389	371	5'-GalNAc2-C6-p-CAIn(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
390	372	5'-GalNAc2-C6-p-CAIn(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5oh)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	Y
391	373	5'-ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5oh)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpscpApsln(5m)CmA-p-(PS)2-GalNAc3-3'	A	Y
392	157	5'-lnGpslnApslnTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpscpGT-p-(PS)2-GalNAc4-3'	A	Z
393	158	5'-lnGpslnApscpTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGT-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	Y
394	159	5'-lnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGT-p-(PS)2-GalNAc4-3'	A	X
395	374	5'-ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5oh)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpscpApsln(5m)CmA-p-(PS)2-GalNAc4-3'	A	Z
396	128	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'	A	X
397	129	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGp	A	X

Таблица 10. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 5x10 мг/кг раз в 3 дня				
SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
		s(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'		
398	130	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAln(5m)Cpscp(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	B	X
399	375	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApscpGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
400	120	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'	A	X
401	376	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpsamApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	B	X
402	377	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnGpscpTpsGpsAps(8nh)ApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA-3'	A	X
403	378	5'-ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpscpApsln(5m)CmA-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X

[0165] Пример 10. Испытание модифицированного АСО в мышинной модели ААV-ВГВ

[0166] АСО испытывали в дозе 1x 10 мг/кг на мышинной модели аденоассоциированного вируса (AAV)-ВГВ в виде отдельных средств или в комбинации (триггеры S + X, а также триггеры S + S). Результирующее максимальное снижение log₁₀ уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке и кратное изменение АЛТ во время исследования представлены в таблице 11, причем А представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $\geq 1 \log_{10}$, В представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В 0,5 – 1 log₁₀, и С представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $< 0,5 \log_{10}$, и X ≤ 3 -кратное значение АЛТ контроля в виде несущей среды, Y составляет 3-кратное - 30-кратное значение АЛТ контроля в виде несущей среды, и Z составляет ≥ 30 -кратное значение АЛТ контроля в виде несущей среды. Результаты,

продемонстрированные при объединении АСО S и X Triggers, показали добавление к незначительным синергетическим эффектам.

[0167] На фиг. 9А показан график изменения уровня е-антигена гепатита В в сыворотке крови (капсульный антиген гепатита В) от мышей, обработанных АСО 120, АСО 131 и комбинациями АСО 120 и АСО 131 в массовых отношениях 1:1, 2:1 и 3:1. На фиг. 9В показан график изменения поверхностный антиген вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных АСО 120, АСО 121 и комбинациями АСО 120 и АСО 121 в массовых отношениях 1:1, 2:1 и 3:1. Данные результаты демонстрируют, что комбинация с АСО приводит к разрушению всех РНК ВГВ, включая ген Х, а также РНК из интегрированного генома.

Таблица 11. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1x10 мг/кг				
SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
418	123	5- moeGpsmoe(5m)CpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGps sTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGp smoeTpsmoeGpsmoe(5m)C-3	В	Х
423	265А	5'-GalNAc-NH-C6-CA- InGpsInApsInTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5 m)Cps(5m)CpsGpsApsIn(5m)CpsInGpsInGpsInG 3'	А	Х
424	147А	5'-GalNAc-NH-C6-CA- InApsInGpsIn(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)C psAps(5m)CpsApsIn(5m)CpsInGpsInG-3 '	А	Х
273	267	5'-GalNAc-NH-C6-CA- InGpsInGpsInApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsG ps(5m)Cps(5m)CpsGpsInApsIn(5m)CpsInG 3'	А	Х
279	273	5'-GalNAc-NH-C6-CA- In(5m)CpsIn(5m)CpsInApsIn(5m)Cps(5m)CpsAps(5 m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApsInGpsInApsIn(5m)C 3'	А	Х
	АСО 273 + АСО 285 (1: 1)		А	Х
	АСО 273 + АСО 285 (2: 1)		А	Х
	АСО 273 + АСО 285 (3: 1)		А	Х

Таблица 11. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1x10 мг/кг				
SEQ ID NO.	ACO #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
396	128	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C 3'	A	X
	ACO 128 + ACO 377 (1:1)		B	X
	ACO 128 + ACO 377 (2:1)		A	X
397	129	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C 3'	A	X
	ACO 129 + ACO 267 (1:1)		A	X
	ACO 129 + ACO 267 (2:1)		A	X
	ACO 129 + ACO 267 (3:1)		A	X
398	130	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAln(5m)Cpscp(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	B	X
	130 + 120 (1:1)		B	X
	ACO 130 + ACO 121 (1:1)		B	X
	ACO 130 + ACO 121 (2:1)		B	X
	ACO 130 + ACO 121 (3:1)		B	X
	ACO 130 + ACO 131 (1:1)		B	X
	ACO 130 + ACO 131 (2:1)		B	X

Таблица 11. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 1x10 мг/кг				
SEQ ID NO.	ACO #	Последовательность	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
	ACO 130 + ACO 131 (3:1)		A	X
399	375	5'-GalNAc4-(PS)2-p- mAln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8 nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApscpG pslnApsln(5m)C 3'	C	X
400	120	5'-GalNAc4-(PS)2-p- mAlnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGp s(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5 m)C 3'	B	X
	ACO 120 + ACO 121 (1:1)		A	X
	ACO 120 + ACO 121 (2:1)		A	X
	ACO 120 + ACO 121 (3:1)		A	X
	ACO 120 + ACO 131 (1:1)		A	X
	ACO 120 + ACO 131 (2:1)		A	X
	ACO 120 + ACO 131 (3:1)		A	X
401	376	5'-GalNAc4-(PS)2-p- mAlnGpsamApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsG ps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	C	X
402	377	5'-GalNAc4-(PS)2-p- mAlnGpslnGpscpTpsGpsAps(8nh)ApsGps(5m)Cps GpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	B	X
156	121	5'-GalNAc4-(PS)2-p- mUlnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m) CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpsln GpslnG 3'	A	X
419	131	5'-GalNAc4-(PS)2-p- mUlnGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5 m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApscp(5m)CpslnG 3'	A	X

[0168] Пример 11. Испытание модифицированного АСО в мышинной модели AAV-ВГВ

[0169] АСО испытывали при 6 повторных дозах 3 мг/кг или 10 мг/кг в дни 0, 3, 7, 14, 21 и 28 на мышинной модели с аденоассоциированным вирусом (AAV)-ВГВ. Результирующее максимальное снижение \log_{10} уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке и кратное изменение АЛТ во время исследования представлены в таблице 12, причем А представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $\geq 1 \log_{10}$, В представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $0,5 - 1 \log_{10}$, и С представляет собой снижение поверхностного антигена вируса гепатита В $< 0,5 \log_{10}$, и X ≤ 3 -кратное значение АЛТ контроля в виде несущей среды, что считается нормальным. Y составляет от 3 до 30 раз больше АЛТ контроля носителя, и Z > 30 раз больше АЛТ контроля носителя. Оба Y и Z проявляют токсичность для печени. Триггер S и X АСО в комбинации (1:1 и 2:1), в то время как общие количества дозируемого лекарства (в мг) являются постоянными, независимо от того, являются ли они отдельными агентами или комбинированными средствами. Результаты показали, что комбинация S и X (1:1) имеет незначительный синергетический эффект, в то время как смесь 2:1 (S:X) показала меньшее преимущество. На фиг. 4А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей с ВГВ, обработанных АСО 121 или АСО 120. На фиг. 4В показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей с ВГВ, обработанных АСО 121 или АСО 120. На фиг. 4С показан график изменения поверхностный антиген вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей с ВГВ, обработанных (а) комбинацией АСО 121 и АСО 120; или (b) АСО 123 отдельно. На фиг. 4D показан график сывороточной АЛТ от мышей с ВГВ, получавших (а) комбинацию АСО 121 и АСО 120; или (b) только АСО 123. Данные результаты показывают, что АСО с модифицированными LNA и/или гэпом химическими структурами могут эффективно обрабатывать ВГВ. Кроме того, мыши, получавшие комбинацию двух АСО, показали улучшенную эффективность по сравнению с мышами, получавшими только АСО 123. АСО 123 представляет собой GSK836, который в настоящее время проходит фазу 2В клинических испытаний, спонсируемых GSK.

Таблица 12. Максимальное снижение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В (Log) и АЛТ для 6 повторных доз в дни 0, 3, 7, 14, 21, 28			
АСО #*	Доза	Поверхностный антиген вируса гепатита В Nadir (Log)	АЛТ
123	6x10 мг/кг	В	Х
123	6x3 мг/кг	С	Х
130	6x10 мг/кг	В	Х
130	6x3 мг/кг	С	Х
120	6x10 мг/кг	А	Х
120	6x3 мг/кг	А	Х
АСО 120 + АСО 130 (1:1)	6x10 мг/кг	А	Х
АСО 120 + АСО 130 (1:1)	6x3 мг/кг	В	Х
АСО 120 + АСО 121 (1:1)	6x10 мг/кг	А	Х
АСО 120 + АСО 121 (1:1)	6x3 мг/кг	А	Х
АСО 120 + АСО 121 (2:1)	6x10 мг/кг	А	Х
АСО 120 + АСО 121 (2:1)	6x3 мг/кг	В	Х
АСО 121	6x10 мг/кг	А	Х
АСО 121	6x3 мг/кг	В	Х
*Для комбинаций (1:1) и (2:1) означает массовые отношения АСО.			

[0170] Пример 12. Испытание зависимости «доза-эффект» АСО в анализе высвобождения поверхностного антигена вируса гепатита В в модели клеток HepG2.2.15 ВГВ

[0171] In vitro скрининг возрастающих доз АСО проводили в клетках HepG2.2.15 с использованием анализа высвобождения поверхностного антигена вируса гепатита В. Кривые зависимости «доза-эффект» и полученные значения IC₅₀ (нМ) для трех экспериментов показаны на фиг. 1А-2С и в таблице 13, причем А: ≤ 5 нМоль, В составляет 5 - 20 нМоль, С: ≥ 20 нМоль. Результаты показывают, что химические модифицированные АСО Luxna (модифицированные как в ветви, так и в гэпе) показали хорошую эффективность in vitro. Для некоторой последовательности АСО с присоединенным GalNac все еще показывают хорошую эффективность по сравнению с тем же АСО с удаленным GalNac. Для другой последовательности АСО с еще присоединенным GalNacx проявляли меньшую эффективность по сравнению с неконъюгированным АСО той же последовательности.

Таблица 13. Значения IC ₅₀ (нМоль) для зависимости «доза-эффект» АСО					
SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность	IC ₅₀ (нМ)		
			Экс-т 1	Экс-т 2	Экс-т 3
420	126	5'-mA- lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'	В	В	В
400	120	5'-GalNac4-ps2-p-mA- lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'	С	С	С
421	124	5'- lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'	В	В	В
422	127	5' mU- lnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	А	А	А
156	121	5' GalNac4-ps2-p-mU-po- lnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	А	А	А
404	125	5' lnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	А	А	А

[0172] Пример 13. Синтез АСО

[0173] АСО с LNA и/или модифицированными гэпом химическими структурами были синтезированы на синтезаторах ABI 394 и Expedite 8909 с использованием стандартной фосфодитной химии. Содержащие LNA АСО конъюгировали с N-ацетилгалактозамином (GalNac).

[0174] Следующие определенные последовательности в таблице 14 входят в объем настоящего раскрытия. В контексте данного документа, ln = закрытая нуклеиновая кислота (LNA); lnA = закрытая нуклеиновая кислота (LNA) A; ln(5m)Cln(5m)C = закрытая нуклеиновая кислота (LNA)-5-метил C; lnG= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) G; lnT= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) T; (5m)C=5-метил-C; mA = 2-О-метокси A; mU = 2-О-метокси U; (8nh)A = 8-амино A; (8nh)G = 8-амино G; (2s)T = 2-тио T; cp = scp = циклопропил; cpC = scpC = циклопропил C; cpG = scpG= циклопропил G; cpT = scpT = циклопропил T; ps = фосфотиоатные связи.

Таблица 14. Синтез АСО				
SEQ ID NO.	№ АСО	Последовательность 5'→3'	Общее количество (мг)	Конечное количество (мкмоль)
405	380 (Аналог АСО 120)	срGpscрАpscрТpscрАpscрАpsАpsАps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpscрАpscрGpscрАpscр(5m)C	0,33	0,05
406	381 (Аналог АСО 121)	срGpscрАpscрТpsТps(5m)Cps(8nh)АpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsАpscр(5m)CpscрGpscрGpscрG	0,36	0,06
407	382 (Аналог АСО 130)	ср(5m)Cpscр(5m)CpscрАpscр(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Аps(5m)CpsGpsАpsGpsТps(5m)CpsТpsАpscрGpscрАpscр(5m)C	0,36	0,06

[0175] Клетки HepG2.2.15 (стабильная клеточная линия с четырьмя интегрированными геномами ВГВ) поддерживали в среде DMEM с 10% фетальной телячьей сывороткой (FBS) и 1% пенициллина/стрептомицина, 1% глутамина, 1% заменимых аминокислот, 1% пирувата натрия и 250 мкг/мл G418. Клетки поддерживали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для анализа высвобождения поверхностного антигена вируса гепатита В, получали среду для анализа: DMEM с 5% фосфатно-солевого буферного раствора, 1% пенициллина/стрептомицина, 1% глутамина и 1% DMSO. За день до анализа трипсинизированные клетки HepG2.2.15 один раз промывали аналитической средой, центрифугировали при 250 г × 5 мин., ресуспендировали в аналитической среде и посевные клетки в количестве 50000/лунка в аналитической среде в 96-луночных планшетах, покрытых коллагеном. На следующий день АСО разбавляли Opti-MEM, 9-pt, 3-кратное разведение, и Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen) разбавляли согласно инструкции производителя. Разведение АСО и разведение RNAiMAX смешивали, оставляли при комнатной температуре на 5 минут и добавляли по 15 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета. Планшеты оставляли при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе на 5 дней. После инкубации супернатант собирали и измеряли в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В с помощью набора для ELISA (Diasino). Жизнеспособность клеток измеряли с помощью CellTiter-Glo (Promega). EC₅₀, концентрацию лекарственного средства, необходимую для снижения секреции поверхностного антигена вируса гепатита В на 50% по сравнению с контролем необработанных клеток, рассчитывали с использованием Prism Graphpad. CC₅₀, концентрация лекарственного средства, необходимая для снижения жизнеспособности клеток на 50% по сравнению с контролем необработанных клеток, рассчитывали с помощью того же программного обеспечения.

[0176] Полученные значения EC_{50} и CC_{50} для соединений в таблице 14 представлены в следующей таблице 15. Значения EC_{50} являются следующими: А: < 0,1 нмоль, В: 0,1 нмоль- 5 нмоль, С: >5 нмоль.

№ АСО	EC_{50}	CC_{50}
380	С	более 500
381	В	более 500
382	С	более 500

[0177] Пример 14. Биоинформатика АСО, нацеленных на участки генов S и X ВГВ

[0178] В данном примере анализируется генотипический охват и побочные профили АСО, нацеленные на области генов S и X ВГВ. В таблице 15 показан генотипический охват генотипов ВГВ А-Ж для АСО 120, который нацелен на область гена S, и АСО 121, который нацелен на область гена X. % гомологии (определяемой как полное соответствие или с 1 несоответствием) среди > 8000 клинических изолятов показан в таблице 16.

Таблица 16. Генотипический охват: % гомологии среди > 8000 клинических изолятов										
Генотип	А	В	С	Д	Е	F	G	Н	I	J
АСО 120 (S)	98%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
АСО 121 (X)	99%	100%	99%	100%	96%	100%	99%	100%	100%	97%
АСО 120 (S) + АСО 121 (X)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

[0179] Пример 15. Комбинированные терапии АСО

[0180] В данном примере исследуются комбинированные терапии с использованием АСО 120 и АСО 121 и другие способы лечения ВГВ (например, полимеры олигонуклеотидов, ингибирующие транспорт S-антигена (STOP), тенофовир и модуляторы сборки капсида (SAM)). Для исследований комбинации STOP ALG-010133 с АСО (АСО 120: АСО121 в соотношении 2:1, 1:1 или 1:2) 35000 клеток HepG2.2.15 на лунку были обратно трансфицированы в 96--луночном планшете, покрытом коллагеном I- (Corning, Biocoat; № по каталогу 356698). Смесь ALG-010133 и АСО разбавляли в восстановленной сыворотке Opti-MEM™I (Thermo Fisher Scientific; № по каталогу 31985088) до 40-кратной необходимой конечной тестовой концентрации, затем последовательно разбавляли (1:3) до 5 или 9

различных концентраций, соответственно. Аликвоту 3,25-мкл каждого разбавленного соединения объединяли в шахматном порядке, где смесь АСО добавляли в 10 столбцов с наивысшей концентрацией в верхней части планшета, а ALG-010133 добавляли в 7 рядов с максимальной концентрацией в самой дальней лунке справа от тарелки. Данную комбинацию соединений смешивали с 0,3 мкл реагента для трансфекции Lipofectamin[®] RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, № по каталогу 13778150) и 6,2 мкл восстановленной сывороточной среды Opti-MEM[™] I. После инкубации в течение 20 минут смесь добавляли к клеткам HepG2.2.15. Также было отведено место для титрования каждого соединения отдельно в качестве контрольных образцов. Клетки инкубировали с соединениями в течение 3 дней при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через три дня после начальной трансфекции среду обновляли и клетки повторно трансфицировали по тому же протоколу, который применяли для начальной трансфекции. Еще через 3 дня супернатант анализировали в отношении уровней поверхностного антигена вируса гепатита В, а оставшиеся клетки анализировали в отношении цитотоксичности. Для комбинаций смесей АСО с небольшими молекулами, такими как САМ или тенофовир, исследуемые препараты растворяли в исходных растворах диметилсульфоксида (DMSO) и добавляли к клеткам без трансфекции до конечной концентрации 0,5% DMSO. Все остальные аспекты анализа соответствовали протоколу, используемому для исследований комбинации АСО + STOP. ДНК ВГВ в супернатанте измеряли для данных комбинаций с небольшими молекулами, такими как САМ или тенофовир.

[0181] Уровень поверхностного антигена вируса гепатита В определяли с использованием набора ELISA для поверхностного антигена вируса гепатита В (Diasino Laboratories, Ref. DS187701) в соответствии с протоколом производителя. Люминесценцию регистрировали с помощью многоканального счетчика Perkin Elmer Victor3V. Уровни ДНК ВГВ измеряли с помощью кПЦР в реальном времени.

[0182] Для анализа жизнеспособности клеток HepG2.2.15 применяли люминесцентный анализ жизнеспособности клеток Promega CellTiter-Glo[®] (№ по каталогу G7572). Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo представляет собой гомогенный способ определения количества жизнеспособных клеток в культуре, основанный на количественном определении присутствующего аденозинтрифосфата (АТФ), который сигнализирует о присутствии метаболически активных клеток. Планшеты для анализа были настроены в том же формате, что и в анализах активности против ВГВ. Аликвоту реагента CellTiter-Glo по 100-мкл добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 8

минут. Люминесценцию регистрировали с помощью многоканального счетчика Perkin Elmer Victor3V.

[0183] Каждый эксперимент проводили в трех повторностях (3 чашки). Средний процент ингибирования поверхностного антигена вируса гепатита В из трех экспериментов получали и анализировали с использованием способа Причарда (MacSynergy II).

[0184] Как показано в таблице 17, комбинированная терапия АСО со STOP имела аддитивный эффект в снижении поверхностного антигена вируса гепатита В без цитотоксичности. Как показано в таблице 18, комбинированная терапия АСО с тенофовиром имела сильный синергетический эффект в отношении снижения поверхностного антигена вируса гепатита В, а комбинированная терапия АСО с САМ имела умеренный синергетический эффект в отношении снижения поверхностного антигена вируса гепатита В.

Таблица 17. Комбинированная терапия АСО со STOP™ ALG-010133			
Соединение	Отношение АСО 120:АСО121	Синергический эффект	Цитотоксичность
STOP	1:2	Добавка	№
STOP	1:1	Добавка	№
STOP	2:1	Добавка	№

Таблица 18. Комбинированная терапия АСО (АСО 120 +АСО121 1:1) с терапевтическими средствами против ВГВ			
Соединение	Класс	Синергический эффект	CC50
Тенофовир	NA	Сильный синергический эффект	№
САМ	САМ II	Умеренный синергический эффект	№

[0185] Пример 16. Испытание модифицированного АСО в мышинной модели AAV-ВГВ

[0186] АСО с LNA и/или ветвью Lухпа или модифицированными гэпом химическими структурами были синтезированы на синтезаторах ABI 394 и Expedite 8909 с использованием стандартной фосфодитной химии. АСО испытывали в дозе 1x10 мг/кг или 5x10 мг/кг каждые 3 дня на мышинной модели аденоассоциированного вируса (AAV)-ВГВ. На фиг. 5А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от

мышей, обработанных 1×10 мг/кг АСО 128, АСО 129 или АСО 120. На фиг. 5В показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 5×10 мг/кг АСО 128, АСО 129 или АСО 120 раз в 3 дня. Эффективность всех 3 АСО без модификации гэта, модификации химической структуры Lухпа в положении разрыва #1 и модификации Lухпа в положении разрыва #3 имеют одинаковую эффективность. На фиг. 5С показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5×10 мг/кг АСО 128, АСО 129 или АСО 120 раз в 3 дня. Результаты показали, что модификация Lухпа в позиции #3 имеет лучший профиль безопасности для печени.

[0187] Пример 17. Оценка АСО 130 в мышинной модели ААV-ВГВ

[0188] АСО 130 был синтезирован на синтезаторах ABI 394 и Expedite 8909 с использованием стандартной фосфорамидитовой химии. АСО 130 испытывали в дозе 1×10 мг/кг или 5×10 мг/кг каждые 3 дня на мышинной модели аденоассоциированного вируса (AAV)-ВГВ. На фиг. 6А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 1×10 мг/кг АСО 130. На фиг. 6В показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 5×10 мг/кг АСО 130 раз в 3 дня. На фиг. 6С показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5×10 мг/кг АСО 130 раз в 3 дня. Данные результаты демонстрируют, что модификации химических структур Lухпа на ветви и гэпе могут давать устойчивый и длительный эффект без повышения АЛТ.

[0189] Пример 18. Оценка АСО 131 в мышинной модели ААV-ВГВ

[0190] АСО 131 был синтезирован на синтезаторах ABI 394 и Expedite 8909 с использованием стандартной фосфорамидитовой химии и конъюгировали с GalNac4. АСО 131 испытывали в дозе 3×10 мг/кг каждые 3 дня на мышинной модели аденоассоциированного вируса (AAV)-ВГВ. На фиг. 7А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3×10 мг/кг АСО 131 раз в 3 дня. На фиг. 6С показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 3×10 мг/кг АСО 131 раз в 3 дня. Данные результаты демонстрируют, что модификации химических структур Lухпа на ветви и гэпе могут давать устойчивый и длительный эффект без повышения АЛТ.

[0191] Пример 19. Оценка АСО 121 в мышинной модели ААV-ВГВ

[0192] АСО 121 был синтезирован на синтезаторах ABI 394 и Expedite 8909 с использованием стандартной фосфорамидитовой химии и конъюгировали с GalNac4. АСО 121 испытывали в дозе 5×10 мг/кг каждые 3 дня на мышинной модели аденоассоциированного вируса (AAV)-ВГВ. На фиг. 7А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в

сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 121 раз в 3 дня. На фиг. 6С показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 121 раз в 3 дня. Данные результаты демонстрируют, что при очень строгом режиме дозирования 3x10 мг/кг раз в 3 дня модификации Lухпа в области ветви и гэта могут давать устойчивый, длительный ответ с большим подъемом АЛТ.

[0193] Пример 20. Оценка модификаций АСО

[0194] В данном примере модификации (LNA или гэта-модифицированные химические структуры) различных положений нуклеотидов в АСО были проверены на эффективность и токсичность.

[0195] Следующие определенные последовательности в таблице 19 входят в объем настоящего раскрытия. В контексте данного документа, ln = закрытая нуклеиновая кислота (LNA); lnA = закрытая нуклеиновая кислота (LNA) A; ln(5m)Cln(5m)C =закрытая нуклеиновая кислота (LNA)-5-метил C; lnG= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) G; lnT= закрытая нуклеиновая кислота (LNA) T; (5m)C=5-метил-C; mA = 2-О-метокси A; mU = 2-О-метокси U; (8nh)A = 8-амино A; (8nh)G = 8-амино G; (2s)T = 2-тио T; am = amNA; am(5m)C = AmNA-NCH₃-(5m)C фосфорамидит; cp = scp = циклопропил; cpC = scpC = циклопропил C; cpG = scpG= циклопропил G; A= dA; G= dG, C= dC, T = тимидин; cpT = scpT = циклопропил T; ps = фосфотиоатные связи; p= фосфодиэфирная связь

Таблица 19. Модификации АСО		
SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность (5'→3')
272	132	5'-GalNAc1-C6-p-CA- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m))CpslnGpslnT 3'
302	133	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m))CpslnGpslnT 3'
303	134	5' -GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m))CpslnGpsAmT 3'
304	135	5' -GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsAm(5 m)CpslnGpslnT 3'
300	136	5' -GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m))CpslnGpscpT 3'

Таблица 19. Модификации АСО

SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность (5' → 3')
408	137A	5' -GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)scpCpslnGpslnT 3'
409	138	5' -GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
410	132A	5' -GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'
411	140	5' -GalNAc1-C6-p-CA-InGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'
412	141	5' -GalNAc1-C6-p-CA-InGpslnApslnTpslnApslnApsAps(8nh)Aps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'
413	142	5' -GalNAc1-C6-p-CA-InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5OH)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'
369	143	5' -ln(5m)Cpsam(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-A-p-(PS)2-GalNAc4-3'
370	144	5' -am(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-A-p-(PS)2-GalNAc4-3'
414	145A	5' -am(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-A-p-(PS)2-GalNAc4-3'
371	146	5' -ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsam(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-A-p-(PS)2-GalNAc4-3'
270	147	5' -GalNAc2-C6-p-CAlnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG-3

Таблица 19. Модификации АСО

SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность (5' → 3')
415	148	5' -GalNAc1-C6-p-CA- In(5m)CpsIn(5m)CpsInApsIn(5m)Cps(5OH)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m) CpsTpsApsInGpsInApsIn(5m)C 3'
416	149	5' -GalNAc1-C6-p-CA- In(5m)CpsIn(5m)CpsInApsIn(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApsInGpsInApsIn(5m)C 3'
417	150	5' -GalNAc1-C6-p-CA- In(5m)CpsIn(5m)CpsInApsIn(5m)Cps(5m)CpsAps(5OH)CpsGpsApsGpsTps(5m) CpsTpsApsInGpsInApsIn(5m)C 3'
284	151	5' -GalNAc6-(PS)2-p- InGpsInGpsInApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsInAps In(5m)CpsInG 3'
286	152	5' -GalNAc6-(PS)2-p- InGpsInGpsInAps(2s)TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsIn ApsIn(5m)CpsInG 3'
287	153	5' -GalNAc6-(PS)2-p- InGpsInGpsInApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsIn ApsIn(5m)CpsInG 3'
288	154	5' -GalNAc6-(PS)2-p- InGpsInGpsInApsTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsInAp sIn(5m)CpsInG 3'
378	155	5'InGpsInGpsInApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps InApscp(5m)CpsInG-A-p-(PS)2-GalNAc6-3'
377	156	5'InGpsInGpsInApsTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsIn Apscp(5m)CpsInG-A-p-(PS)2-GalNAc4-3'
392	157	5'- InGpsInApsInTpsTps(5OH)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsIn(5 m)CpsInGpsInGpscpG-T-p-(PS)2-GalNAc4-3'
393	158	5'- InGpsInApscpTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsIn (5m)CpsInGpsInGpsInG-T-p-(PS)2-GalNAc4-3'

Таблица 19. Модификации АСО		
SEQ ID NO.	АСО #	Последовательность (5'→3')
394	159	5'- InGpslnApscTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps ln(5m)CpslnGpslnGpslnG-T-p-(PS)2-GalNAc4-3'

[0196] Мышей с ВГВ обрабатывали АСО 133-136 и 137А в дозе 3x10 мг/кг раз в неделю. Результирующее изменение сывороточного поверхностного антигена вируса гепатита В показано на фиг. 10А и АЛТ в сыворотке крови показана на фиг. 10В. Данные результаты демонстрируют, что для данной конкретной последовательности ветви АСО с модификацией (5m)срС Lухпа (АСО 137А) имеет более высокую эффективность и более низкий уровень АЛТ, чем все LNA (без химической структуры Lухпа, АСО 133), модифицированный срТ (АСО 136), модифицированный АмТ (АСО 134) и АМ(5m)С(АСО 135).

[0197] Мышей с ВГВ обрабатывали АСО 138 или 153 в дозе 3x10 мг/кг раз в неделю. На фиг. 11А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 138 или 153 раз в неделю. На фиг. 11В показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 138 или 153 раз в неделю. Данные результаты демонстрируют, что АСО с модификацией Lухпа в центральной («гэп») области, положение #2 с (2s) Т, могут устранять АЛТ, сохраняя при этом эффективность.

[0198] Мышей с ВГВ обрабатывали АСО 132А или 137А в дозе 3x10 мг/кг раз в неделю. На фиг. 12А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 132А или 137А раз в неделю. На фиг. 12В показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 132А или 137А раз в неделю. Данные результаты демонстрируют, что АСО с модификацией химической структуры Lухпа (5m)срС в области ветви могут снижать АЛТ, одновременно улучшая эффективность всех LNA (ветви) АСО.

[0199] Мышей с ВГВ обрабатывали АСО 140-142 в дозе 5x10 мг/кг раз в 3 дня. На фиг. 13А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 140-142 раз в 3 дня. На фиг. 13В показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 140-142 раз в 3 дня. Все 3 последовательности имеют все LNA в ветвях, но имеют 8-амино А, 8-амино А или (5-ОН) С в позиции #1 (АСО 140), #2 (АСО 141) и #3 (АСО 142) из 5' конец гэпа (например,

центральная область), соответственно. АСО 142 с (5-ОН)С в позиции #3 гэта не имеет повышения АЛТ и обладает хорошей активностью. Данные результаты демонстрируют, что АСО с модификациями в центральной области могут снижать или устранять АЛТ, сохраняя при этом эффективность.

[0200] Мышей с ВГВ обрабатывали АСО 143, 144, 145А или 146 в дозе 3x10 мг/кг раз в 3 дня. На фиг. 14А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 143, 144, 145А или 146 раз в 3 дня. На фиг. 14В показан график АЛТ в сыворотке крови from mice treated 3x10 мг/кг АСО 143, 144, 145А или 146 раз в 3 дня. Данные последовательности были разработаны с использованием Am(5m)С для «обхода» последовательности, заменяя In(5m)С один за другим. Данные результаты показывают, что АСО с модификацией Am(5m)С на конце 5'-ветви имеет лучший терапевтический индекс по сравнению с Am(5m)С в других положениях.

[0201] Мышей с ВГВ обрабатывали АСО 148-150 в дозе 5x10 мг/кг раз в 3 дня. На фиг. 15А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 148-150 раз в 3 дня. На фиг. 15В показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 148-150 раз в 3 дня. Данные последовательности имеют все ветви LNA, но с модификацией гэта Lухпа в позиции #1 (АСО 148); #2 (АСО 149) и #3 (АСО 150) от 5'-конца центральной области, соответственно. Данные результаты демонстрируют, что для данной последовательности АСО с модификацией Lухпа в позиции гэта #2 имеет лучший терапевтический индекс.

[0202] Мышей с ВГВ обрабатывали АСО 151-154 в дозе 3x10 мг/кг подкожно раз в неделю. На фиг. 16А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 151-154 раз в неделю. На фиг. 16В показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 151-154 раз в неделю. В данных последовательностях есть все ветви LNA, но без модификации химической структуры Lухпа (АСО 151), модификации гэта Lухпа в положении #1 (АСО 152); #2 (АСО 153) и #3 (АСО 154), соответственно. Данные результаты демонстрируют, что АСО с модификациями гэта Lухпа (АСО 152, 153 и 154) в центральной области могут снижать или устранять АЛТ из АСО без модификации гэта Lухпа (АСО 151), сохраняя при этом эффективность. Среди АСО 152, 153 и 154 АСО 153 с модификацией Lухпа в положении гэта #2 не имеет повышения АЛТ.

[0203] Мышей с ВГВ обрабатывали АСО 147, 155, 156 в дозе 3x10 мг/кг раз в 3 дня. На фиг. 17А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в

сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 147, 155 или 156 раз в 3 дня. На фиг. 17В показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 3x10 мг/кг АСО 147, 155 или 156 раз в 3 дня. АСО 155 и 156 имеют одинаковую модификацию ветви Lухна, но разные модификации гэпа. АСО 155 имеет модификацию Lухна в положении #2, а 156 имеет модификацию Lухна в положении #3. Данные результаты демонстрируют, что несмотря на то, что оба АСО с модификациями Lухна могут снижать или устранять АЛТ, модификация в положении гэпа # 2 работает лучше для данной конкретной последовательности.

[0204] Мышей с ВГВ обрабатывали АСО 157-159 в дозе 5x10 мг/кг раз в 3 дня. На фиг. 18А показан график изменения уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 157-159 раз в 3 дня. На фиг. 18В показан график АЛТ в сыворотке крови от мышей, обработанных 5x10 мг/кг АСО 157-159 раз в 3 дня. Данные результаты показывают, что АСО с модификацией Lухна в позиции гэпа #3 и с модификацией срТ в ветви обладает наилучшей эффективностью и безопасностью.

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Вирус гепатита В (номер доступа в GenBank KC315400,1)	ctccaccacttccaccaactctcaagatcccagagtcagggccctgtactttctgctggtggctcaagttc cggaacagtAACCCGTCTCCGACTACTGCTCTCCCATATCGTCAATCTTCGAGGACTGGGGACCCGTAC CGAATATGGAGACACCACATCAGGATCTAGACCCTGCTCGTGTACAGGCGGGGTTTTCTGTGACA AGAATCCTCACAAACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCAATTTCTAGGGGGAGCACCCACGTG TCTGTGGCCAAAATTTGAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCACCTCTGTCTCCAATTTGCTGTATCGCT GGATGTCTCGGGGTTTTATCCTCTCTCATCTGTGTATGCTCATCTCTGTGTGTTCTCTGGACTAC CAAGGATGTGCCCCGTTGCTCTACTTCCAGGAACATCACTACCAGCACCGGACCATGCAAACTGCAC AACTACTGCTCAAGGACCTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGACGGAAACTGCACCTGTAT TCCCATCCCATCCTTGGCTTTCGAAAATACCTATGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTCTCTGGCTCAGTTTAC TAGTGCCATTTGTCAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGTTTGGG GGCCAAAGTCTGTACAACATCTGAGTCCCTTATAACCGTGTACCAATTTCTTTATCTTGGGTATACATTAACC CTCAGAAAACAAAAGATGGGGATATCCCTAACTCATGGGATATGAATGGAGTTGGGGCACTTGGCTC AGGAACATATTGTACAAAATCAAGCAATGTTTAGGAACTCCTGTAACAGGCTATTGATGGAAAGTAT GTCAACRAATGTGGGCTTTTGGGTTTCCGCCCTTTCACGCAATGTGGATATCCTGCTTAAATGCTTATATG CATGTATACAAGCTAAGCAGGCTTTACTTCTCGCCAACCTACAAGGCCCTTCTGTGTAACAATATCTGAACCTT ACCCGTTGCTCGGCAACGGTCAGGCTTTGCCAAGTGTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCTTGGC CATAGGCCATCAGCGCATGCGTGAACCTTTGGCTCCTCTGCCGATCCACTGCGGAACCTCTAGCAGCTT GTTTGTCTCGCAGCCGGTCTGGAGCAAACTATCGGCACCGACAACTCTGTGCTCTCTCTCGGAAATACCT CCTTCCATGGCTGCTAGGATGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTGTCTACTGCCGCTCGGC CTGAATCCCGGGACGACCATCTCGGGCCGTTGGACTCTACCCTCCCTCTGCTGCTCGCTCCGTTCCGCC CGACCACGGGGCGCACCTCTTTACCGGGTCTCCCCGCTGTGCTTCTCATCTCGCGGACCGTGTGCACTT GCTTCACTCTGCACGTGCTGAGACACCCTGAACGCCACGGGAACCTGCCAAGTCTTGCATAAGA GGACTCTGGACTTTCAGCAATGCAACGACCGACCTTAGGCATACTCAAGACTGTGTCTTACTGAGTGGG AGGAGTTGGGGAGGAGGTAGGTTAAAGGCTTTGACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATGTGTGTTACCA GCACATGCAACTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCATGTTCTACTGTTCAAGCCTCAAGCTGTGCTTGT GGTGGCTTGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAAATTTGGAGCTTGTGGAGTACTCTCTTTTGCCTTCT GACTCTTCTCTATTCTAGATCTCTCGACACCGCCTCTGCTGTATCGGGAGGCTTAGAGTCTCCGGAAC ATTGTTACCTCACCATACGGCACTCAGGCAAGCAATCTGTGTTGGGTGAGTAAATGAACTAGCCACCTGG GTGGAGTAATTTGAAGATCCAGCATCCAGGAATTAGTAGTCAGCTATGCAACGTTAATATGGCCATAA

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
		aatcagacaactattgtggttcacattcctgtcttacttttgggagagaaactgtcttgaatattggtgtctttg gagtggattcgactcctcctgcatatagaccacaaaatgccctatcttcaaacctccggaactactg ttgtagacgaagaggcaggtcccctagaagaagaactccctgcctcgcagacgaaggtcctaatcgccg cgtcgcagaagatcctaatctgggaatctcaatgtagtattcctggacacataaggfgggaaactttacgg ggctttattctctacggfacctgcttfaatcctaatggcaaactcctctttcctgacattcattgcaggagga cattgtg atagatgtaagcaattgtggggccccttacagtaaatgaaaacaggagacttaaattaattatgct gctaggttttatccaatgttactaaatattgcccttagataaagggatcaaacgtattatccagagtatgtagt aatcattacttcagacgacattattacacactctttggaaggcgggg atcttataaaaagag agtccac a cgtagcgcctcattttcggggtaccatattctgggaacaagatctacagcatgggagggtggtctccaac ctgaaaaggcatggggacaaatcttctgtccccaatccccgggattcttccccgacatc agttggacct gcatcaagcc aactcagaaaatccagattgggacctcaaccacacaaggacaactggccggacgccaa caagggtggg agtgggagcattcggg ccagggttaccctcctcatgggggactgttggggtggagccctc aggctcaggcatattcacaacagtgccagcagctcctcctcctgctccaccaatcggcagtcaggaaggc agcctactccctctctccaccttaagagacactcatcctcaggccatgcagtgga

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, инфицированного вирусом гепатита В (ВГВ), включающий введение субъекту первого антисмыслового олигонуклеотида (АСО) и второго АСО, причем каждый из первого и второго АСО независимо содержит 14-22 нуклеотидных фрагментов, и каждый из первого и второго АСО независимо содержит следующее:
 - (a) центральная область (В'), содержащая 6 или более смежных нуклеозидов ДНК,
 - (b) область боковой 5'-ветви (А'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов, и
 - (c) область боковой 3'-ветви (С'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов,причем первый АСО комплементарен или гибридизирован с вирусной целевой последовательностью РНК в первой Х-области или первой S-области ВГВ, а второй АСО комплементарен или гибридизирован с вирусной целевой последовательностью РНК во второй Х-области или во второй S-области ВГВ.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что область боковой 5'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО содержит 2-6 соединенных фосфотиоатом закрытых нуклеозидов.
3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что область боковой 3'-ветви по меньшей мере одного из первого и второго АСО содержит 2-6 соединенных фосфотиоатом закрытых нуклеозидов.
4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что центральная область по меньшей мере одного из первого и второго АСО содержит по меньшей мере 5 смежных соединенных фосфотиоатом нуклеозидов ДНК.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что центральная область по меньшей мере одного из каждого из первого и второго АСО независимо содержит 8-10 смежных соединенных фосфотиоатом нуклеозидов ДНК.
6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что закрытые нуклеозиды выбраны из LNA, scpBNA, AmNA (N-H), AmNA (N-Me), GuNA, GuNA (N-R), причем R выбран из Me, Et, *i*-Pr, *t*-Bu и их комбинаций.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что второй АСО комплементарен или гибридизирован с вирусной целевой последовательностью РНК во второй Х-области ВГВ.
8. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что второй АСО комплементарен или гибридизирован с вирусной целевой последовательностью РНК в S-области ВГВ.
9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что первый и/или второй АСО дополнительно содержит нацеливающую группу.
10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что нацеливающая группа содержит фрагмент GalNAc.
11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что каждый из первого и второго АСО независимо содержит 14-18 нуклеотидных фрагментов.
12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что первый и второй АСО вводят одновременно.
13. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что первый и второй АСО вводят последовательно.
14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что субъект представляет собой млекопитающее.
15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой взрослого человека.
16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что лечение включает снижение вирусной нагрузки ВГВ у субъекта.
17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что лечение включает снижение уровня антигена вируса у субъекта.
18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что первый АСО содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична

нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей, приведенных в таблице 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19.

19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что второй АСО содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей, приведенных в таблице 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая первый антисмысловой олигонуклеотид (АСО) и второй АСО,

причем каждый из первого и второго АСО независимо содержит 14-22 нуклеотидных фрагментов, и каждый из первого и второго АСО независимо содержит следующее:

(а) центральная область (В'), содержащая 6 или более смежных нуклеозидов ДНК,

(б) область боковой 5'-ветви (А'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов, и

(с) область боковой 3'-ветви (С'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов,

причем первый АСО комплементарен или гибридизирован с вирусной целевой последовательностью РНК в первой Х-области ВГВ, а второй АСО комплементарен или гибридизирован с вирусной целевой последовательностью РНК во второй Х-области или S-области ВГВ.

21. Антисмысловой олигонуклеотид (АСО), содержащий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей, приведенных в таблице 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19.

22. АСО по п. 21, отличающийся тем, что АСО дополнительно содержит нацеливающий фрагмент.

23. АСО по п. 22, отличающийся тем, что нацеливающий фрагмент содержит фрагмент GalNAc.

24. АСО по п. 22, отличающийся тем, что нацеливающий фрагмент содержит три последовательных фрагмента GalNAc, прикрепленных посредством линкера.

25. Олигонуклеотид по п. 23 или 24, причем фрагмент GalNAc представляет собой GalNAc-4 или GalNAc-6.

26. Способ лечения субъекта, инфицированного вирусом гепатита В (ВГВ), включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества первого АСО и второго АСО, причем первый и второй АСО независимо выбраны из АСО по любому из пп. 21-25.

27. Способ по любому из пп. 1-18 и 26, дополнительно включающий введение пациенту дополнительного средства для лечения ВГВ, такого как аналог нуклеотида, модулятор сборки капсида или другой олигонуклеотид.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что дополнительное средство для лечения ВГВ выбрано из группы, включающей ALG-010133, ALG-000184, рекомбинантный интерферон альфа 2b, IFN-а, PEG-IFN-а-2a, ламивудин, телбивудин, адефовир дипивоксил, клевудин, энтекавир, тенофовир алафенамид, тенофовир дизопроксил, NVR3-778, BAY41-4109, JNJ-632, JNJ-3989 (ARO-ВГВ), RG6004, GSK3228836, REP-2139, REP-2165, AB-729, VIR-2218, DCR-ВГБС, JNJ-6379, GLS4, ABI-H0731, JNJ-440, NZ-4, RG7907, EDP-514, AB-423, AB-506, ABI-H03733 и ABI-H2158.

29. Способ по любому из пп. 1-18 и 26, отличающийся тем, что пациента лечили дополнительным средством для лечения ВГВ.

30. Способ по п. 10, отличающийся тем, что фрагмент GalNAc включает один фрагмент GalNAc или три последовательных фрагмента GalNAc, прикрепленных посредством линкера, причем фрагмент GalNAc представляет собой GalNAc-4 или GalNAc-6.

31. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-30, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят в дозировке по меньшей мере 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг или 15 мг/кг.

32. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-30, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят в дозировке от 0,5 мг/кг до 50 мг/кг, от 0,5 мг/кг до 40 мг/кг, от 0,5 мг/кг до 30 мг/кг, от 1 мг/кг до 50 мг/кг, от 1 мг/кг до 40 мг/кг, от 1 мг/кг до 30 мг/кг, от 1 мг/кг до 20 мг/кг, от 3 мг/кг до 50 мг/кг, от 3 мг/кг до 40 мг/кг, от 3 мг/кг до 30 мг/кг, от 3 мг/кг до 20 мг/кг, от 3 мг/кг до 15 мг/кг, от 3 мг/кг до 10 мг/кг, от 4 мг/кг до 50 мг/кг, от 4 мг/кг до 40 мг/кг, от 4 мг/кг до 30 мг/кг, от 4 мг/кг до 20 мг/кг, от 4 мг/кг до 15 мг/кг, от 4 мг/кг до 10

мг/кг, от 5 мг/кг до 50 мг/кг, от 5 мг/кг до 40 мг/кг, от 5 мг/кг до 30 мг/кг, от 5 мг/кг до 20 мг/кг, от 5 мг/кг до 15 мг/кг или от 5 мг/кг до 10 мг/кг.

33. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-32, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз.

34. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-32, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз в сутки, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз в неделю или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз в месяц.

35. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-32, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят по меньшей мере один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день.

36. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-35, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят в течение периода по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 51, 52, 53, 54 или 55 недель.

37. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-30, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят в однократной дозе 5 мг/кг.

38. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-30, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят в однократной дозе 10 мг/кг.

39. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-30, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят в трех дозах 10 мг/кг раз в неделю.

40. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-30, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят в трех дозах 10 мг/кг раз в три дня.

41. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-30, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят в пяти дозах 10 мг/кг раз в три дня.

42. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-30, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят в шести дозах в диапазоне от 1 мг/кг до 15 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг, от 2 мг/кг до 15 мг/кг, от 2 мг/кг до 10 мг/кг, от 3 мг/кг до 15 мг/кг или от 3 мг/кг до 10 мг/кг.
43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что первую дозу и вторую дозу вводят с перерывом по меньшей мере 3 дня.
44. Способ по п. 42 или 43, отличающийся тем, что вторую дозу и третью дозу вводят с перерывом по меньшей мере 4 дня.
45. Способ по любому из пп. 42-44, отличающийся тем, что третью дозу и четвертую дозу, четвертую дозу и пятую дозу или пятую дозу и шестую дозу вводят с перерывом по меньшей мере 7 дней.
46. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-45, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят в виде частиц или вирусных векторов.
47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой вектор аденовируса, адено-ассоциированного вируса (AAV), альфавируса, флавивируса, вируса простого герпеса, лентивируса, вируса кори, пикорнавируса, поксвируса, ретровируса или рабдовируса.
48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой рекомбинантный вирусный вектор.
49. Способ по п. 47 или 48, отличающийся тем, что вирусный вектор выбран из AAVrh.74, AAVrh.10, AAVrh.20, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13.
50. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-49, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят системно.
51. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-50, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят локально.
52. Способ по любому из пп. 1-18 и 26-51, отличающийся тем, что первый АСО и/или второй АСО вводят внутривенно, подкожно или внутримышечно.

53. Антисмысловой олигонуклеотид (АСО), содержащий 14-22 нуклеотидных фрагментов, причем АСО содержит следующее:

(a) центральная область (В'), содержащая 6 или более смежных нуклеозидов ДНК, причем по меньшей мере один из смежных нуклеозидов ДНК представляет собой модифицированный нуклеотид,

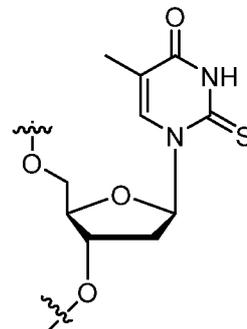
(b) область боковой 5'-ветви (А'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов, и

(c) область боковой 3'-ветви (С'), содержащая 2-6 закрытых нуклеозидов или 2'-замещенных нуклеозидов,

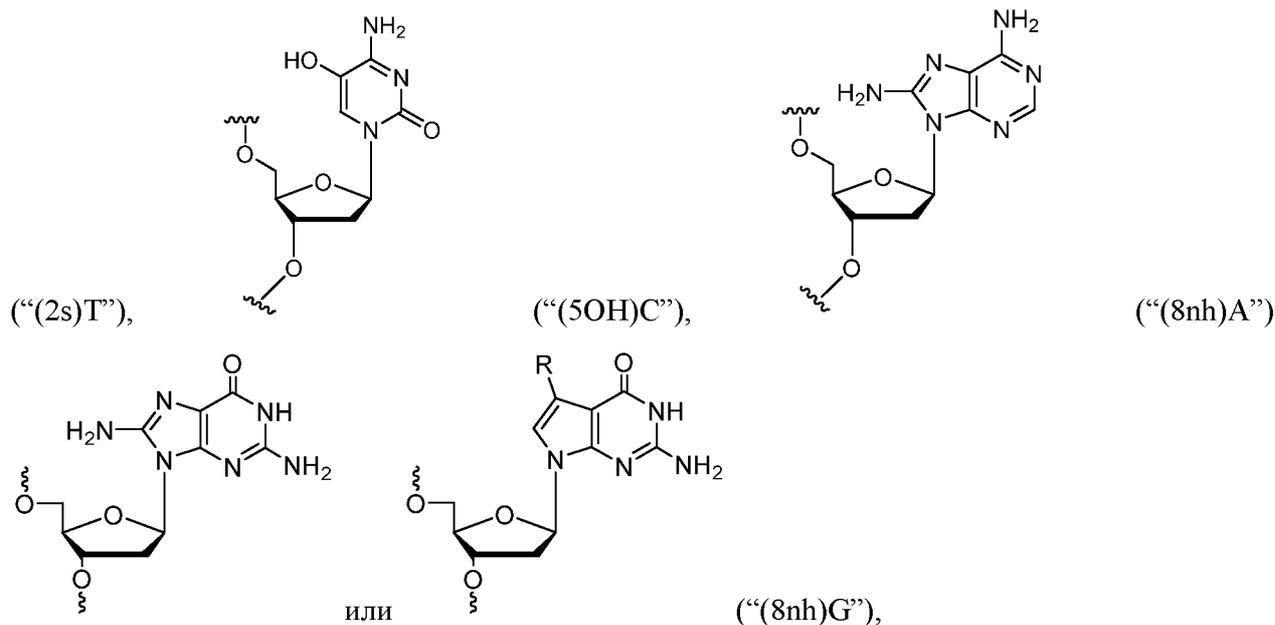
причем центральная область АСО комплементарна или гибридизирована с вирусной целевой последовательностью РНК в Х-области или S-области ВГВ.

54. АСО по п. 53, отличающийся тем, что модифицированный нуклеотид возникает на нуклеотиде в положении 3 от 5'-конца центральной области.

55. АСО по п. 53 или 54, отличающийся тем, что модифицированный нуклеотид



представляет собой нуклеотид с защищенной или незащищенной версией



где

R представляет собой галоген или R'-C≡C-; и

R' представляет собой C₆₋₁₂ арил, 5-12-членный гетероарил, гидроксис-C₁₋₆ алкил или C₁₋₇ алканоилокси.

56. АСО по любому из пп. 53-55, отличающийся тем, что АСО содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей, приведенных в таблице 1, 2А, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 или 19.

57. Способ лечения субъекта, инфицированного вирусом гепатита В (ВГВ), включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества АСО по любому из пп. 21-25 и 53-56.

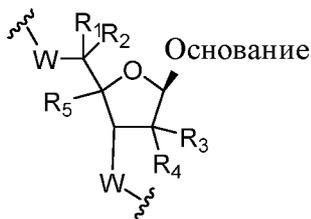
58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что АСО представляет собой АСО 120.

59. Способ по п. 58, дополнительно включающий введение второго АСО, отличающийся тем, что второй АСО представляет собой АСО по любому из пп. 21-25 и 53-56.

60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что второй АСО представляет собой АСО 121.

61. Способ по п. 57, отличающийся тем, что АСО представляет собой АСО 121.

62. Способ по п. 61, дополнительно включающий введение второго АСО, отличающийся тем, что второй АСО представляет собой АСО по любому из пп. 21-25 и 53-56.
63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что второй АСО представляет собой АСО 120.
64. Способ по любому из пп. 1-19 и 26-52, отличающийся тем, что первый АСО представляет собой АСО 120.
65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что второй АСО представляет собой АСО 121.
66. Способ по любому из пп. 1-19 и 26-52, отличающийся тем, что первый АСО представляет собой АСО 121.
67. Способ по п. 66, отличающийся тем, что второй АСО представляет собой АСО 120.
68. АСО по п. 53 или 54, отличающийся тем, что модифицированный нуклеотид представляет собой нуклеотид со следующей структурой:



где:

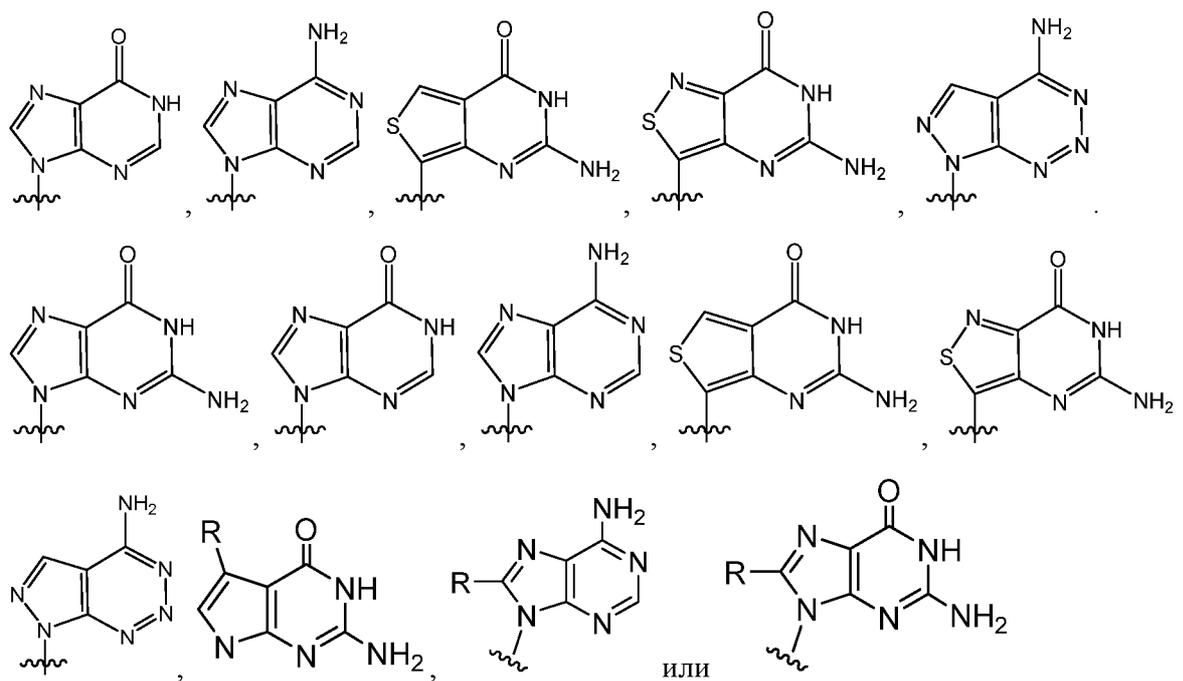
W независимо представляет собой O, N или S;

R₁, R₂ и R₅ независимо представляют собой H или D;

R₃ представляет собой H или F;

R₄ представляет собой F или OCH₃; и

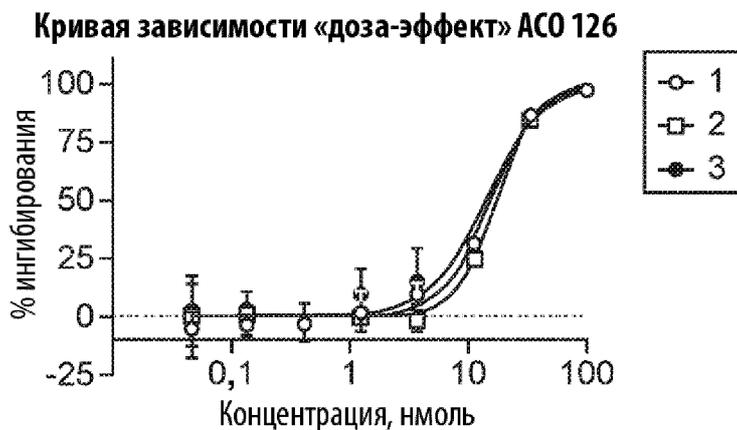
основание представляет собой



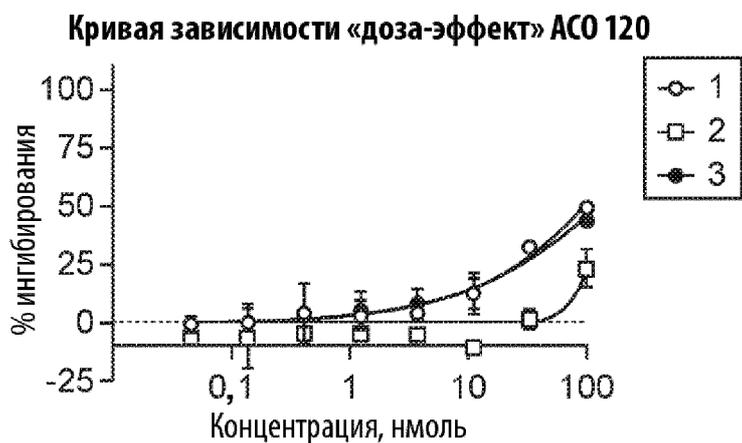
где:

R представляет собой галоген или $R'-C\equiv C-$; и

R' представляет собой C_{6-12} арил, 5-12-членный гетероарил, гидрокси- C_{1-6} алкил или C_{1-7} алканоилокси.



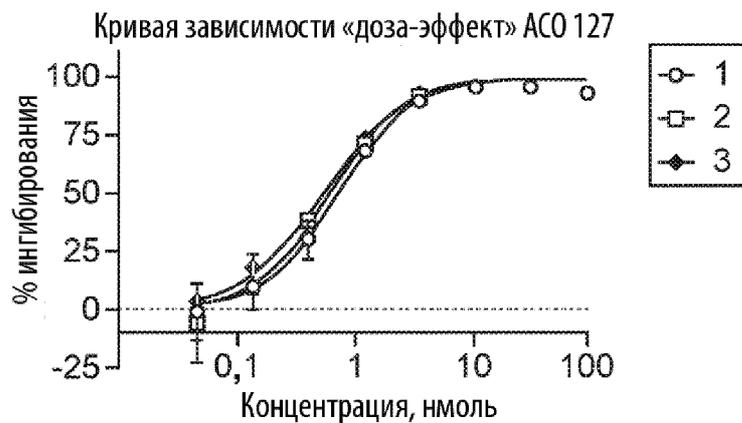
Фиг. 1А



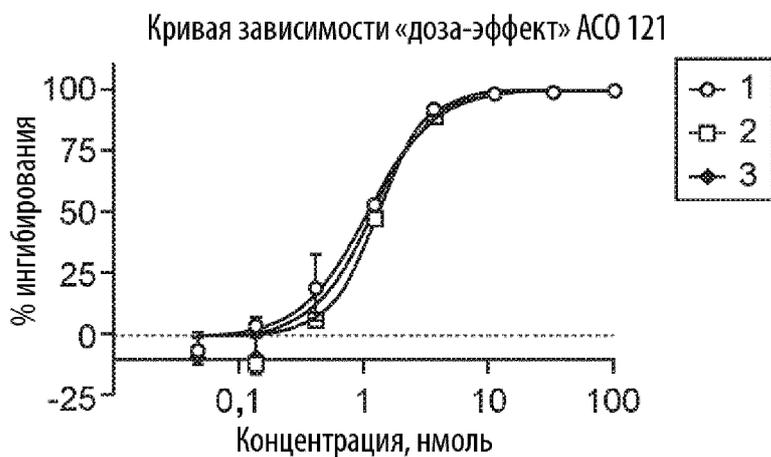
Фиг. 1В



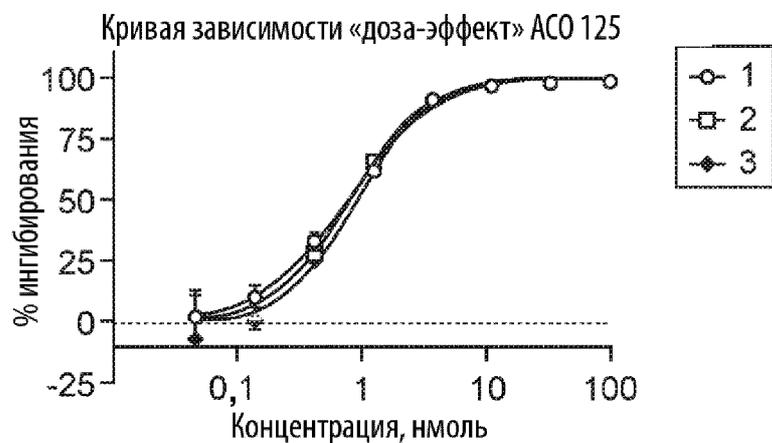
Фиг. 1С



Фиг. 2А



Фиг. 2В



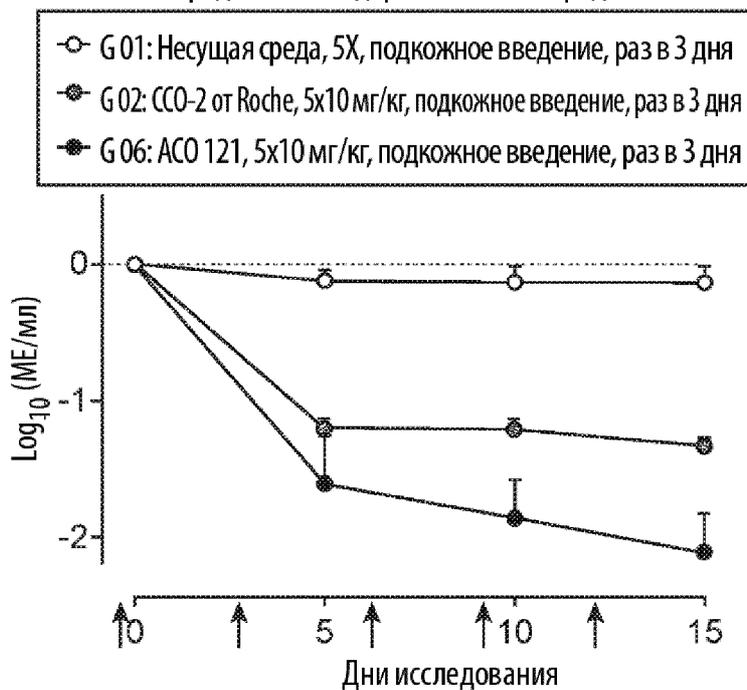
Фиг. 2С

Изменение уровня поверхностного антигена вируса
гепатита В в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего



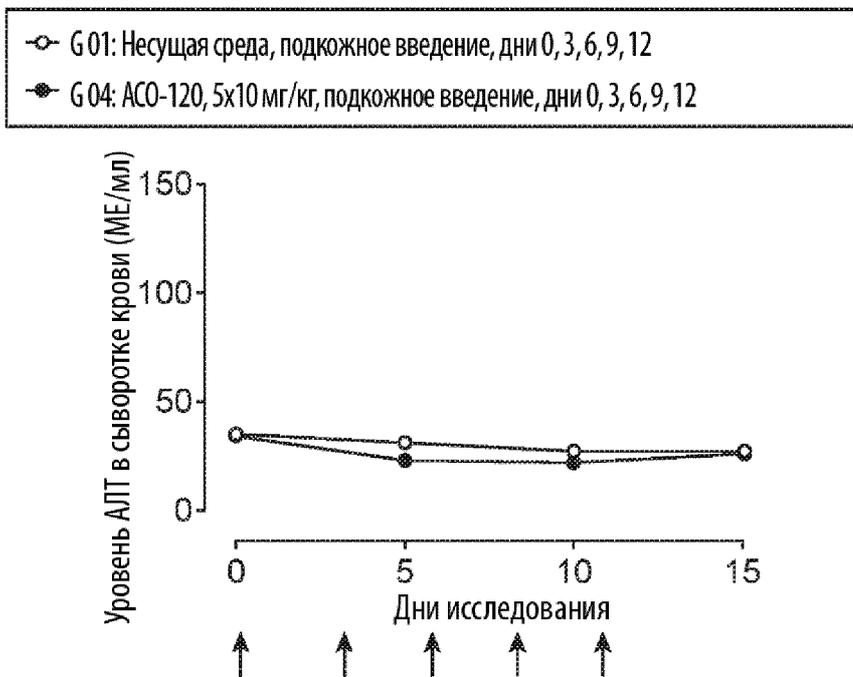
Фиг. 3А

Изменение уровня поверхностного антигена
вируса гепатита В в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего



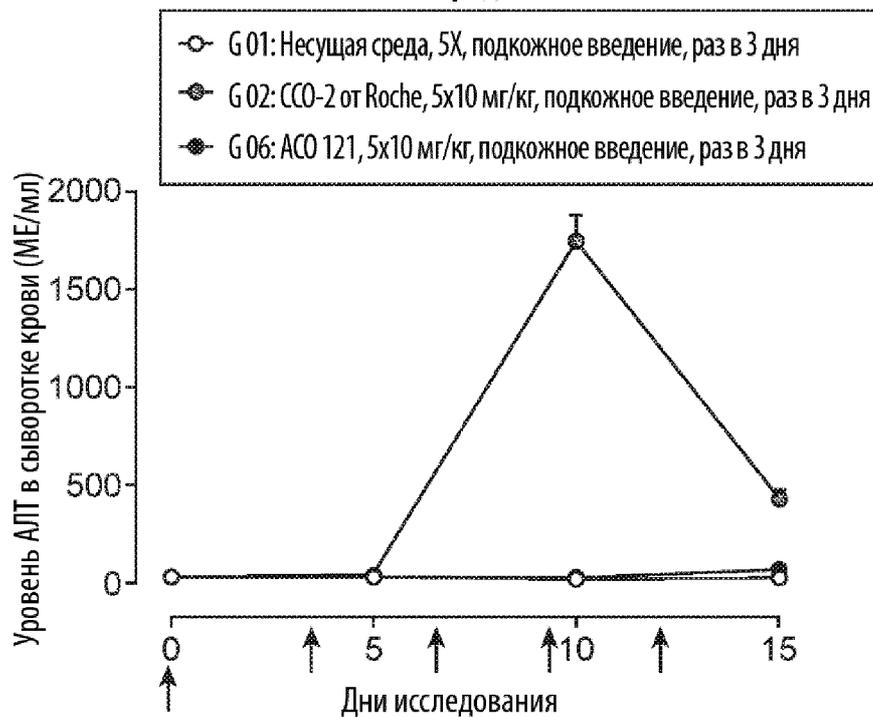
Фиг. 3В

Уровень АЛТ в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка
среднего



Фиг. 3С

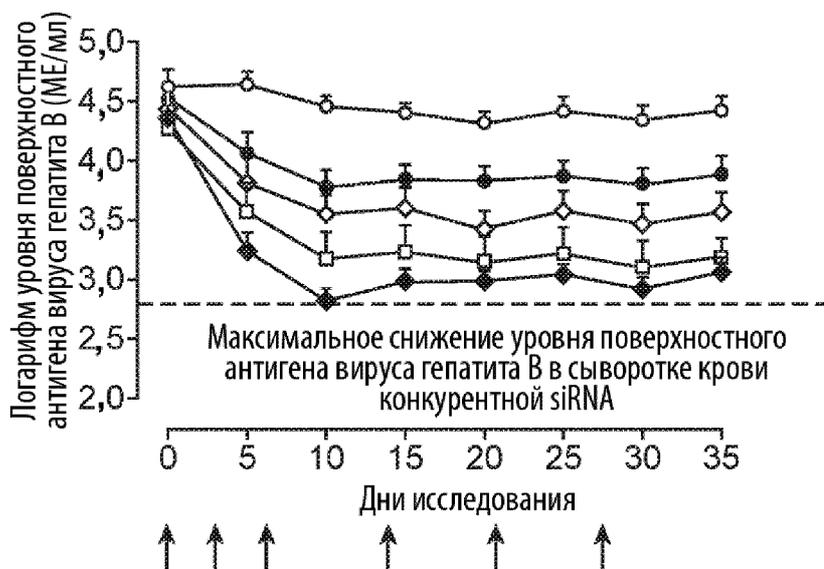
Уровень АЛТ в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка
среднего



Фиг. 3D

Уровень поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего

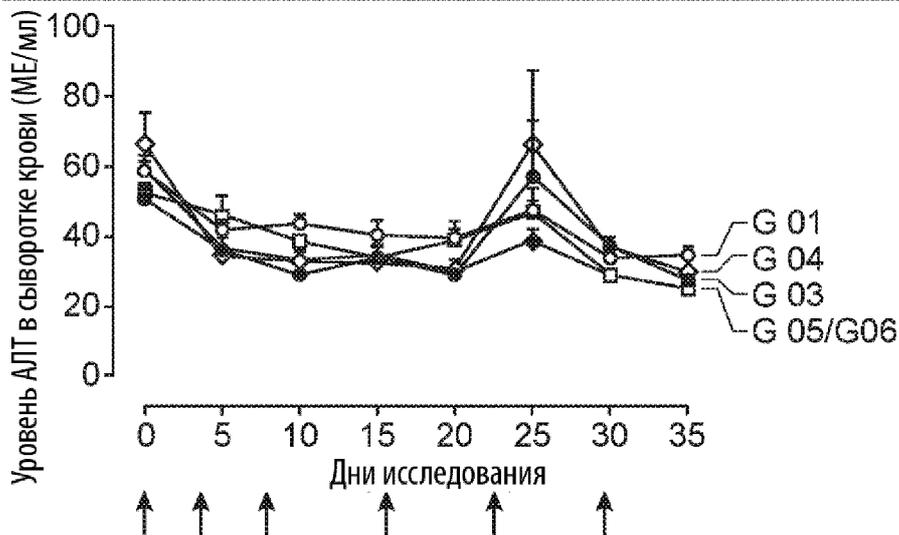
- G 01: Несущая среда, 6X, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- G 04: ACO 121, 6x3 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28 28
- ◇ G 06: ACO 120, 6x3 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28 28
- G 05: ACO 120, 6x10 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28 28
- ◆ G 03: ACO 121, 6x10 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28 28



Фиг. 4А

Уровень АЛТ в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего

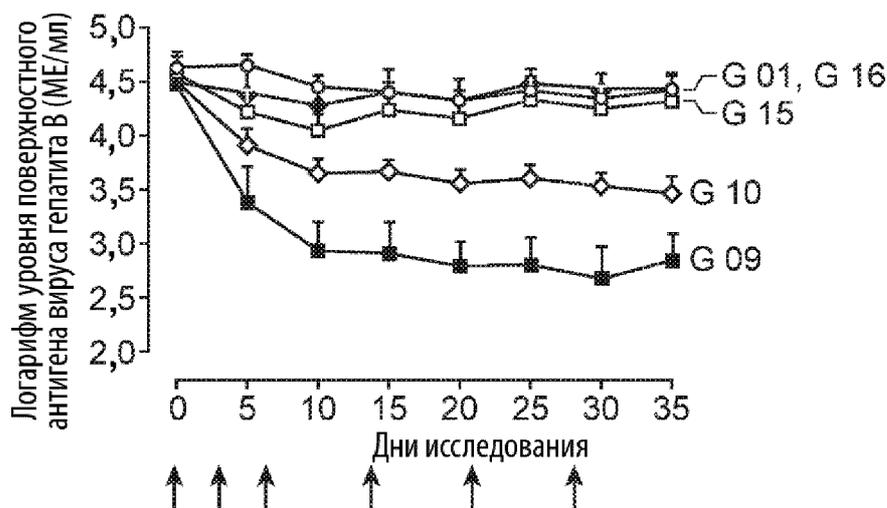
- G 01: Несущая среда, 6X, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- G 03: ACO 121, 6x10 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- ◇ G 04: ACO 121, 6x3 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- G 05: ACO 120, 6x10 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- ◆ G 06: ACO 120, 6x3 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28



Фиг. 4В

**Уровень поверхностного антигена вируса
гепатита В в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего**

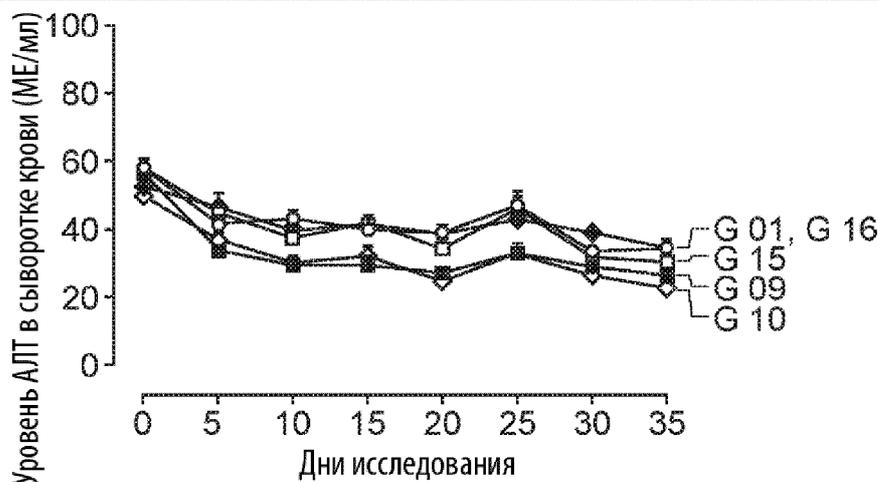
- G 01: Несущая среда, 6X, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- G 09: ACO 121 + ACO 120 (1:1), 6x10 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- ◇ G 10: ACO 121 + ACO 120 (1:1), 6x3 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- G 15: ACO 123, 6x10 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- ◆ G 16: ACO 123, 6x3 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28



Фиг. 4С

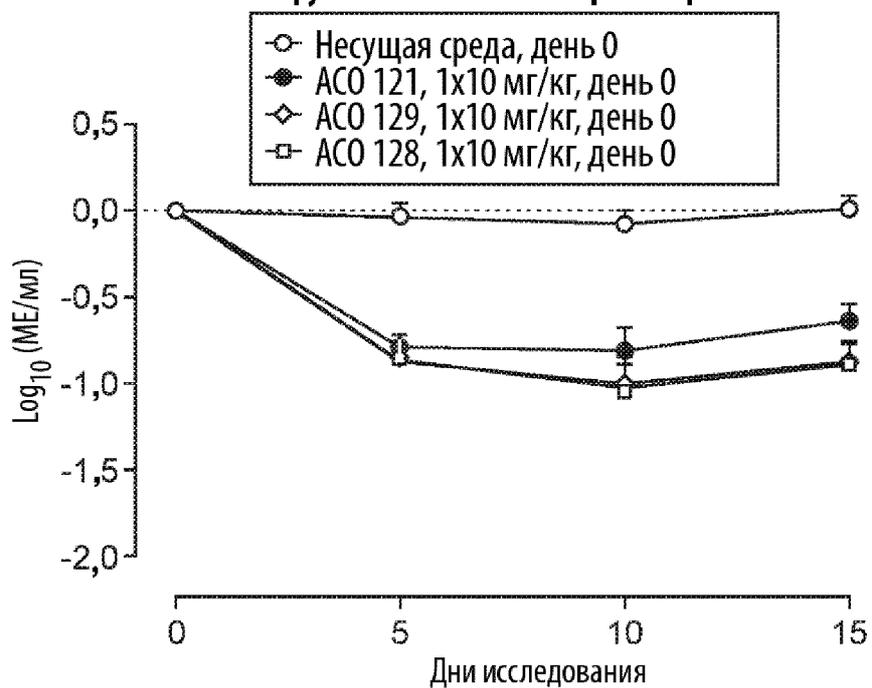
**Уровень АЛТ в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего**

- G 01: Несущая среда, 6X, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- G 09: ACO 121 + ACO 120 (1:1), 6x10 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- ◇ G 10: ACO 121 + ACO 120 (1:1), 6x3 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- G 15: ACO 123, 6x10 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28
- ◆ G 16: ACO 123, 6x3 мг/кг, подкожное введение, дни 0, 3, 7, 14, 21, 28



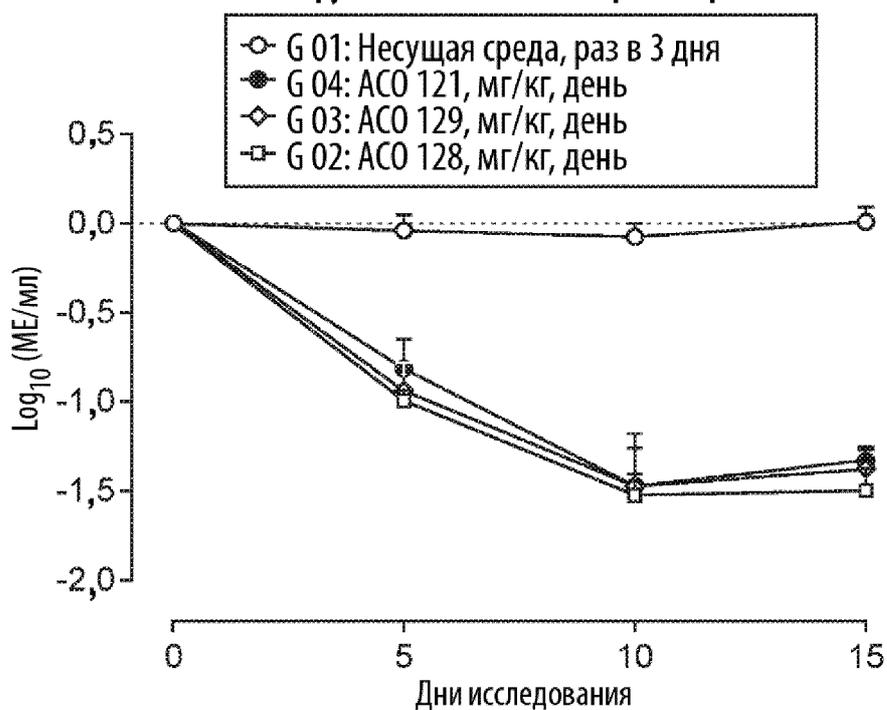
Фиг. 4D

**Изменение уровня поверхностного антигена
вируса гепатита В в сыворотке крови**



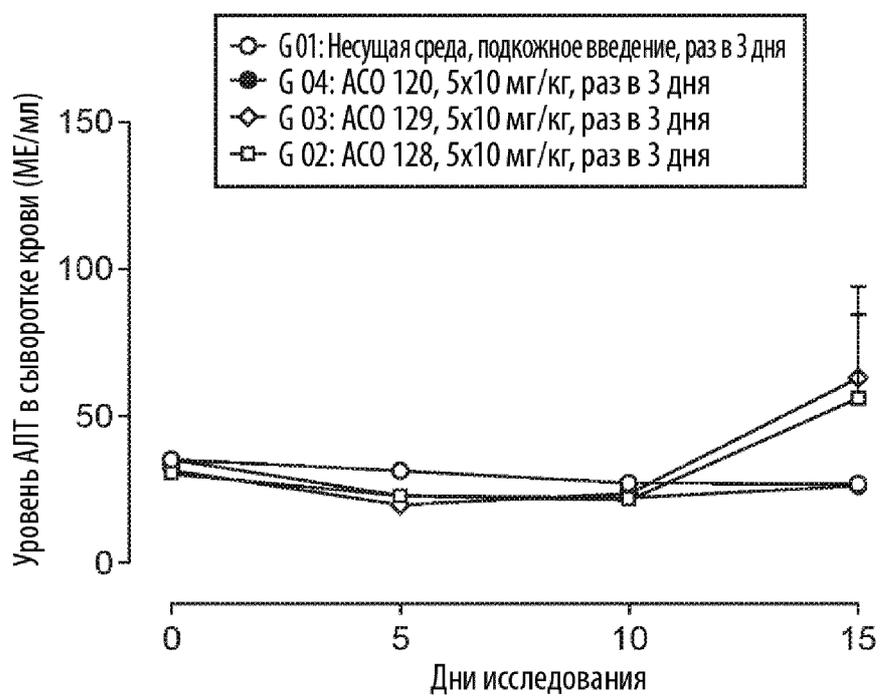
Фиг. 5А

**Изменение уровня поверхностного антигена
вируса гепатита В в сыворотке крови**



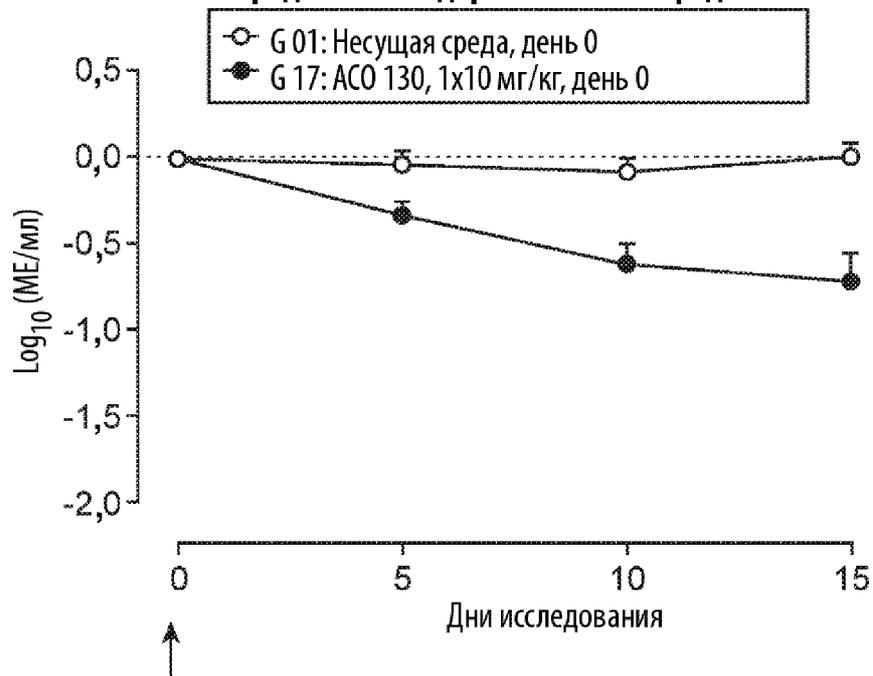
Фиг. 5В

Уровень АЛТ в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего



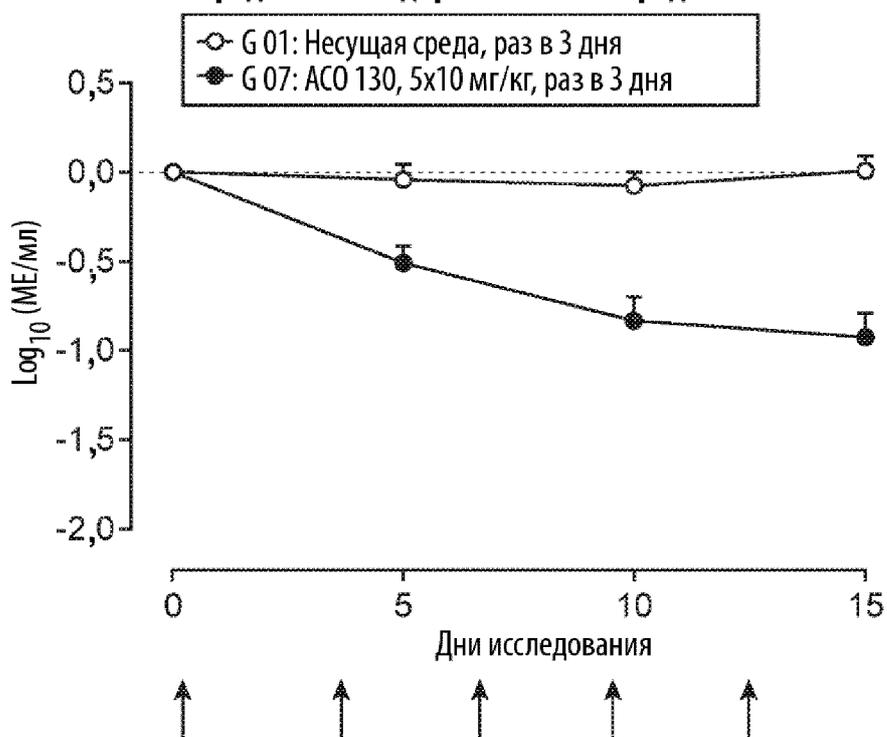
Фиг. 5С

**Изменение уровня поверхностного антигена
вируса гепатита В в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего**

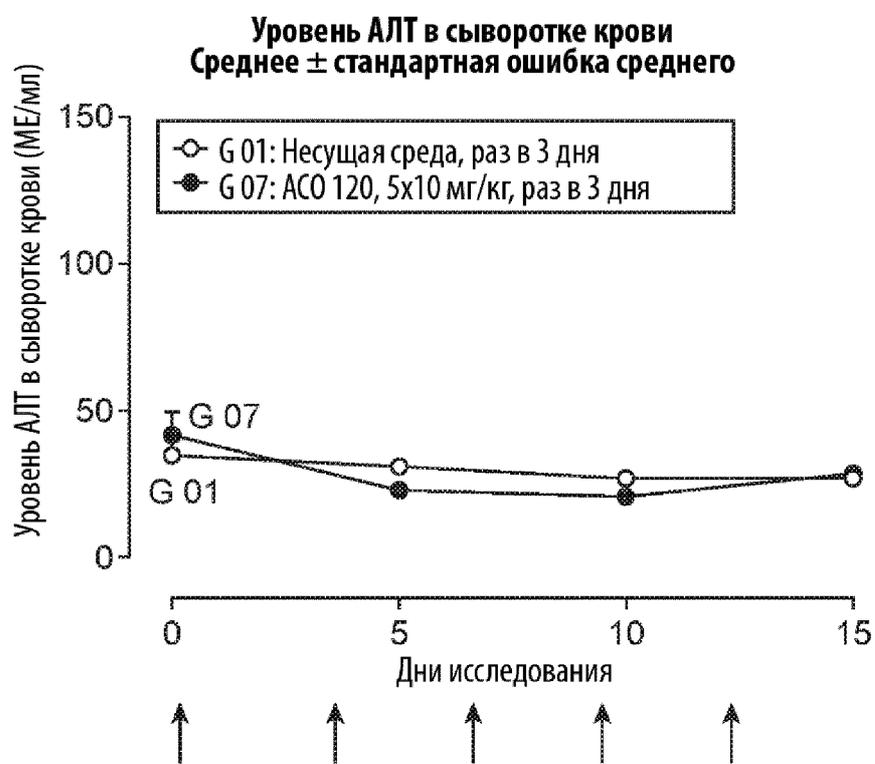


Фиг. 6А

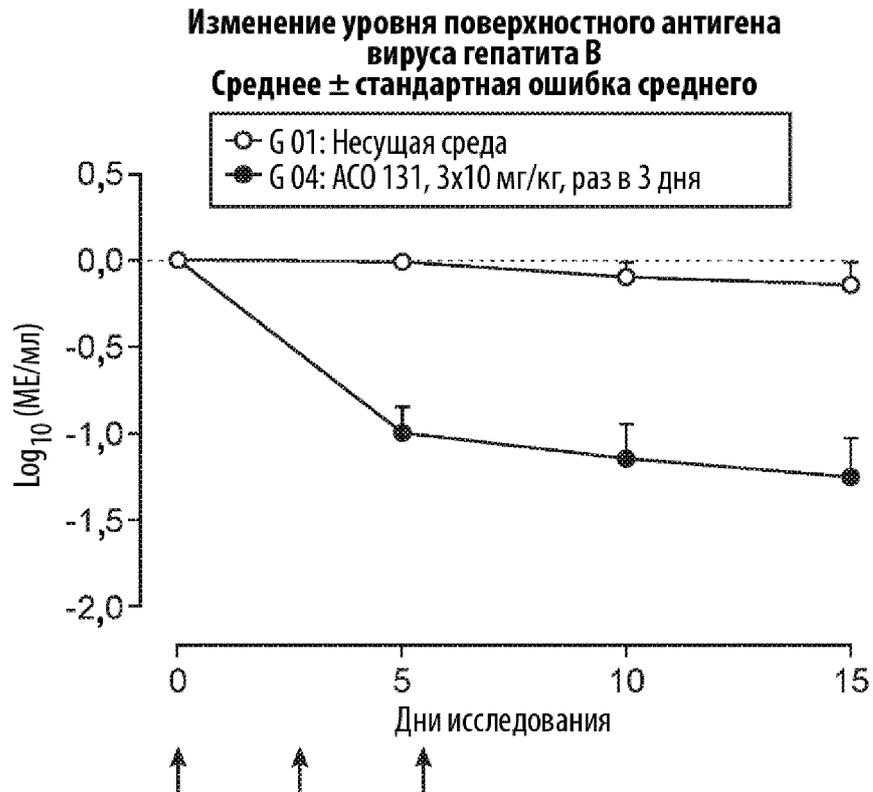
**Изменение уровня поверхностного антигена
вируса гепатита В в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего**



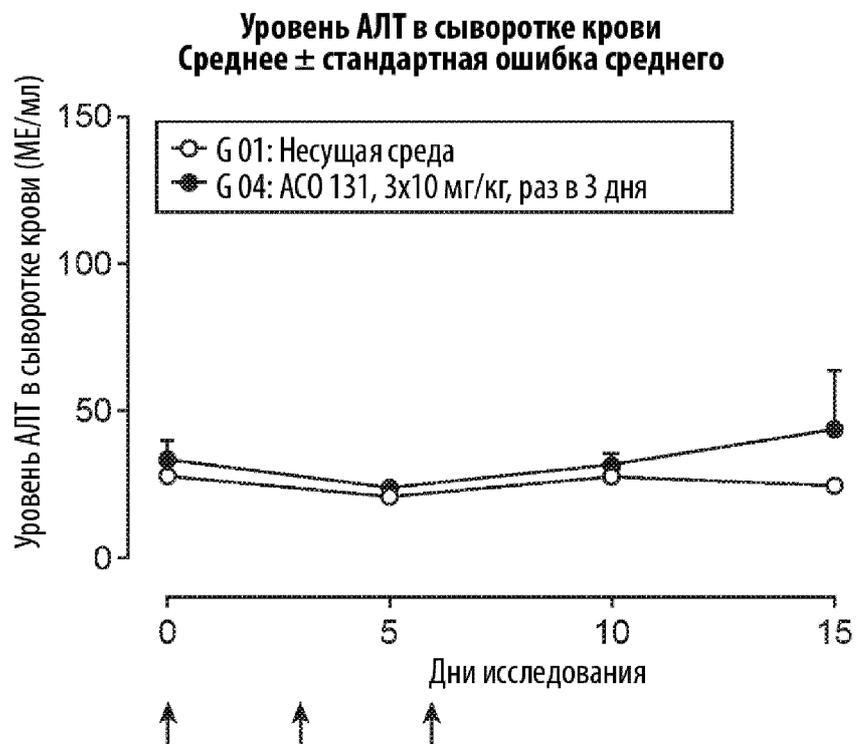
Фиг. 6В



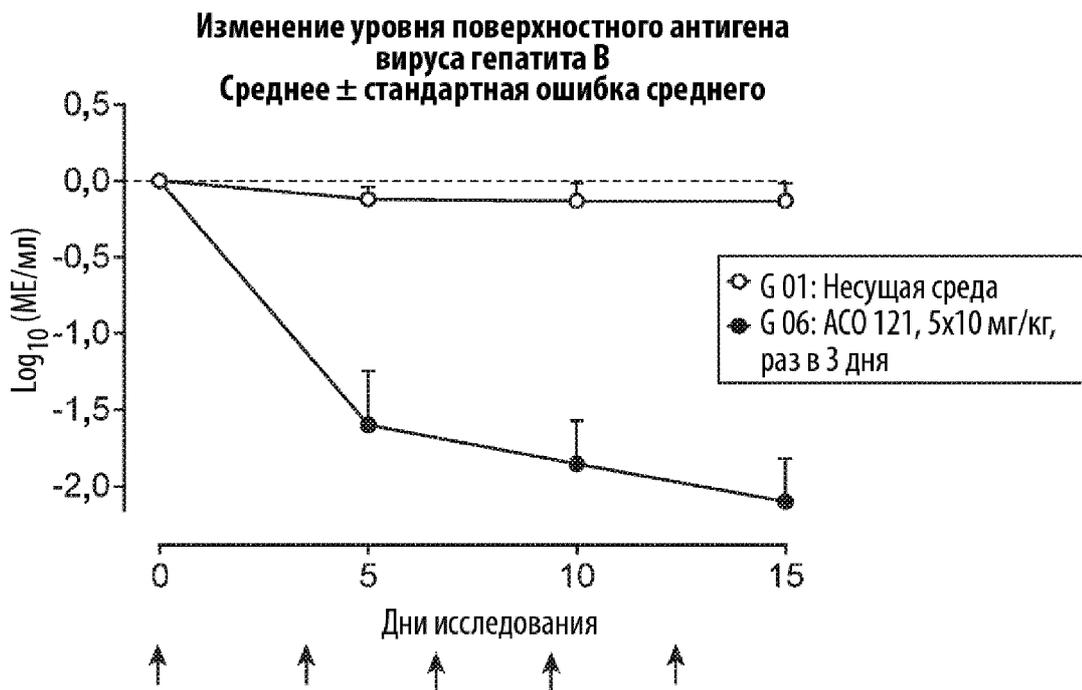
Фиг. 6С



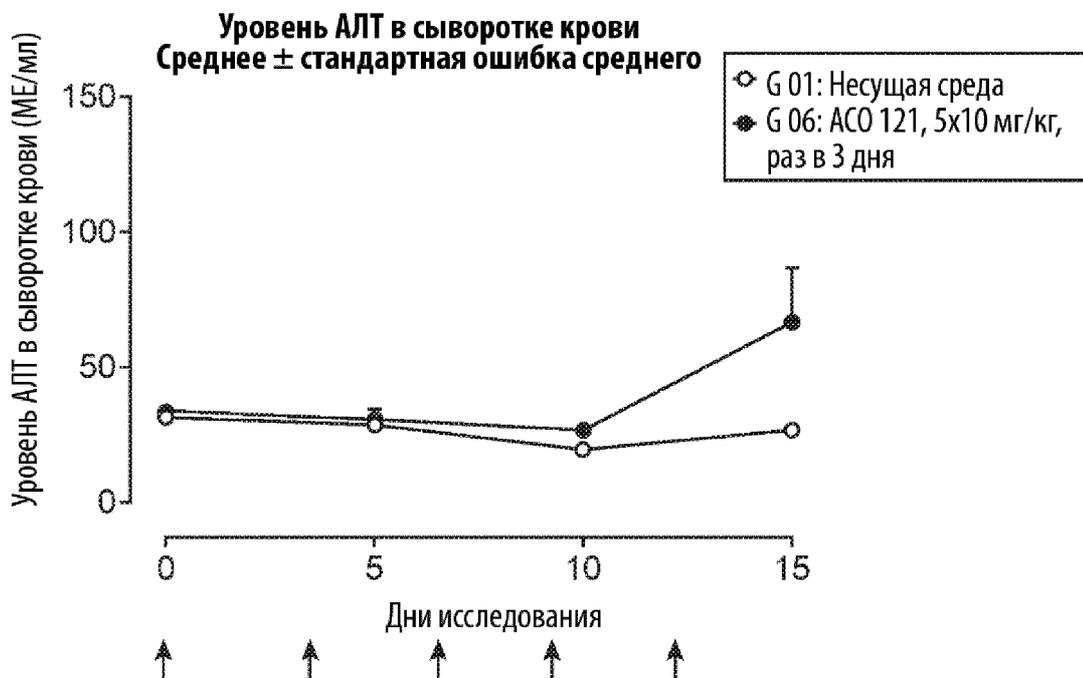
Фиг. 7А



Фиг. 7В

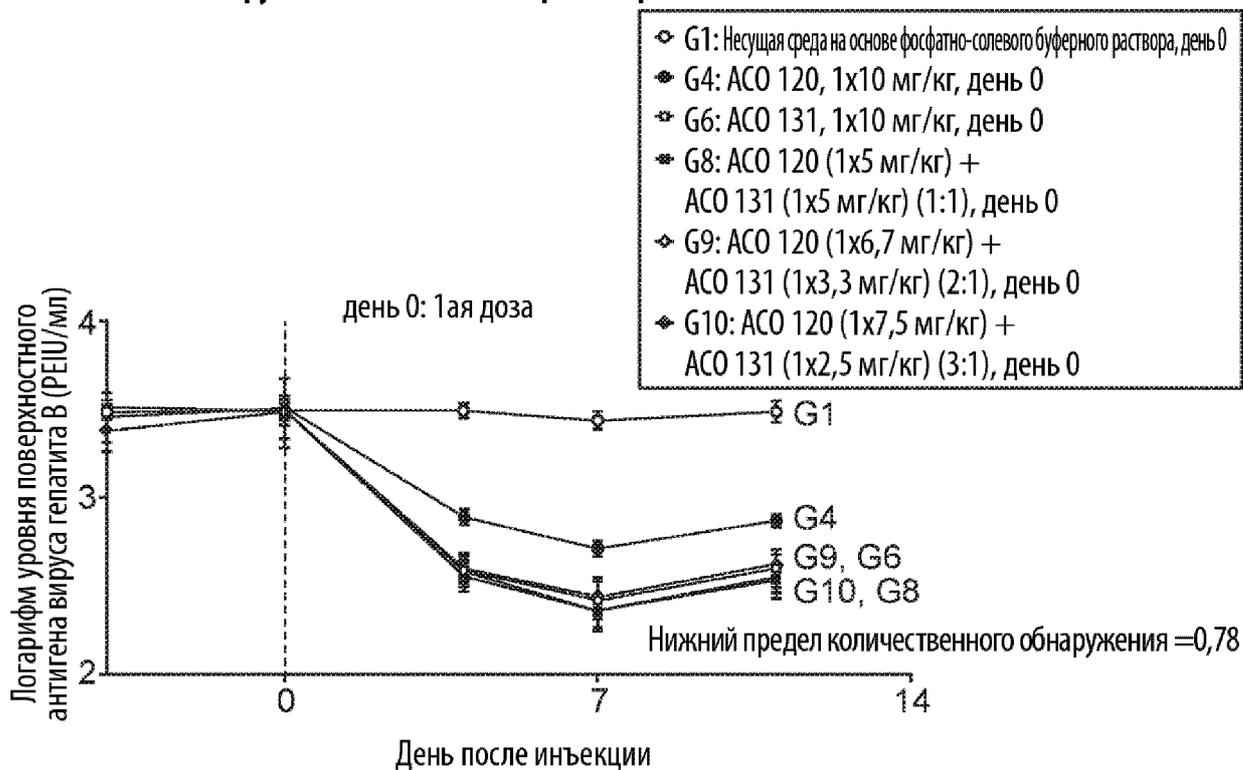


Фиг. 8А



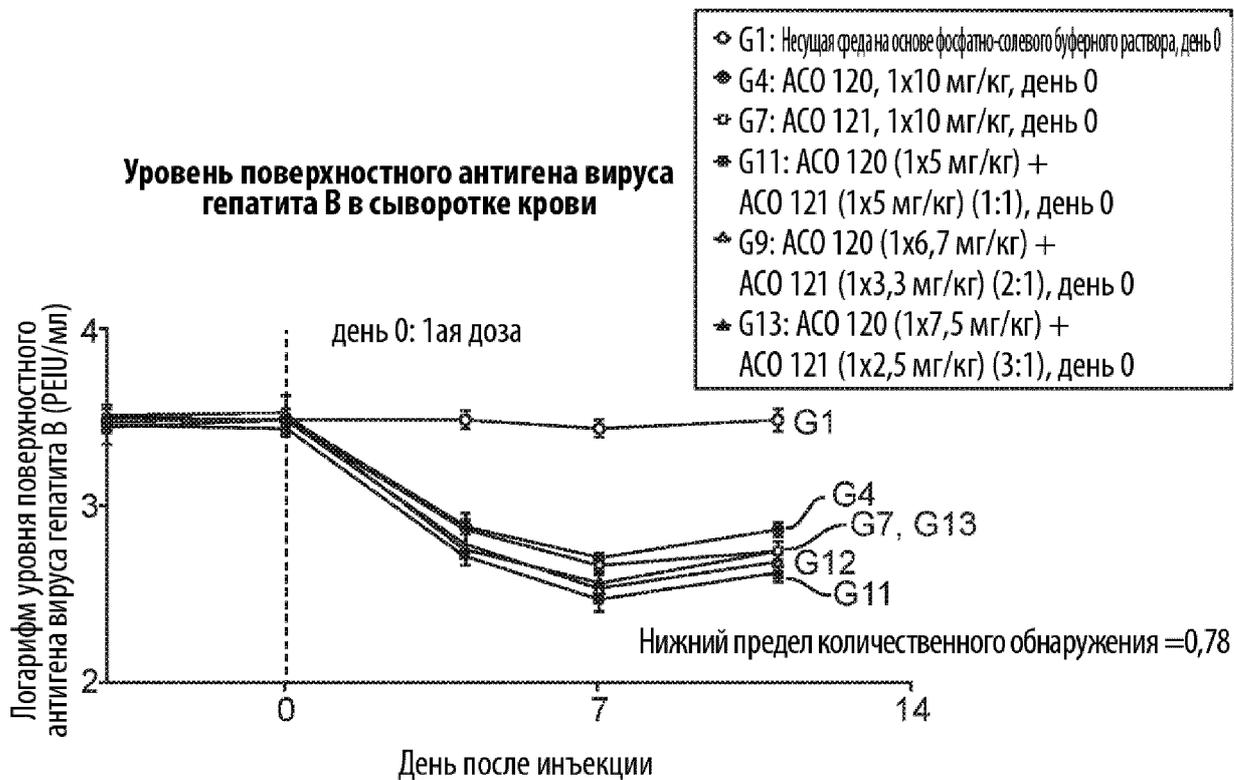
Фиг. 8В

Уровень поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови



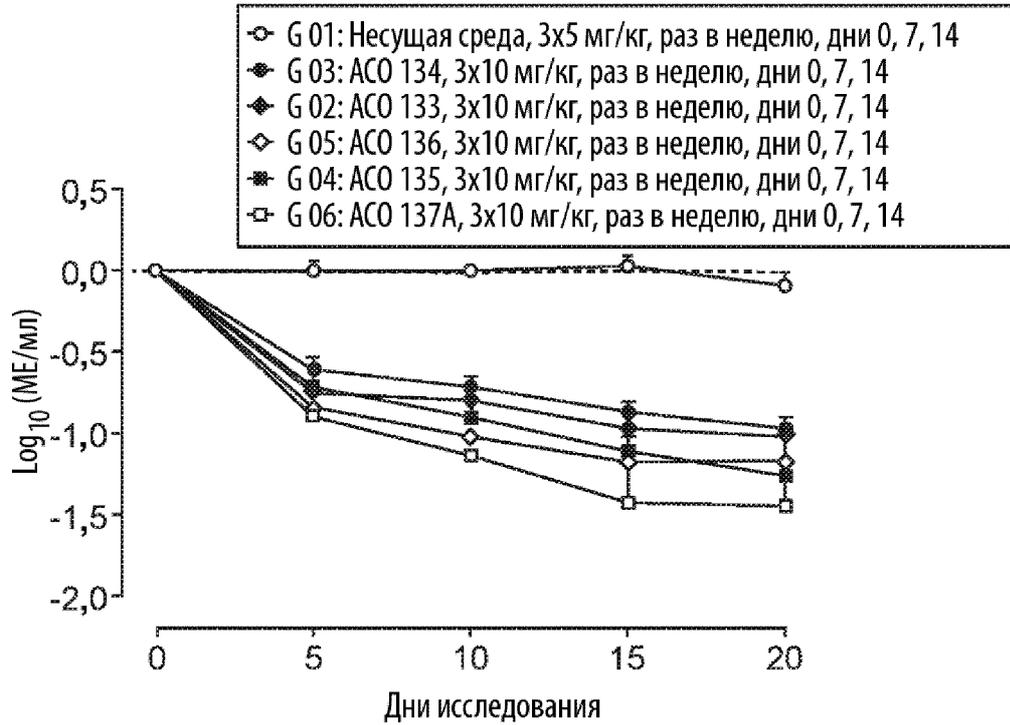
Фиг. 9А

Уровень поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови



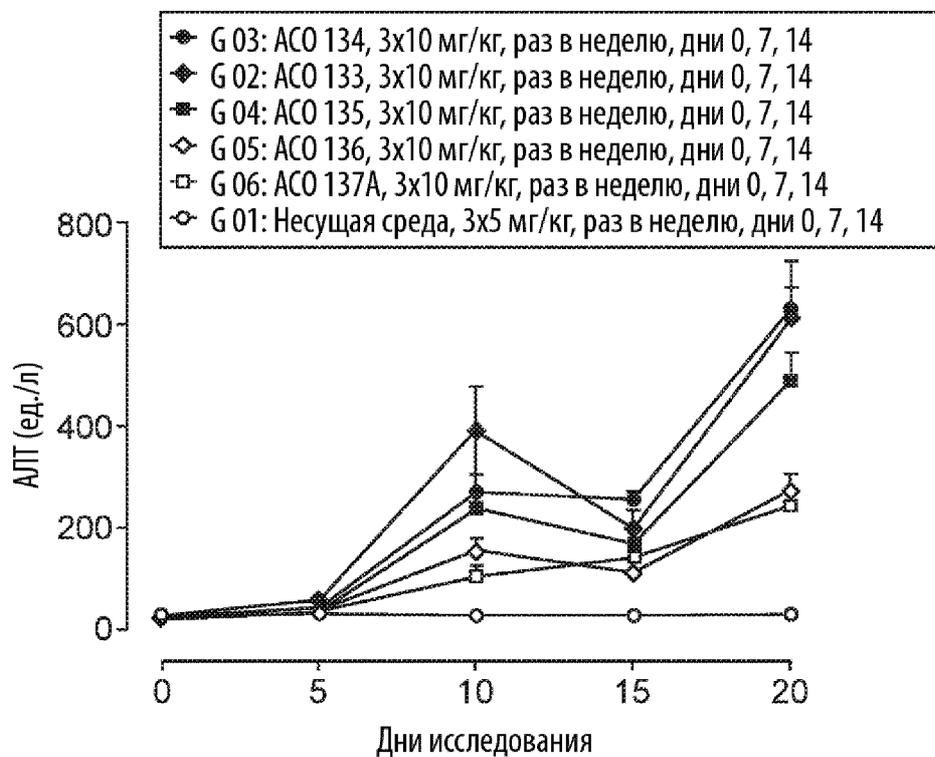
Фиг. 9В

Изменение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови



Фиг. 10А

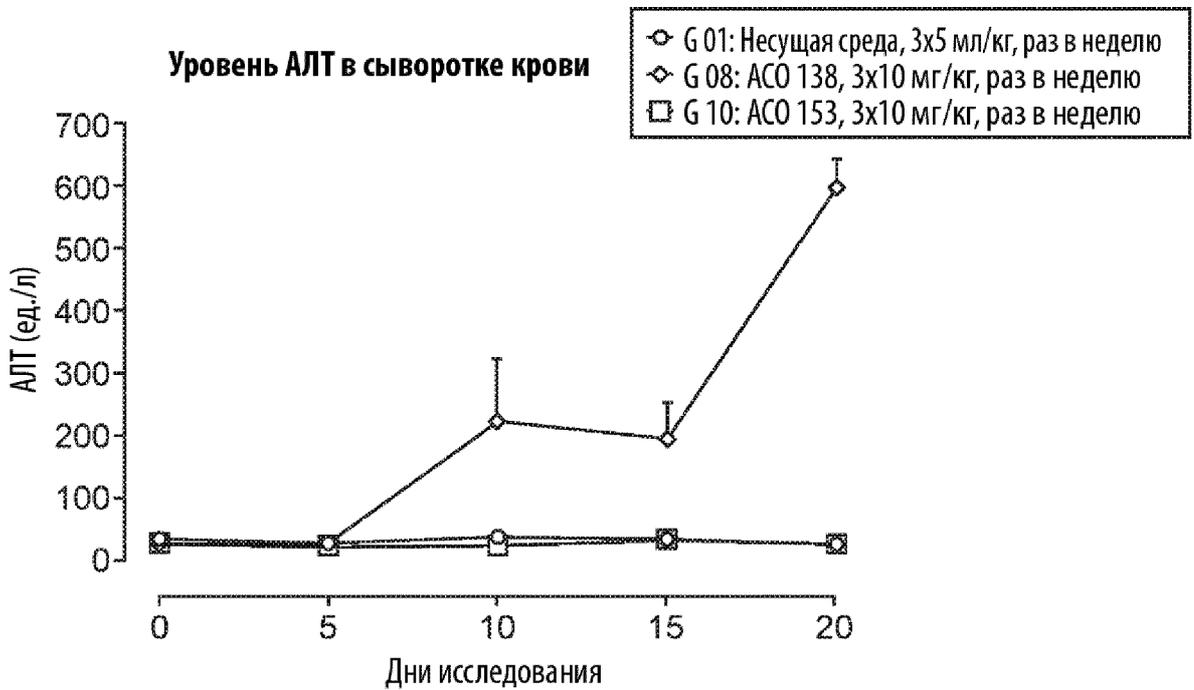
Уровень АЛТ в сыворотке крови Среднее ± стандартная ошибка среднего



Фиг. 10В

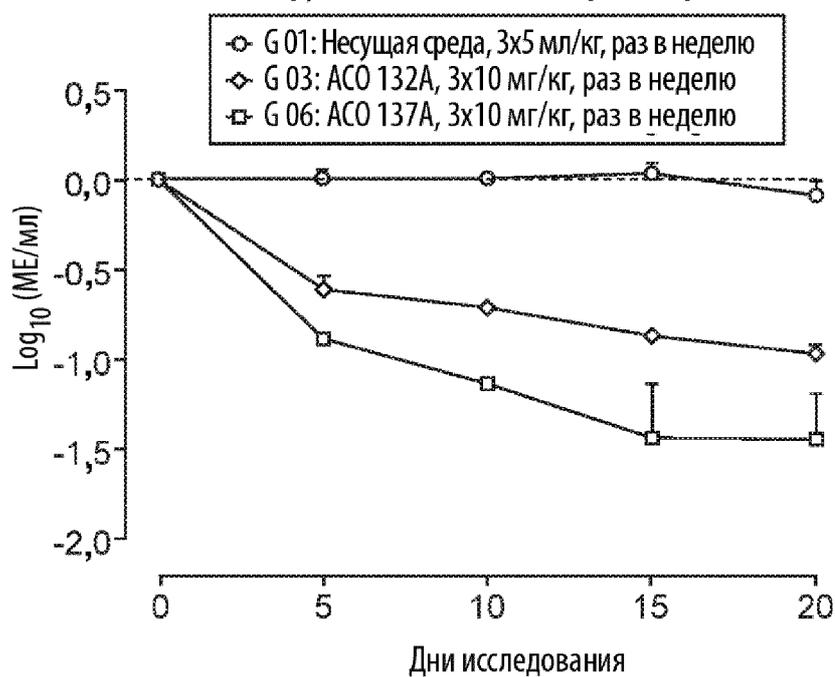


Фиг. 11А



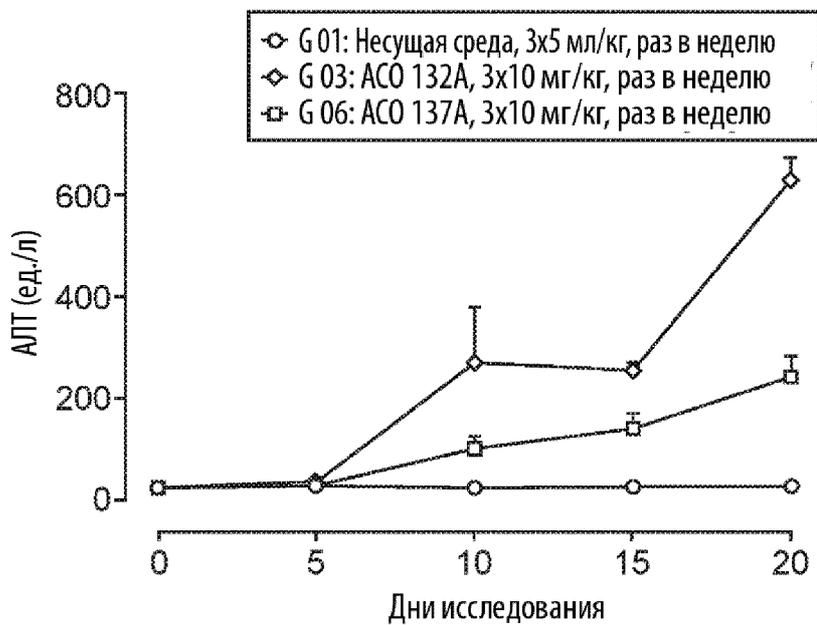
Фиг. 11В

Изменение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови



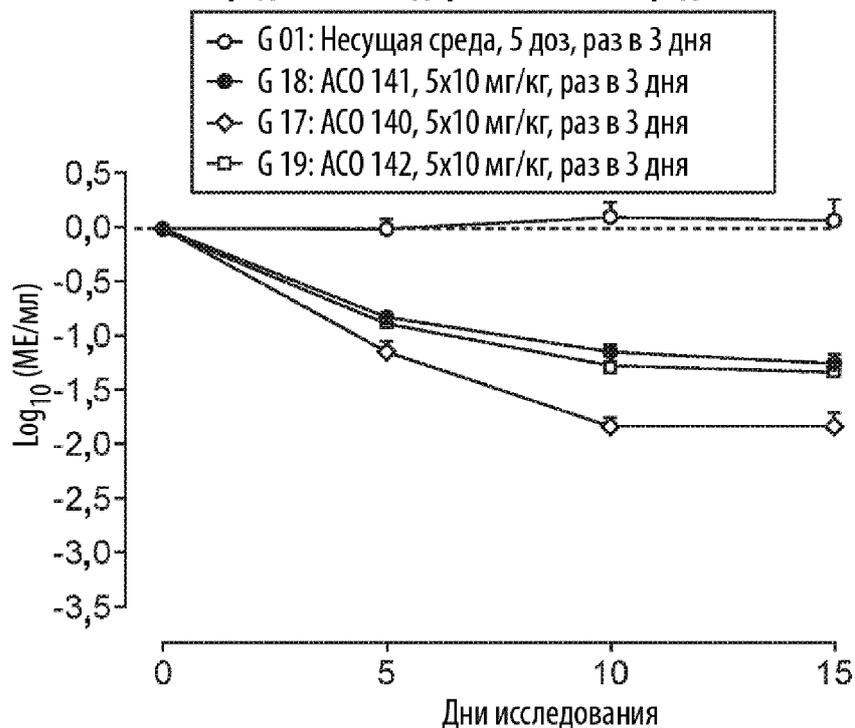
Фиг. 12А

Уровень АЛТ в сыворотке крови



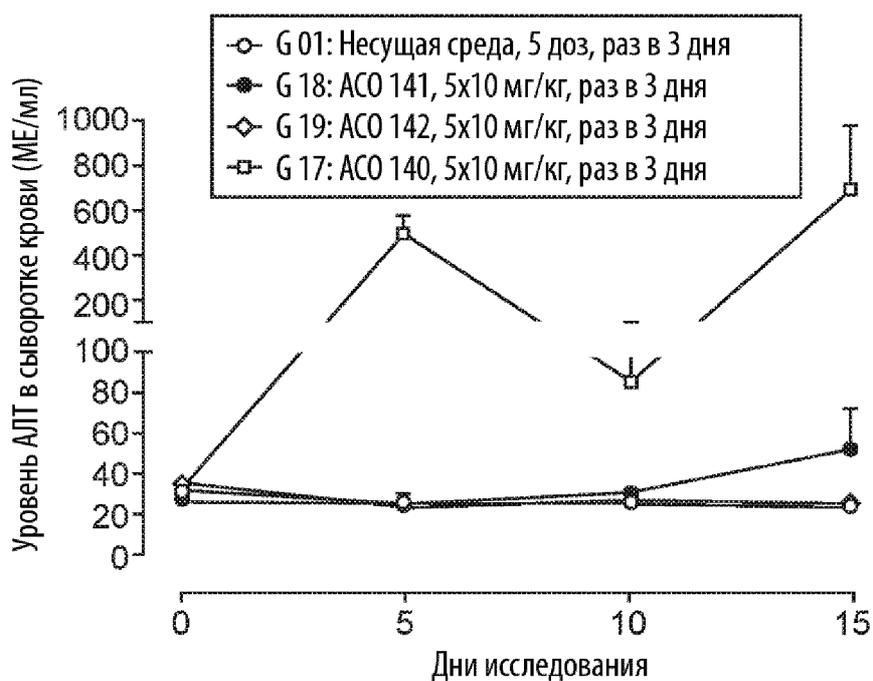
Фиг. 12В

**Изменение уровня поверхностного антигена
вируса гепатита В**
Среднее \pm стандартная ошибка среднего



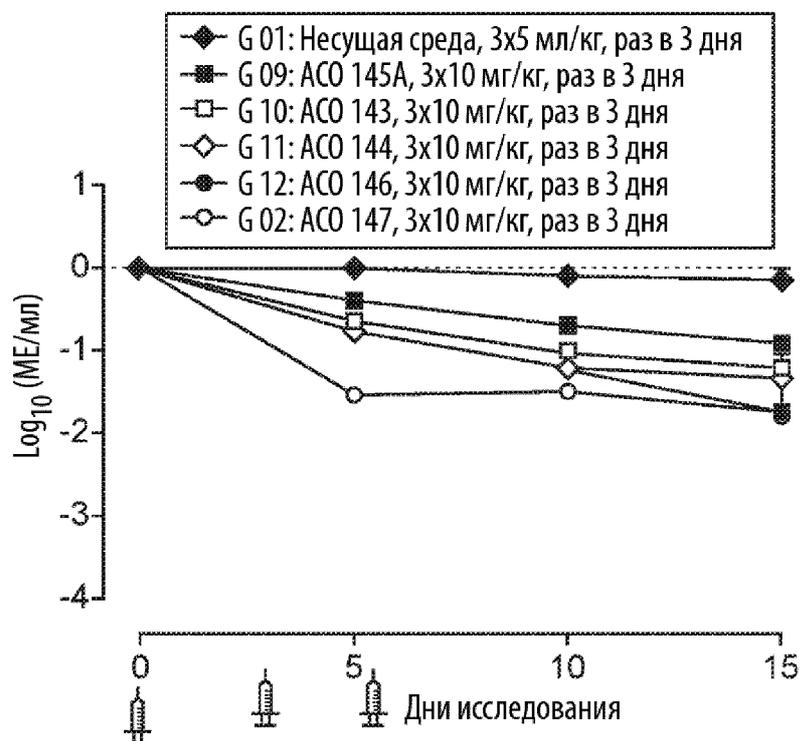
Фиг. 13А

Уровень АЛТ в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего



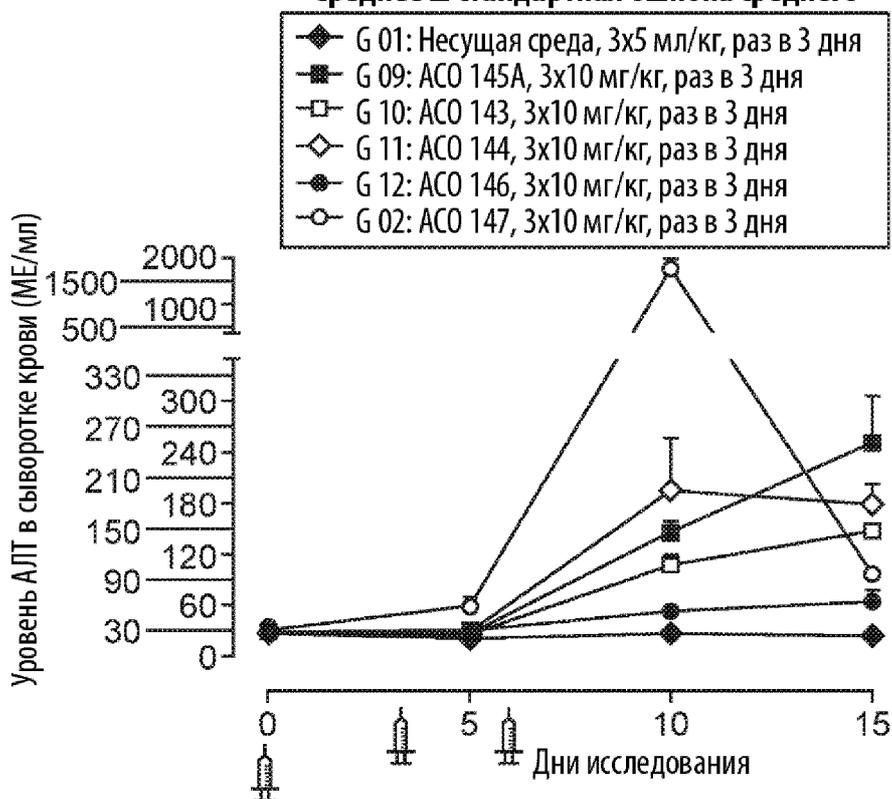
Фиг. 13В

Изменение уровня поверхностного антигена вируса гепатита В
Среднее \pm стандартная ошибка среднего



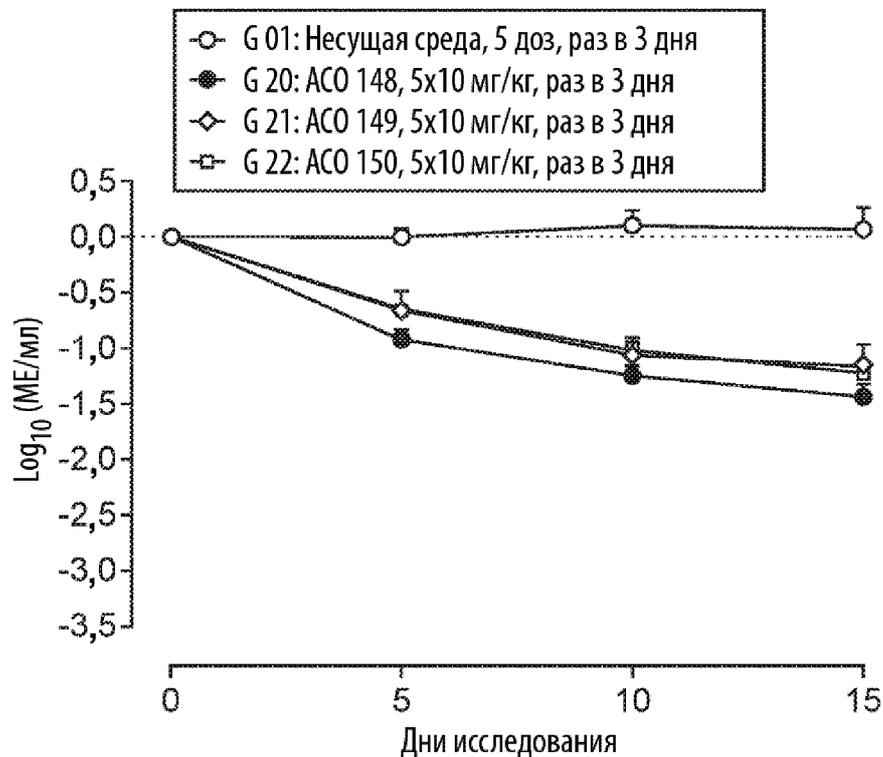
Фиг. 14А

Уровень АЛТ в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего



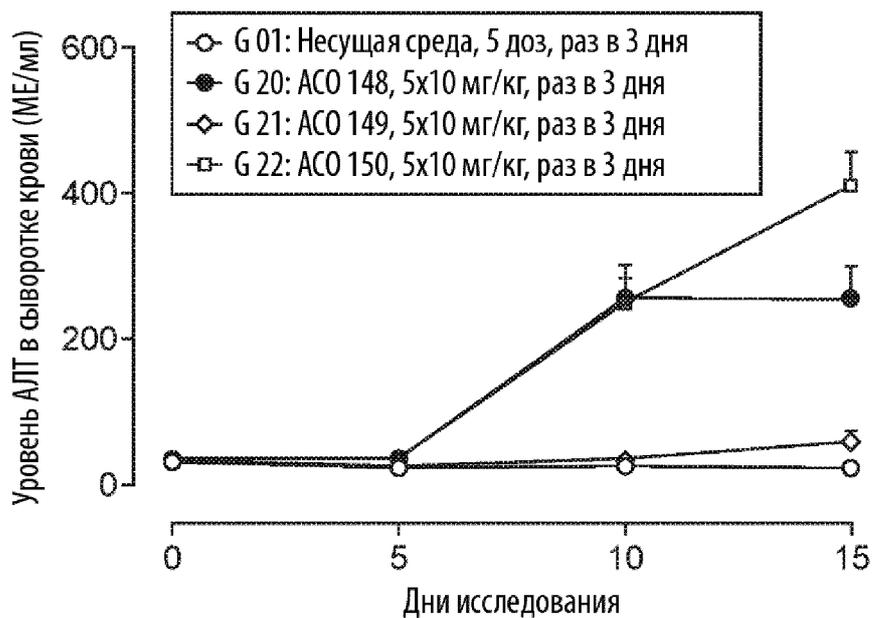
Фиг. 14В

**Изменение уровня поверхностного
антигена вируса гепатита В
Среднее \pm стандартная ошибка среднего**



Фиг. 15А

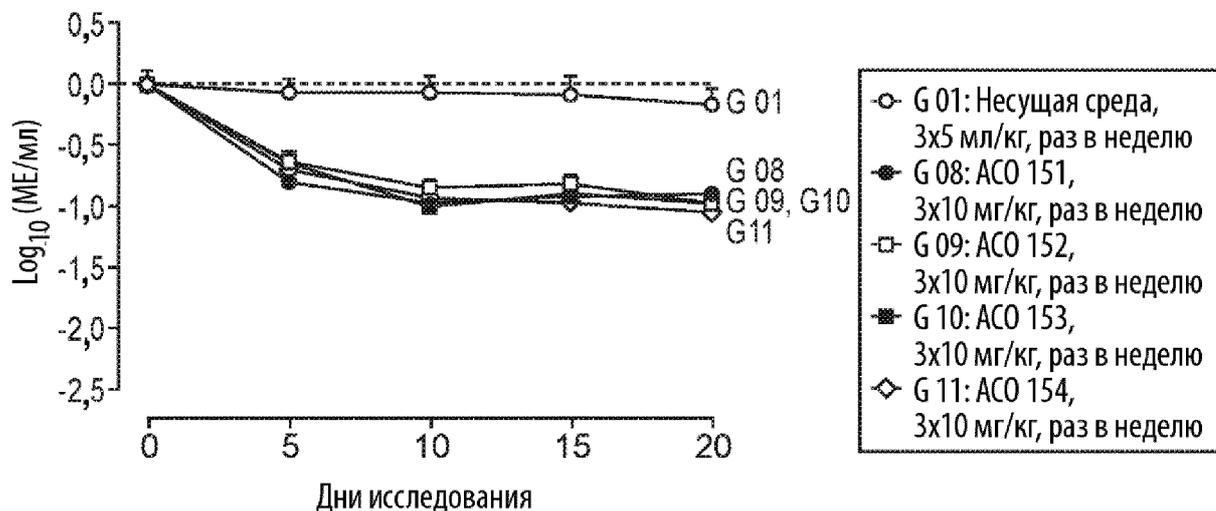
**Уровень АЛТ в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего**



Фиг. 15В

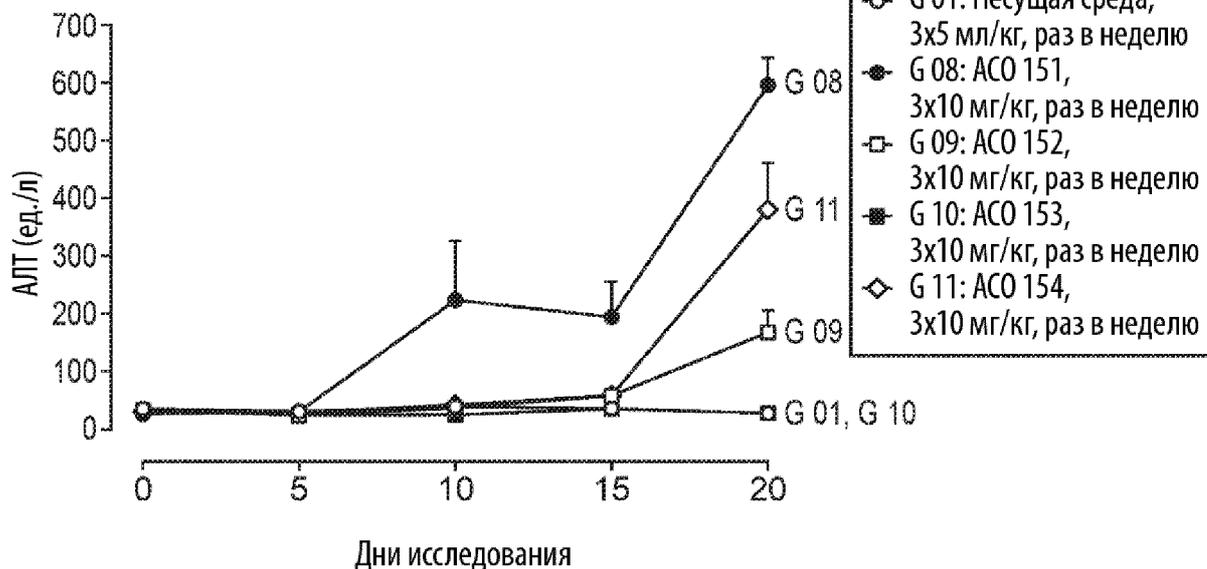
**Изменение уровня поверхностного антигена
вируса гепатита В в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего**

P<0,05, **P<0,01, *P<0,001 по сравнению с группой 01
Двухсторонняя проверка по критерию Стьюдента*



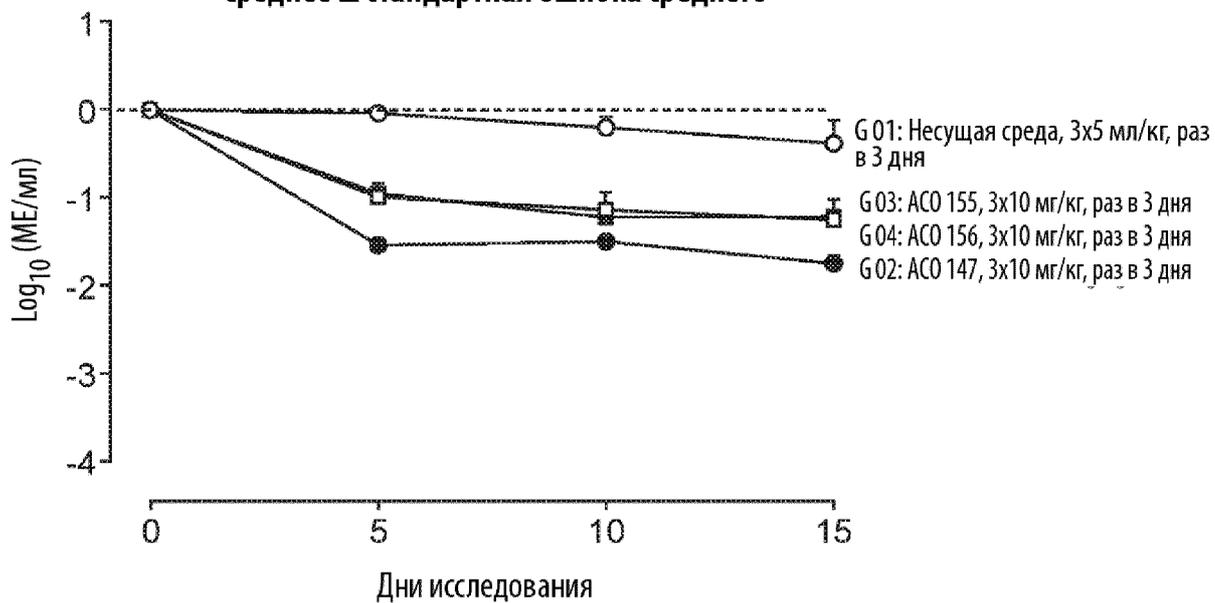
Фиг. 16А

**Уровень АЛТ в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего**



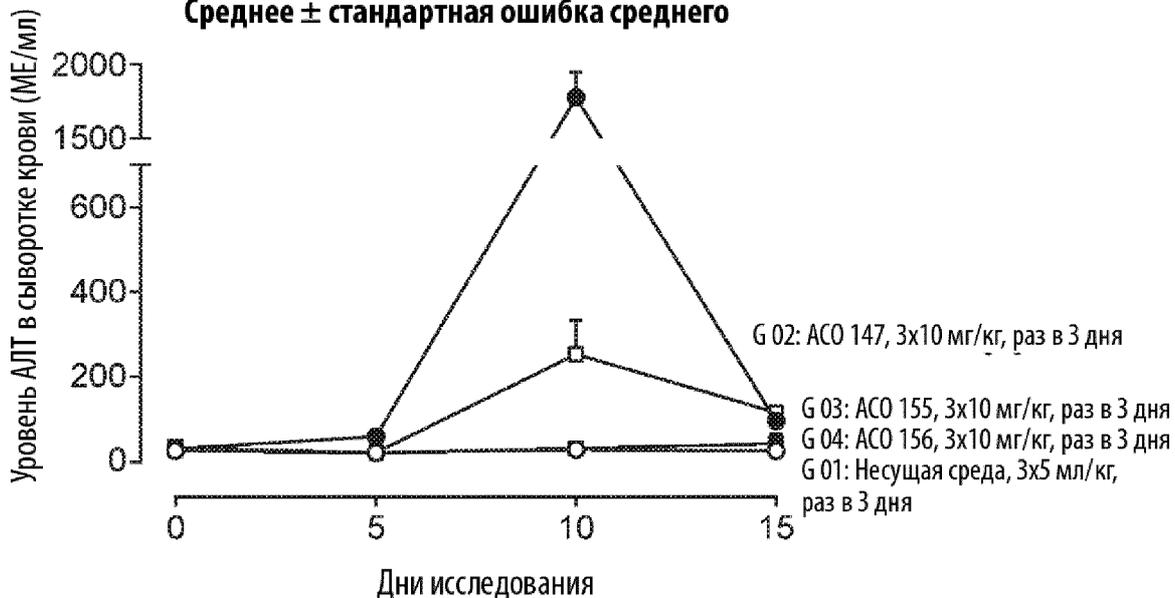
Фиг. 16В

**Изменение уровня поверхностного
антигена вируса гепатита В**
Среднее \pm стандартная ошибка среднего

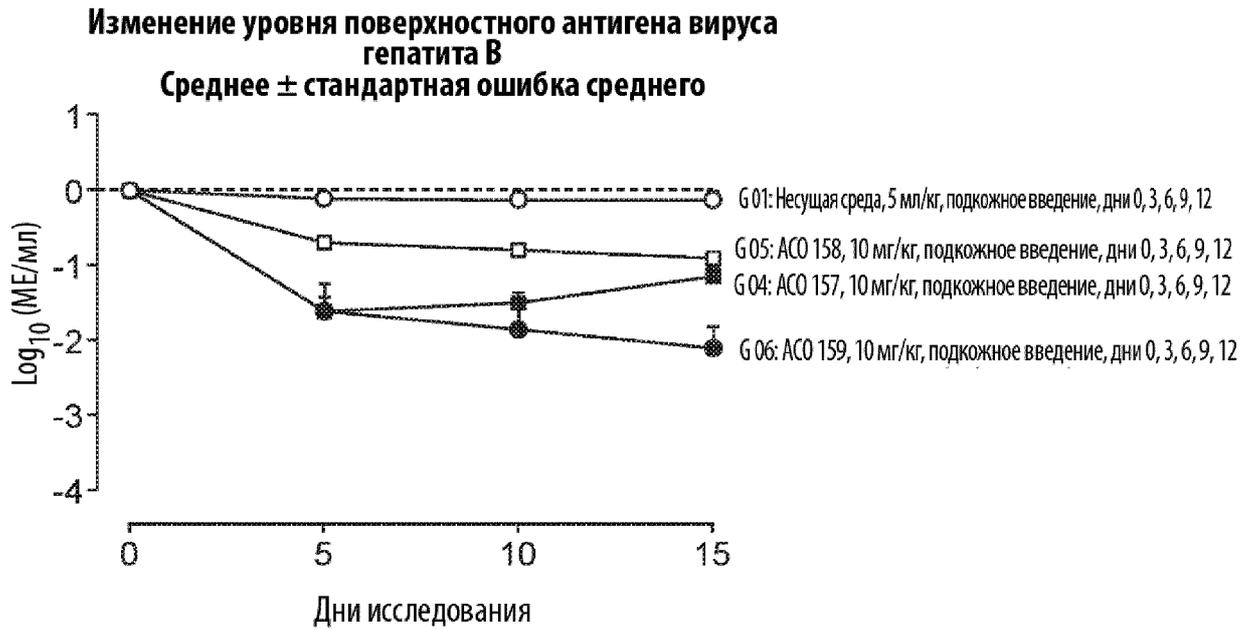


Фиг. 17А

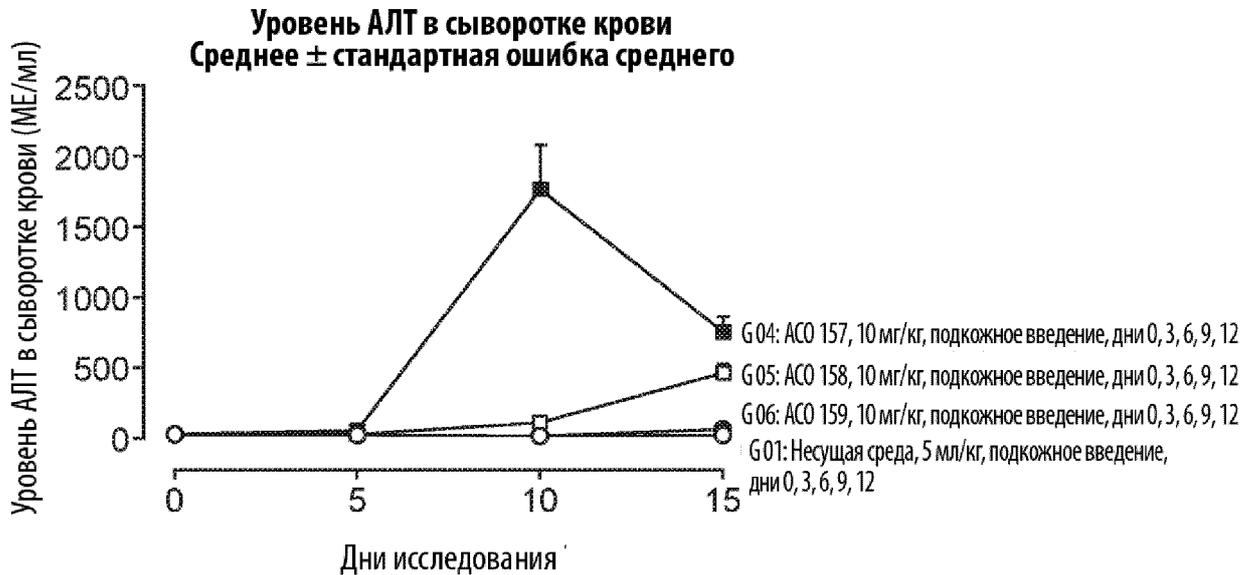
Уровень АЛТ в сыворотке крови
Среднее \pm стандартная ошибка среднего



Фиг. 17В



Фиг. 18А



Фиг. 18В