

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044937**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.13**

(51) Int. Cl. **C07H 21/02** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201990427**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.08.04**

---

(54) **АГЕНТЫ РНКи ПРОТИВ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В**

---

(31) **62/370,754; 62/534,733; 62/540,639**

(56) **US-A1-20030206887**  
**US-A1-2013150433**

(32) **2016.08.04; 2017.07.20; 2017.08.03**

(33) **US**

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/US2017/045446**

(87) **WO 2018/027106 2018.02.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭРРОУХЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛС,**  
**ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Ли Чжэнь, Чжу Жуй, Вудделл**  
**Кристин И., Гивен Брюс Д., Пэй Тао,**  
**Луис Дэвид Л., Алмеда Лорен Дж.,**  
**Розема Дэвид Б., Уэйкфилд Даррен Х.**  
**(US)**

(74) Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,**  
**Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов**  
**А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,**  
**Соколов Р.А. (RU)**

---

(57) В изобретении описаны композиции и способы ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В. Описаны агенты РНК-интерференции (РНКи) для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В. Агенты РНКи против ВГВ, описанные в настоящем документе, могут быть нацелены на клетки, такие как гепатоциты, например, с использованием конъюгированных нацеливающих лигандов. Также описаны фармацевтические композиции, содержащие один или более агентов РНКи против ВГВ и необязательно одно или более дополнительных терапевтических средств. Доставка описанных агентов РНКи против ВГВ в инфицированную печень *in vivo* обеспечивает ингибирование экспрессии гена ВГВ и лечение заболеваний и состояний, связанных с инфекцией ВГВ.

---

**044937**  
**B1**

**044937**  
**B1**

### **Перекрестные ссылки на смежные заявки**

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/540639, поданной 3 августа 2017 г., предварительной заявке на патент США № 62/534733, поданной 20 июля 2017 г., и предварительной заявке на патент США № 62/370754, поданной 4 августа 2016 г., причем описания каждой из заявок полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

### **Область применения изобретения**

В настоящем документе описаны агенты РНК-интерференции (РНКи), предназначенные для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В, композиции, которые включают агенты РНКи против ВГВ, и способы их применения.

### **Предпосылки создания изобретения**

Вирус гепатита В (ВГВ) представляет собой исключительно гепатотропный вирус, содержащий двухцепочечную ДНК. Несмотря на то что ДНК является генетическим материалом, цикл репликации включает стадию обратной транскрипции для копирования прегеномной РНК в ДНК. Вирус гепатита В классифицируется как один из представителей гепаднавирусов и относится к семейству *Hepadnaviridae*. Первичная инфекция вирусом гепатита В у взрослых людей вызывает острый гепатит с симптомами воспаления органов, лихорадки, желтухи и повышения печеночных трансаминаз в крови. У пациентов, которые не в состоянии справиться с вирусной инфекцией, наблюдается хроническое прогрессирование заболевания в течение многих лет, а также повышается риск развития цирроза или рака печени. Перинатальная передача от матерей, инфицированных вирусом гепатита В, новорожденным также приводит к хроническому гепатиту.

После захвата гепатоцитами нуклеокапсид переносится в ядро и высвобождается ДНК. В этом месте происходит синтез цепочки ДНК и восстановление гэпов с образованием ковалентно замкнутой кольцевой (кзк) сверхспирализованной ДНК размером 3,2 кб. кзкДНК предоставляет шаблон для транскрипции пяти основных вирусных мРНК, которые имеют длину 3,5, 3,5, 2,4, 2,1 и 0,7 кб. Все мРНК экпированы на 5'-конце и полиаденилированы на 3'-конце. На 3'-конце между всеми пятью мРНК имеется перекрытие последовательности.

Одна мРНК размером 3,5 кб выступает в качестве шаблона для продукции капсидного белка и полимеразы. Кроме того, один и тот же транскрипт служит в качестве промежуточного соединения для прегеномной репликации и позволяет вирусной полимеразе инициировать обратную транскрипцию в ДНК. Капсидный белок необходим для образования нуклеокапсида. Другая мРНК размером 3,5 кб кодирует пресердцевинную часть, т.е. секретируемый е-антиген (НВеАг). При отсутствии ингибиторов репликации большое количество е-антигена в крови коррелирует с репликацией вируса гепатита В в печени и служит важным диагностическим маркером для контроля прогрессирования заболевания.

мРНК размером 2,4 и 2,1 кб содержат открытые рамки считывания (ORF) pre-S1, pre-S2 и S для экспрессии большого, среднего и малого поверхностного антигена вируса. S-антиген связан с инфекционными полноценными частицами. Кроме того, кровь инфицированных пациентов также содержит неинфекционные частицы, образованные только из s-антигена, и свободные от геномной ДНК или полимеразы. Функция этих частиц не в полной мере понятна. Полное и долговременное исчезновение обнаруживаемого s-антигена из крови считается надежным показателем удаления вируса гепатита В.

мРНК размером 0,7 кб кодирует белок Х. Этот генный продукт важен для эффективной транскрипции вирусных генов, а также выступает в качестве трансактиватора экспрессии гена хозяина. Последний вид активности, по-видимому, имеет значение для трансформации гепатоцитов в процессе развития рака печени.

Пациенты с обнаруживаемым s-антигеном, е-антигеном и/или вирусной ДНК в крови в течение более 6 месяцев считаются хронически инфицированными. Аналоги нуклеозидов в качестве ингибиторов активности обратной транскриптазы, как правило, являются препаратами первого выбора для лечения многих пациентов. Показано, что введение ламивудина, тенофовира и/или энтекавира подавляет репликацию вируса гепатита В, иногда до необнаруживаемых концентраций, при этом наиболее важными преимуществами считаются улучшение функции печени и ослабление воспаления печени. Однако только немногие пациенты достигают полной и устойчивой ремиссии после окончания лечения. Более того, при увеличении продолжительности лечения у вируса гепатита В развивается резистентность к лекарственным средствам. Это в особенности касается пациентов, инфицированных одновременно вирусом гепатита В и вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Оба вируса восприимчивы к аналогам нуклеозидов и у них обоих может совместно развиваться резистентность.

Второй способ лечения представляет собой введение интерферона-альфа. В этом случае пациенты получают высокие дозы интерферона-альфа в течение 6 месяцев. Азиатский генотип В демонстрирует очень низкие частоты ответа на лечение. Показано, что одновременное инфицирование вирусом гепатита D (ВГD) или вирусом иммунодефицита человека делает терапию интерфероном-альфа совершенно неэффективной. Пациенты с выраженным поражением печени и тяжелыми фиброзными заболеваниями не подходят для терапии интерфероном альфа.

Ранее было показано, что некоторые агенты РНК-интерференции (РНКи), специфичные к вирусу гепатита В, ингибируют экспрессию гена ВГВ. Например, в публикации заявки на патент США №

2013/0005793 (авторы Chin et al.), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки, описаны определенные молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В.

#### Краткое изложение

Существует потребность в новых агентах РНК-интерференции (РНКи), специфичных к вирусу гепатита В (ВГВ) (в настоящем документе также называемых агент РНКи, триггер РНКи или триггер), которые способны селективно и эффективно ингибировать экспрессию гена вируса гепатита В (ВГВ). Кроме того, существует потребность в комбинациях новых ВГВ-специфичных агентов РНКи для лечения инфекции ВГВ и предотвращения заболеваний, ассоциированных с ВГВ.

В настоящем документе описаны специфичные к гену ВГВ агенты РНКи, способные селективно и эффективно снижать экспрессию гена ВГВ. Описанные агенты РНКи против ВГВ можно использовать в способах терапевтического лечения и/или предотвращения симптомов и заболеваний, связанных с инфекцией ВГВ, включая, без ограничений, хронические заболевания/расстройства печени, воспалительные заболевания, фиброзные заболевания, пролиферативные расстройства (включая раковые заболевания, такие как гепатоцеллюлярная карцинома), инфекция вируса гепатита D (ВГD) и острая инфекция ВГВ. В некоторых вариантах осуществления агенты РНКи против ВГВ можно использовать в способах терапевтического лечения и/или предотвращения симптомов и заболеваний, связанных с хронической инфекцией ВГВ и/или инфекцией ВГD. Такие способы включают введение одного или более агентов РНКи против ВГВ, описанных в настоящем документе, субъекту, например человеку или животному.

Кроме того, в настоящем документе описаны композиции, содержащие один или более из описанных агентов РНКи против ВГВ, которые способны селективно и эффективно снижать экспрессию гена ВГВ. Композиции, содержащие один или более агентов РНКи против ВГВ, можно вводить субъекту, такому как человек или животное, для лечения и/или предотвращения симптомов и заболеваний, связанных с инфекцией ВГВ.

Каждый описанный в настоящем документе агент РНКи против ВГВ включает в себя по меньшей мере кодирующую цепь и антисмысловую цепь. Кодирующая цепь и антисмысловая цепь могут быть частично, по существу или полностью комплементарными друг другу. Длина описанных в настоящем документе кодирующей и антисмысловой цепей агента РНКи может составлять от 16 до 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кодирующая и антисмысловая цепи независимо имеют длину от 17 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кодирующая и антисмысловая цепи независимо имеют длину от 19 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кодирующая и антисмысловая цепи независимо имеют длину от 21 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кодирующая и антисмысловая цепи независимо имеют длину от 21 до 24 нуклеотидов. Кодирующая и антисмысловая цепи могут иметь одинаковую длину или разные длины. Агенты РНКи против ВГВ, описанные в настоящем документе, выполнены с возможностью включения в свой состав последовательностей антисмысловой цепи, которые, по меньшей мере, частично комплементарны последовательности в геноме ВГВ, которая является консервативной у большинства известных серотипов ВГВ. Агенты РНКи, описанные в настоящем документе, при доставке в клетку, экспрессирующую ВГВ, ингибируют экспрессию одного или более генов ВГВ *in vivo* или *in vitro*.

Агент РНКи против ВГВ включает в себя кодирующую цепь (также называемую сопровождающей цепью), которая включает в себя первую последовательность, и антисмысловую цепь (также называемую направляющей цепью), которая включает в себя вторую последовательность. Кодирующая цепь агентов РНКи против ВГВ, описанных в настоящем документе, включает в себя сердцевинный фрагмент, на по меньшей мере около 85% идентичный нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов, в мРНК ВГВ. В некоторых вариантах осуществления длина сердцевинного нуклеотидного фрагмента кодирующей цепи, на по меньшей мере около 85% идентичного последовательности в мРНК ВГВ, составляет 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида. Антисмысловая цепь агента РНКи против ВГВ содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере около 85% комплементарную в пределах сердцевинного фрагмента из по меньшей мере 16 смежных нуклеотидов последовательности в мРНК ВГВ и соответствующей кодирующей цепи. В некоторых вариантах осуществления длина сердцевинной нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи на по меньшей мере около 8% комплементарной последовательности в мРНК ВГВ или соответствующей кодирующей цепи, составляет 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида.

Примеры кодирующих цепей и антисмысловых цепей агентов РНКи против ВГВ, которые можно использовать в агентах РНКи против ВГВ, представлены в табл. 3 и 4. Примеры дуплексов агента РНКи против ВГВ представлены в табл. 5. Примеры 19-нуклеотидных последовательностей сердцевинного фрагмента, которые состоят или включены в кодирующие цепи и антисмысловые цепи агентов РНКи против ВГВ, описанных в настоящем документе, представлены в табл. 2.

В некоторых вариантах осуществления один или более агентов РНКи против ВГВ доставляются в клетки-мишени или ткани-мишени с применением любой технологии доставки олигонуклеотидов, известной в данной области. Способы доставки нуклеиновых кислот включают, без ограничений, инкапсулирование в липосомах, ионофорез или встраивание в другие несущие среды, такие как гидрогели, цик-

лодекстрины, биоразлагаемые нанокапсулы и биоадгезивные микросферы, белковые векторы или динамические поликонъюгаты (DPC) (см., например, публикации WO 2000/053722, WO 2008/0022309, WO 2011/104169 и WO 2012/083185, каждая из которых включена в настоящий документ путем ссылки). В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ доставляется в клетки-мишени или ткани-мишени путем ковалентного связывания агента РНКи с нацеливающей группой. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа может включать в себя лиганд клеточного рецептора, такой как лиганд асиалогликопротеинового рецептора (ASGPr). В некоторых вариантах осуществления лиганд ASGPr включает в себя или состоит из кластера производных галактозы. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы включает в себя N-ацетилгалактозаминовый тример или N-ацетилгалактозаминовый тетрамер. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы представляет собой N-ацетилгалактозаминовый тример или N-ацетилгалактозаминовый тетрамер.

Нацеливающую группу можно связать с 3'- или 5'-концом кодирующей цепи или антисмысловой цепи агента РНКи против ВГВ. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа связана с 3'- или 5'-концом кодирующей цепи. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа связана с агентом РНКи посредством линкера.

Нацеливающую группу (с линкером или без него) можно связать с 5'- или 3'-концом любой из кодирующих и/или антисмысловых цепей, описанных в табл. 2, 3 и 4. Линкер (с нацеливающей группой или без нее) можно присоединить к 5'- или 3'-концу любой из кодирующих и/или антисмысловых цепей, описанных в табл. 2, 3 и 4.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, предложены композиции, которые включают в себя один или более агентов РНКи против ВГВ, имеющих дуплексные последовательности, описанные в табл. 5.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, предложены композиции, которые включают в себя комбинацию или коктейль из по меньшей мере двух агентов РНКи против ВГВ, имеющих различные нуклеотидные последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждый из двух или более различных агентов РНКи против ВГВ отдельно и независимо связан с нацеливающими группами. В некоторых вариантах осуществления каждый из двух или более различных агентов РНКи против ВГВ связан с нацеливающими группами, состоящими из N-ацетил-галактозаминов. В некоторых вариантах осуществления, в которых в композицию включены два или более агентов РНКи, каждый из агентов РНКи связан с одной и той же нацеливающей группой. В некоторых вариантах осуществления, в которых в композицию включены два или более агентов РНКи, каждый из агентов РНКи связан с различными нацеливающими группами, например нацеливающими группами, имеющими различные химические структуры.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающие группы связаны с агентами РНКи против ВГВ без использования дополнительного линкера. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа выполнена с возможностью наличия легкодоступного линкера для облегчения связывания с агентом РНКи против ВГВ. В некоторых вариантах осуществления, в которых в композицию включены два или более агентов РНКи, данные два или более агентов РНКи могут быть связаны с нацеливающими группами с помощью одинаковых линкеров. В некоторых вариантах осуществления, в которых в композицию включены два или более агентов РНКи, данные два или более агентов РНКи связаны с нацеливающими группами с помощью различных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, предложены композиции, которые включают в себя комбинацию по меньшей мере двух агентов РНКи против ВГВ, имеющих различные последовательности, причем каждый агент РНКи против ВГВ нацелен на другой участок или другую область гена ВГВ. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, предложены композиции, которые включают в себя комбинацию по меньшей мере двух агентов РНКи против ВГВ, причем каждый агент РНКи против ВГВ выполнен с возможностью нацеливания на другой транскрипт ВГВ (например, композиция, которая включает в себя два агента РНКи против ВГВ, причем первый агент РНКи против ВГВ включает в себя антисмысловую цепь, которая по меньшей мере частично комплементарна нуклеотидной последовательности, расположенной в ORF S гена ВГВ, а второй агент РНКи против ВГВ включает в себя антисмысловую цепь, которая, по меньшей мере, частично комплементарна нуклеотидной последовательности, расположенной в ORF X гена ВГВ). В настоящем документе агент РНКи, который включает в себя антисмысловую цепь, по меньшей мере, частично комплементарную нуклеотидной последовательности, расположенной в ORF S, нацелен на часть генома ВГВ SEQ ID NO: 1 между положениями 1-1307 и 3185-3221. В настоящем документе агент РНКи, который включает в себя антисмысловую цепь, по меньшей мере, частично комплементарную нуклеотидной последовательности, расположенной в ORF X, нацелен на часть генома ВГВ SEQ ID NO: 1 между положениями 1308-1930.

Известно, что мРНК ВГВ является полицистронной, что приводит к трансляции множества полипептидов, и в этой последовательности РНК перекрываются отдельные мРНК, поэтому одиночный агент РНКи, нацеленный на ген ВГВ, может приводить к ингибированию большинства или всех транскриптов

ВГВ. Тем не менее, хотя и не желая ограничиваться какой-либо теорией, предположили, что композиция, которая включает в себя два или более агентов РНК против ВГВ, нацеленных на различные участки или области гена ВГВ (и, в частности, два или более агентов РНК против ВГВ, из которых один агент РНК против ВГВ нацелен на ORF S, а второй агент РНК против ВГВ нацелен на ORF X), может давать дополнительные преимущества по сравнению с композицией, которая включает в себя только один агент РНК против ВГВ, такие как (а) обеспечение нацеливания на все вирусные транскрипты ВГВ (т.е. прегеномную РНК размером 3,5 кб; пресердцевинную мРНК размером 3,5 кб; мРНК pre-S1 размером 2,4 кб; мРНК pre-S2/S размером 2,1 кб; мРНК X размером 0,7 кб; а также любые экспрессирующие S-антиген мРНК, полученные из интегрированной ДНК ВГВ); (б) способствование расширению охвата генотипов с целью потенциального воздействия на более крупную популяцию пациентов; и/или (с) потенциальное снижение резистентности вируса вследствие мутаций в сайте связывания мРНК.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, предложены композиции, которые включают комбинацию одного агента РНК против ВГВ, который нацелен на ORF S РНК ВГВ (т.е. имеет антисмысловую цепь, которая нацелена на транскрипты S (S, pre-S1 и pre-S2), прегеномную РНК (сердцевина и полимеразы) и пресердцевинные транскрипты (HBeAg) генома ВГВ) и один агент РНК против ВГВ, который нацелен на ORF X РНК ВГВ (т.е. имеет антисмысловую цепь, которая нацелена на транскрипт X генома ВГВ, транскрипты S (S, pre-S1 и pre-S2), прегеномную РНК (сердцевина и полимеразы) и пресердцевинные транскрипты (HBeAg) генома ВГВ). В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе композиции включают по меньшей мере один агент РНК против ВГВ, который содержит последовательность, нацеленную на ORF S гена ВГВ, и второй агент РНК против ВГВ, который содержит последовательность, нацеленную на ORF X гена ВГВ.

В настоящем документе описаны способы ингибирования экспрессии гена ВГВ, включающие введение одного или более агентов РНК против ВГВ, имеющих антисмысловую цепь, содержащую любую из последовательностей, приведенных в табл. 3.

В настоящем документе описаны способы ингибирования экспрессии гена ВГВ, включающие введение одного или более агентов РНК против ВГВ, имеющих кодирующую цепь, содержащую любую из последовательностей, приведенных в табл. 4.

В настоящем документе описаны способы ингибирования экспрессии гена ВГВ, включающие введение одного или более агентов РНК против ВГВ, имеющих антисмысловую цепь, содержащую любую из последовательностей, приведенных в табл. 3, и кодирующую цепь, содержащую любую из последовательностей, приведенных в табл. 4, которая, по меньшей мере, частично комплементарна антисмысловой цепи.

В настоящем документе описаны способы ингибирования экспрессии гена ВГВ, включающие введение одного или более агентов РНК против ВГВ, имеющих антисмысловую цепь, которая состоит из любой из последовательностей, приведенных в табл. 3, и кодирующую цепь, которая состоит из любой из последовательностей, приведенных в табл. 4, которая, по меньшей мере, частично комплементарна антисмысловой цепи.

В настоящем документе описаны способы ингибирования экспрессии гена ВГВ в клетке, включающие введение одного или более агентов РНК против ВГВ, имеющих дуплексную структуру, приведенную в табл. 5.

В настоящем документе описаны способы лечения инфекции ВГВ или предотвращения заболевания или симптомов, вызванных инфекцией ВГВ, включающие введение одного или более агентов РНК против ВГВ, имеющих антисмысловую цепь, содержащую любую из последовательностей, приведенных в табл. 3.

В настоящем документе описаны способы лечения инфекции ВГВ или предотвращения заболевания или симптомов, вызванных инфекцией ВГВ, включающие введение одного или более агентов РНК против ВГВ, имеющих кодирующую цепь, содержащую любую из последовательностей, приведенных в табл. 4.

В настоящем документе описаны способы лечения инфекции ВГВ или предотвращения заболевания или симптомов, вызванных инфекцией ВГВ, включающие введение одного или более агентов РНК против ВГВ, имеющих антисмысловую цепь, содержащую любую из последовательностей, приведенных в табл. 3, и кодирующую цепь, содержащую любую из последовательностей, приведенных в табл. 4, которая, по меньшей мере, частично комплементарна антисмысловой цепи.

В настоящем документе описаны способы лечения инфекции ВГВ или предотвращения заболевания или симптомов, вызванных инфекцией ВГВ, включающие введение одного или более агентов РНК против ВГВ, имеющих антисмысловую цепь, которая состоит из любой из последовательностей, приведенных в табл. 3, и кодирующую цепь, которая состоит из любой из последовательностей, приведенных в табл. 4, которая, по меньшей мере, частично комплементарна антисмысловой цепи.

В настоящем документе описаны способы лечения инфекции ВГВ или предотвращения заболевания или симптомов, вызванных инфекцией ВГВ, включающие введение одного или более агентов РНК против ВГВ, имеющих дуплексную структуру, приведенную в табл. 5.

В настоящем документе описаны способы ингибирования экспрессии гена ВГВ, включающие ве-











(SEQ ID NO: 178); или

р) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') AGAAAAUUGAGAGAAGUCCACUU (SEQ ID NO: 179); или

q) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') AGAAAAUUGAGAGAAGUCCACC (SEQ ID NO: 180); или

г) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UGAAAAUUGAGAGAAGUCCAC (SEQ ID NO: 181); или

s) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') ACCAAUUUAUGCCUACAGCUU (SEQ ID NO: 182); или

t) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') ACCAAUUUAUGCCUACAGCCUU (SEQ ID NO: 183); или

u) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') ACCAAUUUAUGCCUACAGCCUC (SEQ ID NO: 184); или

v) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UCCAAUUUAUGCCUACAGCUU (SEQ ID NO: 185); или

w) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UCCAAUUUAUGCCUACAGCCUU (SEQ ID NO: 186); или

x) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGCU (SEQ ID NO: 187); или

y) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGCG (SEQ ID NO: 188); или

z) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') AACCAAUUUAUGCCUACAGCC (SEQ ID NO: 189); или

aa) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') ACCAAUUUAUGCCUACAGCCU (SEQ ID NO: 190); или

bb) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UCCAAUUUAUGCCUACAGCCU (SEQ ID NO: 191); или

cc) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') ACCAAUUUAUGCCUACAGCCG (SEQ ID NO: 192); или

dd) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UCCAAUUUAUGCCUACAGCCG (SEQ ID NO: 193); или

ee) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGGG (SEQ ID NO: 194);

и при этом агент РНКи против ВГВ дополнительно содержит кодирующую цепь, по меньшей мере частично комплементарную соответствующей антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, содержит:

а) антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности, отличающейся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGGCCUU (SEQ ID NO: 149); или

б) антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности, отличающейся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGGCCU (SEQ ID NO: 150); или

с) антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности, отличающейся на 0,



0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UCCAAUUUAUGCCUACAGCCUU (SEQ ID NO: 186); или

х) антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности, отличающейся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGCU (SEQ ID NO: 187); или

у) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGCG (SEQ ID NO: 188); или

з) антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности, отличающейся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') AACCAAUUUAUGCCUACAGCC (SEQ ID NO: 189); или

аа) антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности, отличающейся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') ACCAAUUUAUGCCUACAGCCU (SEQ ID NO: 190); или

bb) антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности, отличающейся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UCCAAUUUAUGCCUACAGCCU (SEQ ID NO: 191); или

ее) антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности, отличающейся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') ACCAAUUUAUGCCUACAGCCG (SEQ ID NO: 192); или

dd) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UCCAAUUUAUGCCUACAGCCG (SEQ ID NO: 193); или.

Ee) антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности, отличающейся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGGG (SEQ ID NO: 194);

и при этом агент РНКи против ВГВ дополнительно содержит кодирующую цепь, по меньшей мере частично комплементарную соответствующей антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, содержит:

i) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfcsusuAu (SEQ ID NO: 61); или

ii) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfcsusu (SEQ ID NO: 62); или

iii) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfcsusu (SEQ ID NO: 63); или

iv) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfsc (SEQ ID NO: 64); или

v) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu (SEQ ID NO: 68); или

vi) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfscscaauUfuAfuGfcCfuacagcsc (SEQ ID NO: 85); или

vii) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfsusugagAfgAfaGfuCfcaccacsg (SEQ ID NO: 94); или

viii) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfsusUfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfgsa (SEQ ID NO: 98); или

ix) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgcsc (SEQ ID NO: 102); или

x) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgcusu (SEQ ID NO: 103); или

xi) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccsu (SEQ ID NO: 104); или

xii) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccusu (SEQ ID NO: 105); или

xiii) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') cPrpusAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu (SEQ ID NO: 107); или



xl) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcCfsu (SEQ ID NO: 145); или  
 xli) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') asCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccsg (SEQ ID NO: 146); или  
 xlii) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccsg (SEQ ID NO: 147); или  
 xliii) антисмысловую цепь, которая содержит последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательности (5'→3') usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfggsg (SEQ ID NO: 148);  
 где a, g, с и u представляют собой 2'-О-метил(2'-ОМе)-модифицированные нуклеотиды; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды;

s представляет собой фосфоротиоатную межнуклеотидную связь, а остальные нуклеотидные мономеры связаны фосфодиэфирными связями; и

cPrpu представляет собой 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метил-модифицированный нуклеотид; и при этом агент РНКи против ВГВ дополнительно содержит кодирующую цепь, по меньшей мере, частично комплементарную соответствующей антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, содержит:

i) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfccsusuAu (SEQ ID NO: 61); или

ii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfccsu (SEQ ID NO: 62); или

iii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfccsu (SEQ ID NO: 63); или

iv) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfsc (SEQ ID NO: 64); или

v) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu (SEQ ID NO: 68); или

vi) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfscscaauUfuAfuGfcCfuacagcsc (SEQ ID NO: 85); или

vii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsusugagAfgAfaGfuCf-caccacsg (SEQ ID NO: 94); или

viii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsusUfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsga (SEQ ID NO: 98); или

ix) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfscsCfaA-fuuuauGfcCfuAfcAfgcsc (SEQ ID NO: 102); или

x) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfscsCfaA-fuuuauGfcCfuAfcAfgcusu (SEQ ID NO: 103); или

xi) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfscsCfaA-fuuuauGfcCfuAfcAfgccsu (SEQ ID NO: 104); или

xii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfscsCfaA-fuuuauGfcCfuAfcAfgccusu (SEQ ID NO: 105); или

xiii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') cPrpusAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu (SEQ ID NO: 107); или

xiv) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') cPrpusAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg (SEQ ID NO: 108); или

xv) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsusUfgAfgagaaGfuCf-cAfcCfausu (SEQ ID NO: 109); или

xvi) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsusUfgAfgagaaGfuCf-cAfcCfacsg (SEQ ID NO: 110); или

xvii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacusu (SEQ ID NO: 111); или

xviii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacsgsa (SEQ ID NO: 112); или

xix) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsusUfgAfgagaaGfuCf-cAfcCfacusu (SEQ ID NO: 120); или

xx) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') asGfsasAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcusu (SEQ ID NO: 125);

xxi) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') asGfsasAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcasc (SEQ ID NO: 126); или

xxii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') asGfsasAfaAfuUfgAfgAf-

gAfaGfuCfcacusu (SEQ ID NO: 127); или

xxiii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') asGfsasAfaAfuUfgAf-gAfgAfaGfuCfcasc (SEQ ID NO: 128); или

xxiv) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usGfsasAfaAfuUfgAf-gAfgAfaGfuCfcusu (SEQ ID NO: 129); или

xxv) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usGfsasAfaAfuUfgAfgAf-gAfaGfuCfcasc (SEQ ID NO: 130); или

xxvi) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') asCfscsAfaUfuU-faUfgCfcUfaCfaGfcusu (SEQ ID NO: 131); или

xxvii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') asCfscsAfaUfuU-faUfgCfcUfaCfaGfcusu (SEQ ID NO: 132); или

xxviii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') asCfscsAfaUfuU-faUfgCfcUfaCfaGfccusc (SEQ ID NO: 133); или

xxix) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usCfscsAfaUfuU-faUfgCfcUfaCfaGfcusu (SEQ ID NO: 134); или

xxx) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usCfscsAfaUfuU-faUfgCfcUfaCfaGfccusu (SEQ ID NO: 135); или

xxxi) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') cPrpusAfsCsCfaAfuUfuA-fuGfcCfuAfcAfgcsc (SEQ ID NO: 136); или

xxxii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsCsCfaAfuUfuA-fuGfcCfuAfcAfgcsc (SEQ ID NO: 137); или

xxxiii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') cPrpusAfsCsCfaA-fuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc (SEQ ID NO: 138); или

xxxiv) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsCsCfaAfuUfuA-fuGfcCfuAfcAfgcsu (SEQ ID NO: 139); или

xxxv) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsCsCfaAfuUfuA-fuGfcCfuAfcAfgcsg (SEQ ID NO: 140); или

xxxvi) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') asAfsCsCfaAfuUfuA-fuGfcCfuAfcAfgcsc (SEQ ID NO: 141); или

xxxvii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsCsCfaAfuUfuA-fuGfcCfuAfcAfgusu (SEQ ID NO: 142); или

xxxviii) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsCsCfaAfuUfuA-fuGfcCfuAfcAfgCfsc (SEQ ID NO: 143); или

xxxix) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') asCfscAfaUfuU-faUfgCfcUfaCfaGfcCfsu (SEQ ID NO: 144); или

xl) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usCfscAfaUfuUfaUfgCfcU-faCfaGfcCfsu (SEQ ID NO: 145); или

xli) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') asCfscAfaUfuUfaUfgCfcU-faCfaGfccsg (SEQ ID NO: 146); или

xlII) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usCfscAfaUfuU-faUfgCfcUfaCfaGfccsg (SEQ ID NO: 147); или

xlIII) антисмысловую цепь, которая состоит из последовательности (5'→3') usAfsCsCfaAfuUfuA-fuGfcCfuAfcAfggsg (SEQ ID NO: 148);

где a, g, c и u представляют собой 2'-O-метил(2'-Оме)-модифицированные нуклеотиды; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; s представляет собой фосфоротиоатную межнуклеотидную связь, а остальные нуклеотидные мономеры связаны фосфодиэфирными связями; и cPrpu представляет собой 5'-циклопропилфосфонат-2'-O-метил-модифицированный нуклеотид; и при этом агент РНКи против ВГВ дополнительно содержит кодирующую цепь, по меньшей мере частично комплементарную соответствующей антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, содержит:

а) кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UUGCCUGUAGGCAUAAAUUG-GUAUT (SEQ ID NO: 275); или

б) кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UAUAUGCCUGUAGGCAUAAAUUG-GUA (SEQ ID NO: 276); или

с) кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') CUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU (SEQ ID NO: 278); или





х) кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') AGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 327); или

у) кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') CGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 328); или

з) кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUU (SEQ ID NO: 329); или

аа) бессмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') AGGCUGUAGGCAUAAAUUGGU (SEQ ID NO: 330); или

bb) кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') AGGCUGUAGGCAUAAAUUGGA (SEQ ID NO: 331); или

cc) кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') CGGCUGUAGGCAUAAAUUGGU (SEQ ID NO: 332); или

dd) кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') CGGCUGUAGGCAUAAAUUGGA (SEQ ID NO: 333); или

ee) кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') CCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 334);

и при этом агент РНКи против ВГВ дополнительно содержит бессмысловую цепь, по меньшей мере частично комплементарную соответствующей бессмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, содержит:

а) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') UUGCCUGUAGGCAUAAAUUGGUAUT (SEQ ID NO: 275); или

б) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') UUAUAGCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 276); или

в) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') CUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU (SEQ ID NO: 278); или

д) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU (SEQ ID NO: 285); или

е) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') CGUGGUGGACUUCUCUCAAU (SEQ ID NO: 289); или

ф) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') CUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 292); или

г) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 294); или

h) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') UCGUGGUGGACUUCUCUCAAUU (SEQ ID NO: 300); или

и) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GUGGACUUCUCUCAAUUUUCU (SEQ ID NO: 302); или

ж) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GCUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU (SEQ ID NO: 303); или

к) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU (SEQ ID NO: 304); или

л) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') UGGUGGACUUCUCUCAAUUU (SEQ ID NO: 306); или

м) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GUGGUGGACUUCUCUCAAUUU (SEQ ID NO: 307); или

н) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') AAUGGUGGACUUCUCUCAAUUU (SEQ ID NO: 308); или

о) кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность (5'→3') GGACUUCUCUCAAUUUUCU (SEQ ID NO: 318); или

р) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GGUGGACUUCUCUCAAUUUUCU (SEQ ID NO: 319); или

q) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GGACUUCU-CUCAUUUUUCA (SEQ ID NO: 320); или

r) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GUGGACUU-CUCUCAUUUUUCA (SEQ ID NO: 321); или

s) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GCUGUAGG-CAUAAAUUGGU (SEQ ID NO: 322); или

t) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GGCUGUAGGCAUAAAUUGGU (SEQ ID NO: 323); или

u) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GAGG-CUGUAGGCAUAAAUUGGU (SEQ ID NO: 324); или

v) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GCUGUAGG-CAUAAAUUGGA (SEQ ID NO: 325); или

w) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GGCUGUAGGCAUAAAUUGGA (SEQ ID NO: 326); или

x) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') AG-CUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 327); или

y) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') CGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 328); или

z) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUU (SEQ ID NO: 329); или

aa) антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность (5'→3') AGG-CUGUAGGCAUAAAUUGGU (SEQ ID NO: 330); или

bb) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') AGG-CUGUAGGCAUAAAUUGGA (SEQ ID NO: 331); или

cc) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') CGGCUGUAGGCAUAAAUUGGU (SEQ ID NO: 332); или

dd) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') CGGCUGUAGGCAUAAAUUGGA (SEQ ID NO: 333); или

ee) кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') CCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 334);

и при этом агент РНКи против ВГВ дополнительно содержит антисмысловую цепь, по меньшей мере, частично комплементарную соответствующей антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции для ингибирования экспрессии гена ВГВ в клетке, содержащие два агента РНКи против ВГВ, причем первый агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UAUUGAGA-GAAGUCCACCACUU (SEQ ID NO: 175), и кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') GUGGUGGACUUCUCUCAUAUU (SEQ ID NO: 307); и при этом второй агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAUUUAUGCCUACAGUU (SEQ ID NO: 154), и кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') CUGUAGG-CAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 292).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции для ингибирования экспрессии гена ВГВ в клетке, содержащие два агента РНКи против ВГВ, причем первый агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU (SEQ ID NO: 175), и кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') GUGGUGGACUUCUCUCAUAUU (SEQ ID NO: 307); и при этом второй агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') UACCAUUUAUGCCUACAGUU (SEQ ID NO: 154), и кодирующую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности (5'→3') CUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 292).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции для ингибирования экспрессии гена ВГВ в клетке, содержащие два агента РНКи против ВГВ, причем первый агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') AGAAAAU-UGAGAGAAGUCCAC (SEQ ID NO: 171), и кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') GUGGACUUCUCUCAUUUUUCU (SEQ ID NO: 302); и при этом второй агент РНКи против ВГВ содер-





нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') GUGGUGGACUUCUCUCAAAUAAU (SEQ ID NO: 307); и при этом второй агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGUU (SEQ ID NO: 154), и кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') CUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 292), и при этом кодирующая цепь первого агента РНКи против ВГВ и второго агента РНКи против ВГВ конъюгированы с нацеливающим лигандом, представляющим собой N-ацетилгалактозамин.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции для ингибирования экспрессии гена ВГВ в клетке, содержащие два агента РНКи против ВГВ, причем все или по существу все нуклеотиды в кодирующей цепи являются модифицированными и/или все или по существу все нуклеотиды в антисмысловой цепи в первом и/или втором агенте РНКи против ВГВ представляют собой модифицированные нуклеотиды, и при этом первый агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') AGAAAAUUGAGAGAAGUCCAC (SEQ ID NO: 171), и кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') GUGGACUUCUCUCAAAUUUCU (SEQ ID NO: 302); и при этом второй агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGCG (SEQ ID NO: 188), и кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') CGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 328), и при этом кодирующая цепь первого агента РНКи против ВГВ и второго агента РНКи против ВГВ конъюгированы с нацеливающим лигандом, представляющим собой N-ацетилгалактозамин.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции для ингибирования экспрессии гена ВГВ в клетке, содержащие два агента РНКи против ВГВ, причем все или по существу все нуклеотиды в кодирующей цепи являются модифицированными и/или все или по существу все нуклеотиды в антисмысловой цепи в первом и/или втором агенте РНКи против ВГВ представляют собой модифицированные нуклеотиды, и при этом первый агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') AGAAAAUUGAGAGAAGUCCAC (SEQ ID NO: 171), и кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') GUGGACUUCUCUCAAAUUUCU (SEQ ID NO: 302); и при этом второй агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGCC (SEQ ID NO: 162), и кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA (SEQ ID NO: 294), и при этом кодирующая цепь первого агента РНКи против ВГВ и второго агента РНКи против ВГВ конъюгированы с нацеливающим лигандом, представляющим собой N-ацетилгалактозамин.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции для ингибирования экспрессии гена ВГВ в клетке, содержащие два агента РНКи против ВГВ, причем все или по существу все нуклеотиды в кодирующей цепи являются модифицированными и/или все или по существу все нуклеотиды в антисмысловой цепи в первом и/или втором агенте РНКи против ВГВ представляют собой модифицированные нуклеотиды, и при этом первый агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') AGAAAAUUGAGAGAAGUCCAC (SEQ ID NO: 171), и кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') GUGGACUUCUCUCAAAUUUCU (SEQ ID NO: 302); и при этом второй агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') UACCAAUUUAUGCCUACAGCC (SEQ ID NO: 162), и кодирующую цепь, которая содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных основания от последовательности (5'→3') GUGGUGGACUUCUCUCAAAUAAU (SEQ ID NO: 307), и при этом кодирующая цепь первого агента РНКи против ВГВ и второго агента РНКи против ВГВ конъюгированы с нацеливающим лигандом, представляющим собой N-ацетилгалактозамин.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения инфекции ВГВ или предотвращения заболевания или симптомов, вызванных инфекцией ВГВ, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества AD04872 и эффективного количества AD05070. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04872 и AD05070, вводимых нуждающемуся в этом субъекту, составляет около 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение



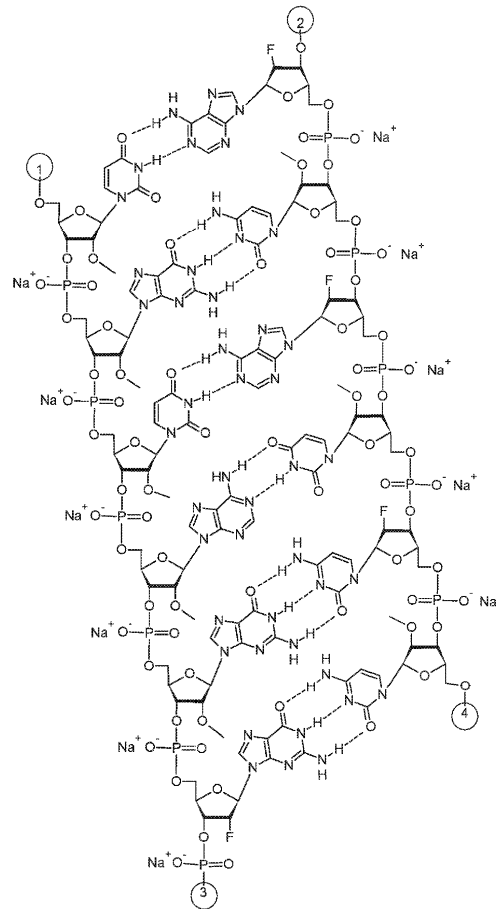
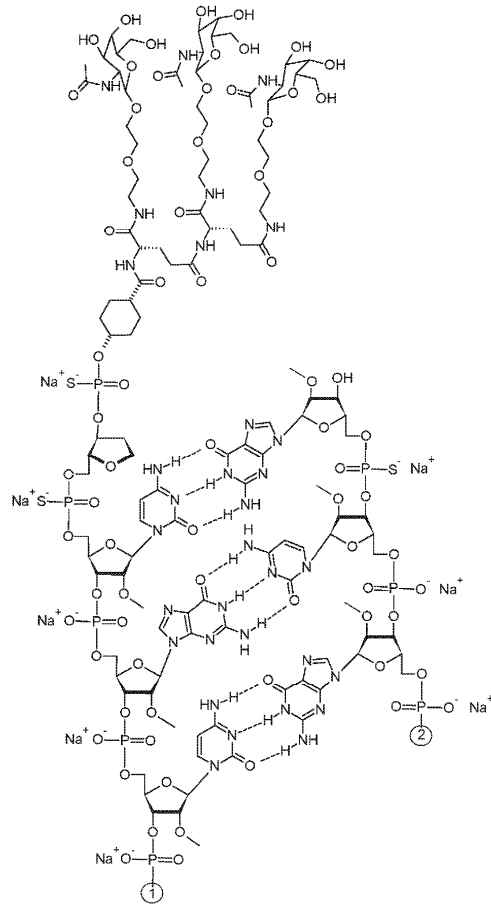
торых вариантах осуществления соотношение AD04872 и AD04982, вводимых нуждающемуся в этом субъекту, составляет 1:2.

В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят около 1 мг/кг (mpk) AD04872 и около 1 мг/кг AD04982. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят около 1,5 мг/кг AD04872 и около 1,5 мг/кг AD04982. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят около 2,0 мг/кг AD04872 и около 1,0 мг/кг AD04982. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят около 3,0 мг/кг AD04872 и около 1,0 мг/кг AD04982. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят около 3,2 мг/кг AD04872 и около 0,8 мг/кг AD04982. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят около 2,7 мг/кг AD04872 и около 1,3 мг/кг AD04982. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят около 4,0 мг/кг AD04872 и около 1,0 мг/кг AD04982. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят около 3,3 мг/кг AD04872 и около 1,7 мг/кг AD04982. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят от около 0,05 до около 5 мг/кг AD04872 и от около 0,05 до около 5 мг/кг AD04982. В некоторых вариантах осуществления соответствующие дозы AD04872 и AD04982 вводят отдельно (например, отдельными инъекциями). В некоторых вариантах осуществления соответствующие дозы AD04872 и AD04982 вводят вместе (например, одной инъекцией). В некоторых вариантах осуществления соответствующие дозы AD04872 и AD04982 получают в одной фармацевтической композиции.

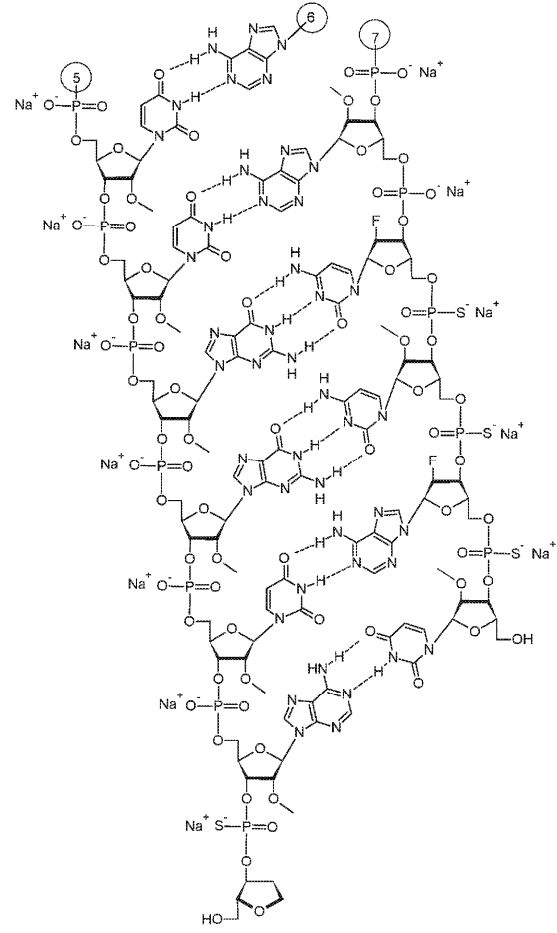
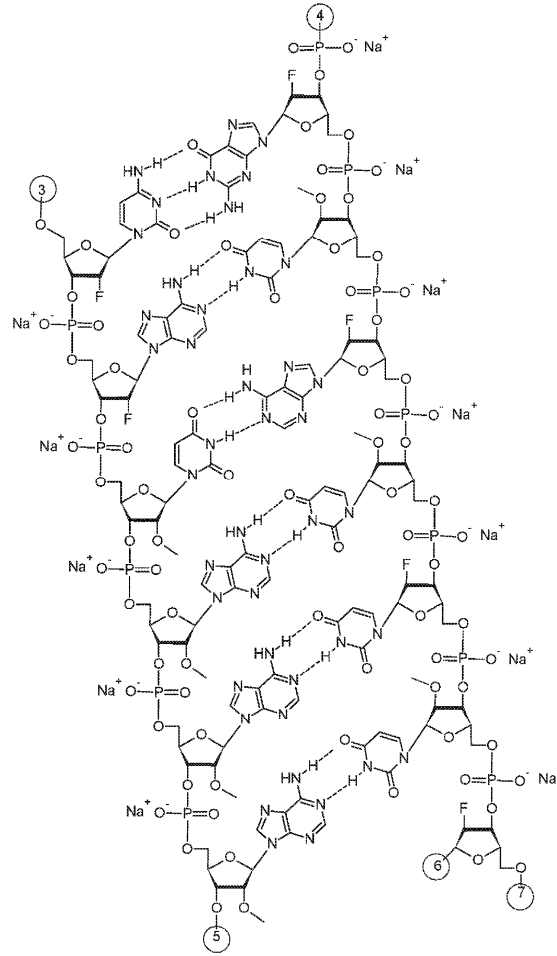
В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения инфекции ВГВ или предотвращения заболевания или симптомов, вызванных инфекцией ВГВ, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества AD04580 и эффективного количества AD04585. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04580 и AD04585, вводимых нуждающемуся в этом субъекту, составляет около 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04580 и AD04585, вводимых нуждающемуся в этом субъекту, составляет около 3:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04580 и AD04585, вводимых нуждающемуся в этом субъекту, составляет около 4:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04580 и AD04585, вводимых нуждающемуся в этом субъекту, составляет около 5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04580 и AD04585, вводимых нуждающемуся в этом субъекту, составляет около 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04580 и AD04585, вводимых нуждающемуся в этом субъекту, составляет около 1:2. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят около 1 мг/кг (mpk) AD04580 и около 1 мг/кг AD04585. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят около 1,5 мг/кг AD04580 и около 1,5 мг/кг AD04585. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят от около 0,05 до около 5 мг/кг AD04580 и от около 0,05 до около 5 мг/кг AD04585.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, состоит из или содержит соединение AD05070, связанное с (NAG37)s, показанным в виде натриевой соли, и имеет структуру, представленную ниже:

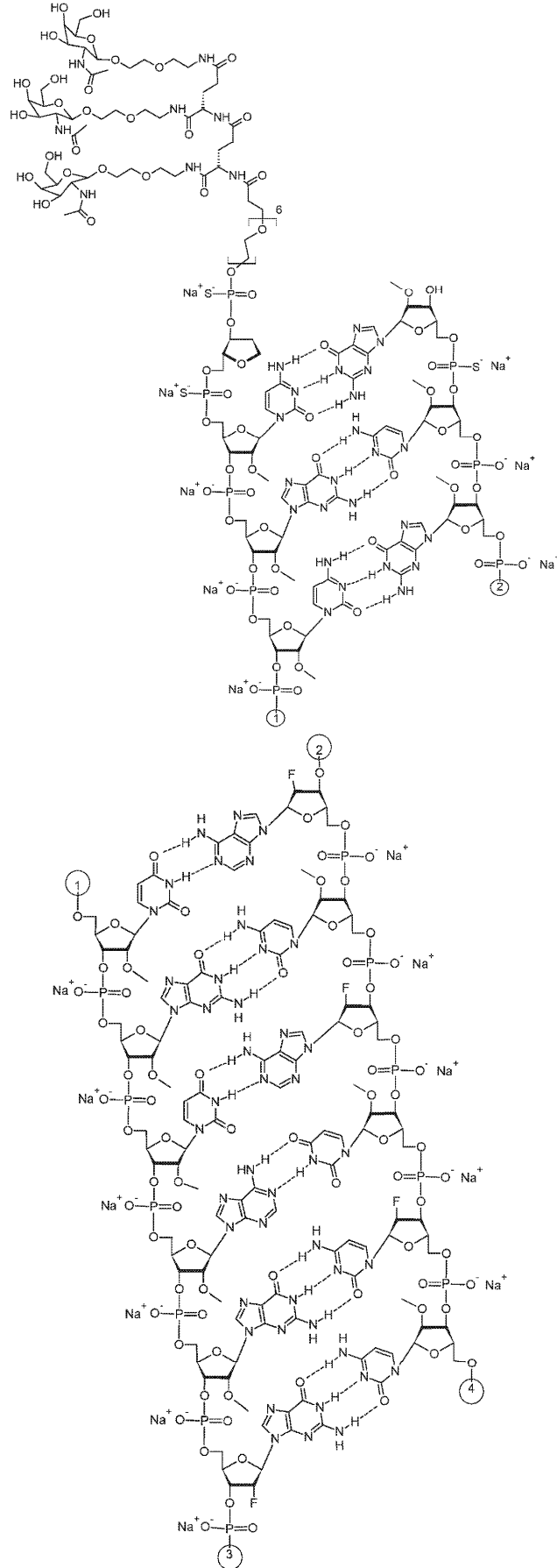
044937

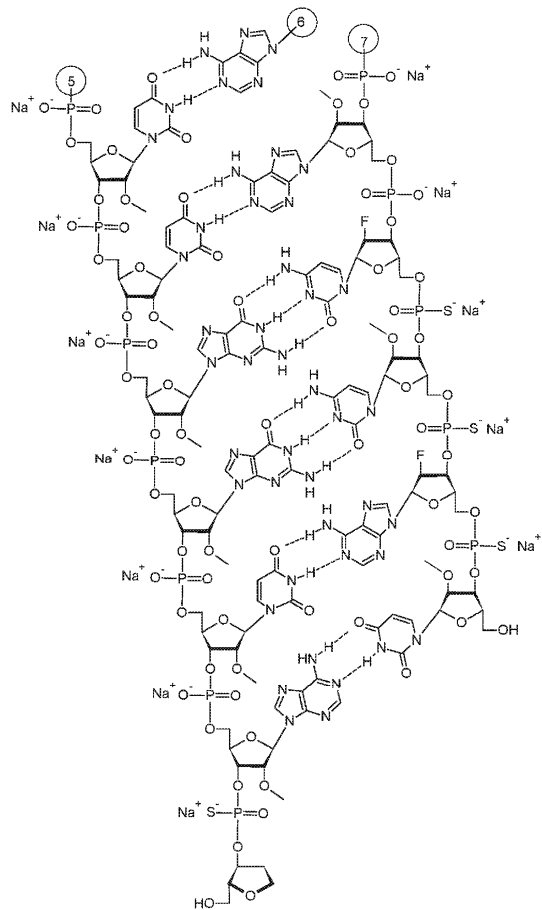
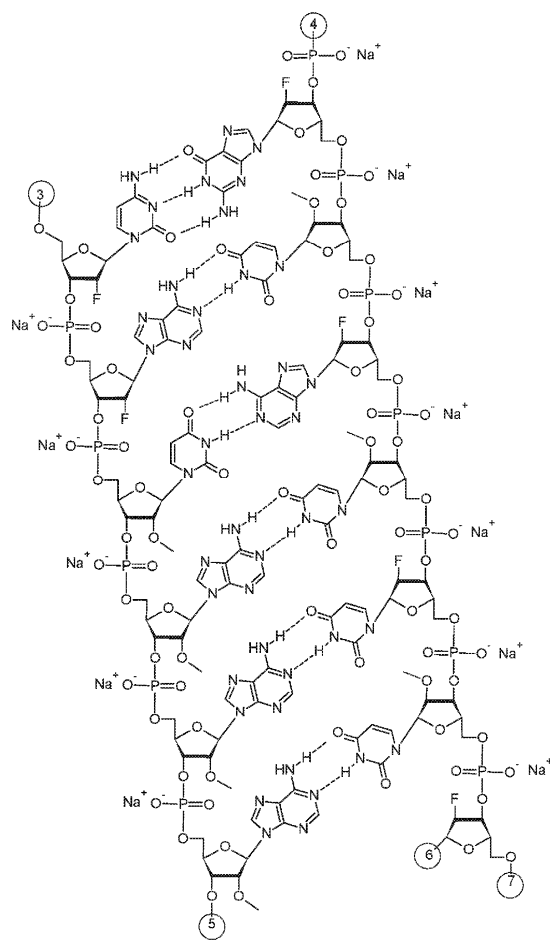






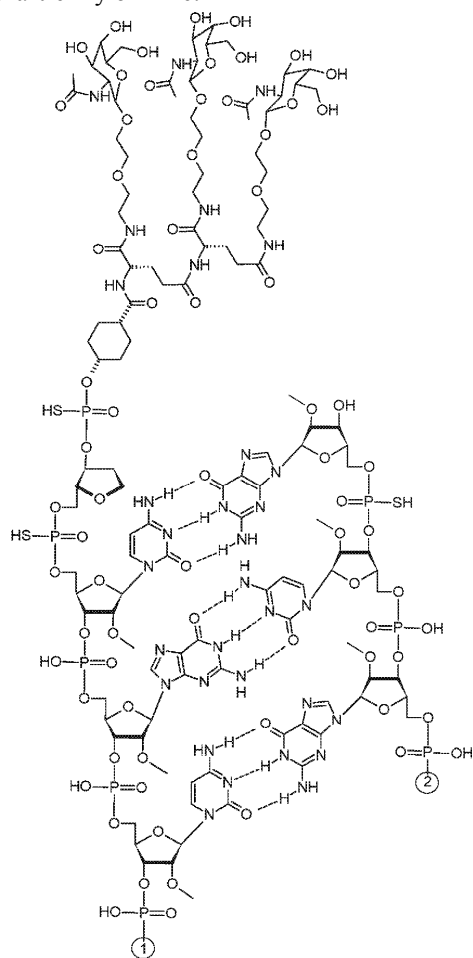
В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, состоит из или содержит соединение AD05070, связанное с (NAG25)<sub>s</sub>, показанным в виде натриевой соли, и имеет структуру, представленную ниже:

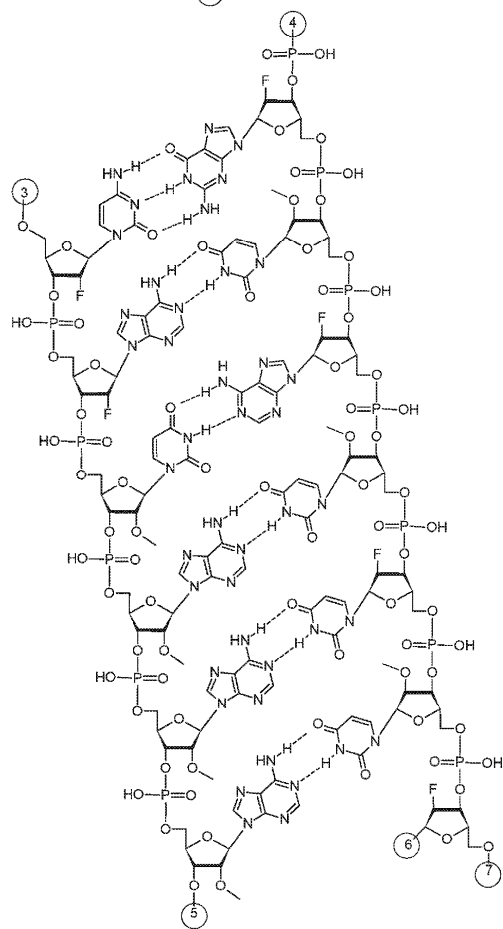
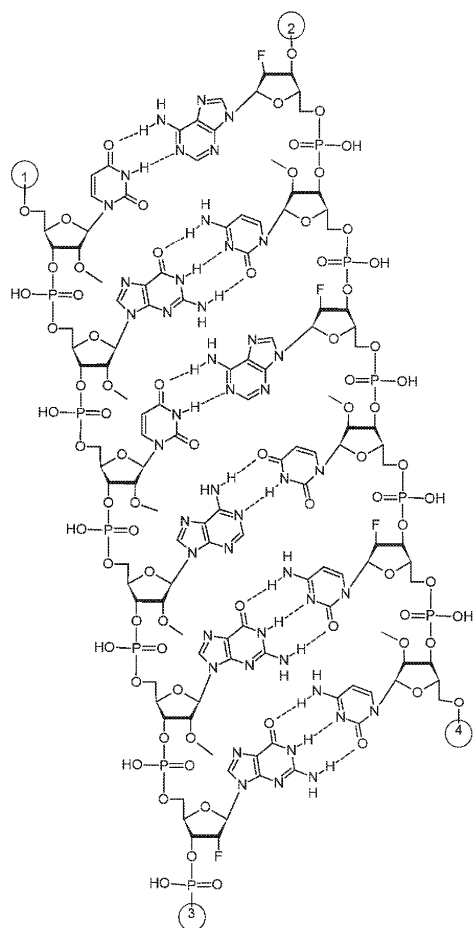


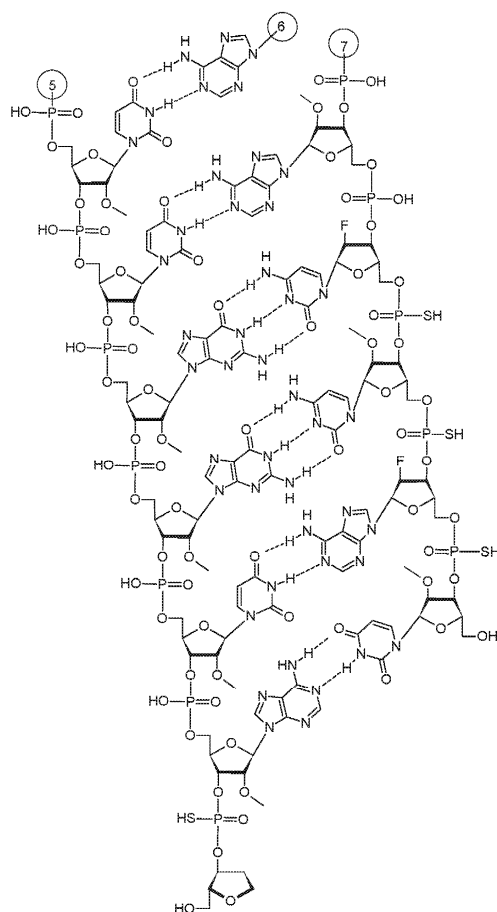


В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем докумен-

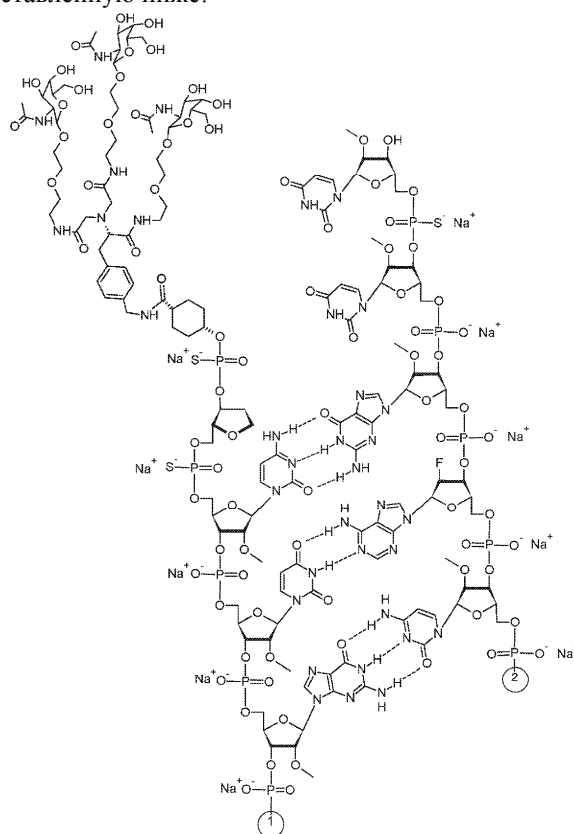
те, состоит из или содержит соединение AD05070, связанное с (NAG37)s, показанным в виде свободной кислоты, и имеет структуру, представленную ниже:

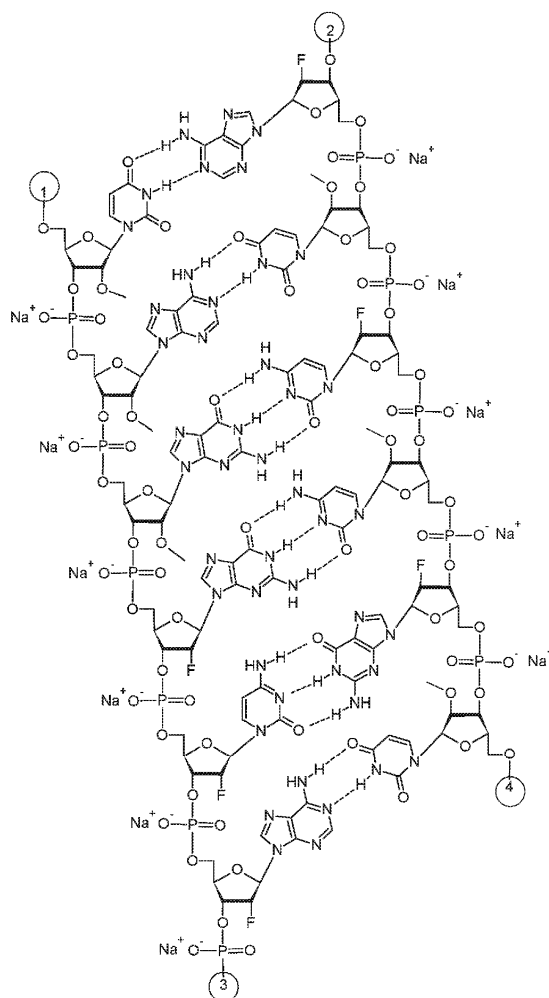


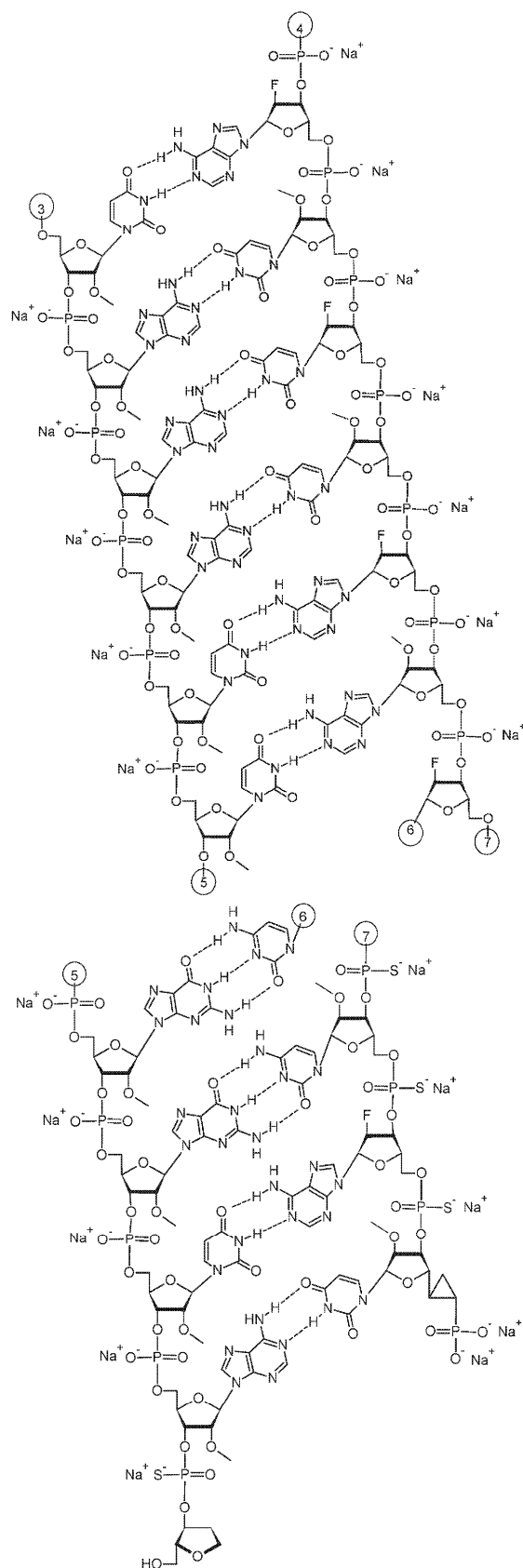




В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, состоит из или содержит соединение AD04580, связанное с (NAG31)<sub>s</sub>, показанным в виде натриевой соли, и имеет структуру, представленную ниже:

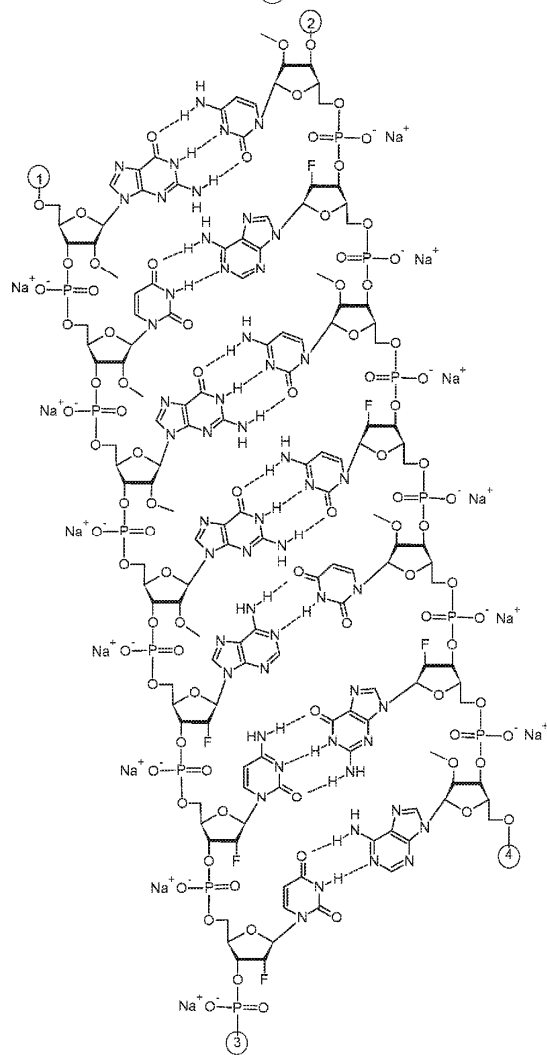
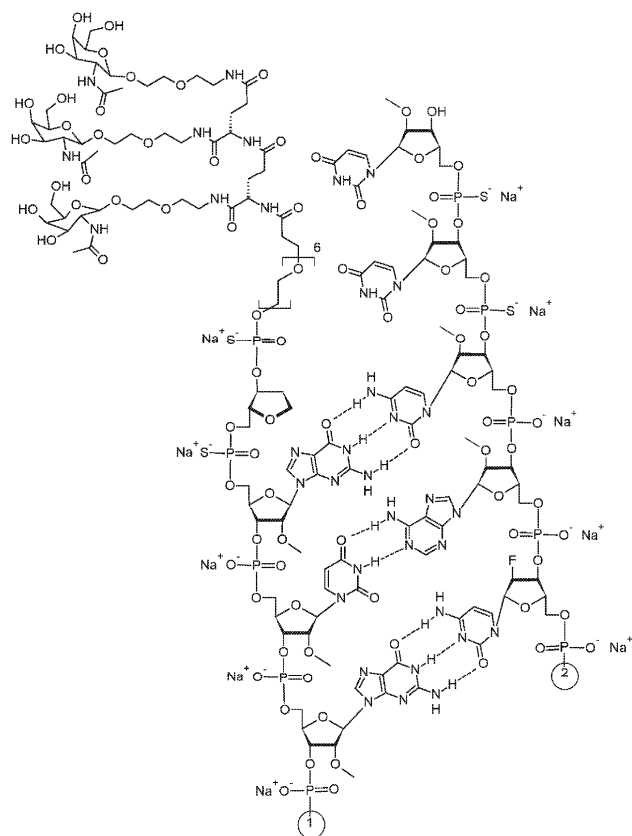


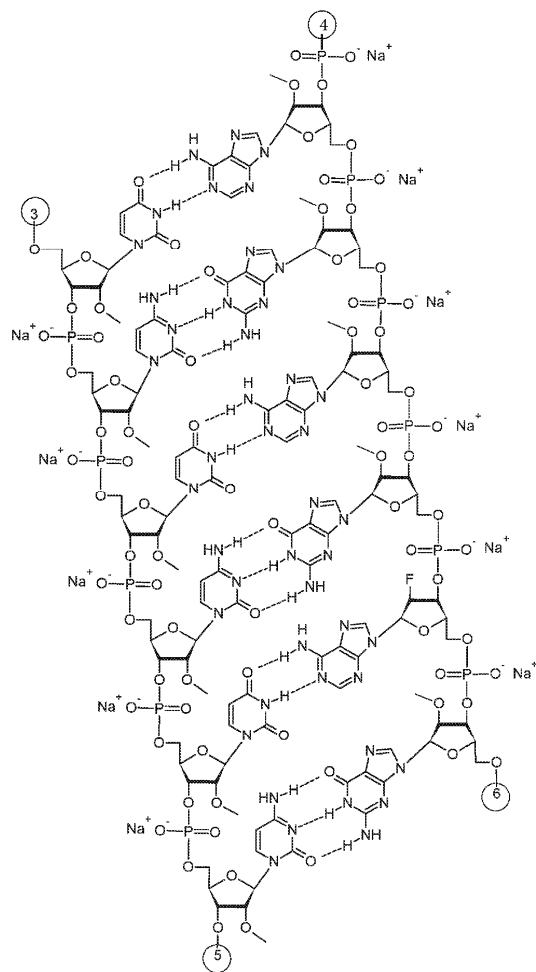


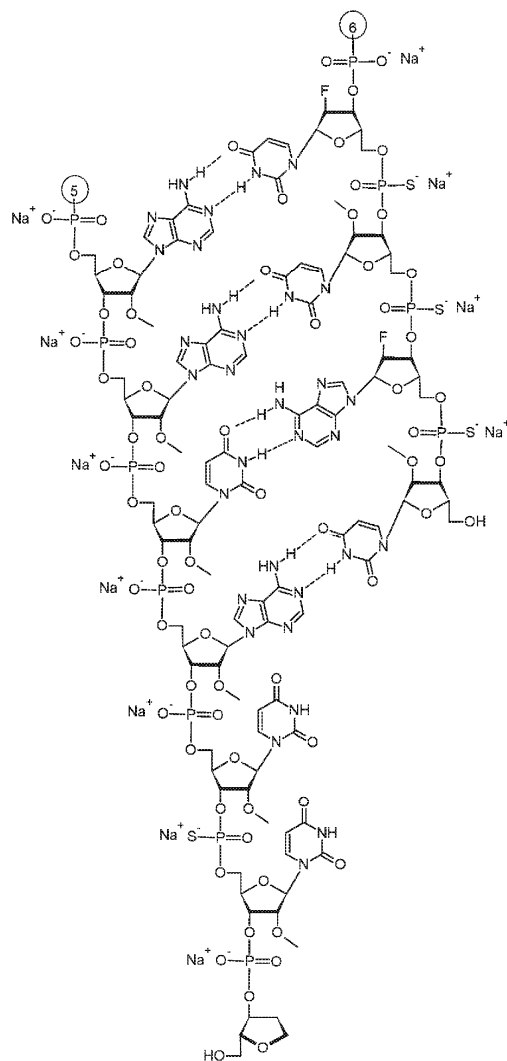


В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, состоит из или содержит соединение AD04585, связанное с (NAG25)s, показанным в виде натриевой соли, и имеет структуру, представленную ниже:



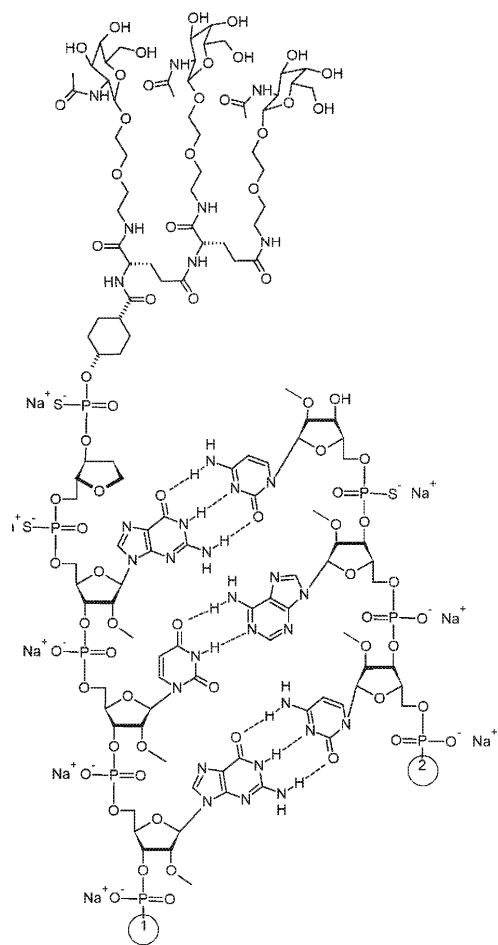


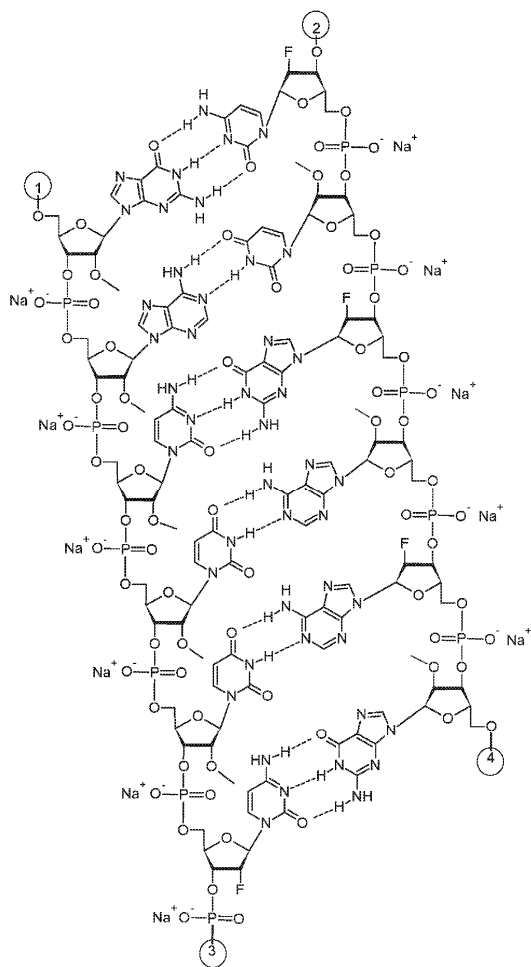




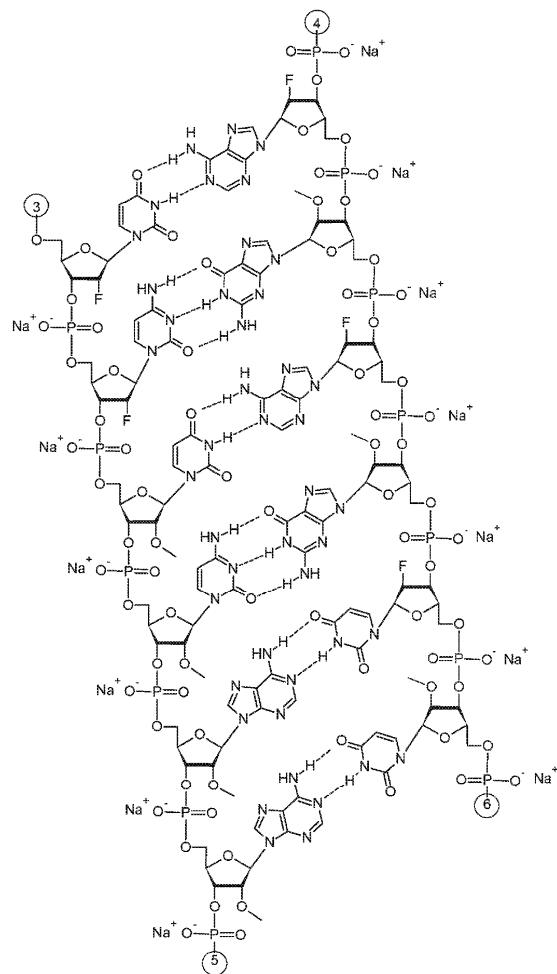
В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, состоит из или содержит соединение AD04872, связанное с (NAG37)s, показанным в виде натриевой соли, и имеет структуру, представленную ниже:

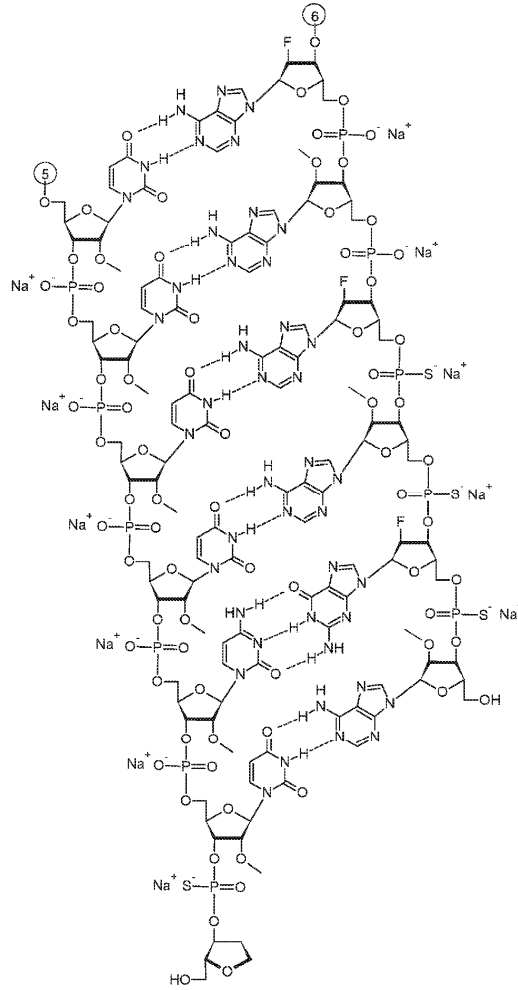
044937



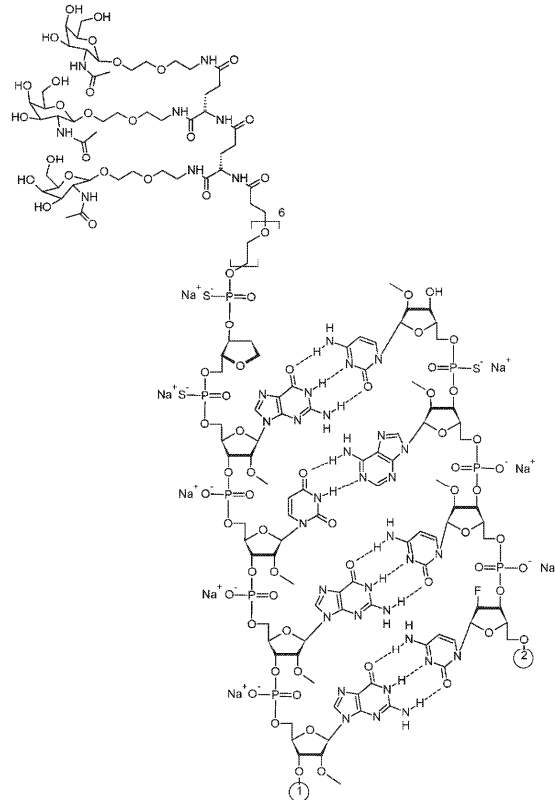


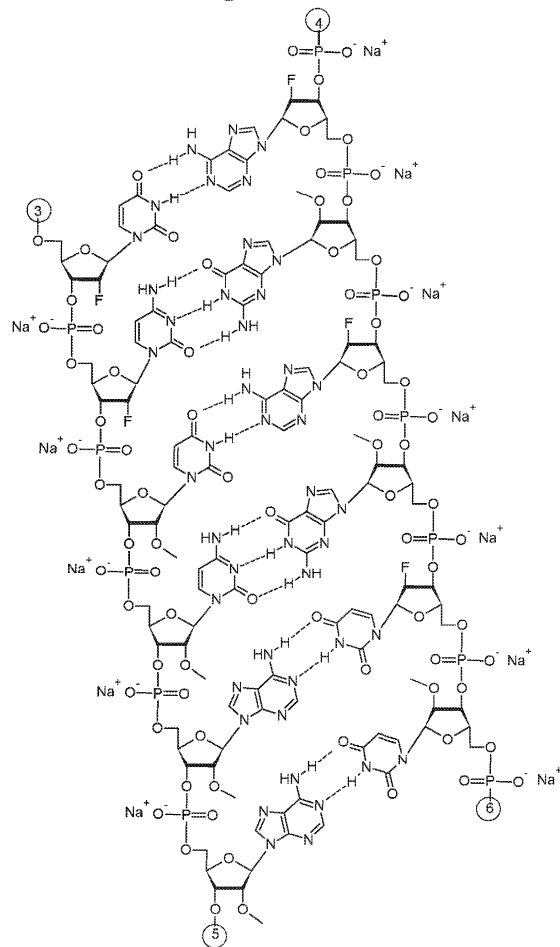
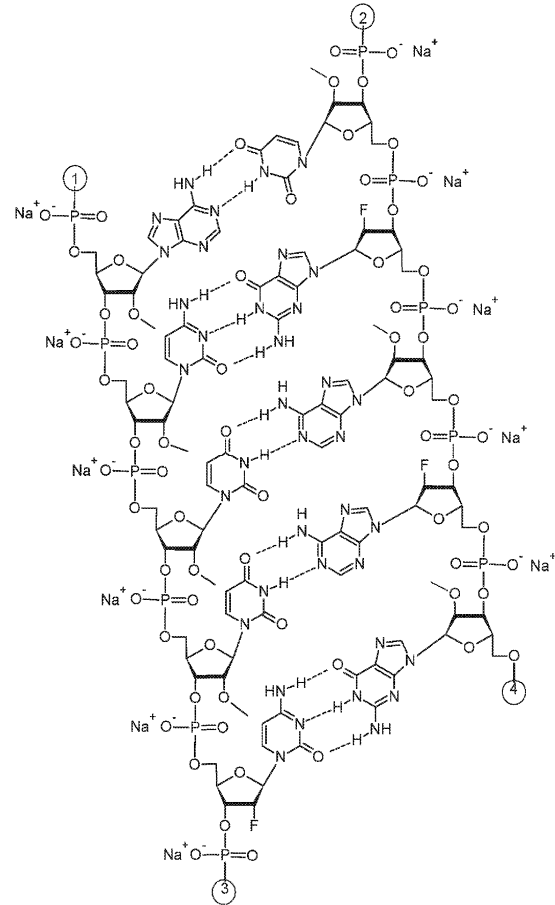
044937



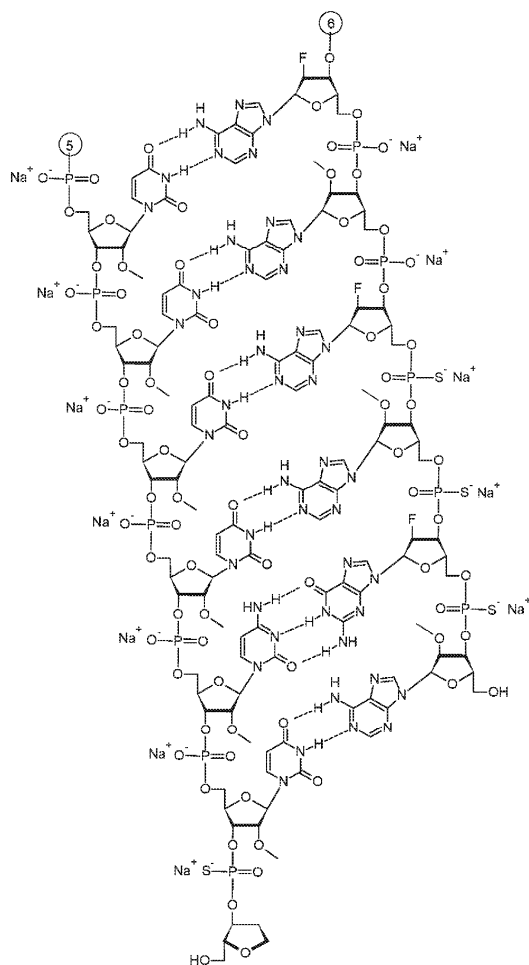


В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, состоит из или содержит соединение AD04872, связанное с (NAG25)s, показанным в виде натриевой соли, и имеет структуру, представленную ниже:

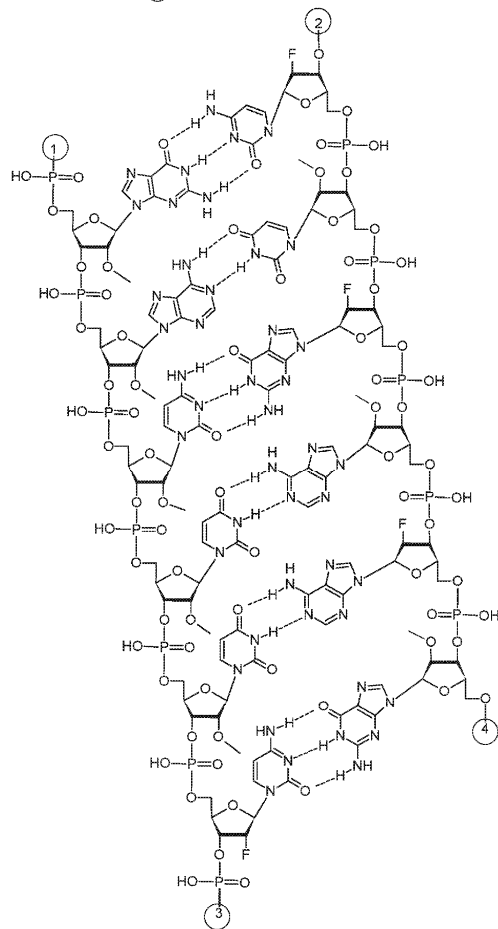
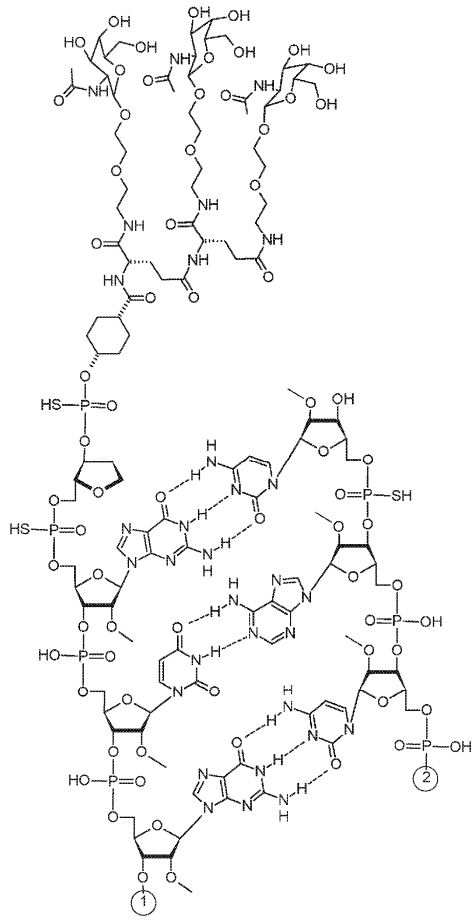


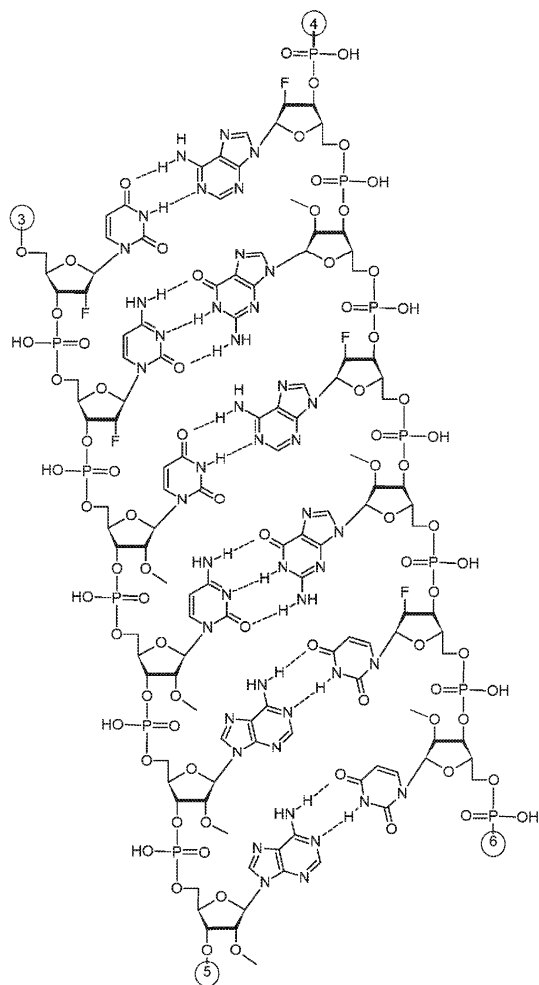


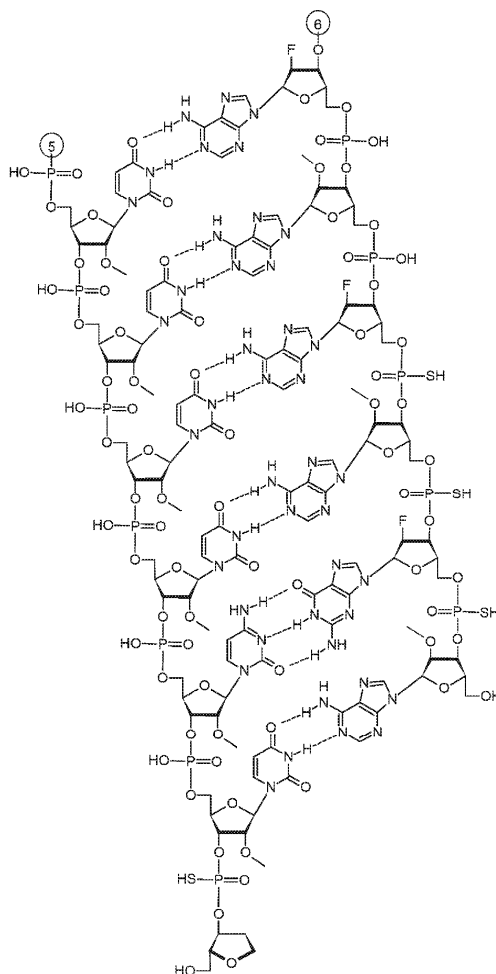




В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, состоит из или содержит соединение AD04872, связанное с (NAG37)s, показанным в виде свободной кислоты, и имеет структуру, представленную ниже:







В некоторых вариантах осуществления описанный(ые) агент(ы) РНКи против ВГВ обязательно комбинируют с одним или более дополнительными (т.е. вторым, третьим и т.д.) терапевтическими средствами. Вторым терапевтическим средством может быть другой агент РНКи против ВГВ (например, агент РНКи против ВГВ, который нацелен на другую последовательность в пределах генома ВГВ). Дополнительное терапевтическое средство может также представлять собой низкомолекулярное лекарственное средство, антитело, фрагмент антитела и/или вакцину. Агенты РНКи против ВГВ, содержащие или не содержащие одно или более дополнительных терапевтических средств, можно комбинировать с одним или более эксципиентами с образованием фармацевтических композиций.

В некоторых вариантах осуществления описанный(ые) агент(ы) РНКи против ВГВ обязательно комбинируют с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой нуклеозидный ингибитор или нуклеотидный ингибитор. В некоторых вариантах осуществления описанный(ые) агент(ы) РНКи против ВГВ обязательно комбинируют с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой энтекавир, тенофовир, тенофовира алафенамид, тенофовира дизопроксил, ламивудин или другое противовирусное терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления описанный (-ые) агент (-ы) РНКи против ВГВ обязательно комбинируют с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой интерферон. В некоторых вариантах осуществления описанный (-ые) агент (-ы) РНКи против ВГВ обязательно комбинируют с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой интерферон альфа. В некоторых вариантах осуществления описанный(ые) агент(ы) РНКи против ВГВ обязательно комбинируют с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой вакцину против ВГВ.

В некоторых вариантах осуществления описанный(ые) агент(ы) РНКи против ВГВ обязательно комбинируют с одним или более дополнительными терапевтическими средствами в одной лекарственной форме (т.е. смесь вводят одной инъекцией). В некоторых вариантах осуществления описанный (-ые) агент(ы) РНКи против ВГВ можно вводить отдельно от одного или более необязательных дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления описанный(ые) агент(ы) РНКи против ВГВ вводят нуждающемуся в этом субъекту посредством подкожной инъекции, а один или более дополнительных терапевтических агентов вводят перорально, что вместе представляет собой схему ле-

чения заболеваний и состояний, связанных с инфекцией ВГВ. В некоторых вариантах осуществления описанный(ые) агент(ы) РНКи против ВГВ вводят нуждающемуся в этом субъекту посредством подкожной инъекции, а один или более дополнительных терапевтических агентов вводят посредством отдельной подкожной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции для доставки агента РНКи против ВГВ в клетку печени *in vivo*, которые включают в себя агент РНКи против ВГВ, конъюгированный или связанный с нацеливающей группой. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа представляет собой лиганд асиалогликопротеинового рецептора. В некоторых вариантах осуществления описаны композиции для доставки агента РНКи против ВГВ в клетку печени *in vivo*, которые включают в себя агент РНКи против ВГВ, связанный с N-ацетилгалактозаминовым нацеливающим лигандом.

В некоторых вариантах осуществления один или более описанных агентов РНКи против ВГВ вводят млекопитающему в фармацевтически приемлемом носителе или разбавителе. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека.

Применение агента(ов) РНКи против вируса гепатита В представляет собой способы терапевтического и/или профилактического лечения заболеваний/расстройств, связанных с инфекцией ВГВ. Описанные агенты РНКи против ВГВ опосредуют РНК-интерференцию для ингибирования экспрессии одного или более генов, необходимых для репликации и/или патогенеза вируса гепатита В. В частности, например, агенты РНКи против ВГВ могут ингибировать вирусную полимеразу, капсидный белок, поверхностный

антиген, е-антиген и/или белок Х в клетке, ткани или организме млекопитающего. Агенты РНКи против ВГВ можно использовать для лечения инфекции ВГВ. Агенты РНКи против ВГВ также можно использовать для лечения или профилактики хронических заболеваний/расстройств печени, воспалительных заболеваний, фиброзных заболеваний и пролиферативных расстройств, таких как раковые заболевания, связанные с инфекцией ВГВ. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают лечение вируса гепатита D (ВГD) у субъекта. Такие способы включают введение агента РНКи против ВГВ человеку или животному, инфицированному ВГВ. Дополнительно описаны композиции для доставки агентов РНКи против ВГВ в клетки печени *in vivo*.

Фармацевтические композиции, содержащие один или более агентов РНКи против ВГВ, можно вводить различными способами в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение. Введение может представлять собой, без ограничений, внутривенное, внутриартериальное, подкожное, внутрибрюшинное, субдермальное (например, посредством имплантированного устройства) и интрапленхиматозное введение. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, вводят путем подкожной инъекции.

Описанные агенты РНКи против ВГВ и/или содержащие их композиции можно применять в способах терапевтического лечения инфекции ВГВ или заболевания или состояний, вызванных инфекцией ВГВ. Такие способы включают введение агента РНКи против ВГВ, описанного в настоящем документе, субъекту, например человеку или животному.

При использовании в настоящем документе термины "олигонуклеотид" и "полинуклеотид" означают полимер из связанных нуклеозидов, каждый из которых может быть независимо модифицированным или немодифицированным.

При использовании в настоящем документе термин "агент РНКи" или "триггер РНКи" означает композицию, которая содержит олигонуклеотидную молекулу РНК или РНК-подобную олигонуклеотидную молекулу (например, химически модифицированную РНК), которая способна нарушать или ингибировать трансляцию транскриптов матричной РНК (мРНК), специфичным для данной последовательности образом. В настоящем документе агенты РНКи могут функционировать через механизм РНК-интерференции (т.е. индуцировать РНК-интерференцию посредством взаимодействия с системой пути РНК-интерференции (РНК-индуцированный комплекс выключения гена или RISC) клеток млекопитающих) или любой(ые) альтернативный(ые) механизм(ы) или путь(и). Хотя считается, что агенты РНКи, поскольку этот термин используется в настоящем документе, функционируют преимущественно через механизм РНК-интерференции, описанные агенты РНКи не связаны или не ограничены каким-либо конкретным путем или механизмом действия. Агенты РНКи, описанные в настоящем документе, состоят из кодирующей цепи и антисмысловой цепи и включают в себя, без ограничений: малые интерферирующие РНК (миРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), миРНК (миРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК) и субстраты фермента Дайсер. Антисмысловая цепь агентов РНКи, описанных в настоящем документе, по меньшей мере частично комплементарна мРНК, на которую осуществляется нацеливание. Агенты РНКи могут состоять из модифицированных нуклеотидов и/или одной или более нефосфодиэфирных связей.

При использовании в настоящем документе термины "выключать", "снижать", "ингибировать", "подавлять" или "понижать активность" в отношении экспрессии данного гена означают, что экспрессия гена, измеренная по концентрации РНК, транскрибированной из гена, или концентрации полипептида, белка или субединицы белка, транслированного с мРНК в клетке, группе клеток, ткани, органе или субъекте, в котором ген транскрибирован, уменьшается при лечении клетки, группы клеток, ткани, орга-

на или субъекта олигомерными соединениями, такими как агенты РНКи, описанные в настоящем документе, по сравнению со второй клеткой, группой клеток, тканью, органом или субъектом, которые не были подвергнуты такому лечению.

При использовании в настоящем документе термин "последовательность" или "нуклеотидная последовательность" означает непрерывный ряд или порядок нуклеотидных оснований или нуклеотидов, описанный с помощью последовательности букв с использованием стандартной номенклатуры.

При использовании в настоящем документе термин "нуклеотидное основание" или "нуклеотид" представляет собой гетероциклическое пиримидиновое или пуриновое соединение, которое является стандартным составляющим всех нуклеиновых кислот и включает в себя основания, которые формируют нуклеотиды аденин (А), гуанин (Г), цитозин (Ц), тимин (Т) и урацил (У). Нуклеотидное основание может быть дополнительно модифицировано таким образом, чтобы включать в себя, без ограничений, универсальные основания, гидрофобные основания, смешанные основания, основания увеличенного размера и фторсодержащие основания.

При использовании в настоящем документе, если не указано иное, термин "комплементарный", используемый для описания первой нуклеотидной последовательности (например, кодирующей цепи агента РНКи или целевой мРНК) по отношению ко второй нуклеотидной последовательности (например, антисмысловой последовательности агента РНКи или одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида), означает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, включая первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться (формировать водородные связи между парами оснований в физиологических для млекопитающего условиях (или аналогичных условиях *in vitro*)) и формировать дуплексную или двойную спиральную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включая вторую нуклеотидную последовательность. Комплементарные последовательности включают пары оснований, образованные по Уотсону-Крику, или пары оснований, образованные не по Уотсону-Крику, и включают в себя природные или модифицированные нуклеотиды или миметики нуклеотидов, по меньшей мере в степени, обеспечивающей соблюдение вышеприведенных требований по гибридизации. Идентичность или комплементарность последовательности не зависит от модификации. Например, а и Аf комплементарны U (или Т) и идентичны А для целей определения идентичности или комплементарности.

При использовании в настоящем документе термин "абсолютно комплементарный" или "полностью комплементарный" означает, что все (100%) из оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же числом оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Непрерывная последовательность может содержать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

При использовании в настоящем документе термин "частично комплементарный" означает, что в гибридизованной паре нуклеотидных последовательностей по меньшей мере 70% (но не все) из оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же числом оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида.

При использовании в настоящем документе термин "по существу комплементарный" означает, что в гибридизованной паре нуклеотидных последовательностей по меньшей мере около 85% (но не все) из оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же числом оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Термины "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по существу комплементарный" в настоящем документе могут использоваться по отношению к основаниям, совпадающим между кодирующей цепью и антисмысловой цепью агента двухцепочечной РНКи, между антисмысловой цепью агента РНКи и последовательностью целевой мРНК или между одноцепочечным антисмысловым олигонуклеотидом и последовательностью целевой мРНК.

При использовании в настоящем документе термин "по существу идентичный" или "практически полная идентичность" по отношению к нуклеотидной последовательности означает, что нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая на по меньшей мере около 85% или более, предпочтительно на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентична при сравнении с эталонной последовательностью. Процент идентичности последовательности определяли путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения. Процентное значение рассчитывают путем определения числа положений, в которых в обеих последовательностях встречаются идентичные нуклеиновые основания с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательности. Описанные в настоящем документе изобретения охватывают нуклеотидные последовательности, по существу идентичные последовательностям, описанным в настоящем документе, например в табл. 2, 3 и 4. В некоторых вариантах осуществления последовательности, описанные в настоящем документе, полностью идентичны или на по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям, описанным в настоящем документе, например в табл. 1, 2, 3 и 4.

При использовании в настоящем документе термины "лечить", "лечение" и т.п. означают способы

или стадии, выполняемые для ослабления или уменьшения числа, тяжести и/или частоты одного или более симптомов заболевания или состояния у субъекта.

При использовании в настоящем документе фраза "введение в клетку" в отношении олигомерного соединения означает функционализированную доставку олигомерного соединения в клетку. Фраза "функционализированная доставка" означает, доставку олигомерного соединения в клетку таким образом, который позволяет олигомерному соединению проявлять ожидаемую биологическую активность, например ингибирование экспрессии гена, специфичное для конкретной последовательности.

Если не указано иное, применение символа в контексте настоящего документа означает, что сюда может быть присоединена любая группа или группы, которые соответствуют объему изобретений, описанных в настоящем документе.

При использовании в настоящем документе термин "изомеры" относится к соединениям, имеющим идентичные молекулярные формулы, но отличающимся по характеру или последовательности связывания их атомов или расположению их атомов в пространстве. Изомеры, которые различаются по расположению своих атомов в пространстве, называются "стереоизомерами". Стереоизомеры, которые не являются зеркальным отражением друг друга, называются "диастереомерами", а стереоизомеры, которые являются зеркальными отражениями, не совпадающими при наложении друг на друга, называются "энантиомерами" или, в некоторых случаях, оптическими изомерами. Атом углерода, связанный с четырьмя неидентичными заместителями, называется "хиральным центром".

В настоящем документе, если специально не указано, что структура имеет конкретную конформацию, для каждой структуры, в которой присутствуют асимметричные центры и которая, следовательно, обуславливает образование энантиомеров, диастереомеров или других стереоизомерных конфигураций, предполагается, что каждая структура, описанная в настоящем документе, отражает все такие возможные изомеры, включая их оптически чистые и рацемические формы. Например, предполагается, что структуры, описанные в настоящем документе, охватывают смеси диастереомеров, а также отдельные стереоизомеры.

При использовании в формуле изобретения, приведенной в настоящем документе, фраза "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не упомянутый в формуле изобретения. При использовании в формуле изобретения настоящего документа фраза "состоящий по существу из" ограничивает объем формулы изобретения конкретными материалами или этапами "и теми, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики" заявленного изобретения.

Среднему специалисту в данной области будет легко понять, что соединения и композиции, описанные в настоящем документе, могут иметь определенные атомы (например, атомы N, O или S) в протонированном или депротонированном состоянии в зависимости от среды, в которой находится соединение или композиция. Соответственно, при использовании в настоящем документе структур, представленных в настоящем документе, предполагается, что определенные функциональные группы, такие как, например, OH, SH или NH, могут быть протонированными или депротонированными.

Предполагается, что настоящее изобретение охватывает описанные соединения и композиции, независимо от состояния их протонирования, зависящего от окружающей среды (например, pH), как можно будет легко понять среднему специалисту в данной области.

Все используемые в настоящем документе технические и научные термины, если не дано их иное определение, имеют общепринятое значение, понятное среднему специалисту в данной области. В настоящем документе описаны примеры способов и материалов, хотя для проверки или анализа настоящего изобретения можно использовать подходящие способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие упоминаемые в настоящем документе литературные источники включены в настоящий документ в полном объеме путем ссылки. В случае противоречий настоящее описание, включая определения, будет иметь приоритет. Кроме того, материалы, способы и примеры приводятся только в целях иллюстрации и не имеют ограничительного характера.

Прочие признаки и преимущества изобретения будут понятны из представленного ниже подробного описания, а также из формулы изобретения.

#### **Подробное описание**

В настоящем документе описаны агенты РНКи для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (ВГВ) (называемые в настоящем документе агентами РНКи против ВГВ или триггерами РНКи против ВГВ). Каждый агент РНКи против ВГВ содержит кодирующую цепь и антисмысловую цепь. Каждая из кодирующей цепи и антисмысловой цепи может иметь длину от 16 до 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая из кодирующей и антисмысловой цепей может иметь длину от 17 до 26 нуклеотидов. Кодирующая и антисмысловая цепи могут иметь одинаковую длину или они могут иметь разные длины. В некоторых вариантах осуществления каждая из кодирующей и антисмысловой цепей независимо имеет длину от 17 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая из кодирующей и антисмысловой цепей независимо имеет длину от 17 до 21 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления каждая из кодирующей и антисмысловой цепей имеет длину от 21 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь имеет длину около 19 нуклеотидов, тогда

как антисмысловая цепь имеет длину около 21 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь имеет длину около 21 нуклеотида, тогда как антисмысловая цепь имеет длину около 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая из кодирующей цепи и антисмысловой цепи имеет длину 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая из кодирующей и антисмысловой цепей агента РНКи независимо имеет длину 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный агент РНКи имеет дуплексную длину около 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов. Данная область абсолютной или существенной комплементарности между кодирующей цепью и антисмысловой цепью обычно имеет длину 15-25 (например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) нуклеотидов и находится на 5'-конце антисмысловой цепи или вблизи него (например, эта область может быть отделена от 5'-конца антисмысловой цепи 0, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидами, которые не являются абсолютно или по существу комплементарными).

Каждая кодирующая цепь и антисмысловая цепь содержит последовательность сердцевинного фрагмента, которая имеет длину от 16 до 23 нуклеотидов. Последовательность сердцевинного фрагмента антисмысловой цепи на 100% (абсолютно) комплементарна или на по меньшей мере около 85% (по существу) комплементарна нуклеотидной последовательности (иногда называемой, например, целевой последовательностью), присутствующей в целевой мРНК ВГВ. Последовательность сердцевинного фрагмента кодирующей цепи на 100% (абсолютно) комплементарна или на по меньшей мере около 85% (по существу) комплементарна последовательности сердцевинного фрагмента в антисмысловой цепи, и, следовательно, последовательность сердцевинного фрагмента кодирующей цепи абсолютно идентична или на по меньшей мере около 85% идентична нуклеотидной последовательности (целевой последовательности), присутствующей в целевой мРНК ВГВ. Последовательность сердцевинного фрагмента кодирующей цепи может иметь ту же длину, что и соответствующая антисмысловая сердцевинная последовательность, или она может иметь другую длину. В некоторых вариантах осуществления последовательность сердцевинного фрагмента антисмысловой цепи составляет в длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления последовательность сердцевинного фрагмента кодирующей цепи составляет в длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида.

Примеры нуклеотидных последовательностей кодирующей и антисмысловой цепей, используемых для формирования агентов РНКи против ВГВ, представлены в табл. 3 и 4. Примеры дуплексов агентов РНКи, которые включают нуклеотидные последовательности из табл. 3 и 4, представлены в табл. 5.

Кодирующая и антисмысловая цепи агента РНКи против ВГВ соединяются с образованием дуплекса. Кодирующая цепь и антисмысловая цепь агента РНКи против ВГВ могут быть частично, по существу или полностью комплементарными друг другу. В пределах комплементарной дуплексной области последовательность сердцевинного фрагмента кодирующей цепи на по меньшей мере около 85% комплементарна или на 100% комплементарна последовательности сердцевинного фрагмента антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления последовательность сердцевинного фрагмента кодирующей цепи содержит последовательность из по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 21 нуклеотида, которая на по меньшей мере около 85% или 100% комплементарна соответствующей последовательности из 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотида сердцевинного фрагмента антисмысловой цепи (т.е. последовательности сердцевинного фрагмента кодирующей цепи и антисмысловой цепи агента РНКи против ВГВ имеют область из по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 21 нуклеотида, которая спарена по основаниям на по меньшей мере 85% или на 100%).

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента РНКи против ВГВ, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловой цепи, приведенных в табл. 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь агента РНКи против ВГВ, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей кодирующей цепи, приведенных в табл. 2 или 4.

Длина описанных в настоящем документе кодирующей и антисмысловой цепей агента РНКи против ВГВ независимо имеют длину от 16 до 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кодирующая и антисмысловая цепи независимо имеют длину от 17 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кодирующая и антисмысловая цепи имеют длину от 19 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления описанные кодирующая и антисмысловая цепи агента РНКи независимо имеют длину 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов. Кодирующая и антисмысловая цепи могут иметь одинаковую длину или они могут иметь разные длины. В некоторых вариантах осуществления каждая из кодирующей цепи и антисмысловой цепи имеет длину 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь имеет длину 23 нуклеотида, а антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь имеет длину 22 нуклеотида, а антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь имеет длину 21 нуклеотид и антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь имеет длину 19 нуклеотидов, а антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид.



Кодирующая цепь и/или антисмысловая цепь могут необязательно и независимо содержать дополнительные 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов (удлинение) на 3'-конце, 5'-конце или на обоих 3'- и 5'-концах сердцевинных последовательностей. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой цепи (при наличии) могут быть комплементарными или не комплементарными соответствующей последовательности в мРНК ВГВ. Дополнительные нуклеотиды кодирующей цепи (при наличии) могут быть идентичными или не идентичными соответствующей последовательности в мРНК ВГВ. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой цепи (при наличии) могут быть комплементарными или не комплементарными соответствующим дополнительным нуклеотидам кодирующей цепи (при наличии).

В настоящем документе удлинение содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов на 5- и/или 3'-конце последовательности сердцевинного фрагмента кодирующей цепи и/или последовательности сердцевинного фрагмента антисмысловой цепи. Нуклеотиды удлинения на кодирующей цепи могут быть комплементарными или не комплементарными нуклеотидам последовательности сердцевинного фрагмента или нуклеотидам удлинения в соответствующей антисмысловой цепи. И наоборот, нуклеотиды удлинения на антисмысловой цепи могут быть комплементарными или не комплементарными нуклеотидам последовательности сердцевинного фрагмента или нуклеотидам удлинения в соответствующей кодирующей цепи. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь и антисмысловая цепь агента РНКи содержит удлинения на 3'- и 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления один или более из нуклеотидов 3'-удлинения одной цепи спарены по основаниям с одним или более нуклеотидами 5'-удлинения другой цепи. В других вариантах осуществления один или более из нуклеотидов 3'-удлинения одной цепи не спарены по основаниям с одним или более нуклеотидами 5'-удлинения другой цепи. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ имеет антисмысловую цепь, имеющую 3'-удлинение, и кодирующую цепь, имеющую 5'-удлинение.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, имеющую 3'-удлинение размером 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В других вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, имеющую 3'-удлинение размером 1, 2 или 3 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления один или более из нуклеотидов удлинения антисмысловой цепи содержат урациловые или тимидиновые нуклеотиды или нуклеотиды, которые комплементарны соответствующей последовательности мРНК ВГВ. В некоторых вариантах осуществления 3'-удлинение антисмысловой цепи включает в себя или состоит из, без ограничений: AUA, UGCUU, CUG, UG, UGCC, CUGCC, CGU, CUU, UGCCUA, CUGCCU, UGCCU, UGAUU, GCCUAU, T, TT, U, UU (каждый из них записан от 5' к 3').

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец антисмысловой цепи может включать в себя дополнительные нуклеозиды, лишённые азотистого основания (Ab). В некоторых вариантах осуществления Ab или AbAb могут быть добавлены к 3'-концу антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, имеющую 5'-удлинение размером 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов. В других вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь, имеющую 5'-удлинение размером 1 или 2 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления один или более из нуклеотидов удлинения антисмысловой цепи содержат урациловые или тимидиновые нуклеотиды или нуклеотиды, которые комплементарны соответствующей последовательности мРНК ВГВ. В некоторых вариантах осуществления 5'-удлинение антисмысловой цепи включает в себя или состоит из, без ограничений, UA, TU, U, T, UU, TT, CUC (каждый из них записан от 5' к 3'). Антисмысловая цепь может иметь любое из описанных выше 3'-удлинений в комбинации с любым из описанных выше 5'-удлинений антисмысловой цепи (при наличии).

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит кодирующую цепь, имеющую 3'-удлинение размером 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более из нуклеотидов удлинения кодирующей цепи содержат аденозиновые, урациловые или тимидиновые нуклеотиды, динуклеотид AT или нуклеотиды, которые соответствуют нуклеотидам в последовательности мРНК ВГВ. В некоторых вариантах осуществления 3'-удлинение кодирующей цепи включает в себя или состоит из, без ограничений: T, UT, TT, UU, UUT, TTT или TTTT (каждый из них записан от 5' к 3').

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец кодирующей цепи может включать в себя дополнительные нуклеозиды, лишённые азотистого основания. В некоторых вариантах осуществления UUA<sub>n</sub>, UA<sub>n</sub> или Ab могут быть добавлены к 3'-концу кодирующей цепи. В некоторых вариантах осуществления один или более лишённых азотистого основания нуклеозидов, добавленных к 3'-концу кодирующей цепи, могут быть инвертированными (invAb). В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных нуклеозидов, лишённых азотистого основания, могут быть вставлены между нацеливающим лигандом и нуклеотидной последовательностью кодирующей цепи агента РНКи. В некоторых вариантах осуществления включение одного или более инвертированных нуклеозидов, лишённых азотистого основания, в конец или концы кодирующей цепи агента РНКи или вблизи их может привести к увеличению активности агента РНКи или приобретению им других желаемых свойств.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит кодирующую цепь, имеющую 5'-удлинение размером 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления

один или более из нуклеотидов удлинения кодирующей цепи содержат урациловые или аденозиновые нуклеотиды или нуклеотиды, которые соответствуют нуклеотидам в последовательности мРНК ВГВ. В некоторых вариантах осуществления 5'-удлинение кодирующей цепи может представлять собой, без ограничений: CA, AUAGGC, AUAGG, AUAG, AUA, A, AA, AC, GCA, GGCA, GGC, UAUCA, UAUC, UCA, UAU, U, UU (каждый из них записан от 5' к 3'). Кодирующая цепь может иметь 3'-удлинение и/или 5'-удлинение.

В некоторых вариантах осуществления 5'-конец кодирующей цепи может включать в себя дополнительный нуклеозид, лишенный азотистого основания (Ab), или нуклеозиды, лишенные азотистого основания (AbAb). В некоторых вариантах осуществления один или более лишенных азотистого основания нуклеозидов, добавленных к 5'-концу кодирующей цепи, могут быть инвертированными (invAb). В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных нуклеозидов, лишенных азотистого основания, могут быть вставлены между нацеливающим лигандом и нуклеотидной последовательностью кодирующей цепи агента РНКи. В некоторых вариантах осуществления включение одного или более инвертированных нуклеозидов, лишенных азотистого основания, в конец или концы кодирующей цепи агента РНКи или вблизи их может привести к увеличению активности агента РНКи или приобретению им других желаемых свойств.

Примеры нуклеотидных последовательностей, используемых для формирования агентов РНКи против ВГВ, представлены в табл. 3 и 4. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента РНКи против ВГВ включает в себя любую из нуклеотидных последовательностей, представленных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента РНКи против ВГВ включает в себя последовательность нуклеотидов 1-17, 2-15, 2-17, 1-18, 2-18, 1-19, 2-19, 1-20, 2-20, 1-21, 2-21, 1-22, 2-22, 1-23, 2-23, 1-24, 2-24, 1-25, 2-25, 1-26 или 2-26 любой из последовательностей, представленных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь агента РНКи против ВГВ включает в себя любую из нуклеотидных последовательностей, представленных в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь агента РНКи против ВГВ включает в себя последовательность нуклеотидов 1-18, 1-19, 1-20, 1-21, 1-22, 1-23, 1-24, 1-25, 1-26, 2-19, 2-20, 2-21, 2-22, 2-23, 2-24, 2-25, 2-26, 3-20, 3-21, 3-22, 3-23, 3-24, 3-25, 3-26, 4-21, 4-22, 4-23, 4-24, 4-25, 4-26, 5-22, 5-23, 5-24, 5-25, 5-26, 6-23, 6-24, 6-25, 6-26, 7-24, 7-25, 7-25, 8-25, 8-26, любой из последовательностей представленных в табл. 4.

В некоторых вариантах осуществления кодирующая и антисмысловая цепи агентов РНКи, описанных в настоящем документе, содержат одинаковое число нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кодирующая и антисмысловая цепи агентов РНКи, описанных в настоящем документе, содержат различные числа нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-конец кодирующей цепи и 3'-конец антисмысловой цепи агента РНКи формируют тупой конец. В некоторых вариантах осуществления 3'-конец кодирующей цепи и 5'-конец антисмысловой цепи агента РНКи формируют тупой конец. В некоторых вариантах осуществления оба конца агента РНКи формируют тупые концы. В некоторых вариантах осуществления ни один из концов агента РНКи не является тупым. При использовании в настоящем документе термин "тупой конец" относится к концу двухцепочечного агента РНКи, в котором концевые нуклеотиды двух соединенных цепей являются комплементарными (формируют комплементарную пару оснований). В некоторых вариантах осуществления 5'-конец кодирующей цепи и 3'-конец антисмысловой цепи агента РНКи формируют раскрытый конец.

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец кодирующей цепи и 5'-конец антисмысловой цепи агента РНКи формируют раскрытый конец. В некоторых вариантах осуществления оба конца агента РНКи формируют раскрытый конец. В некоторых вариантах осуществления ни один из концов агента РНКи не является раскрытым. При использовании в настоящем документе термин "раскрытый конец" относится к концу двухцепочечного агента РНКи, в котором концевые нуклеотиды двух соединенных цепей формируют пару (т.е. не формируют выступ), но не являются комплементарными (т.е. формируют некомплементарную пару). При использовании в настоящем документе термин "выступ" представляет собой фрагмент одного или более непарных нуклеотидов на конце одной цепи двухцепочечного агента РНКи. Непарные нуклеотиды могут находиться на кодирующей цепи или антисмысловой цепи, создавая выступы на 3'-конце или на 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи содержит: тупой конец и раскрытый конец, тупой конец и 5'-выступающий конец, тупой конец и 3'-выступающий конец, раскрытый конец и 5'-выступающий конец, раскрытый конец и 3'-выступающий конец, два 5'-выступающих конца, два 3'-выступающих конца, 5'-выступающий конец и 3'-выступающий конец, два раскрытых конца или два тупых конца.

Нуклеотидное основание (нуклеотид) представляет собой гетероциклическое пиримидиновое или пуриновое соединение, которое является составляющим всех нуклеиновых кислот и включает в себя аденин (A), гуанин (G), цитозин (C), тимин (T) и урацил (U). При использовании в настоящем документе термин "нуклеотид" может включать в себя модифицированный нуклеотид (такой как, например, миметик нуклеотида, лишенный азотистых оснований участок (Ab) или суррогатный замещающий фрагмент).

Модифицированные нуклеотиды, при использовании в различных полинуклеотидных или олигонуклеотидных конструктах, могут сохранять активность соединения в клетках, в то же время повышая стабильность данных соединений в сыворотке, а также могут сводить к минимуму вероятность актива-

ции активности интерферона у людей при введении такого полинуклеотидного или олигонуклеотидного конструктора.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ получают или предлагают в виде соли, смешанной соли или свободной кислоты. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ получают в виде натриевой соли. Такие формы находятся в пределах объема изобретений, описанных в настоящем документе.

#### Модифицированные нуклеотиды

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит один или более модифицированных нуклеотидов. В настоящем документе "модифицированный нуклеотид" представляет собой нуклеотид, не являющийся рибонуклеотидом (2'-гидроксилнуклеотид). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99 или 100%) нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами. В настоящем документе модифицированные нуклеотиды включают, без ограничений, дезоксирибонуклеотиды, миметики нуклеотидов, лишенные азотистых оснований нуклеотиды (обозначаемые в настоящем документе как Ab), 2'-модифицированные нуклеотиды, нуклеотиды со связями 3' к 3' (инвертированные) (обозначаемые в настоящем документе как invdN, invN, invn, invAb), не встречающиеся в природе содержащие основания нуклеотиды, мостиковые нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), миметики 2',3'-секонуклеотидов (разблокированные нуклеотидные аналоги, обозначаемые в настоящем документе как N<sub>UNA</sub> или NUNA), заблокированные нуклеотиды (обозначаемые в настоящем документе как N<sub>LNA</sub> или NLNA), 3'-О-метокси (2'-межнуклеозидно-связанные) нуклеотиды (обозначаемые в настоящем документе как 3'-OMen), 2'-F-арабинонуклеотиды (обозначаемые в настоящем документе как NfANA или Nf<sub>ANA</sub>), 5'-Me, 2'-фторнуклеотид (обозначаемый в настоящем документе как 5Me-Nf), морфолинонуклеотиды, винилфосфонатдезоксирибонуклеотиды (обозначаемые в настоящем документе как vpdN), винилфосфонат-содержащие нуклеотиды и циклопропилфосфонат-содержащие нуклеотиды (cPrpN). 2'-Модифицированные нуклеотиды (т.е. нуклеотиды с группой, отличной от гидроксильной группы в 2'-положении пятичленного сахарного кольца) включают в себя, без ограничений, 2'-О-метилнуклеотиды (обозначаемые в настоящем документе в виде строчной буквы n в нуклеотидной последовательности), 2'-дезокси-2'-фторнуклеотиды (обозначаемые в настоящем документе как Nf, также обозначаемые в настоящем документе как 2'-фторнуклеотид), 2'-дезоксинуклеотиды (обозначаемые в настоящем документе как dN), 2'-метоксиэтил (2'-О-2-метоксиэтил)нуклеотиды (обозначаемые в настоящем документе как NM или 2'-МОЕ), 2'-аминонуклеотиды и 2'-алкилнуклеотиды. Необязательно все положения в данном соединении должны быть одинаково модифицированы. И наоборот, в одном агенте РНКи против ВГВ или даже в одном его нуклеотиде может быть выполнено более одной модификации. Кодированные цепи и антисмысловые цепи агента РНКи против ВГВ могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, известными в данной области. Модификация в одном нуклеотиде не зависит от модификации в другом нуклеотиде.

Модифицированные нуклеиновые основания включают в себя синтетические и природные нуклеотидные основания, такие как 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и O-6-замещенные пурины (например, 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил или 5-пропинилцитозин), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-алкильные (например, 6-метил, 6-этил, 6-изопропил или 6-n-бутил) производные аденина и гуанина, 2-алкильные (например, 2-метил, 2-этил, 2-изопропил или 2-n-бутил) и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин, 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил, цитозин, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 6-азоурацил, 6-азоцитозин, 6-азотимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-сульфгидрил, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген (например, 5-бром), 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезазагуанин, 7-дезазааденин, 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин.

В некоторых вариантах осуществления все или по существу все нуклеотиды агента РНКи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В настоящем документе агент РНКи, в котором по существу все из имеющихся нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой агент РНКи, в котором четыре или менее (т.е. 0, 1, 2, 3 или 4) нуклеотидов как в кодирующей цепи, так и в антисмысловой цепи, являются рибонуклеотидами. В настоящем документе кодирующая цепь, в которой по существу все из имеющихся нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой кодирующую цепь, в которой два или менее (т.е. 0, 1 или 2) нуклеотидов в кодирующей цепи являются рибонуклеотидами. В настоящем документе антисмысловая кодирующая цепь, в которой по существу все из имеющихся нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой антисмысловую цепь, в которой два или менее (т.е. 0, 1 или 2) нуклеотидов в кодирующей цепи являются рибонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов агента РНКи представляют собой рибонуклеотиды.

### Модифицированные межнуклеозидные связи

В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов агента РНКи против ВГВ связаны нестандартными связями или остовами (т.е. модифицированными межнуклеозидными связями или модифицированными остовами). В некоторых вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой не содержащую фосфат ковалентную межнуклеозидную связь. Модифицированные межнуклеозидные связи или остовы включают в себя, без ограничений, 5'-фосфоротиоатные группы (обозначаемые в настоящем документе строчной буквой s), хиральные фосфоротиоаты, тиофосфаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоксилфосфотриэфиры, алкилфосфонаты (например, метилфосфонаты или 3'-алкиленфосфонаты), хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты (например, 3'-аминофосфорамидат, аминоксилфосфорамидаты или тионофосфорамидаты), тиоалкилфосфонаты, тиоалкилфосфотриэфиры, морфолиновые связи, боранофосфаты, имеющие обычные связи 3'-5', 2'-5'-связанные аналоги боранофосфатов или боранофосфаты, имеющие обратную полярность, причем смежные пары нуклеозидных звеньев связаны связями от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. В некоторых вариантах осуществления в модифицированной межнуклеозидной связи или остове отсутствует атом фосфора. Модифицированные межнуклеозидные связи, не имеющие атома фосфора, включают в себя, без ограничений, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные связи между сахарами, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные связи между сахарами, или одну или более короткоцепочечных гетероатомных или гетероциклических связей между сахарами. В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеозидные остовы включают в себя, без ограничений, силоксановые остовы, сульфидные остовы, сульфоксидные остовы, сульфоновые остовы, формацетиловые и тиоформацетиловые остовы, метиленаформацетиловые и тиоформацетиловые остовы, алкен-содержащие остовы, сульфаматные остовы, метилениминовые и метиленигидразиновые остовы, сульфонатные и сульфонамидные остовы, амидные остовы и другие остовы, имеющие смешанные компоненты N, O, S и CH<sub>2</sub>.

В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь агента РНКи против ВГВ может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных связей, антисмысловая цепь агента РНКи против ВГВ может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных связей или как кодирующая цепь, так и антисмысловая цепь независимо могут содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных связей. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь агента РНКи против ВГВ может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатные связи, антисмысловая цепь агента РНКи против ВГВ может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатные связи или как кодирующая цепь, так и антисмысловая цепь независимо могут содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатные связи.

В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь агента РНКи против ВГВ содержит по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеозидные связи находятся между нуклеотидами в положениях 1-3 от 3'-конца кодирующей цепи. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеозидные связи находятся между нуклеотидами в положениях 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 4-5 или 6-8 от 5'-конца кодирующей цепи. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента РНКи против ВГВ содержит четыре фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления четыре фосфоротиоатные межнуклеозидные связи находятся между нуклеотидами в положениях 1-3 от 5'-конца кодирующей цепи и между нуклеотидами в положениях 19-21, 20-22, 21-23, 22-24, 23-25 или 24-26 от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеозидные связи в кодирующей цепи и три или четыре фосфоротиоатные межнуклеозидные связи в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит один или более модифицированных нуклеотидов и одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид комбинирован с модифицированной межнуклеозидной связью.

### Агенты РНКи против ВГВ

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе агенты РНКи против ВГВ нацеливаются на ген ВГВ в положениях или вблизи положений генома ВГВ, показанных в следующей табл. 1. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента РНКи против ВГВ, описанного в настоящем документе, включает в себя последовательность сердцевинного фрагмента, которая полностью, по существу или по меньшей мере частично комплементарна целевой 19-мерной последовательности ВГВ, описанной в табл. 1.

Таблица 1. Примерные 19-мерные целевые последовательности кДНК ВГВ для агентов РНКи против ВГВ (полученные из вируса гепатита В (подтип ADW2), генотип А, полный геном в GenBank AM282986.1 (SEQ ID NO: 1)).

SEQ ID No.	19-мерные целевые последовательности ВГВ (5' → 3')	Геном Положение SEQ ID NO: 1	Целевая область гена ВГВ
2	Gtggtaggacttctctcaat	256-274	ORF S
3	tggtggacttctctcaatt	257-275	ORF S
4	ggacttctctcaattttct	261-279	ORF S
5	Gctgtaggcataaattgggt	1780-1798	ORF X
6	ctgtaggcataaattgggtc	1781-1799	ORF X

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ включает в себя антисмысловую цепь, в которой положение 19 (5'→3') способно формировать пару оснований с положением 1 19-мерной целевой последовательности, описанной в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ включает в себя антисмысловую цепь, в которой положение 1 (5'→3') способно формировать пару оснований с положением 19 19-мерной целевой последовательности, описанной в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ включает в себя антисмысловую цепь, в которой положение 2 (5'→3') способно формировать пару оснований с положением 18 19-мерной целевой последовательности, описанной в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ включает в себя антисмысловую цепь, в которой положения 2-18 (5'→3') способны формировать пары оснований с каждым из соответствующих комплементарных оснований, расположенных в положениях 18-2 19-мерной целевой последовательности, описанной в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления агенты РНКи против ВГВ включают в себя сердцевинные 19-мерные нуклеотидные последовательности, показанные в следующей табл. 2.

Таблица 2. Последовательности сердцевинного фрагмента антисмысловой цепи и кодирующей цепи агента РНКи против ВГВ (N=любой нуклеотид)

SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность (5' → 3') (19-мерная)	SEQ ID NO:	Кодирующая последовательность (5' → 3') (19-мерная)	Геном Положение SEQ ID NO: 1
7	AUUGAGAGAAGUCCACCAC	34	GUgUggacUUCUcUcaaU	256-274
8	UUUGAGAGAAGUCCACCAC	35	GUgUggacUUCUcUcaaA	256-274
9	AUUGAGAGAAGUCCACCAN	36	NUgUggacUUCUcUcaaU	256-274
10	UUUGAGAGAAGUCCACCAN	37	NUgUggacUUCUcUcaaA	256-274
11	NUUGAGAGAAGUCCACCAN	38	NUgUggacUUCUcUcaaN	256-274
12	AAUUGAGAGAAGUCCACCA	39	UggUggacUUCUcUcaaUU	257-275
13	UAUUGAGAGAAGUCCACCA	40	UggUggacUUCUcUcaaUA	257-275
14	AAUUGAGAGAAGUCCACCN	41	NggUggacUUCUcUcaaUU	257-275
15	UAUUGAGAGAAGUCCACCN	42	NggUggacUUCUcUcaaUA	257-275
16	NAUUGAGAGAAGUCCACCN	43	NggUggacUUCUcUcaaUN	257-275
17	AGAAAUAUUGAGAGAAGUCC	44	ggacUUCUcUcaaUUUUcU	261-279
18	UGAAAUAUUGAGAGAAGUCC	45	ggacUUCUcUcaaUUUUcA	261-279
19	AGAAAUAUUGAGAGAAGUCN	46	NgacUUCUcUcaaUUUUcU	261-279
20	UGAAAUAUUGAGAGAAGUCN	47	NgacUUCUcUcaaUUUUcA	261-279
21	NGAAAUAUUGAGAGAAGUCN	48	NgacUUCUcUcaaUUUUcN	261-279
22	ACCAAUUUUAGCCUACAGC	49	GcUgUaggcaUaaaUUggU	1780-1798
23	UCCA AUUUUAGCCUACAGC	50	GcUgUaggcaUaaaUUggA	1780-1798
24	ACCA AUUUUAGCCUACAGN	51	NcUgUaggcaUaaaUUggU	1780-1798
25	UCCA AUUUUAGCCUACAGN	52	NcUgUaggcaUaaaUUggA	1780-1798
26	NCCA AUUUUAGCCUACAGN	53	NcUgUaggcaUaaaUUggN	1780-1798
27	GACCA AUUUUAGCCUACAG	54	cUgUaggcaUaaaUUggUc	1781-1799
28	AACCA AUUUUAGCCUACAG	55	cUgUaggcaUaaaUUggUU	1781-1799
29	UACCA AUUUUAGCCUACAG	56	cUgUaggcaUaaaUUggUA	1781-1799
30	GACCA AUUUUAGCCUACAN	57	NUgUaggcaUaaaUUggUc	1781-1799
31	AACCA AUUUUAGCCUACAN	58	NUgUaggcaUaaaUUggUU	1781-1799
32	UACCA AUUUUAGCCUACAN	59	NUgUaggcaUaaaUUggUA	1781-1799
33	NACCA AUUUUAGCCUACAN	60	NUgUaggcaUaaaUUggUN	1781-1799

Кодирующие цепи и антисмысловые цепи агента РНКи против ВГВ, которые содержат или состоят из нуклеотидных последовательностей из табл. 2, могут быть модифицированными нуклеотидами или немодифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления агенты РНКи против ВГВ, имеющие последовательности кодирующей и антисмысловой цепей, которые содержат или состоят из нуклеотидных последовательностей из табл. 2, полностью или по существу полностью состоят из модифицированных нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента РНКи против ВГВ, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловой цепи, приведенных в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь агента РНКи против ВГВ, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей кодирующей цепи, приведенных в табл. 2.

Модифицированные последовательности антисмысловой цепи агента РНКи против ВГВ, а также их исходные немодифицированные последовательности представлены в табл. 3. Модифицированные последовательности кодирующей цепи агента РНКи против ВГВ, а также их исходные немодифицированные последовательности представлены в табл. 4. При формировании агентов РНКи против ВГВ каждый из нуклеотидов в каждой из немодифицированных последовательностей, перечисленных в табл. 3 и 4, может представлять собой модифицированный нуклеотид.

В настоящем документе (включая табл. 3 и 4) для обозначения модифицированных нуклеотидов, нацеливающих групп и связывающих групп используются следующие условные знаки. Как будет понятно среднему специалисту в данной области, если в последовательности не указано иное, мономеры, при наличии в олигонуклеотиде, взаимно соединены 5'-3'-фосфодиэфирными связями:

A = аденозин-3'-фосфат;  
 C = цитидин-3'-фосфат;  
 G = гуанозин-3'-фосфат;  
 U = уридин-3'-фосфат  
 n = любой 2'-ОМе-модифицированный нуклеотид  
 a = 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат  
 as = 2'-О-метиладенозин-3'-фосфоротиоат  
 c = 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат  
 cs = 2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат  
 g = 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат  
 gs = 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат  
 t = 2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат  
 ts = 2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат  
 и = 2'-О-метилуридин-3'-фосфат  
 us = 2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат  
 Nf = любой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид  
 Af = 2'-фтораденозин-3'-фосфат  
 Afs = 2'-фтораденозин-3'-фосфоротиоат  
 Cf = 2'-фторцитидин-3'-фосфат  
 Cfs = 2'-фторцитидин-3'-фосфоротиоат  
 Gf = 2'-фторгуанозин-3'-фосфат  
 Gfs = 2'-фторгуанозин-3'-фосфоротиоат  
 Tf = 2'-фтор-5'-метилуридин-3'-фосфат  
 Tfs = 2'-фтор-5'-метилуридин-3'-фосфоротиоат  
 Uf = 2'-фторуридин-3'-фосфат  
 Ufs = 2'-фторуридин-3'-фосфоротиоат  
 dN = любой 2'-дезоксирибонуклеотид  
 dT = 2'-дезокситимидин-3'-фосфат  
 N<sub>UNA</sub> = миметики 2',3'-секонуклеотидов (разблокированные нуклеотидные аналоги)  
 N<sub>LNA</sub> = заблокированный нуклеотид  
 Nf<sub>ANA</sub> = 2'-F-арабинонуклеотид  
 NM = 2'-метоксиэтилнуклеотид  
 AM = 2'-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат  
 AMs = 2'-метоксиэтиладенозин-3'-фосфоротиоат  
 TM = 2'-метоксиэтилтимидин-3'-фосфат  
 TMs = 2'-метоксиэтилтимидин-3'-фосфоротиоат  
 R = рибит  
 (invdN) = любой инвертированный дезоксирибонуклеотид (3'-3'-связанный нуклеотид)  
 (invAb) = инвертированный (3'-3'-связанный) лишенный азотистого основания дезоксирибонуклеотид, см. табл. 6  
 (invAb)s = инвертированный (3'-3'-связанный) лишенный азотистого основания дезоксирибонуклеотид-5'-фосфоротиоат, см. табл. 6  
 (invn) = любой инвертированный 2'-ОМе нуклеотид (3'-3'-связанный нуклеотид)  
 s = фосфоротиоатная связь  
 vpdN = винилфосфонатдезоксирибонуклеотид (5Me-Nf) = 5'-Me, 2'-фторнуклеотид  
 cPrp = циклопропилфосфонат, см. табл. 6  
 epTcPr = см. табл. 6  
 epTM = см. табл. 6

Среднему специалисту в данной области будет понятно, что концевой нуклеотид на 3'-конце данной олигонуклеотидной последовательности, как правило, будет иметь гидроксильную (-ОН) группу в соответствующем 3'-положении данного мономера вместо фосфатной группы *ex vivo*. Таким образом, например, как показано выше на изображении структуры AD05070, нуклеотид с модификацией g на 3'-конце антисмысловой цепи AM06606-AS имеет гидроксильную группу, расположенную в положении 3'. Если в настоящем документе прямо не указано иное, такое понимание среднего специалиста в данной области используется при описании агентов РНКи против ВГВ и композиций агентов РНКи против ВГВ, описанных в настоящем документе.

Нацеливающие группы и связывающие группы включают в себя следующие фрагменты, химиче-

ские структуры которых приведены ниже в табл. 6: (PAZ), (NAG13), (NAG13)s, (NAG18), (NAG18)s, (NAG24), (NAG24)s, (NAG25), (NAG25)s, (NAG26), (NAG26)s, (NAG27), (NAG27)s, (NAG28), (NAG28)s, (NAG29), (NAG29)s, (NAG30), (NAG30)s, (NAG31), (NAG31)s, (NAG32), (NAG32)s, (NAG33), (NAG33)s, (NAG34), (NAG34)s, (NAG35), (NAG35)s, (NAG36), (NAG36)s, (NAG37), (NAG37)s, (NAG38), (NAG38)s, (NAG39), (NAG39)s. Каждая кодирующая цепь и/или антисмысловая цепь может иметь любые нацеливающие группы или связывающие группы, перечисленные ниже, а также другие нацеливающие или связывающие группы, конъюгированные с 5'- и/или 3'-концом последовательности.

Таблица 3. Последовательности антисмысловой цепи агента РНКи против ВГВ

Идентификатор антисмысловой цепи	Модифицированная последовательность (5' → 3')	SEQ ID NO:	Немодифицированная последовательность (5' → 3')	SEQ ID NO:
AM03508-AS	usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfccsu suAu	61	UACCAAUUUAUGCCUACAGGCCUUUAU	149
AM04441-AS	usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfcsclu	62	UACCAAUUUAUGCCUACAGGCCU	150
AM04442-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfccclu	63	UACCAAUUUAUGCCUACAGGCCU	150
AM04443-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfsc	64	UACCAAUUUAUGCCUACAGGC	151
AM04661-AS	usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu	65	UGUGAAGCGAAGUGCACACUU	152
AM04768-AS	usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfcsuscgc	66	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUCCGC	153
AM04769-AS	vpusAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfcsuscgc	67	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUCCGC	153
AM05011-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu	68	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05012-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfggsc	69	UACCAAUUUAUGCCUACAGGC	151
AM05013-AS	vpusAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfsc	70	UACCAAUUUAUGCCUACAGGC	151
AM05014-AS	vpusAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu	71	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05052-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfssa	72	AUUGAGAGAAGUCCACCACGA	155
AM05053-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcgsa	73	AUUGAGAGAAGUCCACCACGA	155
AM05054-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcusu	74	AUUGAGAGAAGUCCACCACUU	156
AM05055-AS	vpusUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfssa	75	UUUGAGAGAAGUCCACCACGA	157
AM05056-AS	asAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	76	AAUUGAGAGAAGUCCACCACG	158
AM05057-AS	asAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfacsg	77	AAUUGAGAGAAGUCCACCACG	158
AM05058-AS	asAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfausu	78	AAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	159
AM05060-AS	vpusAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	79	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05351-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfusu	80	UACCAAUUUAUGCCUACAGGU	161
AM05608-AS	usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgsusu	81	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05609-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc	82	UACCAAUUUAUGCCUACAGCC	162
AM05610-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgccusu	83	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUU	163
AM05611-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgccusc	84	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUC	164
AM05612-AS	usAfscscaauUfuAfuGfcCfuacagcsc	85	UACCAAUUUAUGCCUACAGCC	162
AM05613-AS	usAfscscaauUfuAfuGfcCfuacagccusu	86	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUU	163
AM05614-AS	usAfscscaauUfuAfuGfcCfuacagccusc	87	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUC	164
AM05618-AS	asUfsusgagaGfaAfgUfcCfaccacusu	88	AUUGAGAGAAGUCCACCACUU	156
AM05621-AS	usUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcusu	89	UUUGAGAGAAGUCCACCACUU	165
AM05623-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcggsusu	90	AUUGAGAGAAGUCCACCAGGUU	166
AM05626-AS	asUfsusgagaGfaAfgUfcCfaccacggsusu	91	AUUGAGAGAAGUCCACCAGGUU	166
AM05628-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcgagsu	92	AUUGAGAGAAGUCCACCACGAGU	167
AM05631-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	93	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05632-AS	usAfsusugagAfgAfaGfuCfcaccacsg	94	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05633-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsgusu	95	UAUUGAGAGAAGUCCACCAGGUU	168
AM05634-AS	usAfsusugagAfgAfaGfuCfcaccacgasg	96	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	169
AM05635-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsgasg	97	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	169
AM05637-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsgasa	98	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	170
AM05638-AS	usAfsusugagAfgAfaGfuCfcaccacgsa	99	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	170
AM05747-AS	asGfsasAfaAfuugagAfgAfaGfuCfcAfc	100	AGAAAUUUAUGAGAAAGUCCAC	171
AM05849-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgusu	101	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05850-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgcsc	102	UACCAAUUUAUGCCUACAGCC	162
AM05851-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgcusu	103	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	172
AM05852-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccsu	104	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCU	173
AM05853-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccusu	105	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUU	163
AM05854-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccusc	106	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUC	164
AM05855-AS	cPrpusAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu	107	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	154

AM05860-AS	cPrpusAfsusUfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	108	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05862-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfausu	109	UAUUGAGAGAAGUCCACCAUU	174
AM05863-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacsg	110	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05864-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacssu	111	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM05865-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacsgsa	112	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	170
AM05867-AS	vpusAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfaCfsg	113	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05873-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfcAfcusu	114	UUUGAGAGAAGUCCACCACUU	165
AM05874-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfcAfcgsa	115	UUUGAGAGAAGUCCACCACGA	157
AM05875-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfcAfcgusu	116	UUUGAGAGAAGUCCACCACGUU	176
AM05876-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfcAfcgag	117	UUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	177
AM05877-AS	cPrpusUfsusGfaGfaGfaUfgUfcCfaCfcAfcusu	118	UUUGAGAGAAGUCCACCACUU	165
AM06074-AS	cPrpusAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacssu	119	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06142-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacusu	120	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06143-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacgusu	121	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGUU	168
AM06144-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacuus (invAb)	122	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06145-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacgag	123	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	169
AM06222-AS	usAfsusUfgAfgAfaGfuCfcAfcCfacusu	124	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06281-AS	asGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcusu	125	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCUU	178
AM06282-AS	asGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcasc	126	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCAC	171
AM06283-AS	asGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcacusu	127	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCACUU	179
AM06284-AS	asGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcacsc	128	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCACC	180
AM06285-AS	usGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcusu	129	UGAAAAUUGAGAGAAGUCCUU	152
AM06286-AS	asGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcasc	130	UGAAAAUUGAGAGAAGUCCAC	181
AM06299-AS	asCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcusu	131	ACCAAUUUUGCCUACAGCUU	182
AM06300-AS	asCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccusu	132	ACCAAUUUUGCCUACAGCCUU	183
AM06301-AS	asCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccusc	133	ACCAAUUUUGCCUACAGCCUC	184
AM06302-AS	usCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccusu	134	UCCAAUUUUGCCUACAGCUU	185
AM06303-AS	usCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccusu	135	UCCAAUUUUGCCUACAGCCUU	186
AM06463-AS	cPrpusAfsusCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc	136	UACCAAUUUUGCCUACAGCC	162
AM06464-AS	usAfsusCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc	137	UACCAAUUUUGCCUACAGCC	162
AM06465-AS	cPrpusAfsusCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgscsc	138	UACCAAUUUUGCCUACAGCC	162
AM06604-AS	usAfsusCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsu	139	UACCAAUUUUGCCUACAGCU	187
AM06606-AS	usAfsusCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsg	140	UACCAAUUUUGCCUACAGCG	188
AM06608-AS	asAfsusCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc	141	AACCAAUUUUGCCUACAGCC	189
AM06611-AS	usAfsusCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu	142	UACCAAUUUUGCCUACAGUU	154
AM06612-AS	usAfsusCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfsc	143	UACCAAUUUUGCCUACAGCC	162
AM06614-AS	asCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcCfsu	144	ACCAAUUUUGCCUACAGCCU	190
AM06616-AS	usCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcCfsu	145	UCCAAUUUUGCCUACAGCCU	191
AM06618-AS	asCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccsg	146	ACCAAUUUUGCCUACAGCCG	192
AM06620-AS	usCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccsg	147	UCCAAUUUUGCCUACAGCCG	193
AM06751-AS	usAfsusCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfggsg	148	UACCAAUUUUGCCUACAGGG	194

Таблица 4. Последовательности кодирующей цепи агента РНК против ВГВ

Идентификатор цепи	Модифицированная последовательность (5' → 3')	SEQ ID NO:	Немодифицированная последовательность (5' → 3')	SEQ ID NO:
AM04444-SS	(NAG25) usgscucguagGfCfAfuaaaugguauus (invdT)	195	UUGCCUGUAGGCAUAAAUGGUAUT	275
AM04445-SS	(NAG25) uaausgscucguagGfCfAfuaaauggu (invdA)	196	UAUAUGCCUGUAGGCAUAAAUGGUA	276
AM04767-SS	(NAG25) gcgagsgcucguagGfCfAfuaaaugguTM (invdA)	197	GCGGAGGCGUAGGCAUAAAUGGTA	277
AM05010-SS	(NAG25) scsugagGfCfAfuaaaugguauus (invAb)	198	CUGUAGGCAUAAAUGGUAAU	278
AM05015-SS	(NAG25) sgscucguagGfCfAfuaaaugguas (invAb)	199	GCCUGUAGGCAUAAAUGGUA	279
AM05016-SS	(NAG25) sgscucguagGfCfAfuaaauggus (invdA)	200	GCCUGUAGGCAUAAAUGGUA	279
AM05017-SS	(NAG25) sgscucguagGfCfAfuaaaugguAMs (invAb)	201	GCCUGUAGGCAUAAAUGGUA	279
AM05018-SS	(NAG25) sgscucguagGfCfAfuaaaugguTMAMs (invAb)	202	GCCUGUAGGCAUAAAUGGTA	280



AM05019-SS	(NAG25) sasacuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	203	AACUGUAGGCAUAAAUGGUA	281
AM05034-SS	(NAG25) suscguaggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	204	UCGUGGUGGACUUCUCUCAU	282
AM05046-SS	(NAG25) sasaguggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	205	AAGUGGUGGACUUCUCUCAU	283
AM05047-SS	(NAG25) suscguaggGfAfCfuucucucaAMTMs (invAb)	206	UCGUGGUGGACUUCUCUCAAT	284
AM05048-SS	(NAG25) scsguggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	207	CGUGGUGGACUUCUCUCAUU	285
AM05049-SS	(NAG25) sasauggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	208	AAUGGUGGACUUCUCUCAUU	286
AM05050-SS	(NAG25) scsguggGfAfCfuucucucaaTMTMs (invAb)	209	CGUGGUGGACUUCUCUCAATT	287
AM05051-SS	(NAG25) ssggacuucCfUfCfaauuuucaas (invAb)	210	GGACUUCUCUCAAUUUCUCAA	288
AM05063-SS	(NAG25) scsguggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	211	CGUGGUGGACUUCUCUCAUA	289
AM05064-SS	(NAG25) suscguaggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	212	UCGUGGUGGACUUCUCUCAAA	290
AM05346-SS	(NAG31) sasccuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	213	ACCUGUAGGCAUAAAUGGUA	291
AM05347-SS	(NAG31) s (invAb) scuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	214	CUGUAGGCAUAAAUGGUA	292
AM05606-SS	(NAG25) s (invAb) scuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	215	CUGUAGGCAUAAAUGGUA	292
AM05607-SS	(NAG37) s (invAb) scuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	216	CUGUAGGCAUAAAUGGUA	292
AM05615-SS	(NAG25) s (invAb) sacuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	217	ACUGUAGGCAUAAAUGGUA	293
AM05616-SS	(NAG25) ssggcuuagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	218	GGCUGUAGGCAUAAAUGGUA	294
AM05617-SS	(NAG37) sasaguggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	219	AAGUGGUGGACUUCUCUCAU	283
AM05620-SS	(NAG25) sasaguggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	220	AAGUGGUGGACUUCUCUCAAA	295
AM05622-SS	(NAG25) scsguggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	221	CCGUGGUGGACUUCUCUCAU	296
AM05624-SS	(NAG25) s (invAb) scguggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	222	CCGUGGUGGACUUCUCUCAU	296
AM05627-SS	(NAG25) scsucguggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	223	CUCGUGGUGGACUUCUCUCAU	297
AM05629-SS	(NAG25) s (invAb) sguggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	224	GUGgUggacUUCUcUcaaU	298
AM05630-SS	(NAG25) s (invAb) sguggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	225	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	299
AM05636-SS	(NAG25) suscguaggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	226	UCGUGGUGGACUUCUCUCAUU	300
AM05639-SS	(NAG25) s (invAb) suggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	227	UggUggacUUCUcUcaaUU	301
AM05640-SS	(NAG37) s (invAb) suggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	228	UggUggacUUCUcUcaaUU	301
AM05746-SS	(NAG25) ssggacuucCfUfCfucaauuuucus (invAb)	229	GUGGACUUCUCUCAAUUUCU	302
AM05856-SS	(NAG25) s (invAb) scuguagGfCfAfuaaaauugguausu (invAb)	230	CUGUAGGCAUAAAUGGUAUU	278
AM05857-SS	(NAG25) s (invAb) sgcuguagGfCfAfuaaaauugguausu (invAb)	231	GCUGUAGGCAUAAAUGGUAUU	303
AM05858-SS	(NAG25) s (invAb) sggcuuagGfCfAfuaaaauugguausu (invAb)	232	GGCUGUAGGCAUAAAUGGUAUU	304
AM05859-SS	(NAG25) s (invAb) saacuguagGfCfAfuaaaauugguausu (invAb)	233	AACUGUAGGCAUAAAUGGUAUU	305
AM05868-SS	(NAG25) s (invAb) uggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	234	UGGUGGACUUCUCUCAUUU	306
AM05869-SS	(NAG25) s (invAb) sguggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	235	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	307
AM05870-SS	(NAG25) sasauggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	236	AAUGGUGGACUUCUCUCAUUU	308
AM05871-SS	(NAG25) scsguggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	237	CGUGGUGGACUUCUCUCAUUU	309
AM05872-SS	(NAG31) scsguggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	238	CGUGGUGGACUUCUCUCAUA	289
AM05879-SS	(NAG25) s (invAb) saaguggGfAfCfuucucucaaus (invAb)	239	AAGUGGUGGACUUCUCUCAU	283
AM05880-SS	(NAG25) s (invAb) sguggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	240	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	310
AM05881-SS	(NAG25) s (invAb) scguggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	241	CGUGGUGGACUUCUCUCAUUU	311
AM05882-SS	(NAG25) sasaguggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	242	AAGUGGUGGACUUCUCUCAUUU	312
AM05883-SS	(NAG25) suscguaggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	243	UCGUGGUGGACUUCUCUCAUUU	313
AM06146-SS	(NAG37) s (invAb) sguggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	244	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	307
AM06147-SS	(NAG37) s (invAb) scguggGfAfCfuucucucaauusu (invAb)	245	CGUGGUGGACUUCUCUCAUUU	309

	(invAb)		
AM06148-SS	(NAG37) s (invAb) scucgugguggAfCfUfucucucaauas (invAb)	246	CUCGUGGUGGACUUCUCUCAUA 314
AM06149-SS	(NAG37) s (invAb) scucgugguggAfCfUfucucucaauau su (invAb)	247	CUCGUGGUGGACUUCUCUCAUAUU 315
AM06150-SS	(NAG37) s (invAb) sggcuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	248	GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA 294
AM06151-SS	(NAG37) s (invAb) sgaggcuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	249	GAGGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA 316
AM06152-SS	(NAG37) s (invAb) sgaggcuguagGfCfAfuaaaauugguau su (invAb)	250	GAGGCUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU 317
AM06287-SS	(NAG37) s (invAb) sggacuuCfUfCfuaaaauuucus (invAb)	251	GGACUUCUCUCAUUUUUCU 318
AM06288-SS	(NAG37) s (invAb) sgggacuuCfUfCfuaaaauuucus (invAb)	252	GUGGACUUCUCUCAUUUUUCU 302
AM06289-SS	(NAG37) s (invAb) sgggacuuCfUfCfuaaaauuucus (invAb)	253	GGUGGACUUCUCUCAUUUUUCU 319
AM06290-SS	(NAG37) s (invAb) sggacuuCfUfCfuaaaauucas (invAb)	254	GGACUUCUCUCAUUUUUCA 320
AM06291-SS	(NAG37) s (invAb) sgggacuuCfUfCfuaaaauucas (invAb)	255	GUGGACUUCUCUCAUUUUUCA 321
AM06304-SS	(NAG37) s (invAb) sgcuguaGfGfCfuaaaauuggus (invAb)	256	GcUgUaggcaUaaaUUggU 322
AM06305-SS	(NAG37) s (invAb) sggcuguaGfGfCfuaaaauuggus (invAb)	257	GGCUGUAGGCAUAAAUUGGU 323
AM06306-SS	(NAG37) s (invAb) sgaggcuguaGfGfCfuaaaauuggus (invAb)	258	GAGGCUGUAGGCAUAAAUUGGU 324
AM06307-SS	(NAG37) s (invAb) sgcuguaGfGfCfuaaaauuggas (invAb)	259	GCUGUAGGCAUAAAUUGGA 325
AM06308-SS	(NAG37) s (invAb) sggcuguaGfGfCfuaaaauuggas (invAb)	260	GGCUGUAGGCAUAAAUUGGA 326
AM06603-SS	(NAG37) s (invAb) sagcuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	261	AGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA 327
AM06605-SS	(NAG37) s (invAb) scgcuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	262	CGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA 328
AM06607-SS	(NAG37) s (invAb) sggcuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	263	GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUU 329
AM06609-SS	(NAG37) s (invAb) scuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	264	CUGUAGGCAUAAAUUGGUUU 278
AM06610-SS	(NAG37) s (invAb) scuGfuAfgGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	265	CUGUAGGCAUAAAUUGGUUU 278
AM06613-SS	(NAG37) s (invAb) sagcuguagGfGfCfuaaaauuggus (invAb)	266	AGGCUGUAGGCAUAAAUUGGU 330
AM06615-SS	(NAG37) s (invAb) sagcuguagGfGfCfuaaaauuggas (invAb)	267	AGGCUGUAGGCAUAAAUUGGA 331
AM06617-SS	(NAG37) s (invAb) scggcuguagGfGfCfuaaaauuggus (invAb)	268	CGGCUGUAGGCAUAAAUUGGU 332
AM06619-SS	(NAG37) s (invAb) scggcuguagGfGfCfuaaaauuggas (invAb)	269	CGGCUGUAGGCAUAAAUUGGA 333
AM06750-SS	(NAG37) s (invAb) scccguguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	270	CCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA 334
AM06752-SS	(NAG37) csgcuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	271	CGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA 328
AM06753-SS	(NAG37) csccguguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	272	CCCGUGUAGGCAUAAAUUGGUA 334
AM06776-SS	(NAG25) s (invAb) sgggacuuCfUfCfuaaaauuucus (invAb)	273	GUGGACUUCUCUCAUUUUUCU 302
AM06777-SS	(NAG25) s (invAb) scgcuguagGfCfAfuaaaauugguas (invAb)	274	CGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA 328

Агенты РНК против ВГВ, описанные в настоящем документе, образуются путем соединения анти-смысловой цепи с кодирующей цепью. Кодирующая цепь, содержащая последовательность, приведенную в табл. 4, может быть гибридизирована с любой антисмысловой цепью, содержащей последовательность, приведенную в табл. 3, при условии что две последовательности имеют область, на по меньшей мере около 85% комплементарную непрерывной нуклеотидной последовательности из 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента РНК против ВГВ, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловой цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь агента РНК против ВГВ, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей кодирующей цепи, приведенных в табл. 4.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента РНК против ВГВ содержит любую из нуклеотидных последовательностей, представленных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента РНК против ВГВ содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца → к 3'-концу) 1-17, 2-17, 1-18, 2-18, 1-19, 2-19, 1-20, 2-20, 1-21, 2-21, 1-22, 2-22, 1-23, 2-23, 1-24, 2-24, 1-25, 2-25, 1-26 или 2-26 любой из последовательностей, представленных в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь агента РНК против ВГВ содержит любую из нуклеотидных последовательностей, представленных в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь агента РНК против ВГВ содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца → к 3'-концу) 1-17, 2-17, 3-17, 4-17, 1-18, 2-18, 3-18, 4-18, 1-19, 2-19, 3-19, 4-19, 1-20, 2-20, 3-20, 4-20, 1-21, 2-21, 3-21, 4-21, 1-22, 2-22, 3-22, 4-22, 1-23, 2-23, 3-23, 4-23, 1-24, 2-24, 3-24, 4-24, 1-25, 2-25, 3-

25, 4-25, 1-26, 2-26, 3-26 или 4-26 любой из последовательностей, представленных в табл. 4.

В отношении агентов РНКи против ВГВ, описанных в настоящем документе, нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (от 5'-конца → к 3'-концу) может быть абсолютно комплементарным гену ВГВ или может быть не комплементарным гену ВГВ. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (от 5'-конца → к 3'-концу) представляет собой U, A или dT. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (от 5'-конца → к 3'-концу) формирует с кодирующей цепью пару оснований A:U или U:A.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента РНКи против ВГВ содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца → к 3'-концу) 2-18 или 2-19 любой из последовательностей антисмысловой цепи из табл. 3. В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь агента РНКи против ВГВ содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца → к 3'-концу) 1-17 или 1-18 любой из последовательностей кодирующей цепи из табл. 4.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ включает в себя (i) антисмысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидов (от 5'-конца → к 3'-концу) 2-18 или 2-19 любой из последовательностей антисмысловой цепи из таблицы 3, и (ii) кодирующую цепь, содержащую последовательность нуклеотидов (от 5'-конца → к 3'-концу) 1-17 или 1-18 любой из последовательностей кодирующей цепи из табл. 4.

Кодирующая цепь, содержащая последовательность, приведенную в табл. 4, может быть гибридизирована с любой антисмысловой цепью, содержащей последовательность, приведенную в табл. 3, при условии что две последовательности имеют область, на по меньшей мере около 85% комплементарную непрерывной нуклеотидной последовательности из 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотида. Примеры спаренных последовательностей, обозначенных идентификационными номерами дуплексов, показаны в табл. 5.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит любой из дуплексов с идентификационными номерами, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ состоит из любого из дуплексов с идентификационными номерами, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит нуклеотидные последовательности кодирующей цепи и/или антисмысловой цепи любого из дуплексов с идентификационными номерами, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит нуклеотидные последовательности кодирующей цепи и антисмысловой цепи любого из дуплексов с идентификационными номерами, представленных в настоящем документе, и нацеливающую группу и/или связывающую группу, причем нацеливающая группа и/или связывающая группа ковалентно связана (т.е. конъюгирована) с кодирующей цепью или антисмысловой цепью. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит модифицированные нуклеотидные последовательности кодирующей цепи и антисмысловой цепи любого из дуплексов с идентификационными номерами, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит модифицированные нуклеотидные последовательности кодирующей цепи и антисмысловой цепи любого из дуплексов с идентификационными номерами, представленных в настоящем документе, и нацеливающую группу и/или связывающую группу, причем нацеливающая группа и/или связывающая группа ковалентно связана с кодирующей цепью или антисмысловой цепью.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь и кодирующую цепь, имеющие нуклеотидные последовательности любого из дуплексов антисмысловая цепь/кодирующая цепь из табл. 5, и дополнительно содержит нацеливающую группу, представляющую собой лиганд асиалогликопротеинового рецептора.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь и кодирующую цепь, имеющие любую из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи и/или кодирующей цепи любого из дуплексов из табл. 5, и дополнительно содержит нацеливающую группу, выбранную из группы, состоящей из (PAZ), (NAG13), (NAG13)s, (NAG18), (NAG18)s, (NAG24), (NAG24)s, (NAG25), (NAG25)s, (NAG26), (NAG26)s, (NAG27), (NAG27)s, (NAG28), (NAG28)s, (NAG29), (NAG29)s, (NAG30), (NAG30)s, (NAG31), (NAG31)s, (NAG32), (NAG32)s, (NAG33), (NAG33)s, (NAG34), (NAG34)s, (NAG35), (NAG35)s, (NAG36), (NAG36)s, (NAG37), (NAG37)s.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь и кодирующую цепь, имеющие модифицированные нуклеотидные последовательности любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи и/или кодирующей цепи любого из дуплексов из табл. 5.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит антисмысловую цепь и кодирующую цепь, имеющие модифицированные нуклеотидные последовательности любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи и/или кодирующей цепи любого из дуплексов из табл. 5, и дополнительно содержит нацеливающую группу, представляющую собой лиганд асиалогликопротеинового рецептора.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит любой из дуплексов из табл. 5.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ состоит из любого из дуплексов из табл. 5.

Таблица 5. Примеры дуплексов агента РНКи против ВГВ

Идентификатор дуплекса	Идентификатор антисмысловой цепи	Идентификатор кодирующей цепи	Идентификатор дуплекса	Идентификатор антисмысловой цепи	Идентификатор кодирующей цепи
AD03498	AM03508-AS	AM04445-SS	AD04426	AM05623-AS	AM05622-SS
AD03499	AM04441-AS	AM04444-SS	AD04427	AM05623-AS	AM05624-SS
AD03500	AM04442-AS	AM04444-SS	AD04428	AM05626-AS	AM05622-SS
AD03501	AM04443-AS	AM04444-SS	AD04429	AM05626-AS	AM05624-SS
AD03738	AM04768-AS	AM04767-SS	AD04430	AM05628-AS	AM05627-SS
AD03739	AM04769-AS	AM04767-SS	AD04431	AM05054-AS	AM05629-SS
AD03967	AM04443-AS	AM05010-SS	AD04432	AM05054-AS	AM05630-SS
AD03968	AM05011-AS	AM05010-SS	AD04433	AM05631-AS	AM05048-SS
AD03969	AM04443-AS	AM05015-SS	AD04434	AM05632-AS	AM05048-SS
AD03970	AM05011-AS	AM05019-SS	AD04435	AM05633-AS	AM05048-SS
AD03971	AM05012-AS	AM05015-SS	AD04436	AM05635-AS	AM05048-SS
AD03972	AM04443-AS	AM05016-SS	AD04437	AM05634-AS	AM05048-SS
AD03973	AM04443-AS	AM05017-SS	AD04438	AM05637-AS	AM05636-SS
AD03974	AM04443-AS	AM05018-SS	AD04439	AM05638-AS	AM05636-SS
AD03975	AM05013-AS	AM05015-SS	AD04440	AM05058-AS	AM05639-SS
AD03976	AM05014-AS	AM05019-SS	AD04441	AM05057-AS	AM05639-SS
AD03977	AM05013-AS	AM05017-SS	AD04442	AM05057-AS	AM05640-SS
AD03978	AM05013-AS	AM04444-SS	AD04511	AM05747-AS	AM05746-SS
AD04001	AM05052-AS	AM05034-SS	AD04570	AM05011-AS	AM05856-SS

AD04002	AM05053-AS	AM05034-SS	AD04571	AM05849-AS	AM05856-SS
AD04003	AM05054-AS	AM05046-SS	AD04572	AM05850-AS	AM05856-SS
AD04004	AM05052-AS	AM05047-SS	AD04573	AM05851-AS	AM05857-SS
AD04005	AM05055-AS	AM05064-SS	AD04574	AM05852-AS	AM05857-SS
AD04006	AM05056-AS	AM05048-SS	AD04575	AM05853-AS	AM05858-SS
AD04007	AM05057-AS	AM05048-SS	AD04576	AM05854-AS	AM05858-SS
AD04008	AM05058-AS	AM05049-SS	AD04577	AM05011-AS	AM05859-SS
AD04009	AM05056-AS	AM05050-SS	AD04578	AM05850-AS	AM05858-SS
AD04010	AM05060-AS	AM05063-SS	AD04579	AM05014-AS	AM05347-SS
AD04176	AM05351-AS	AM05346-SS	AD04580	AM05855-AS	AM05347-SS
AD04177	AM04443-AS	AM05347-SS	AD04581	AM05860-AS	AM05063-SS
AD04178	AM05011-AS	AM05347-SS	AD04583	AM05862-AS	AM05868-SS
AD04412	AM05011-AS	AM05606-SS	AD04584	AM05863-AS	AM05868-SS
AD04413	AM05011-AS	AM05607-SS	AD04585	AM05864-AS	AM05869-SS
AD04414	AM05608-AS	AM05606-SS	AD04586	AM05865-AS	AM05869-SS
AD04415	AM05011-AS	AM05615-SS	AD04587	AM05862-AS	AM05870-SS
AD04416	AM05609-AS	AM05616-SS	AD04588	AM05863-AS	AM05871-SS
AD04417	AM05610-AS	AM05616-SS	AD04590	AM05867-AS	AM05063-SS
AD04418	AM05611-AS	AM05616-SS	AD04591	AM05860-AS	AM05872-SS
AD04419	AM05612-AS	AM05616-SS	AD04592	AM05054-AS	AM05879-SS
AD04420	AM05613-AS	AM05616-SS	AD04593	AM05873-AS	AM05880-SS
AD04421	AM05614-AS	AM05616-SS	AD04594	AM05874-AS	AM05880-SS
AD04422	AM05054-AS	AM05617-SS	AD04595	AM05875-AS	AM05881-SS
AD04423	AM05618-AS	AM05046-SS	AD04596	AM05876-AS	AM05881-SS
AD04425	AM05621-AS	AM05620-SS	AD04597	AM05873-AS	AM05882-SS
	<b>Идентификат</b>				
	<b>ор</b>				
<b>Идентификат</b>	<b>ор</b>	<b>Идентификат</b>			
<b>ор дуплекса</b>	<b>антисмыслов</b>	<b>кодирующей</b>			
	<b>ой цепи</b>				
AD04598	AM05874-AS	AM05883-SS			
AD04599	AM05877-AS	AM05620-SS			
AD04734	AM06074-AS	AM05869-SS			
AD04771	AM06142-AS	AM06146-SS			
AD04772	AM06143-AS	AM06147-SS			
AD04773	AM06144-AS	AM06146-SS			
AD04774	AM06145-AS	AM06148-SS			
AD04775	AM06145-AS	AM06149-SS			
AD04776	AM05850-AS	AM06150-SS			
AD04777	AM05854-AS	AM06151-SS			
AD04778	AM05854-AS	AM06152-SS			
AD04822	AM06222-AS	AM06146-SS			
AD04823	AM05609-AS	AM06150-SS			
AD04871	AM06281-AS	AM06287-SS			
AD04872	AM06282-AS	AM06288-SS			
AD04873	AM06283-AS	AM06288-SS			
AD04874	AM06284-AS	AM06289-SS			
AD04875	AM06285-AS	AM06290-SS			
AD04876	AM06286-AS	AM06291-SS			
AD04881	AM06299-AS	AM06304-SS			
AD04882	AM06300-AS	AM06305-SS			
AD04883	AM06301-AS	AM06306-SS			
AD04884	AM06302-AS	AM06307-SS			
AD04885	AM06303-AS	AM06308-SS			
AD04962	AM05864-AS	AM06146-SS			
AD04963	AM05855-AS	AM05607-SS			
AD04981	AM06463-AS	AM06150-SS			
AD04982	AM06464-AS	AM06150-SS			
AD04983	AM06465-AS	AM06150-SS			
AD05069	AM06604-AS	AM06603-SS			
AD05070	AM06606-AS	AM06605-SS			
AD05071	AM06608-AS	AM06607-SS			
AD05072	AM05011-AS	AM06609-SS			
AD05073	AM06611-AS	AM06610-SS			
AD05074	AM06612-AS	AM06150-SS			
AD05075	AM06614-AS	AM06613-SS			
AD05076	AM06616-AS	AM06615-SS			
AD05077	AM06618-AS	AM06617-SS			
AD05078	AM06620-AS	AM06619-SS			
AD05147	AM06751-AS	AM06750-SS			
AD05148	AM06606-AS	AM06752-SS			
AD05149	AM06751-AS	AM06753-SS			
AD05164	AM06282-AS	AM06776-SS			
AD05165	AM06606-AS	AM06777-SS			

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ получают или предлагают в виде соли, смешанной соли или свободной кислоты. Агенты РНКи, описанные в настоящем документе, при доставке в клетку, экспрессирующую ген ВГВ, ингибируют или уменьшают экспрессию одного или более генов ВГВ *in vivo*.

#### **Нацеливающие группы, связывающие группы и доставляющие несущие среды**

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ конъюгирован с одной или более нуклеотидными группами, включая, без ограничений, нацеливающую группу, связывающую группу, доставляющий полимер или доставляющую несущую среду. Нуклеотидная группа может усиливать нацеливание, доставку или присоединение агента РНКи. Примеры нацеливающих групп и связывающих групп представлены в таблице б. Нуклеотидная группа может быть ковалентно связана с 3'- и/или 5'-

концом любой из кодирующей цепи и/или антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи против ВГВ содержит нуклеотидную группу, связанную с 3'- и/или 5'-концом кодирующей цепи. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа связана с 5'-концом кодирующей цепи агента РНКи против ВГВ. Нуклеотидная группа может быть напрямую или опосредованно связана с агентом РНКи посредством линкера/связывающей группы. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа связана с агентом РНКи посредством неустойчивой, расщепляемой или обратной связи или линкера.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа усиливает фармакокинетические или биораспределительные свойства агента или конъюгата РНКи, к которому она присоединена, для повышения клеточно- или тканеспецифического распределения и клеточноспецифического захвата конъюгата. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа усиливает эндоцитоз агента РНКи.

Нацеливающие группы или нацеливающие фрагменты усиливают фармакокинетические или биораспределительные свойства конъюгата, к которым они присоединены, для улучшения клеточноспецифического распределения и клеточноспецифического захвата конъюгата. Нацеливающая группа может быть одновалентной, двухвалентной, трехвалентной, четырехвалентной или иметь более высокую валентность. Типичные нацеливающие группы включают в себя, без ограничений, соединения с аффинностью к молекуле клеточной поверхности, лиганды клеточных рецепторов, гаптен, антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител и миметики антител с аффинностью к молекулам клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа связана с агентом РНКи с помощью линкера, такого как ПЭГ линкер или одна, две или три лишенные азотистого основания и/или рибитные (лишенная азотистого основания рибоза) группы. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа содержит кластер производных галактозы.

Агенты РНКи против ВГВ, описанные в настоящем документе, могут быть синтезированы с наличием реакционноспособной группы, такой как аминогруппа, на 5'-конце. Реакционноспособная группа может применяться для последующего присоединения нацеливающего фрагмента с использованием способов, типичных для данной области.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа содержит лиганд асиалогликопротеинового рецептора. В некоторых вариантах осуществления лиганд асиалогликопротеинового рецептора включает в себя или состоит из одного или более производных галактозы. При использовании в настоящем документе термин "производное галактозы" включает галактозу и производные галактозы, имеющие аффинность к асиалогликопротеиновому рецептору, равную или превышающую аффинность галактозы. Примеры производного галактозы включают, без ограничений: галактозу, галактозамин, N-формилгалактозамин, N-ацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-н-бутаноилгалактозамин и N-изобутаноилгалактозамин (см., например: Iobst, S.T. and Drickamer, K. J.B.C. 1996, 271, 6686). В данной области известны производные галактозы и кластеры производных галактозы, которые можно использовать для нацеливания *in vivo* олигонуклеотидов и других молекул в отношении печени (см., например, Baenziger and Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 939-945). Производные галактозы применяли для нацеливания молекул на гепатоциты *in vivo* посредством их связывания с асиалогликопротеиновым рецептором (ASGPr), экспрессированным на поверхности гепатоцитов. Связывание лигандов ASGPr с ASGPr(s) способствует клеточноспецифичному нацеливанию на гепатоциты и эндоцитозу молекулы в гепатоциты. Лиганды ASGPr могут быть мономерными (например, иметь одно производное галактозы) или мультимерными (например, иметь множество производных галактозы). Производное галактозы или кластер производных галактозы может быть присоединен к 3'-концу или 5'-концу полинуклеотида РНКи с помощью способов, известных в данной области. Получение нацеливающих групп, таких как кластеры производных галактозы, описано, например, в заявках на патент США № 15/452,324 и 15/452,423, содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

В настоящем документе кластер производных галактозы содержит молекулу, имеющую от двух до четырех концевых производных галактозы. Терминальное производное галактозы присоединено к молекуле посредством своего атома углерода C-1. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы представляет собой тример производного галактозы (также называемый трехантенным производным галактозы или трехвалентным производным галактозы). В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы содержит N-ацетилгалактозамин. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы содержит три N-ацетилгалактозамин. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы представляет собой тетрамер производного галактозы (также называемый четырехантенным производным галактозы или четырехвалентным производным галактозы). В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы содержит четыре N-ацетилгалактозамин.

В настоящем документе тример производного галактозы содержит три производных галактозы, каждое из которых связано с центральной точкой ветвления. В настоящем документе тетрамер производного галактозы содержит четыре производных галактозы, каждое из которых связано с центральной точкой ветвления. Производные галактозы могут быть присоединены к центральной точке ветвления посред-

вом атомов углерода C-1 сахаридов. В некоторых вариантах осуществления производные галактозы связаны с точкой ветвления посредством линкеров или спейсеров. В некоторых вариантах осуществления линкер или спейсер представляет собой гибкий гидрофильный спейсер, такой как ПЭГ-группа (см., например, патент США № 5,885,968; Biessen et al. J. Med. Chem. 1995 Vol. 39 p. 1538-1546). В некоторых вариантах осуществления ПЭГ спейсер представляет собой ПЭГ<sub>3</sub> спейсер. Точка ветвления может представлять собой любую малую молекулу, которая позволяет присоединить три производных галактозы и дополнительно позволяет присоединить точку ветвления к агенту РНКи. Примером группы точек ветвления является дилизин или диглутамат. Присоединение точки ветвления к агенту РНКи может осуществляться посредством линкера или спейсера. В некоторых вариантах осуществления линкер или спейсер содержит гибкий гидрофильный спейсер, такой как, без ограничений, ПЭГ спейсер. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит жесткий линкер, такой как циклическая группа. В некоторых вариантах осуществления производное галактозы содержит или состоит из N-ацетилгалактозамина. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы состоит из тетрамера производного галактозы, который может представлять собой, например, тетрамер N-ацетилгалактозамина.

В некоторых вариантах осуществления описаны фармацевтические композиции для доставки агента РНКи против ВГВ в клетку печени *in vivo*. Такие фармацевтические композиции могут включать в себя, например, агент РНКи против ВГВ, конъюгированный с кластером производных галактозы. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы состоит из тримера производного галактозы, который может представлять собой, например, тример N-ацетилгалактозамина, или тетрамера производного галактозы, который может представлять собой, например, тетрамер N-ацетилгалактозамина.

Нацеливающие группы включают в себя, без ограничений, (PAZ), (NAG13), (NAG13)s, (NAG18), (NAG18)s, (NAG24), (NAG24)s, (NAG25), (NAG25)s, (NAG26), (NAG26)s, (NAG27), (NAG27)s, (NAG28), (NAG28)s, (NAG29), (NAG29)s, (NAG30), (NAG30)s, (NAG31), (NAG31)s, (NAG32), (NAG32)s, (NAG33), (NAG33)s, (NAG34), (NAG34)s, (NAG35), (NAG35)s, (NAG36), (NAG36)s, (NAG37), (NAG37)s, (NAG38), (NAG38)s, (NAG39) и (NAG39)s. В данной области известны другие нацеливающие группы, включая нацеливающие лиганды, представляющие собой кластер галактоз.

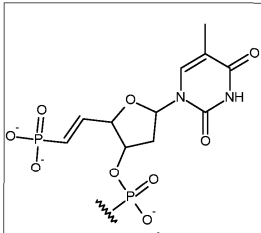
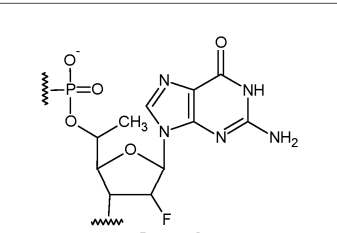
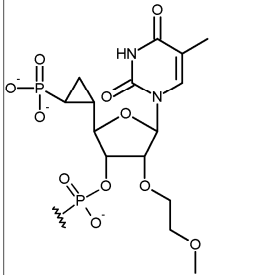
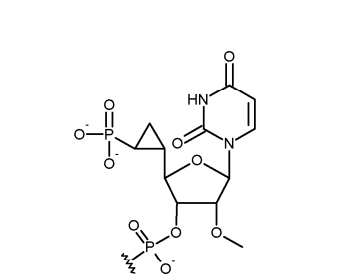
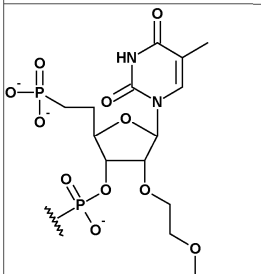
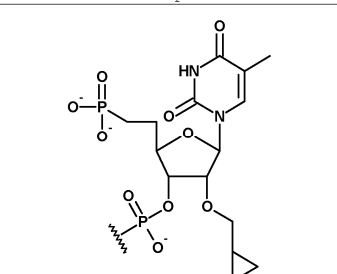
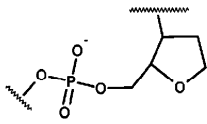
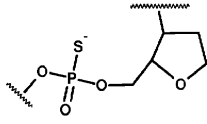
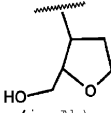
В некоторых вариантах осуществления связывающая группа конъюгирована с агентом РНКи. Связывающая группа способствует ковалентному связыванию агента с нацеливающей группой или доставляющим полимером или доставляющей несущей средой. Связывающая группа может быть связана с 3'- или 5'-концом кодирующей цепи или антисмысловой цепи агента РНКи. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа связана с кодирующей цепью агента РНКи. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа конъюгирована с 5'- или 3'-концом кодирующей цепи агента РНКи. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа конъюгирована с 5'-концом кодирующей цепи агента РНКи. Примеры связывающих групп включают, без ограничений: реакционноспособные группы, такие как первичные амины и алкины, алкильные группы, лишенные азотистого основания нуклеозиды, рибит (лишенная азотистого основания рибоза) и/или ПЭГ-группы.

Линкер или связывающая группа представляет собой соединение между двумя атомами, которое связывает одну интересующую химическую группу (такую как агент РНКи) или сегмент с другой интересующей химической группой (такой как нацеливающая группа или доставляющий полимер) или сегментом посредством одной или более ковалентных связей. Неустойчивое соединение содержит неустойчивую связь. Соединение может необязательно включать в себя спейсер, который увеличивает расстояние между двумя соединенными атомами. Спейсер может дополнительно повышать гибкость и/или длину соединения. Спейсеры могут включать в себя, без ограничений, алкильные группы, алкенильные группы, алкинильные группы, арильные группы, аралкильные группы, аралкенильные группы и аралкинильные группы, каждая из которых может содержать один или более гетероатомов, гетероциклов, аминокислот, нуклеотидов и сахаридов. Спейсерные группы хорошо известны в данной области и приведенный выше список не предназначен для ограничения объема данного описания.

Любая из нуклеотидных последовательностей агента РНКи против ВГВ, перечисленных в табл. 3 и 4, как модифицированных, так и немодифицированных, может содержать нацеливающую группу и/или связывающую группу на 3'- или 5'-конце. Любая из последовательностей агента РНКи против ВГВ, перечисленных в табл. 3 и 4, которая содержит нацеливающую группу и/или связывающую группу на 3'- или 5'-конце, может альтернативно не содержать нацеливающую группу и/или связывающую группу на 3'- или 5'-конце или может содержать другую нацеливающую группу и/или связывающую группу на 3'- или 5'-конце, включая, без ограничений, группы, показанные в табл. 3. Любой из дуплексов агента РНКи против ВГВ, перечисленных в табл. 5, модифицированный или немодифицированный, может дополнительно содержать нацеливающую группу и/или связывающую группу, включая, без ограничений, группы, показанные в табл. 3, и нацеливающая группа или связывающая группа может быть присоединена к 3'- или 5'-концу кодирующей цепи или антисмысловой цепи дуплекса агента РНКи против ВГВ.

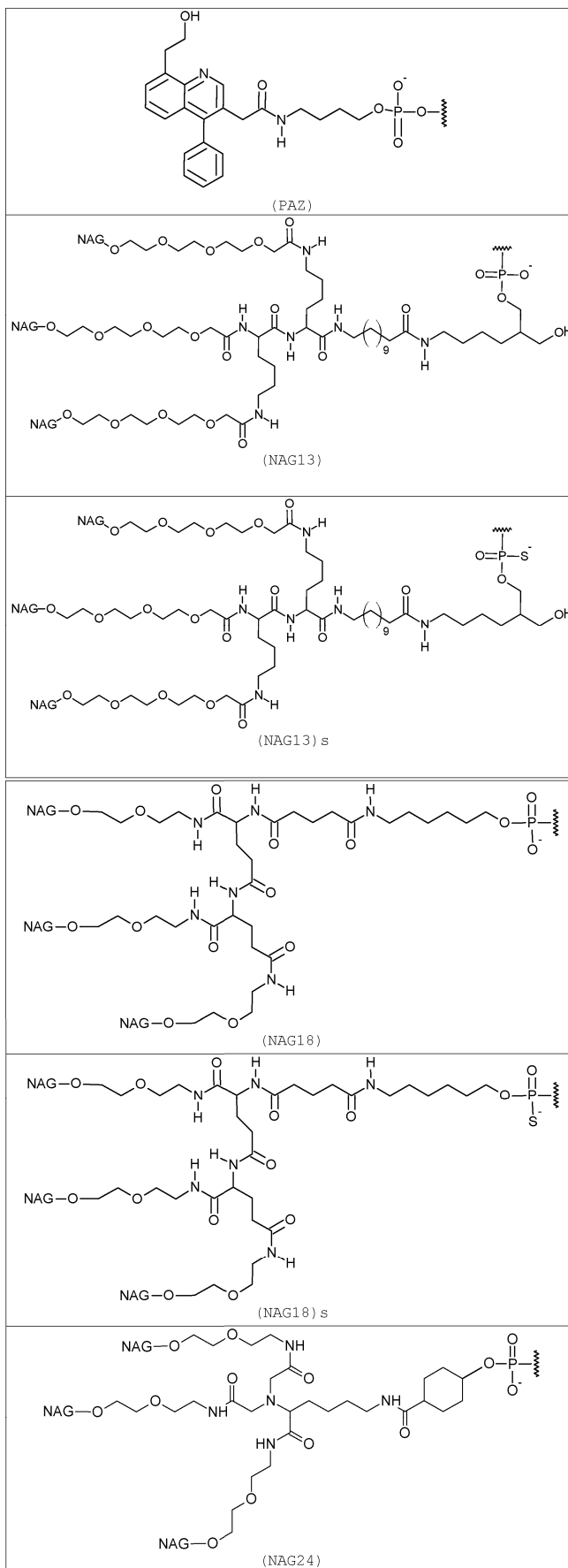
Примеры нацеливающих групп и связывающих групп представлены в табл. 6. В табл. 4 представлено несколько вариантов осуществления кодирования цепей агента РНКи против ВГВ, имеющих нацеливающую группу или связывающую группу, связанную с 5'- или 3'-концом.

Таблица 6. Структуры, представляющие различные модифицированные нуклеотиды, нацеливающие группы и связывающие группы

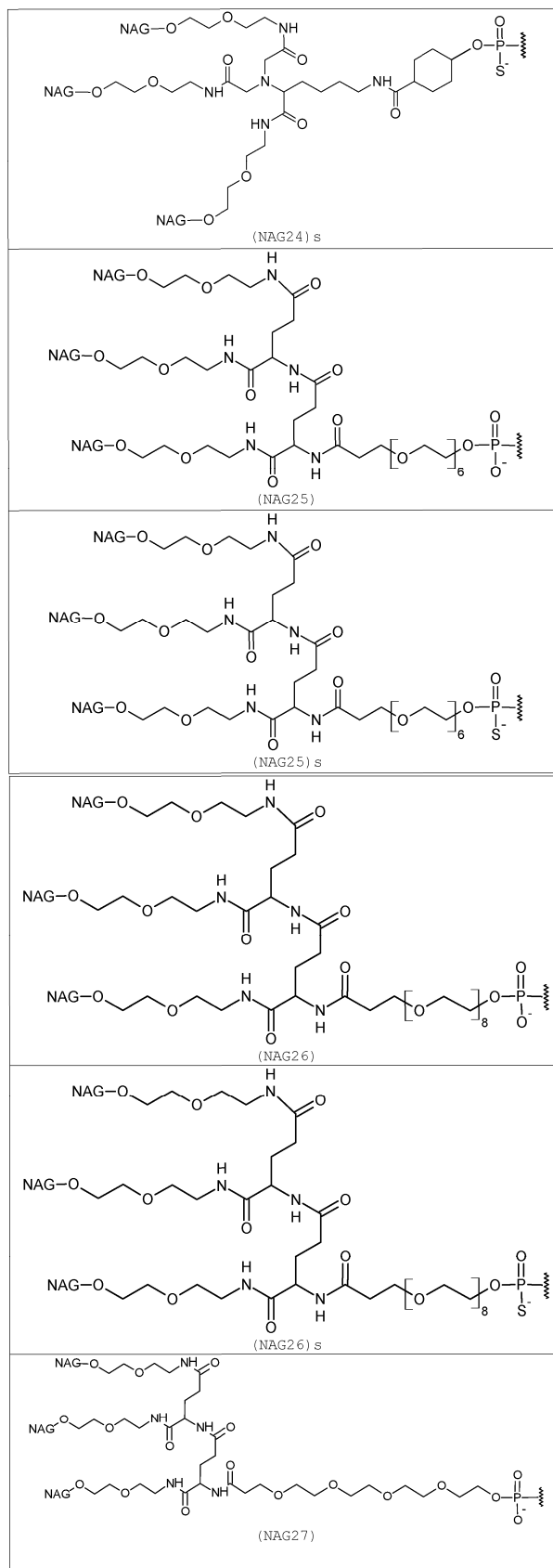
 <p style="text-align: center;">vpdT</p>	 <p style="text-align: center;">5Me-Gf</p>
 <p style="text-align: center;">cPrpTM</p>	 <p style="text-align: center;">cPrpu</p>
 <p style="text-align: center;">epTM</p>	 <p style="text-align: center;">epTcPr</p>
<p>При расположении внутри олигонуклеотида:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>соединение с 3'-концом олигонуклеотида</p>  <p>соединение с 5'-концом олигонуклеотида</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(invAb)</p> </div> </div>	
<p>При расположении внутри олигонуклеотида:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>соединение с 3'-концом олигонуклеотида</p>  <p>соединение с 5'-концом олигонуклеотида</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(invAb)s</p> </div> </div>	
<p>При расположении на 3'-конце олигонуклеотида:</p> <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>соединение с 5'-концом олигонуклеотида</p>  <p>(invAb)</p> </div> </div>	



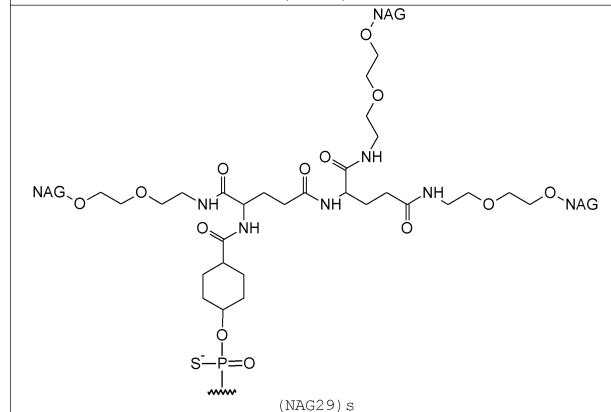
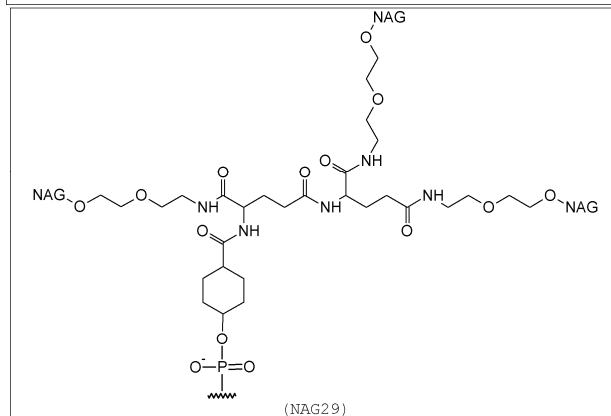
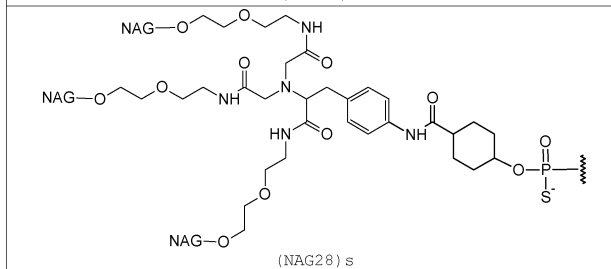
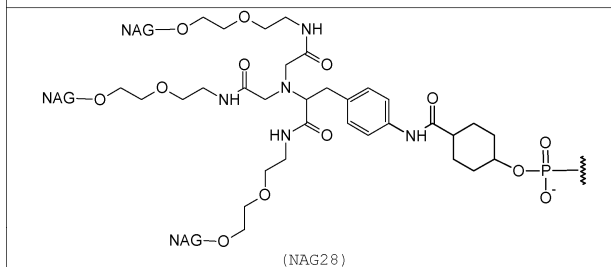
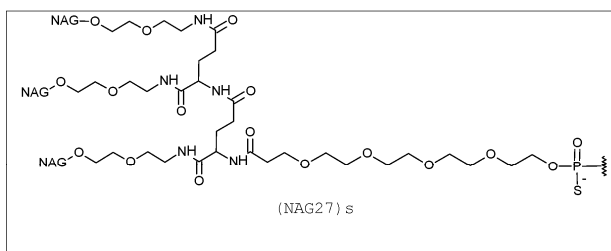
044937



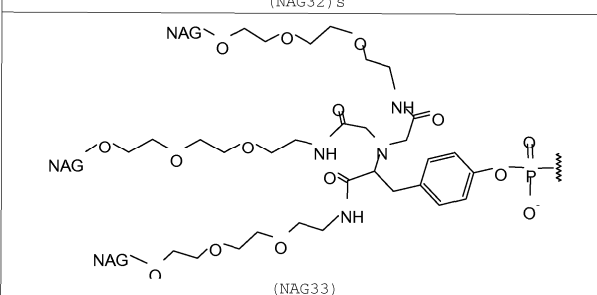
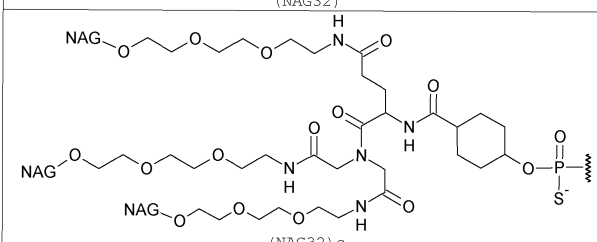
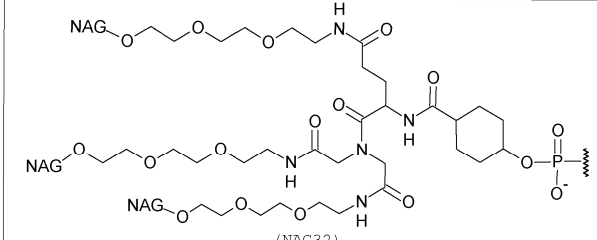
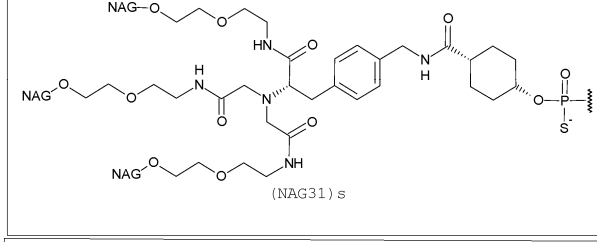
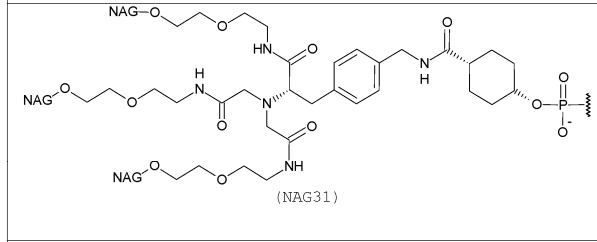
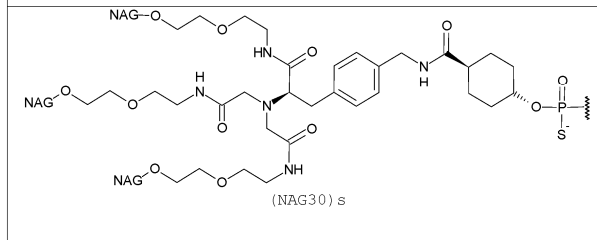
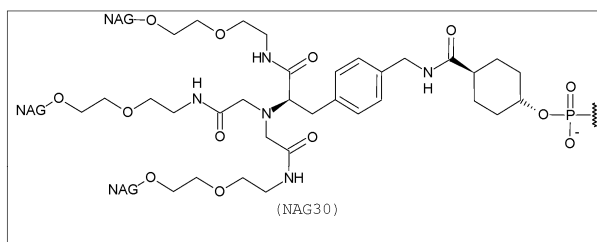
044937

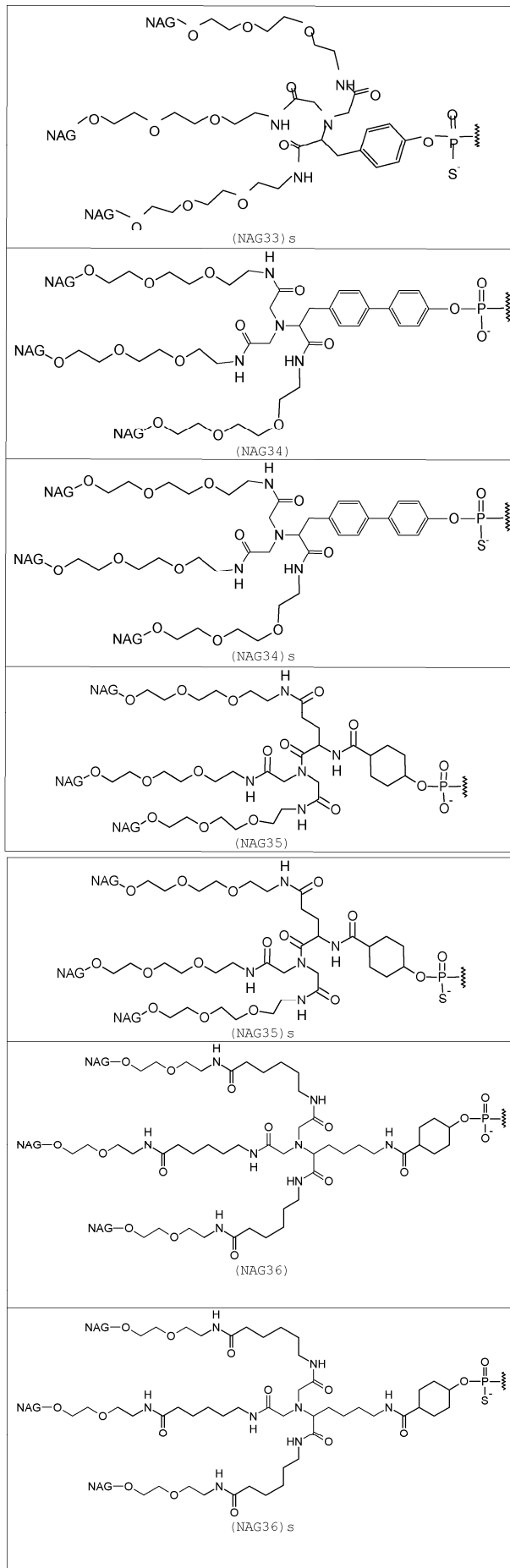


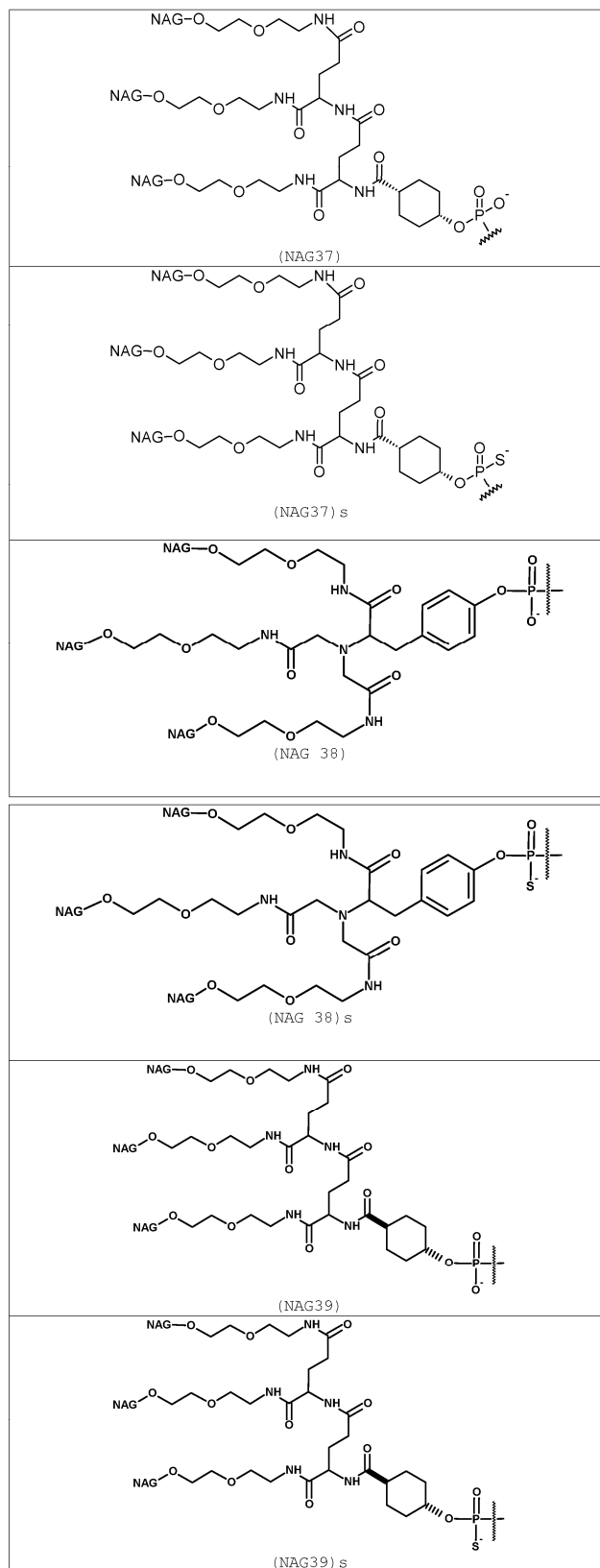
044937



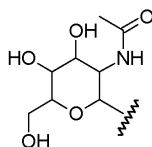
044937





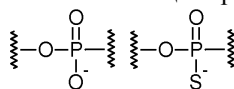


В каждой из приведенных выше структур из табл. 6 NAG содержит N-ацетилгалактозамин или другой лиганд ASGPr, как будет понятно среднему специалисту в данной области, подлежащий присоединению с учетом вышеперечисленных структур и описания, приведенного в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления NAG в структурах, приведенных в табл. 6, представлен следующей структурой:



(N-ацетилгалактозамин)

Каждый (NAG<sub>x</sub>) может быть присоединен к агенту РНКи против ВГВ посредством фосфатной группы (как в (NAG25), (NAG30) и (NAG31)) или фосфоротиоатной группы (как в (NAG25)<sub>s</sub>, (NAG29)<sub>s</sub>, (NAG30)<sub>s</sub>, (NAG31)<sub>s</sub> или (NAG37)<sub>s</sub>), или другой связывающей группы.



Фосфатная группа

Фосфоротиоатная группа

Можно использовать и другие связывающие группы, известные в данной области.

#### Доставляющие несущие среды

В некоторых вариантах осуществления доставляющую несущую среду можно использовать для доставки агента РНКи в клетку или ткань. Доставляющая несущая среда представляет собой соединение, которое улучшает доставку агента РНКи в клетку или ткань. Доставляющая несущая среда может включать в себя или состоять из, без ограничений: полимера, такого как амфипатический полимер, мембранно-активного полимера, пептида, пептида мелитина, мелитиноподобного пептида (MLP), липида, обратимо модифицированного полимера или пептида, или обратимо модифицированного мембранно-активного полиамина.

В некоторых вариантах осуществления агенты РНКи можно комбинировать с липидами, наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, дифосфатидилхолинами (DPC) или другими системами доставки, доступными в данной области. Агенты РНКи также могут быть химически конъюгированы с нацеливающими группами, липидами (включая, без ограничений, холестерин и производные холестерина), наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, DPC (см., например, WO 2000/053722, WO 2008/0022309, WO 2011/104169 и WO 2012/083185, WO 2013/032829, WO 2013/158141, каждая из которых включена в настоящий документ путем ссылки) или другими доступными в данной области системами доставки.

#### Фармацевтические композиции и составы

Агенты РНКи против ВГВ, описанные в настоящем документе, могут быть получены в виде фармацевтических композиций или составов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции включают в себя по меньшей мере один агент РНКи против ВГВ. Эти фармацевтические композиции, в частности, используются для ингибирования экспрессии целевой мРНК в клетке-мишени, группе клеток, ткани или организме. Фармацевтические композиции можно применять для лечения субъекта, имеющего заболевание или расстройство, при котором снижение концентрации целевой мРНК или ингибирование экспрессии целевого гена окажет благоприятное влияние. Фармацевтические композиции можно применять для лечения субъекта, у которого имеется риск развития заболевания или расстройства, при котором снижение концентрации целевой мРНК или ингибирование экспрессии целевого гена окажет благоприятное влияние. В одном варианте осуществления способ включает введение агента РНКи против ВГВ, связанного с нацеливающим лигандом, как описано в настоящем документе, подлежащему лечению субъекту. В некоторых вариантах осуществления один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов (включая несущие среды, носители, разбавители и/или доставляющие полимеры) добавляют в фармацевтические композиции, включая агент РНКи против ВГВ, таким образом формируя фармацевтический состав, приемлемый для доставки человеку *in vivo*.

Фармацевтические композиции, которые включают в себя агент РНКи против ВГВ, и способы, описанные в настоящем документе, могут снижать концентрацию целевой мРНК в клетке, группе клеток, группе клеток, ткани или субъекте, включая: введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе агента РНКи против ВГВ, таким образом ингибируя экспрессию целевой мРНК у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления описанные фармацевтические композиции, включающие в себя агент РНКи против ВГВ, используются для лечения или купирования клинических проявлений, связанных с инфекцией ВГВ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество одной или более из фармацевтических композиций вводят субъекту, нуждающемуся в таком лечении, предотвращении или купировании. В некоторых вариантах осуществления введение любого из описанных агентов РНКи против ВГВ можно использовать для уменьшения числа, тяжести и/или частоты симптомов заболевания у субъекта.

Описанные фармацевтические композиции, включая агент РНКи против ВГВ, можно применять для лечения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего заболевание или расстройство, при котором снижение или ингибирование экспрессии мРНК против ВГВ окажет благоприятное влия-

ние. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят терапевтически эффективное количество одной или более фармацевтических композиций, включающих в себя агент РНКи против ВГВ, таким образом осуществляя лечение симптома. В других вариантах осуществления субъекту вводят профилактически эффективное количество одного или более агентов РНКи против ВГВ, таким образом предотвращая по меньшей мере один симптом.

Способ введения представляет собой путь, посредством которого агент РНКи против ВГВ приводят в контакт с телом. В целом способы введения лекарственных средств и нуклеиновых кислот для лечения млекопитающих хорошо известны в данной области и могут быть применены для введения композиций, описанных в настоящем документе. Агенты РНКи против ВГВ, описанные в настоящем документе, можно вводить посредством любого приемлемого способа в препарате, специально предназначенном для конкретного способа. Таким образом, описанные в настоящем документе фармацевтические композиции можно вводить путем инъекции, например, внутривенно, внутримышечно, внутривожно, подкожно, внутрисуставно или внутривнутрино. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе фармацевтические композиции вводят посредством подкожной инъекции.

Фармацевтические композиции, включающие в себя агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе, могут быть доставлены в клетку, группу клеток, опухоль, ткань или субъект с использованием способов доставки олигонуклеотидов, известных в данной области. В целом любой приемлемый способ, используемый в данной области для доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*), может быть адаптирован для применения с описанными в настоящем документе композициями. Например, доставка может осуществляться путем локального введения (например, прямой инъекции, имплантации или местного введения), системного введения или подкожного, внутривенного, внутривнутрино, или парентеральными способами, включая внутривнутрино (например, внутривнутрино, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутримышечное трансдермальное, ингаляционное (аэрозольное), назальное, пероральное, ректальное или местное (включая буккальное и сублингвальное) введение. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем подкожной или внутривенной инфузии или инъекции.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут содержать один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть приготовлены для введения субъекту.

В настоящем документе фармацевтическая композиция или лекарственное средство включает в себя фармакологически эффективное количество по меньшей мере одного из описанных терапевтических соединений и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. Фармацевтически приемлемые эксципиенты (эксципиенты) представляют собой вещества, отличные от активного фармацевтического ингредиента (АФИ, терапевтическое средство, например агент РНКи против ВГВ), которые намеренно включены в систему доставки лекарственного средства. Эксципиенты не оказывают или не предназначены для оказания терапевтического воздействия в предусмотренной дозе. Эксципиенты могут: а) способствовать обработке системы доставки лекарственного средства в процессе получения, б) защищать, поддерживать или повышать стабильность, биодоступность или переносимость АФИ пациентом, в) содействовать определению подлинности продукта и/или д) усиливать любую другую характеристику общей безопасности, эффективности, доставки АФИ во время хранения или применения. Фармацевтически приемлемый эксципиент может быть или не быть инертным веществом.

Эксципиенты включают, без ограничений: усилители всасывания, антиадгезивы, противовспенивающие агенты, антиоксиданты, связующие вещества, буферные агенты, носители, покрывающие агенты, красители, улучшающие доставку средства, доставляющие полимеры, декстран, декстозу, разбавители, разрыхлители, эмульгаторы, сухие разбавители, наполнители, ароматизаторы, способствующие скольжению вещества, увлажнители, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, солевой раствор, соли, растворители, сахара, суспендирующие агенты, матрицы с замедленным высвобождением, подсластители, загустители, регуляторы тоничности, несущие среды, водоотталкивающие агенты и смазывающие агенты.

Фармацевтические композиции, пригодные для инъекционного введения, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимые), или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов, или дисперсии для инъекции непосредственно перед введением. Для внутривенного введения приемлемые носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, г. Парсипани, штат Нью-Джерси, США) или фосфатно-солевой буферный раствор. Она должна быть стабильной в условиях получения и хранения и должна быть защищена от загрязняющего воздействия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их приемлемые смеси. Надлежащая текучесть может быть обеспечена, например, посредством применения веществ для создания оболочки, таких как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, а также посредством применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включать в компози-



цию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть обеспечено посредством включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут быть получены посредством введения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в зависимости от необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. По существу дисперсии получают посредством введения активного соединения в стерильную несущую среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов способы приготовления включают в себя вакуумную сушку и сублимационную сушку, в результате которых из предварительно стерилизованного фильтрацией раствора образуется порошок активного ингредиента и любого дополнительного нужного ингредиента.

Составы, приемлемые для внутрисуставного введения, могут находиться в форме стерильного водного препарата лекарственного средства, который может находиться в микрокристаллической форме, например в форме водной микрокристаллической суспензии. Липосомные составы или биоразлагаемые полимерные системы также можно использовать для включения лекарственного средства с целью внутрисуставного и внутриглазного введения.

Активные соединения могут быть составлены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из тела, например составы с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут использоваться биологически разлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Специалистам в данной области будут очевидны способы получения таких составов. В качестве фармацевтически приемлемых носителей можно также использовать липосомные суспензии. Их можно получать в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811.

Агенты РНКи против ВГВ можно получать в композициях в единичной дозированной форме для простоты введения и однородности дозы. Дозированная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению; причем каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное на получение желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для дозированных лекарственных форм настоящего описания продиктована и непосредственно зависит от уникальных характеристик активного соединения и терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и ограничений, присущих области составления композиций с таким активным соединением для лечения субъектов.

Фармацевтическая композиция может содержать другие дополнительные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях. Такие дополнительные компоненты включают, без ограничений: противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные агенты (например, антигистамин, дифенгидрамин и т.д.). Также предполагается, что клетки, ткани или изолированные органы, которые экспрессируют или содержат описанные в настоящем документе агенты РНК, можно использовать в качестве "фармацевтических композиций". При использовании в настоящем документе термин "фармакологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или просто "эффективное количество" относится к такому количеству агента РНКи, которое позволяет достичь фармакологического, терапевтического или профилактического результата.

По существу эффективное количество активного соединения будет находиться в диапазоне от около 0,1 до около 100 мг/кг массы тела/сутки, например от около 1,0 до около 50 мг/кг массы тела/сутки. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество активного соединения будет находиться в диапазоне от около 0,25 до около 5 мг/кг массы тела на одну дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество активного ингредиента будет находиться в диапазоне от около 0,5 до около 3 мг/кг массы тела на одну дозу. Введенное количество также, вероятно, будет зависеть от таких переменных, как общее состояние здоровья пациента, относительная биологическая эффективность доставляемого соединения, состав лекарственного средства, наличие и типы эксципиентов в составе и способ введения. Также следует понимать, что вводимая начальная доза может быть увеличена сверх вышеуказанного верхнего уровня, чтобы быстро достичь требуемой концентрации в крови или концентрации в ткани, или начальная доза может быть меньше оптимальной.

Для лечения заболевания или для формирования лекарственного средства или композиции для лечения заболевания фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, включая агент РНКи против ВГВ, можно комбинировать с эксципиентом или со вторым терапевтическим агентом или типом лечения, включая, без ограничений: второй или другой агент РНКи, низкомолекулярное лекарственное средство, антители, фрагмент антитела и/или вакцину.

Описанные агенты РНКи против ВГВ при добавлении к фармацевтически приемлемым эксципиентам или адьювантам могут быть упакованы в наборы, контейнеры, упаковки или диспенсеры. Описанные

в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть упакованы в предварительно заполненные шприцы или флаконы.

#### **Способы лечения и ингибирование экспрессии**

Агенты РНКи против ВГВ, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения субъекта (например, человека или млекопитающего), имеющего заболевание или расстройство, при котором введение соединения окажет благоприятное влияние. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе агенты РНКи можно применять для лечения субъекта (например, человека), имеющего заболевание или расстройство, при котором снижение или ингибирование экспрессии мРНК ВГВ окажет благоприятное влияние. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество любого одного или более агентов РНКи. Субъектом может быть человек, пациент или пациент-человек. Субъект может представлять собой взрослого, подростка, ребенка или младенца. Описанные фармацевтические композиции, включая агент РНКи против ВГВ, можно использовать в качестве способов терапевтического лечения заболеваний. Такие способы включают введение человеку или животному фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления агенты РНКи против ВГВ, описанные в настоящем документе, применяют для лечения субъекта, инфицированного ВГВ. В некоторых вариантах осуществления описанные агенты РНКи против ВГВ применяют для лечения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего инфекцию ВГВ. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество любого одного или более описанных агентов РНКи.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется как инфекция ВГВ, так и инфекция ВГД. В некоторых вариантах осуществления агенты РНКи против ВГВ, описанные в настоящем документе, применяют для лечения субъекта, инфицированного как ВГВ, так и ВГД. В некоторых вариантах осуществления описанные агенты РНКи против ВГВ применяют для лечения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего инфекцию ВГВ или ВГД. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество любого одного или более описанных агентов РНКи.

В некоторых вариантах осуществления агенты РНКи против ВГВ применяют для лечения или купирования клинических проявлений у субъекта, инфицированного ВГВ. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество одного или более агентов РНКи против ВГВ или содержащих агент РНКи против ВГВ композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение подлежащему лечению субъекту композиции, содержащей агент РНКи против ВГВ, описанный в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена и/или концентрация мРНК гена ВГВ у субъекта, которому вводят описанный агент РНКи против ВГВ, снижена на по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более 99% по отношению к субъекту до введения агента РНКи против ВГВ или к субъекту, не получающему агент РНКи против ВГВ. Уровень экспрессии генов и/или концентрация мРНК у субъекта может быть снижена в клетке, группе клеток и/или ткани субъекта. В некоторых вариантах осуществления концентрация экспрессированного белка гена ВГВ у субъекта, которому вводили описанный агент РНКи против ВГВ, снижена на по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более 99% по отношению к субъекту до введения агента РНКи против ВГВ или к субъекту, не получающему агент РНКи против ВГВ. Концентрация белка у субъекта может быть снижена в клетке, группе клеток, ткани, крови и/или другой жидкости субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления количество или концентрация поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) у субъекта, которому вводили описанный агент РНКи против ВГВ, снижена на по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более 99% по отношению к субъекту до введения агента РНКи против ВГВ или к субъекту, не получающему агент РНКи против ВГВ. В некоторых вариантах осуществления количество или концентрация е-антигена гепатита В (HBeAg) у субъекта, которому вводили описанный агент РНКи против ВГВ, снижена на по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более 99% по отношению к субъекту до введения агента РНКи против ВГВ или к субъекту, не получающему агент РНКи против ВГВ. В некоторых вариантах осуществления количество или сывороточная концентрация ДНК ВГВ у субъекта, которому вводили описанный агент РНКи против ВГВ, снижена на по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более 99% по отношению к субъекту до введения агента РНКи против ВГВ или к субъекту, не получающему агент РНКи против ВГВ. Уменьшение присутствия сывороточной концентрации ДНК ВГВ, экспрессии гена ВГВ, мРНК ВГВ или количеств или концентраций белка ВГВ можно оценивать способами, известными в данной области. Уменьшение или снижение количества или концентрации мРНК ВГВ, количества или концентрации экспрессированного белка и/или количества или сывороточной концентрации ДНК ВГВ обобщенно в настоящем документе называется уменьшением или снижением ВГВ или ингибированием или уменьшением экспрессии ВГВ.

#### **Клетки и ткани и не относящиеся к человеку организмы**

Рассматриваются клетки, ткани и не относящиеся к человеку организмы, которые включают в себя

по меньшей мере один из агентов РНКи против ВГВ, описанных в настоящем документе. Клетка, ткань или не относящийся к человеку организм получают путем доставки агента РНКи в клетку, ткань или не относящийся к человеку организм.

Представленные выше варианты осуществления и элементы показаны вместе со следующими не имеющими ограничительного характера примерами.

#### Примеры

Пример 1. Синтез агентов РНКи против ВГВ.

Приведенные в табл. 5 дуплексы агентов РНКи против ВГВ синтезировали, как описано ниже.

А. Синтез.

Смысловые и антисмысловые цепи агентов РНКи против ВГВ синтезировали согласно амидофосфитному методу с использованием твердой фазы, применяемому при синтезе олигонуклеотидов. В зависимости от масштаба использовалось оборудование либо MerMade96E® (BioAutomation), либо MerMade12® (BioAutomation), либо OP Pilot 100 (GE Healthcare). Синтез проводили на твердой подложке, изготовленной из стекла с контролируемой пористостью (СКП, 500 Å или 600 Å, производства Prime Synthesis, г. Астон, штат Пенсильвания, США). Все РНК и 2'-модифицированные амидофосфиты были приобретены у Thermo Fisher Scientific (г. Милуоки, штат Висконсин, США). В частности, использовали следующие 2'-О-метиламидофосфиты: (5'-О-диметокситритил-N<sup>6</sup>-(бензоил)-2'-О-метиладенозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)амидофосфит, 5'-О-диметокситритил-N<sup>4</sup>-(ацетил)-2'-О-метил-цитидин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)амидофосфит, (5'-О-диметокситритил-N<sup>2</sup>-(изобутирил)-2'-О-метилгуанозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)амидофосфит и 5'-О-диметокситритил-2'-О-метилуридин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)амидофосфит. 2'-дезоксидофосфиты содержали те же защитные группы, что и 2'-О-метиламидофосфиты. Лишенные азотистых оснований (3'-О-диметокситритил-2'-дезоксирибозидо-5'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)амидофосфиты приобретали в ChemGenes (г. Уилмингтон, штат Массачусетс, США). Содержащие нацеливающий лиганд амидофосфиты растворяли в безводном дихлорметане или безводном ацетонитриле (50 мМ), тогда как все остальные амидофосфиты растворяли в безводном ацетонитриле (50 мМ) и добавляли молекулярные сита (3Å). В качестве активирующего раствора использовали 5-бензилтио-1Н-тетразол (БТТ, 250 мМ в ацетонитриле) или 5-этилтио-1Н-тетразол (ЕТТ, 250 мМ в ацетонитриле). Значения продолжительности связывания составляла 12 мин (РНК), 15 мин (нацеливающий лиганд), 90 с (2'Оме) и 60 с (2'Ф). Для введения фосфоротиоатных связей использовали 100 мМ раствор 3-фенил-1,2,4-диотиазолин-5-она (POS, приобретенного у PolyOrg, Inc., г. Леоминстер, штат Массачусетс, США) в безводном ацетонитриле.

В. Расщепление и снятие защиты со связанного с подложкой олигомера.

После завершения твердофазного синтеза высушенную твердую подложку в течение 1,5 ч при 30°C обрабатывали 1:1 объемом 40 мас.% раствора метиламина в воде и 28 мас.% раствора гидроксида аммония (Aldrich). Раствор выпаривали и твердый остаток разводили в воде (см. ниже).

С. Очистка.

Неочищенные олигомеры очищали методом анионообменной ВЭЖХ с использованием колонки TSKgel SuperQ 5PW 13 мкм и системы Shimadzu LC-8. Буферный раствор А (рН 9,0) состоял из 20 мМ трис, 5 мМ ЭДТА и содержал 20% ацетонитрила, буферный раствор В имел такой же состав, что и буферный раствор А, но с добавлением 1,5 М хлорида натрия. Были записаны УФ-спектры при 260 нм. Соответствующие фракции объединяли и анализировали методом эксклюзионной ВЭЖХ с использованием колонки производства ХК 26/40 GE Healthcare, заполненной Sephadex G-2 5 с подвижным буферным раствором, состоящим из деионизированной (DI) воды или 100 мМ бикарбоната аммония (рН 6,7) и 20% ацетонитрила.

Д. Отжиг.

Для получения агентов РНКи смешивали комплементарные нити объединением эквимоллярных растворов РНК (кодирующей и антисмысловой) в 1× фосфатно-солевом буферном растворе (Corning, Cellgro). Некоторые агенты РНКи лиофилизировали и хранили при температуре от -15 до -25°C. Концентрацию дуплекса определяли, измеряя оптическое поглощение раствора на УФ-Вид спектрометре в 1× фосфатно-солевом буферном растворе. Затем для определения концентрации дуплекса оптическое поглощение раствора при 260 нм умножали на коэффициент пересчета и коэффициент разбавления. Если не указано иное, все коэффициенты пересчета составляли 0,037 мг/(мл·см). Для некоторых экспериментов коэффициент пересчета рассчитывали на основе экспериментально определенного коэффициента экстинкции.

Пример 2. Мышиная модель рНВV

Самок мышей NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCrl (NOD-SCID) в возрасте от шести до восьми недель временно трансфицировали *in vivo* с помощью гидродинамической инъекции МС-НВV1.3 в хвостовую вену (Yang PL et al. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection, PNAS USA 2002 Vol. 99: p. 13825-13830), проводимой за 30-45 дней до введения агента РНКи против ВГВ или контрольного препарата. МС-НВV1.3 представляет собой мини-кольцо на основе плазмиды, содержащее ту же терминально избыточную последовательность НВV1.3 вируса гепатита В человека,

что и в плазмиде pHBV1.3 и у трансгенных мышей HBV1.3.32 (№ доступа в GenBank V01460) (Guidotti LG et al., High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice, *J Virol* 1995 Vol. 69, p6158-6169). Для создания модели pHBV хронической инфекции ВГВ мышам в хвостовую вену вводили 5 или 10 мкг МС-HBV1.3 в растворе Рингера (в общем объеме 10% массы тела животного). Раствор вводили в течение 5-7 секунд через иглу калибра 27, как описано ранее (Zhang G et al., High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injection of naked plasmid DNA. *Human Gene Therapy* 1999 Vol. 10, p1735-1737.). Перед введением указанного раствора (или в день 1 до введения, или в дни -1 и -2) методом ИФА измеряли уровни экспрессии поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в сыворотке и группировали мышей в соответствии со средними уровнями экспрессии HBsAg.

Анализы.

Концентрации HBsAg, HBeAg, ДНК ВГВ в сыворотке или РНК ВГВ в печени можно измерять в разное время до и после введения агентов РНКи против ВГВ. Уровни экспрессии ВГВ нормировали к уровням экспрессии до введения и по контрольным мышам, которым вводили фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

1) Сбор сывороток

Мышей анестезировали 2-3%-м изофлураном и из подчелюстной области отбирали пробы крови в пробирки для отделения сыворотки (Sarstedt AG & Co., г. Нюмбрехт, Германия). В течение 20 мин давали крови коагулировать при температуре окружающей среды. Для отделения сыворотки пробирки центрифугировали в течение 3 мин при 8000×g и хранили при 4°C.

ii) Сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg)

Сыворотку собирали и разбавляли в 10-8000 раз в PBS, содержащем 5% обезжиренного сухого молока. Вторичные стандартные образцы HBsAg, разведенные в растворе обезжиренного молока, получали из сыворотки мышей ICR (Harlan Sprague Dawley), трансфицированных 10 мкг плазмиды pRc/CMV HBs, экспрессирующей HBsAg (Aldevron, г. Фарго, штат Северная Дакота, США). Концентрации HBsAg определяли с помощью набора GS HBsAg EIA 3,0 (Bio Rad Laboratories, Inc., г. Редмонд, штат Вашингтон, США) в соответствии с описанием производителя. В качестве первичного стандарта применяли рекомбинантный белок HBsAg, подтип ауw (Aldevron), также разбавленный в растворе обезжиренного молока в PBS.

Для учета снижения экспрессии МС-HBV1.3, не связанного с лечением, экспрессию HBsAg для каждого животного нормировали к контрольной группе мышей, которым инъецировали PBS. Сначала для определения соотношения экспрессии "нормированной к уровню до лечения", величину уровня HBsAg для каждого животного в данный момент времени делили на уровень экспрессии у этого животного до лечения. Затем экспрессию в конкретный момент времени нормировали к уровню контрольной группы делением соотношения "нормированная к уровню до лечения" для отдельного животного на среднее соотношение "нормированная к уровню до лечения" для всех мышей в контрольной группе, получавшей обычный PBS.

iii) Сывороточные концентрации е-антигена гепатита В (HBeAg).

Определение HBeAg проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) согласно описанию производителя (DiaSorin) с использованием сыворотки, разведенной в 4-20 раз в 5%-м обезжиренном сухом молоке. Количественное определение антигена проводили в линейном диапазоне данного анализа по отношению к стандартному образцу белка HBeAg (Fitzgerald Industries International, № 30-AN18 по каталогу, г. Актон, штат Массачусетс, США).

Для учета снижения экспрессии МС-HBV1.3, не связанного с лечением, экспрессию HBeAg для каждого животного нормировали к контрольной группе мышей, которым инъецировали PBS. Для оценки концентрации HBeAg в сыворотке анализировали HBeAg из объединенной группы или подгруппы проб сыворотки. Сначала для определения соотношения экспрессии "нормированной к уровню до лечения" величину уровня HBeAg для каждой объединенной группы или подгруппы делили на уровень экспрессии в той же группе или подгруппе до лечения. Затем экспрессию в конкретный момент времени нормировали к уровню контрольной группы делением соотношения "нормированная к уровню до лечения" для группы или подгруппы на среднее соотношение "нормированная к уровню до лечения" для всех проб из контрольной группы, получавшей обычный PBS.

iv) Сывороточные концентрации ДНК ВГВ

Равные объемы сыворотки, полученные от мышей, в группе или подгруппе объединяли до конечного объема 100 мкл. ДНК из проб сыворотки выделяли с помощью набора QIAamp MinElute Virus Spin (Qiagen, г. Валенсия, штат Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. В каждую пробу добавляли стерильный 0,9%-й физиологический раствор до конечного объема 200 мкл. Пробы сыворотки добавляли в пробирки, содержащие буфер и протеазу. Добавляли РНК-носитель для облегчения выделения небольших количеств ДНК. В качестве контроля выделения добавляли 1 нг плазмидной ДНК pHCR/Ubc-SEAP (Wooddell CI, et al. Long-term RNA interference from optimized siRNA expression constructs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) 334, 117-127). После инкубации в течение 15 мин при 56°C нуклеиновые кислоты осаждали из лизатов этанолом и весь раствор наносили на колонку. После промывки пробы элюировали в 50 мкл буферного раствора AVE.

Число копий геномов ВГВ в ДНК, выделенной из сыворотки мышинной модели рНВВ, определяли посредством количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР). Плазмиду рSEAP-НВВ353-777, кодирующую короткий сегмент генома ВГВ в пределах гена S (основания 353-777 последовательности с номером доступа V01460 в GenBank), использовали для создания стандартной логарифмической кривой, охватывающей шесть логарифмов. Исключали пробы с выделением ДНК менее 2 среднеквадратичных отклонений от среднего на основании результатов обнаружения рHCR/Ubc-SEAP. Использовали химические праймеры и зонды TaqMan с фтором/ZEN/IBFQ.

Анализ кПЦР выполняли на системе ПЦР в реальном времени 7500 Fast или StepOne Plus (Life Technologies). Для оценки ДНК ВГВ в сыворотке ДНК выделяли посредством стадий одиночной или двойной очистки из объединенных проб сыворотки, полученных из группы. Количественные содержания ДНК ВГВ и выделение контрольной плазмиды определяли посредством реакций кПЦР, выполненных в трех повторениях. В каждую реакционную смесь включали пробы для количественного определения ВГВ и рHCR/Ubc-SEAP.

Пример 3. Агенты РНКи против ВГВ в мышинной модели рНВВ

Использовали мышиную модель рНВВ, описанную в примере 2 выше. В день 1 каждой мыши выполняли одну подкожную инъекцию 200 мкл, содержащую 2 мг/кг (mpk) агента РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, применяемого в качестве контроля. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды,

конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Исследуемые агенты РНКи против ВГВ включали в себя агенты, которые имеют номера дуплексов, показанные в табл. 7 ниже. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненатянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе (n=3).

Сыворотку собирали на день 8, 15, 22 и 29 и определяли сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 7. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю (PBS), у мышей рНВВ после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 3 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
PBS	1,000 ± 0,185	1,000 ± 0,288	1,000 ± 0,540	1,000 ± 0,326
AD04178	0,164 ± 0,043	0,206 ± 0,044	0,293 ± 0,050	0,348 ± 0,099
AD04579	0,083 ± 0,028	0,099 ± 0,022	0,112 ± 0,022	0,138 ± 0,056
AD04580	0,048 ± 0,007	0,073 ± 0,012	0,085 ± 0,012	0,126 ± 0,014
AD04570	0,241 ± 0,076	0,294 ± 0,071	0,276 ± 0,068	0,474 ± 0,092
AD04572	0,190 ± 0,040	0,279 ± 0,011	0,323 ± 0,049	0,441 ± 0,046
AD04573	0,333 ± 0,143	0,505 ± 0,106	0,361 ± 0,060	0,444 ± 0,068
AD04574	0,291 ± 0,032	0,650 ± 0,056	0,388 ± 0,048	0,485 ± 0,070
AD04575	0,397 ± 0,189	0,514 ± 0,234	0,574 ± 0,204	0,689 ± 0,207
AD04419	0,262 ± 0,038	0,174 ± 0,042	0,258 ± 0,064	0,311 ± 0,089
AD04578	0,210 ± 0,056	0,235 ± 0,033	0,298 ± 0,035	0,336 ± 0,049

Каждый из агентов РНКи AD04178, AD04579, AD04580, AD04570, AD04572, AD04573, AD04574, AD04575, AD04419 и AD04578 был сконструирован таким образом, чтобы его последовательности анти-смысловой цепи были по меньшей мере частично комплементарны открытой рамке считывания X в положениях 1781-1789 генома ВГВ, показанного в табл. 1 и 2 выше. Каждый из агентов РНКи против ВГВ показал существенное снижение HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени. Например, AD04580 показал снижение концентраций s-антигена более чем на 95% на день 8 (концентрация HBsAg 0,048±0,007) после нормирования к уровню до лечения и контролю PBS.

Кроме того, сывороточные концентрации ДНК ВГВ определяли для групп, получавших PBS, AD04579 и AD04580, из проб сывороток, собранных на день 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50, в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Сыворотку из каждой группы объединяли, а впоследствии

из сыворотки выделяли ДНК в двух повторениях. Данные представлены в следующей таблице.

Таблица 8. Средние сывороточные концентрации ДНК ВГВ, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВВ после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 3 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
PBS	1,0000 ± 0,1185	1,0000 ± 0,0591	1,0000 ± 0,0322	1,0000 ± 0,0597
AD04579	0,1541 ± 0,0070	0,1776 ± 0,0027	0,1810 ± 0,0450	0,3738 ± 0,0302
AD04580	0,0921 ± 0,0253	0,0869 ± 0,0117	0,1444 ± 0,0755	0,0950 ± 0,0026
Группа	День 36	День 43	День 50	
PBS	1,0000 ± 0,1625	1,0000 ± 0,0055	1,0000 ± 0,1484	
AD04579	0,9670 ± 0,1247	0,7643 ± 0,1334	0,6299 ± 0,1319	
AD04580	0,4949 ± 0,0096	0,4350 ± 0,0344	0,6819 ± 0,0266	

Данные, представленные в табл. 8, показывают, что оба исследованных агента РНКи обеспечивали существенное снижение концентраций ДНК ВГВ по сравнению с группой PBS, причем AD04580 приводил к снижению, немного превышающему 1 логарифм в самой низкой точке (например, средняя сывороточная концентрация ДНК на день 15 составляла 0,0869±0,0117).

Пример 4. Агенты РНКи против ВГВ в мышинной модели рНВВ

Использовали мышиную модель рНВВ, описанную в примере 2 выше. В день 1 каждой мыши подкожно вводили 200 мкл, содержащих 2 мг/кг (мрк) агента РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, применяемого в качестве контроля. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. В состав вводимых агентов РНКи против ВГВ входили агенты, перечисленные ниже в табл. 9. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в натянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе (n=3).

Сыворотку собирали на день 8, 15, 22 и 29 и определяли сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 9. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВВ после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 4 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
PBS	1,000 ± 0,085	1,000 ± 0,235	1,000 ± 0,171	1,000 ± 0,099
AD04010	0,229 ± 0,141	0,165 ± 0,091	0,142 ± 0,085	0,116 ± 0,076
AD04581	0,379 ± 0,042	0,221 ± 0,066	0,135 ± 0,040	0,112 ± 0,050
AD04591	0,285 ± 0,101	0,145 ± 0,064	0,086 ± 0,024	0,081 ± 0,026
AD04434	0,295 ± 0,041	0,191 ± 0,008	0,147 ± 0,016	0,187 ± 0,049
AD04583	0,488 ± 0,018	0,545 ± 0,037	0,511 ± 0,086	0,663 ± 0,112
AD04584	0,392 ± 0,136	0,337 ± 0,073	0,364 ± 0,075	0,515 ± 0,155
AD04585	0,099 ± 0,016	0,042 ± 0,014	0,030 ± 0,009	0,044 ± 0,014
AD04586	0,222 ± 0,056	0,107 ± 0,034	0,074 ± 0,016	0,106 ± 0,039
AD04588	0,255 ± 0,065	0,205 ± 0,021	0,185 ± 0,021	0,207 ± 0,024
AD04438	0,265 ± 0,106	0,113 ± 0,045	0,091 ± 0,031	0,130 ± 0,038

Агенты РНКи AD04010, AD04581, AD04591, AD04434, AD04583, AD04584, AD04585, AD04586, AD04588 и AD04438 были сконструированы таким образом, чтобы их последовательности антисмысловой цепи были, по меньшей мере, частично комплементарны открытой рамке считывания S в положи-

ях 257-275 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2. Каждый из агентов РНКи против ВГВ, показанных в табл. 9 выше, демонстрировал существенное снижение HBsAg по сравнению с контролем (PBS) во всех отмеченных моментах времени. Например, AD04585 показывал снижение HBsAg на около 90% на день 8, снижение на 95% на день 15, снижение на 97% на день 22 и снижение на 95% на день 29.

Кроме того, сывороточные концентрации ДНК ВГВ определяли для групп, получавших PBS, AD04585 из проб сыворотки, собранных на день 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50, в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Сыворотку из каждой группы объединяли, а впоследствии из сыворотки выделяли ДНК в двух повторениях. Данные представлены в следующей таблице.

Таблица 10. Средние сывороточные концентрации ДНК ВГВ, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВВ после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 4 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
PBS	1,000 ± 0,248	1,000 ± 0,089	1,000 ± 0,195	1,000 ± 0,180
AD04585	0,901 ± 0,183	0,225 ± 0,003	0,187 ± 0,023	0,191 ± 0,004
Группа	День 36	День 43	День 50	
PBS	1,000 ± 0,018	1,000 ± 0,033	1,000 ± 0,778	
AD04585	0,209 ± 0,017	0,171 ± 0,019	0,305 ± 0,010	

Данные, представленные в табл. 10, указывают на то, что агент РНКи против ВГВ AD04585 привел к снижению концентраций ДНК ВГВ по сравнению с группой, получавшей PBS.

Пример 5. Ответ на лечение в зависимости от дозы и комбинации агентов РНКи против ВГВ в мышиную модель рНВВ.

Использовали мышиную модель рНВВ, описанную в примере 2 выше. Мышей разделяли на различные группы, включая приведенные в табл. 11 ниже, и мышам выполняли подкожные инъекции объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в табл. 11.

Таблица 11. Группы дозирования мышей рНВВ для примера 5

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
A	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1
B	3,0 мг/кг AD04585	Одиночная инъекция в день 1
C	3,0 мг/кг AD04585	Инъекция в день 1, день 8 и день 15 (т. е. три инъекции один раз в неделю)
D	3,0 мг/кг AD04580	Одиночная инъекция в день 1
E	3,0 мг/кг AD04580	Инъекция в день 1, день 8 и день 15 (т. е. три инъекции один раз в неделю)
F	1,0 мг/кг AD4585 + 1,0 мг/кг AD04580	Инъекция в день 1 и другая инъекция в день 22
G	1,0 мг/кг AD4585 + 1,0 мг/кг AD04580	Инъекция в день 1, день 8, день 15 и день 43
H	1,5 мг/кг AD4585 + 1,5 мг/кг AD04580	Инъекция в день 1, день 22 и день 43
I	1,5 мг/кг AD4585 + 1,5 мг/кг AD04580	Инъекция в день 1, день 8, день 15 и день 43

Каждой мыши подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в табл. 11. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминные нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненатянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе (n=3).

Сыворотку собирали на день 8, день 15, день 22, день 29, день 36, день 43, день 50 и день 57 и определяли сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с про-

цедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 12. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рHBV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 5 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
A	1,000 ± 0,162	1,000 ± 0,138	1,000 ± 0,083	1,000 ± 0,204
B	0,060 ± 0,015	0,010 ± 0,003	0,006 ± 0,002	0,007 ± 0,002
C	0,087 ± 0,014	0,004 ± 0,001	0,001 ± 0,0003	0,0002 ± 0,0001
D	0,026 ± 0,009	0,035 ± 0,013	0,037 ± 0,014	0,046 ± 0,006
E	0,023 ± 0,005	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,0003	0,001 ± 0,0004
F	0,063 ± 0,046	0,083 ± 0,051	0,086 ± 0,016	0,027 ± 0,006
G	0,062 ± 0,011	0,022 ± 0,008	0,009 ± 0,003	0,008 ± 0,002
H	0,055 ± 0,015	0,062 ± 0,002	0,072 ± 0,013	0,011 ± 0,001
I	0,031 ± 0,006	0,008 ± 0,001	0,003 ± 0,0004	0,003 ± 0,0003
Группа	День 36	День 43	День 50	День 57
A	1,000 ± 0,211	1,000 ± 0,189	1,000 ± 0,179	1,000 ± 0,062
B	0,013 ± 0,005	0,027 ± 0,004	0,026 ± 0,004	0,057 ± 0,012
C	0,001 ± 0,0002	0,002 ± 0,001	0,008 ± 0,004	0,020 ± 0,015
D	0,116 ± 0,019	0,214 ± 0,056	0,263 ± 0,046	0,404 ± 0,030
E	0,003 ± 0,0001	0,007 ± 0,001	0,012 ± 0,002	0,033 ± 0,011
F	0,029 ± 0,003	0,065 ± 0,005	0,064 ± 0,004	0,161 ± 0,033
G	0,014 ± 0,008	0,039 ± 0,011	0,018 ± 0,008	0,046 ± 0,008
H	0,017 ± 0,005	0,039 ± 0,008	0,007 ± 0,001	0,013 ± 0,003
I	0,007 ± 0,001	0,020 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,011 ± 0,002

Каждый из агентов РНКи против ВГВ AD04580 и AD04585 индивидуально приводил к снижению HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени. Кроме того, комбинированное лечение AD04585 и AD04580, которое, как отмечалось в примерах выше, нацелено на разные области генома ВГВ, также приводило к снижению HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени.

Кроме того, сывороточные концентрации ДНК ВГВ определяли для каждой из групп, приведенных в табл. 11, в пробах сыворотки, собранных на день 8, 15, 22, 29 и 36, в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Сыворотку из каждой группы объединяли, а впоследствии из сыворотки выделяли ДНК в двух реакционных смесях. Данные представлены в следующей таблице.



Таблица 13. Средние сывороточные концентрации ДНК ВГВ, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 5 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
A	1,000 ± 0,063	1,000 ± 0,059	1,000 ± 0,372	1,000 ± 0,237
B	0,267 ± 0,003	0,043 ± 0,016	0,038 ± 0,008	0,044 ± 0,004
C	0,236 ± 0,016	0,023 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,002 ± 0,000
D	0,058 ± 0,016	0,085 ± 0,017	0,252 ± 0,071	0,217 ± 0,009
E	0,056 ± 0,002	0,0009 ± 0,0004	0,0005 ± 0,0002	0,003 ± 0,002
F	0,298 ± 0,013	0,351 ± 0,032	0,823 ± 0,127	0,217 ± 0,007
G	0,276 ± 0,035	0,112 ± 0,020	0,061 ± 0,002	0,073 ± 0,002
H	0,232 ± 0,012	0,213 ± 0,028	0,403 ± 0,047	0,079 ± 0,005
I	0,092 ± 0,026	0,055 ± 0,000	0,002 ± 0,003	0,010 ± 0,004

Группа	День 36
A	1,000 ± 0,024
B	0,046 ± 0,007
C	0,003 ± 0,000
D	0,319 ± 0,034
E	0,002 ± 0,000
F	0,122 ± 0,004
G	0,047 ± 0,006
H	0,056 ± 0,003
I	0,021 ± 0,007

Данные, представленные в табл. 13, указывают на то, что исследованные агенты РНКи, как индивидуально, так и в комбинации, обеспечивали снижение концентраций ДНК ВГВ по сравнению с группой, получавшей PBS. Повторное дозирование или увеличение количества дозы приводило к дополнительным снижениям ДНК ВГВ.

Пример 6. Агенты РНКи против ВГВ у мышей рНВV: исследования ответа в зависимости от дозы и комбинированного лечения

Использовали мышиную модель рНВV, описанную в примере 2 выше. Мышей разделяли на различные группы, как указано в табл. 14 ниже, и каждой мыши выполняли одну подкожную инъекцию объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в табл. 14.

Таблица 14. Группы дозирования мышей рНВV для примера 6

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
A	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1
B	4,0 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1
C	1,0 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1
D	2,0 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1
E	1,0 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
F	2,0 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
G	3,0 мг/кг AD04872	Одиночная инъекция в день 1
H	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1
I	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
J	3,0 мг/кг AD04872 + 2,0 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1

Каждой мышке подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в таблице 14. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т. е. инъекции были подкожными) в ненатянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе (n=3).

Сыворотку собирали за 1 день до введения, а затем на день 8, день 15, день 22, день 29 и день 36 определяли сывороточные концентрации HBsAg в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей табл. 15, где средние значения HBsAg отражают нормированные средние значения HBsAg.

Таблица 15. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 6 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22
A	1,000 ± 0,068	1,000 ± 0,183	1,000 ± 0,181
B	0,085 ± 0,020	0,068 ± 0,005	0,089 ± 0,014
C	0,283 ± 0,039	0,343 ± 0,055	0,436 ± 0,004
D	0,161 ± 0,052	0,137 ± 0,036	0,190 ± 0,068
E	0,182 ± 0,040	0,233 ± 0,023	0,436 ± 0,029
F	0,078 ± 0,024	0,093 ± 0,015	0,167 ± 0,028
G	0,066 ± 0,030	0,013 ± 0,002	0,010 ± 0,002
H	0,033 ± 0,012	0,016 ± 0,005	0,020 ± 0,005
I	0,040 ± 0,011	0,028 ± 0,003	0,032 ± 0,007
J	0,035 ± 0,010	0,019 ± 0,002	0,021 ± 0,001
Группа	День 29	День 36	
A	1,000 ± 0,032	1,000 ± 0,141	
B	0,148 ± 0,016	0,194 ± 0,047	
C	0,622 ± 0,041	0,741 ± 0,132	
D	0,234 ± 0,055	0,280 ± 0,071	
E	0,623 ± 0,116	0,782 ± 0,114	
F	0,259 ± 0,014	0,368 ± 0,068	
G	0,010 ± 0,003	0,009 ± 0,004	
H	0,022 ± 0,005	0,024 ± 0,009	
I	0,065 ± 0,014	0,087 ± 0,015	
J	0,031 ± 0,0001	0,044 ± 0,002	

Исследованные агенты РНКи против ВГВ приводили к снижению HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени. Кроме того, комбинированное лечение AD04872 (который включает в себя последовательность антисмысловой цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна ORF S в положениях 261-279 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2) и одним из AD04981 или AD04963 (оба из которых включают в себя последовательности антисмысловой цепи, которые по меньшей мере частично комплементарны ORF X в положениях 1781-1799 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2), которое показано в группах H, I и J примера 6, демонстрирует, что комбинированное лечение двумя агентами РНКи, один из которых нацелен на ORF S, а другой - на ORF X генома ВГВ, аналогичным образом приводило к снижению HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени.

Кроме того, также оценивали сывороточные концентрации е-антигена гепатита В (HBeAg). Сначала объединяли пробы от мышей в каждой соответствующей группе, а полученные образцы сыворотки анализировали в один прием. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 16. Средние концентрации HBeAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 6

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29	День 36
A	1,000	1,000	1,000	0,183	1,000
B	0,138	0,180	0,274	0,005	0,089
C	0,316	0,376	0,588	0,055	0,436
D	0,167	0,250	0,262	0,036	0,190
E	0,301	0,327	0,447	0,023	0,436
F	0,167	0,172	0,305	0,015	0,167
G	0,275	0,135	0,158	0,002	0,010
H	0,080	0,053	0,094	0,005	0,020
I	0,165	0,124	0,185	0,003	0,032
J	0,120	0,057	0,101	0,002	0,021

Как показано в табл. 16, комбинация AD04872 (который нацелен на ORF S генома ВГВ) и одного из

AD04981 или AD04963 (оба из которых нацелены на ORF X генома ВГВ) показала дополнительное снижение концентраций HBeAg по сравнению с введением только AD04872.

Пример 7. Агенты РНКи против ВГВ у мышей рНВВ: дополнительные исследования ответа в зависимости от дозы и комбинированного лечения

Использовали мышиную модель рНВВ, описанную в примере 2 выше. Мышей разделяли на различные группы, как указано в табл. 17 ниже, и каждой мышке выполняли одну подкожную инъекцию объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в табл. 17.

Таблица 17. Группы дозирования мышей рНВВ для примера 7

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
A	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1
B	4,0 мг/кг AD04776	Одиночная инъекция в день 1
C	1,0 мг/кг AD04982	Одиночная инъекция в день 1
D	2,0 мг/кг AD04982	Одиночная инъекция в день 1
E	1,0 мг/кг AD04776	Одиночная инъекция в день 1
F	2,0 мг/кг AD04776	Одиночная инъекция в день 1
G	3,0 мг/кг AD04872	Одиночная инъекция в день 1
H	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD04982	Одиночная инъекция в день 1
I	3,0 мг/кг AD04872 + 2,0 мг/кг AD04982	Одиночная инъекция в день 1

Каждой мышке подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в таблице 17. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненатянутую кожу в области шеи и плеч. Четыре (4) мыши в каждой группе исследовали в день -1 и день 8 (n=4), а затем одну мышку из каждой группы умерщвляли для гистологической оценки. Исследовали три (3) мыши в каждой группе в день 22 и день 29 (n=3).

Сыворотку собирали в день -1 до введения, а затем в день 8, день 15, день 22 и день 29, и определяли сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей табл. 18.

Таблица 18. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения (день -1) и контролю PBS, у мышей рНВВ после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 7 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-)).

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
A	1,000 ± 0,347	1,000 ± 0,278	1,000 ± 0,194	1,000 ± 0,318
B	0,117 ± 0,069	0,085 ± 0,039	0,148 ± 0,045	0,198 ± 0,049
C	0,519 ± 0,058	0,375 ± 0,012	0,422 ± 0,046	0,525 ± 0,037
D	0,342 ± 0,062	0,255 ± 0,046	0,272 ± 0,122	0,314 ± 0,068
E	0,279 ± 0,057	0,245 ± 0,032	0,374 ± 0,121	0,304 ± 0,035
F	0,224 ± 0,018	0,161 ± 0,009	0,310 ± 0,016	0,482 ± 0,053
G	0,029 ± 0,010	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,006 ± 0,001
H	0,016 ± 0,005	0,004 ± 0,001	0,010 ± 0,006	0,015 ± 0,008
I	0,026 ± 0,012	0,008 ± 0,001	0,010 ± 0,002	0,015 ± 0,005

Исследованные агенты РНКи против ВГВ приводили к снижению HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени.

Кроме того, также оценивали сывороточные концентрации e-антигена гепатита В (HBeAg). Сначала объединяли пробы от мышей в каждой соответствующей группе, а полученные образцы сыворотки анализировали в один прием. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 19. Средние концентрации НВеАg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 7

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29	День 36
A	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
B	0,193	0,213	0,260	0,307	0,464
C	0,471	0,424	0,562	0,513	0,705
D	0,335	0,310	0,411	0,442	0,500
E	0,381	0,368	0,355	0,564	0,483
F	0,275	0,255	0,370	0,495	0,449
G	0,323	0,218	0,205	0,250	0,190
H	0,124	0,102	0,099	0,156	0,156
I	0,081	0,059	0,045	0,063	0,086

Таблица 19-1. Среднее кратное снижение НВеАg, нормированное к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 7

Группа	День 8 (Кратное снижение)	День 15 (Кратное снижение)	День 22 (Кратное снижение)	День 29 (Кратное снижение)	День 36 (Кратное снижение)
A	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
B	5,2	4,7	3,8	3,3	2,2
C	2,1	2,4	1,8	2,0	1,4
D	3,0	3,2	2,4	2,3	2,0
E	2,6	2,7	2,8	1,8	2,1
F	3,6	3,9	2,7	2,0	2,2
G	3,1	4,6	4,9	4,0	5,3
H	8,1	9,8	10,1	6,4	6,4
I	12,3	17,0	22,3	15,7	11,6

В табл. 19-1 представлено соотношение кратности снижения НВеАg по сравнению с контролем, которое рассчитывается как нормированная концентрация НВеАg в контрольной группе (PBS)/нормированная концентрация НВеАg в соответствующей группе с агентом(ами) РНКи (т.е. 1,000/концентрация НВеАg). Данные в таблице 19-1 указывают на то, что комбинация AD04872 (который, как отмечено выше, включает в себя последовательность антисмысловой цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна ORF S в положениях 261-279 генома ВГВ) с AD04982 (который включает в себя последовательность антисмысловой цепи, которая, по меньшей мере, частично комплементарна ORF X в положениях 1781-1799 генома ВГВ) приводила к дополнительному снижению концентраций НВеАg по сравнению с введением только отдельных агентов РНКи (см., например, табл. 19 и 19-1, группы H и I). Дополнительно данные из этого примера также показывают, что комбинация AD04872 с AD04982 приводила к кратному снижению НВеАg, превышающему сумму кратных снижений НВеАg, наблюдаемых при введении AD04872 и AD04982 по отдельности. Например, в группе I (в которой вводили 3,0 мг/кг AD04872+2,0 мг/кг AD04982) происходило снижение НВеАg на день 15 в 17,0 раз, что больше суммы кратного снижения в группе G (3,0 мг/кг AD04872), которое составляло 4,6, и кратного снижения в группе D (2,0 мг/кг AD04982), которое составляло 3,2.

Дополнительно сывороточные концентрации ДНК ВГВ определяли для каждой из групп, приведенных в табл. 17, в пробах сыворотки, собранных в дни -1, 8, 15, 22, 29 и 36, в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Сывороточную ДНК ВГВ выделяли у каждого животного в каждый момент времени. Данные представлены в следующей таблице.

Таблица 20. Средние сывороточные концентрации ДНК ВГВ, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 7 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
A	1,000 ± 0,493	1,000 ± 0,358	1,000 ± 0,424	1,000 ± 0,387
B	0,224 ± 0,150	0,263 ± 0,185	0,335 ± 0,204	0,449 ± 0,108
C	0,358 ± 0,207	0,428 ± 0,073	0,433 ± 0,220	0,474 ± 0,090
D	0,516 ± 0,163	0,523 ± 0,264	0,244 ± 0,123	0,241 ± 0,085
E	0,601 ± 0,388	0,319 ± 0,125	0,279 ± 0,138	0,506 ± 0,525
F	0,363 ± 0,128	0,374 ± 0,197	0,275 ± 0,146	0,385 ± 0,141
G	0,071 ± 0,032	0,022 ± 0,009	0,015 ± 0,015	0,025 ± 0,005
H	0,069 ± 0,070	0,018 ± 0,014	0,019 ± 0,020	0,022 ± 0,001
I	0,044 ± 0,024	0,033 ± 0,016	0,017 ± 0,012	0,022 ± 0,014
<hr/>				
Группа	День 36			
A	1,000 ± 0,326			
B	0,603 ± 0,068			
C	0,509 ± 0,163			
D	0,543 ± 0,079			
E	0,444 ± 0,407			
F	0,721 ± 0,043			
G	0,058 ± 0,030			
H	0,047 ± 0,021			
I	0,058 ± 0,051			

Данные, представленные в табл. 20, показывают, что исследованные агенты РНКи, как по отдельности, так и в комбинации, приводили к снижению концентраций ДНК ВГВ по сравнению с получавшей PBS группой, и дополнительно показывают, что комбинация AD04872 (которая нацелена на ORF S) и AD04982 (которая нацелена на ORF X) снижает сывороточную концентрацию ДНК ВГВ в той же степени, что и аналогичное количество только AD04872.

Пример 8. Агенты РНКи против ВГВ у мышей рНВV: дальнейшие исследования ответа в зависимости от дозы и комбинированного лечения

Использовали мышиную модель рНВV, описанную в примере 2 выше. Мышей разделяли на различные группы, как указано в таблице 21 ниже, и каждой мыши выполняли одну подкожную инъекцию объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в табл. 21.

Таблица 21. Группы дозирования мышей рНВV для примера 8

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования	Число животных (n)
1	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1	4
2А	4,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
2В	4,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
3А	3,3 мг/кг AD04872 + 1,7 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
3В	3,3 мг/кг AD04872 + 1,7 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
4А	3,2 мг/кг AD04872 + 0,8 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
4В	3,2 мг/кг AD04872 + 0,8 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
5А	2,7 мг/кг AD04872 + 1,3 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
5В	2,7 мг/кг AD04872 +	Одиночная инъекция в день 1	4
	1,3 мг/кг AD05070	день 1	
6А	4,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
6В	4,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
7А	1,7 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
7В	1,7 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
8А	0,8 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
8В	0,8 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	4
9	1,7 мг/кг AD05148	Одиночная инъекция в день 1	4
10	2,7 мг/кг AD04872	Одиночная инъекция в день 1	3
11	1,7 мг/кг AD05147	Одиночная инъекция в день 1	3
12	4,0 мг/кг AD04872	Одиночная инъекция в день 1	3
13	1,7 мг/кг AD05149	Одиночная инъекция в день 1	3

Кроме того, планируется умерщвление мышей согласно следующему графику:

День 11: Умерщвление 2 мышей из групп 2А, 3А, 4А, 5А, 6А, 7А и 8А и умерщвление одной мыши из группы 9.

День 14: Умерщвление 2 мышей из групп 2А, 3А, 4А, 5А, 6А, 7А и 8А.

День 21: Умерщвление 2 мышей из групп 2В, 3В, 4В, 5В, 6В, 7В и 8В.

День 28: Умерщвление 2 мышей из групп 1, 2В, 3В, 4В, 5В, 6В, 7В и 8В и всех мышей (4) из групп 10 и 12.

Каждой мыши подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в табл. 21. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в

себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненатянутую кожу в области шеи и плеч. Как показано в табл. 14 выше, исследовали четыре (4) мыши в каждой группе (n=4), за исключением групп 10, 11, 12 и 13, в которых исследовали три мыши (n=3).

Сыворотку собирали в день -1 до введения и в дни 8, 14, 21 и 28, и определяли сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 22. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей rHBV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 8 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Номер группы	День 8	День 14	День 21	День 28
1	1,000 ± 0,089	1,000 ± 0,087	1,000 ± 0,132	1,000 ± 0,138
2A	0,009 ± 0,003	0,005 ± 0,001		
2B	0,006 ± 0,003	0,002 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,005 ± 0,001
3A	0,032 ± 0,021	0,009 ± 0,004		
3B	0,028 ± 0,027	0,008 ± 0,006	0,012 ± 0,005	0,015 ± 0,005
4A	0,036 ± 0,020	0,012 ± 0,006		
4B	0,029 ± 0,025	0,010 ± 0,008	0,015 ± 0,005	0,022 ± 0,004
5A	0,027 ± 0,014	0,008 ± 0,002		
5B	0,027 ± 0,013	0,007 ± 0,003	0,019 ± 0,004	0,031 ± 0,005
6A	0,058 ± 0,035	0,069 ± 0,039		
6B	0,117 ± 0,058	0,079 ± 0,047	0,145 ± 0,082	0,135 ± 0,061
7A	0,189 ± 0,100	0,084 ± 0,029		
7B	0,099 ± 0,010	0,147 ± 0,025	0,267 ± 0,048	0,345 ± 0,063
8A	0,355 ± 0,099	0,366 ± 0,069		
8B	0,271 ± 0,058	0,334 ± 0,060	0,464 ± 0,055	0,624 ± 0,053
9	0,239 ± 0,148	0,179 ± 0,127	0,309 ± 0,213	0,345 ± 0,225
10	0,018 ± 0,009	0,005 ± 0,003	0,005 ± 0,002	0,007 ± 0,003
11	0,129 ± 0,068	0,138 ± 0,060	0,239 ± 0,092	0,315 ± 0,119
12	0,033 ± 0,022	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,0004
13	0,200 ± 0,093	0,239 ± 0,114	0,367 ± 0,123	0,477 ± 0,125

Исследованные агенты РНКи против ВГВ, как по отдельности, так и в комбинации, приводили к существенному снижению HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени.

#### Пример 9. Доставка агента РНКи

Использовали мышиную модель rHBV, описанную в примере 2 выше. В день 1 каждой мыши выполняли одну подкожную инъекцию 200 мкл, содержащих 10 мг/кг (mpk) агента РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ для применения в качестве контроля. Исследованные агенты РНКи против ВГВ включали в себя агенты, имеющие номера дуплекса, приведенные в табл. 23 ниже, причем каждый из них включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненатянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе (n=3).

Сыворотку собирали перед введением, а затем в день 8, 15, 22 и 29, и определяли сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с процедурой, приведенной

выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 23. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 9 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Агент РНКи	HBsAg в сыворотке в низшей точке (норм. фракция)	% снижения в низшей точке	День низшей точки
PBS	1,000	Н/П	Н/П
AD03498	0,087 ± 0,016	91,3%	8
AD03499	0,069 ± 0,011	93,1%	15
AD03500	0,095 ± 0,031	90,5%	8
AD03501	0,046 ± 0,020	95,4%	15

Каждый из агентов РНКи против ВГВ, показанных в табл. 23 выше, включал в себя последовательность антисмысловой нити, которая, по меньшей мере, частично комплементарна ORF X в положениях 1781-1799 генома ВГВ. Каждый из агентов РНКи приводил к значительному снижению по сравнению с контролем PBS.

Пример 10. Агенты РНКи против ВГВ у мышей рНВV: дополнительные исследования комбинированного лечения

Использовали мышиную модель рНВV, описанную в примере 2 выше. Мышей разделяли на различные группы, как указано в табл. 24 ниже, и каждой мыши выполняли одну подкожную инъекцию объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в табл. 24.

Таблица 24. Группы дозирования мышей рНВV для примера 10

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
A	Группа I с PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
B	Группа II с PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
C	3,0 мг/кг AD04585	Одиночная инъекция в день 1, день 22, день 50 и день 64
D	3,0 мг/кг AD04771	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
E	3,0 мг/кг AD04580	Одиночная инъекция в день 1, день 22, день 50 и день 64
F	3,0 мг/кг AD04776	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
G	1,5 мг/кг AD04585 + 1,5 мг/кг AD04580	Одиночная инъекция в день 1, день 22, день 50 и день 64
H	1,5 мг/кг AD04771 + 1,5 мг/кг AD04776	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
I	2,0 мг/кг AD04771 + 1,0 мг/кг AD04776	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
J	2,25 мг/кг AD04771 + 0,75 мг/кг AD04776	Одиночная инъекция в день 1 и день 22

Каждой мыши подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в табл. 24. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминные нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненапрянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе (n=3).

Сыворотку собирали перед введением, а затем в день -1, день 8, день 15, день 22, день 29, день 36, день 43, день 50, день 57 и день 64. Сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) определяли в соответствии с процедурой, приведенной в примере 2 выше. Данные эксперимента показаны ниже.



Таблица 25. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS (в качестве контроля использовали группу А), у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 10 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22
А	1,000 ± 0,146	1,000 ± 0,095	1,000 ± 0,202
В	0,931 ± 0,161	1,091 ± 0,156	1,132 ± 0,259
С	0,071 ± 0,050	0,031 ± 0,022	0,024 ± 0,013
Д	0,134 ± 0,035	0,130 ± 0,024	0,119 ± 0,028
Е	0,015 ± 0,001	0,041 ± 0,012	0,087 ± 0,015
F	0,197 ± 0,081	0,308 ± 0,138	0,476 ± 0,156
G	0,029 ± 0,015	0,069 ± 0,029	0,094 ± 0,016
Н	0,191 ± 0,057	0,315 ± 0,094	0,420 ± 0,126
И	0,153 ± 0,050	0,194 ± 0,076	0,233 ± 0,116
Ж	0,155 ± 0,059	0,177 ± 0,067	0,316 ± 0,117
Группа	День 29	День 36	День 43
А	1,000 ± 0,182	1,000 ± 0,287	1,000 ± 0,298
В	1,417 ± 0,414	1,166 ± 0,248	
С	0,007 ± 0,005	0,004 ± 0,003	0,006 ± 0,001
Д	0,048 ± 0,023	0,036 ± 0,020	0,052 ± 0,027
Е	0,014 ± 0,006	0,021 ± 0,011	0,026 ± 0,011
F	0,246 ± 0,081	0,244 ± 0,097	0,179 ± 0,061
G	0,023 ± 0,009	0,027 ± 0,009	0,037 ± 0,013
Н	0,200 ± 0,080	0,185 ± 0,081	0,194 ± 0,055
И	0,141 ± 0,082	0,133 ± 0,051	0,151 ± 0,082
Ж	0,133 ± 0,064	0,102 ± 0,039	0,129 ± 0,050
Группа	День 50	День 57	День 64
А	1,000 ± 0,296	1,000 ± 0,394	1,000 ± 0,395
В			
С	0,015 ± 0,0001	0,002 ± 0,001	0,004 ± 0,001
Д			
Е	0,052 ± 0,015	0,009 ± 0,002	0,018 ± 0,007
F			
G	0,076 ± 0,020	0,012 ± 0,003	0,020 ± 0,007
Н			
И			
Ж			

Агенты РНКи против ВГВ AD04585 и AD04771 были сконструированы таким образом, чтобы их последовательности антисмысловой цепи были по меньшей мере частично комплементарны открытой рамке считывания S в положениях 257-275 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2. Агенты РНКи против ВГВ AD04580 и AD04776 были сконструированы таким образом, чтобы их последовательности антисмысловой цепи были по меньшей мере частично комплементарны открытой рамке считывания X в положениях 1781-1799 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2. Исследованные агенты РНКи против ВГВ, как по отдельности, так и в комбинации, приводили к снижению HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени. Каждая последующая доза дополнительно усиливала снижение HBsAg в низшей точке.

Кроме того, сывороточные концентрации ДНК ВГВ определяли для группы С (3,0 мг/кг AD04585), группы Е (3,0 мг/кг AD04580) и группы G (1,5 мг/кг AD04585+1,5 мг/кг AD04580) из табл. 24 в пробах сыворотки, собранных в дни -1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50, в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2.

Сывороточную ДНК ВГВ выделяли у каждого животного в каждый из этих моментов времени. Данные представлены в следующей таблице.

Таблица 26. Средние сывороточные концентрации ДНК ВГВ, нормированные к уровню до лечения и контролям PBS (обе группы А и В, получавшие PBS), у мышей рНВВ после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 10 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
А/В (PBS)	1,000 ± 0,316	1,000 ± 0,427	1,000 ± 0,428	1,000 ± 0,475
С	0,172 ± 0,151	0,142 ± 0,079	0,252 ± 0,132	0,072 ± 0,086
Е	0,024 ± 0,015	0,042 ± 0,037	0,449 ± 0,184	0,053 ± 0,048
Г	0,093 ± 0,053	0,083 ± 0,037	0,370 ± 0,153	0,211 ± 0,060
Группа	День 36	День 43	День 50	
А/В (PBS)	1,000 ± 0,623	1,000 ± 0,532	1,000 ± 0,532	
С	0,044 ± 0,020	0,104 ± 0,033	0,156 ± 0,016	
Е	0,012 ± 0,004	0,061 ± 0,031	0,161 ± 0,019	
Г	0,048 ± 0,022	0,147 ± 0,010	0,295 ± 0,041	

Данные, представленные в табл. 26, указывают на то, что исследованные агенты РНКи против ВГВ, как индивидуально, так и в комбинации, приводили к снижению концентраций ДНК ВГВ по сравнению с группой, получавшей PBS.

Пример 11. Агенты РНКи против ВГВ у мышей рНВВ: исследования комбинированного лечения.

Использовали мышиную модель рНВВ, описанную в примере 2 выше. Мышей разделяли на различные группы, как указано в табл. 27 ниже, и каждой мышке выполняли одну подкожную инъекцию объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в табл. 27.

Таблица 27. Группы дозирования мышей рНВВ для примера 11

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
А	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1
В	3,0 мг/кг AD04962	Одиночная инъекция в день 1
С	3,0 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
Д	1,5 мг/кг AD04962 + 1,5 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
Е	2,0 мг/кг AD04962 + 1,0 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
Г	2,25 мг/кг AD04962 + 0,75 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
Г	1,5 мг/кг AD04962 + 1,5 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
Н	3,0 мг/кг AD04962 + 3,0 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
И	1,5 мг/кг AD04962 + 1,5 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
Ж	4,5 мг/кг AD04962 + 4,5 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
К	3,0 мг/кг AD04872	Одиночная инъекция в день 1
Л	3,0 мг/кг AD04882	Одиночная инъекция в день 1
М	3,0 мг/кг AD04885	Одиночная инъекция в день 1

Каждой мышке подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в табл. 24. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненатянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе (n=3).

Сыворотку собирали в день -1 до введения, а затем в день 8, день 15, день 22, день 29 и день 36 (за исключением группы L (AD04882) и группы M (AD04885), и определяли сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 28. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКi против ВГВ из примера 11 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22
A	1,000 ± 0,048	1,000 ± 0,144	1,000 ± 0,083
B	0,125 ± 0,025	0,083 ± 0,014	0,063 ± 0,016
C	0,019 ± 0,005	0,035 ± 0,008	0,052 ± 0,009
D	0,054 ± 0,013	0,079 ± 0,009	0,108 ± 0,021
E	0,099 ± 0,025	0,098 ± 0,053	0,142 ± 0,050
F	0,070 ± 0,015	0,103 ± 0,036	0,140 ± 0,020
G	0,041 ± 0,021	0,012 ± 0,008	0,021 ± 0,013
H	0,020 ± 0,006	0,044 ± 0,010	0,062 ± 0,019
I	0,077 ± 0,017	0,019 ± 0,004	0,004 ± 0,001
J	0,012 ± 0,002	0,021 ± 0,001	0,032 ± 0,002
K	0,045 ± 0,014	0,013 ± 0,005	0,008 ± 0,005
L	0,106 ± 0,020	0,176 ± 0,044	0,215 ± 0,082
M	0,275 ± 0,029	0,378 ± 0,080	0,572 ± 0,043
<b>Группа</b>			
A	1,000 ± 0,209	1,000 ± 0,270	
B	0,079 ± 0,020	0,096 ± 0,007	
C	0,087 ± 0,014	0,164 ± 0,026	
D	0,176 ± 0,014	0,292 ± 0,030	
E	0,223 ± 0,082	0,373 ± 0,150	
F	0,213 ± 0,020	0,328 ± 0,034	
G	0,031 ± 0,013	0,078 ± 0,064	
H	0,97 ± 0,028	0,160 ± 0,060	
I	0,008 ± 0,001	0,002 ± 0,0003	
J	0,044 ±	0,069 ±	
		0,008	0,009
K	0,011 ± 0,007	0,011 ± 0,009	
L	0,299 ± 0,009		
M	0,792 ± 0,057		

Агент РНКi AD04962 был сконструирован таким образом, чтобы его последовательность антисмысловой цепи была по меньшей мере частично комплементарна открытой рамке считывания S в положениях 257-275 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2. Агенты РНК AD04872 был сконструирован таким образом, чтобы его последовательность антисмысловой цепи были по меньшей мере частично комплементарна открытой рамке считывания S в положениях 261-279 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2. Агент РНКi AD04963 был сконструирован таким образом, чтобы его последовательность антисмысловой цепи была по меньшей мере частично комплементарна открытой рамке считывания X в положениях 1781-1799 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2. Агенты РНКi AD04882 и AD04885 были сконструированы таким образом, чтобы их последовательности антисмысловой цепи были по меньшей мере частично комплементарны открытой рамке считывания X в положениях 1780-1798 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2. Каждый из агентов РНКi против ВГВ, показанных в табл. 9 выше, приводил к существенному снижению HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени при введении как по отдельности, так и в комбинации. Повторное дозирование приводило к дополнительному

снижению HBsAg.

Кроме того, также оценивали сывороточные концентрации е-антигена гепатита В (HBeAg) во всех группах, кроме групп L и M. Сначала объединяли пробы от мышей в каждой соответствующей группе, а полученные образцы сыворотки анализировали в один прием. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 29. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 11

Группа	День 8	День 22	День 29	День 36
A	1,000	1,000	1,000	1,000
B	0,425	0,291	0,371	0,365
C	0,152	0,170	0,328	0,356
D	0,266	0,249	0,456	0,440
E	0,278	0,295	0,589	0,561
F	0,306	0,291	0,718	0,522
G	0,183	0,138	0,291	0,249
H	0,091	0,131	0,315	0,238
I	0,183	0,052	0,069	0,036
J	0,089	0,114	0,190	0,236
K	0,458	0,172	0,322	0,207

Дополнительно сывороточные концентрации ДНК ВГВ определяли для каждой из групп, приведенных в табл. 27, в пробах сыворотки, собранных в дни 8, 15, 22 и 29, в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Сывороточную ДНК ВГВ выделяли у каждого животного в каждый момент времени. Данные представлены в следующей таблице.

Таблица 30. Средние сывороточные концентрации ДНК ВГВ, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 7 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
A	1,000 ± 0,232	1,000 ± 0,463	1,000 ± 0,272	1,000 ± 0,205
B	0,577 ± 0,219	0,222 ± 0,064	0,196 ± 0,055	0,261 ± 0,117
C	0,165 ± 0,051	0,070 ± 0,042	0,142 ± 0,105	0,228 ± 0,174
D	0,343 ± 0,125	0,307 ± 0,091	0,300 ± 0,092	0,356 ± 0,032
E	0,262 ± 0,033	0,216 ± 0,018	0,227 ± 0,028	0,279 ± 0,090
F	0,320 ± 0,134	0,332 ± 0,208	0,344 ± 0,209	0,338 ± 0,211
G	0,231 ± 0,036	0,034 ± 0,024	0,069 ± 0,039	0,077 ± 0,020
H	0,229 ± 0,101	0,155 ± 0,121	0,148 ± 0,079	0,215 ± 0,035
I	0,281 ± 0,129	0,109 ± 0,071	0,023 ± 0,019	0,011 ± 0,009
J	0,078 ± 0,050	0,061 ± 0,020	0,074 ± 0,029	0,056 ± 0,030
K	0,314 ± 0,064	0,119 ± 0,043	0,076 ± 0,067	0,078 ± 0,095
L	0,295 ± 0,077	0,305 ± 0,101	0,213 ± 0,088	0,186 ± 0,084
M	0,515 ± 0,247	0,505 ± 0,293	0,488 ± 0,318	0,478 ± 0,267

Данные, представленные в табл. 30, указывают на то, что исследованные агенты РНКи, как индивидуально, так и в комбинации, обеспечивали снижение концентраций ДНК ВГВ по сравнению с группой, получавшей PBS. Повторное дозирование приводило к дополнительному снижению ДНК ВГВ.

Пример 12. Агенты РНКи против ВГВ у мышей рНВV.

Использовали мышиную модель рНВV, описанную в примере 2 выше. Мышей разделяли на различные группы, как указано в таблице 31 ниже, и каждой мышке выполняли одну подкожную инъекцию объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в табл. 31.

Таблица 31. Группы дозирования мышей рНВV для примера 12

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
А	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1
В	2,0 мг/кг AD04871	Одиночная инъекция в день 1
С	2,0 мг/кг AD04872	Одиночная инъекция в день 1
Д	2,0 мг/кг AD04874	Одиночная инъекция в день 1
Е	2,0 мг/кг AD04875	Одиночная инъекция в день 1
F	2,0 мг/кг AD04876	Одиночная инъекция в день 1
Г	2,0 мг/кг AD04881	Одиночная инъекция в день 1
Н	2,0 мг/кг AD04883	Одиночная инъекция в день 1
І	2,0 мг/кг AD04884	Одиночная инъекция в день 1

Каждой мыши подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в табл. 24. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненатянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе (n=3).

Сыворотку собирали перед введением, а затем в день 8, день 15 и день 22. В группе А (PBS), группе В (2,0 мг/кг AD04871), группе С (2,0 мг/кг AD04872), группе Д (2,0 мг/кг AD04874), группе Е (2,0 мг/кг AD04875) и группе F (2,0 мг/кг AD04876) также собрали сыворотку в день 29, день 36, день 43 и день 50. Сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) определяли в соответствии с процедурой, приведенной в примере 2 выше. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 32. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 12

(среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
А	1,000 ± 0,132	1,000 ± 0,089	1,000 ± 0,080	1,000 ± 0,098
В	0,102 ± 0,034	0,041 ± 0,021	0,049 ± 0,033	0,048 ± 0,031
С	0,153 ± 0,064	0,064 ± 0,032	0,063 ± 0,034	0,042 ± 0,017
Д	0,123 ± 0,022	0,049 ± 0,017	0,039 ± 0,010	0,023 ± 0,001
Е	0,190 ± 0,075	0,094 ± 0,038	0,107 ± 0,061	0,081 ± 0,051
F	0,190 ± 0,031	0,076 ± 0,035	0,084 ± 0,038	0,049 ± 0,024
Г	0,159 ± 0,047	0,216 ± 0,057	0,235 ± 0,151	
Н	0,508 ± 0,078	0,666 ± 0,131	0,543 ± 0,048	
І	0,279 ± 0,087	0,357 ± 0,078	0,614 ± 0,156	
<hr/>				
Группа	День 36	День 43	День 50	
А	1,000 ± 0,065	1,000 ± 0,242	1,000 ± 0,224	
В	0,054 ± 0,038	0,064 ± 0,030	0,092 ± 0,025	
С	0,049 ± 0,017	0,054 ± 0,015	0,085 ± 0,010	
Д	0,037 ± 0,004	0,037 ± 0,010	0,065 ± 0,012	
Е	0,126 ± 0,077	0,125 ±	0,170 ±	
			0,063	0,079
F	0,089 ± 0,044	0,082 ± 0,034	0,115 ± 0,028	
Г				
Н				
І				

Каждый из агентов РНКи против ВГВ AD04871, AD04872, AD04874, AD04875 и AD04876 был сконструирован таким образом, чтобы его последовательность антисмысловой цепи была по меньшей мере частично комплементарна открытой рамке считывания S в положениях 261-279 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2. Каждый из этих агентов РНКи против ВГВ должен приводить к существенному снижению HBsAg по сравнению с контролем PBS. Например, однократная доза 2 мг/кг каждого из AD04871 (группа В), AD04872 (группа С), AD04874 (группа Д) и AD04876 (группа F) приводила к сни-

жению HBsAg более чем на 90% в каждой из измеренных временных отметок с дня 15 по день 43 по сравнению с контролем. Каждый из агентов РНКи против ВГВ AD04881, AD04883, AD04884 был сконструирован таким образом, чтобы его последовательность антисмысловой цепи была по меньшей мере частично комплементарна открытой рамке считывания X в положениях 1780-1798 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2.

Пример 13. Ответ на лечение в зависимости от дозы и комбинации агентов РНКи против ВГВ в мышинной модели с нокаутированной областью X

В качестве альтернативного средства оценки эффектов комбинации агента РНКи, который включает в себя последовательность антисмысловой цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна области, расположенной в ORF S мРНК ВГВ, и второго агента РНКи, который включает в себя последовательность антисмысловой цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна области, расположенной в ORF X мРНК ВГВ, была создана плаزمиды, которая включала в себя геном ВГВ с нокаутом сайта связывания агентами РНКи против ВГВ, которые нацелены на положения 1780 и 1781, как показано в табл. 1 и 2 (далее в настоящем документе такие мыши называются мышами с нокаутированной областью X). Эту модель создавали путем мутации десяти (10) оснований в плазмиде рHBV1.3 в пределах сайта связывания этих агентов РНКи. Оставшаяся часть мРНК ВГВ, включающая область S, оставалась функциональной. Таким образом, в этой мышинной модели ВГВ ожидается, что включение агента РНКи против ВГВ, имеющего антисмысловую цепь, которая нацелена на положения 1780 и 1781 генома ВГВ, описанного в настоящем документе, будет неэффективным в отношении подавления экспрессии.

Мышей разделяли на различные группы, включая приведенные в табл. 33 ниже, и мышам выполняли подкожные инъекции объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в следующей таблице.

Таблица 33. Группы дозирования мышей с нокаутированной областью X для примера 13

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования	Число животных (n)
1	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1	4
2	2,0 мг/кг AD04585 + 1,0 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1	4
3	2,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1	4
4	2,5 мг/кг AD04585 + 0,5 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1	4
5	2,5 мг/кг AD04872 + 0,5 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1	4
6	3,0 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 15	1

Каждой мышке подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в табл. 33. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминные нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненапрянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе (n=3).

Сыворотку собирали в день 5, день 8, день 15, день 22 и день 29 и определяли сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. В группах 1-5 также собирали сыворотку в дни 36 и 43. Данные эксперимента показаны в следующей табл. 34.

Таблица 34. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей с нокаутированной областью X после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 13 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22
1	1,000 ± 0,186	1,000 ± 0,165	1,000 ± 0,132
2	0,061 ± 0,034	0,041 ± 0,035	0,030 ± 0,015
3	0,020 ± 0,011	0,007 ± 0,003	0,003 ± 0,002
4	0,063 ± 0,039	0,022 ± 0,011	0,029 ± 0,013
5	0,027 ± 0,014	0,003 ± 0,003	0,001 ± 0,001
6	0,948	1,360	1,652
	День 29	День 36	День 43
1	1,000 ± 0,059	1,000 ± 0,044	1,000 ± 0,045
2	0,051 ± 0,029	0,062 ± 0,029	
3	0,004 ± 0,003	0,008 ± 0,003	0,018 ± 0,007
4	0,040 ± 0,022	0,061 ± 0,030	
5	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,002	0,014 ± 0,006
6	1,831		

Как и ожидалось, группа 6, в которой вводили однократную дозу 3,0 мг/кг агента РНКи против ВГВ AD04963, включающего в себя антисмысловую цепь, которая по меньшей мере частично комплементарна открытой рамке считывания X в положениях 1781-1799 генома ВГВ, не смогла обеспечить снижение HBsAg. Кроме того, каждая из групп 2-5 обеспечивала существенное снижение HBsAg по сравнению с контролем PBS, причем в группе 3 и в группе 5 наблюдали уменьшение HBsAg в нижней точке более чем на 2 логарифма (день 22).

Пример 14. Ответ на лечение в зависимости от дозы и комбинации агентов РНКи против ВГВ в мышинной модели с нокаутированной областью X

Использовали мышиную модель с нокаутированной областью X, описанную в примере 13 выше. Мышей разделяли на различные группы, включая приведенные в табл. 31 ниже, и каждой мышке выполняли одну подкожную инъекцию объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в табл. 35.

Таблица 35. Группы дозирования мышей рНВV для примера 14

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1
2	2,0 мг/кг AD04872	Одиночная инъекция в день 1
3	2,0 мг/кг AD04872 + 0,7 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1
4	2,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1
5	2,0 мг/кг AD04872 + 2,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1

Каждой мышке подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в табл. 35. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненапрянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе, приведенной в табл. 35 (n=3).

Сыворотку собирали в день 1 (перед введением дозы), день 8, день 15, день 22 и день 29 и определяли сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 36. Средние концентрации HBsAg нормировали к уровню до лечения и контролю PBS у мышей с нокаутированной областью X из примера 14

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
1	1,000 ± 0,120	1,000 ± 0,255	1,000 ± 0,224	1,000 ± 0,143
2	0,104 ± 0,104	0,009 ± 0,009	0,005 ± 0,004	0,005 ± 0,003
3	0,076 ± 0,041	0,010 ± 0,009	0,006 ± 0,005	0,005 ± 0,005
4	0,036 ± 0,008	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001
5	0,019 ± 0,017	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,001	0,004 ± 0,000

В табл. 36 показано, что агент РНКи против ВГВ AD04872 вводили отдельно, а комбинация AD04872 (который включает в себя антисмысловую цепь, которая, по меньшей мере, частично комплементарна открытой рамке считывания S в положениях 261-279 генома ВГВ) и AD05070 (который включает в себя антисмысловую цепь, которая, по меньшей мере, частично комплементарна открытой рамке считывания X в положениях 1781-1799 генома ВГВ) приводила к значительному снижению HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени. Добавление 0,7-2 мг/кг агента РНКи против ВГВ AD05070, для которого имеется мутированный целевой сайт, присутствующий в данной модели с нокаутированной областью X, не уменьшало активности агента РНКи против ВГВ AD04872 в дозе 2 мг/кг.

Кроме того, сывороточные концентрации ДНК ВГВ определяли в пробах сыворотки, собранных в дни 8, 15 и 22, в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Сыворотку из каждой группы объединяли, а впоследствии из сыворотки выделяли ДНК в один прием. Данные представлены в следующей таблице.

Таблица 37. Средние сывороточные концентрации ДНК ВГВ, нормированные к уровню до лечения и контролям PBS, у мышей с нокаутированной областью X после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 14 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22
1	1,000 ± 0,007	1,000 ± 0,011	1,000 ± 0,066
2	0,225 ± 0,019	0,022 ± 0,001	0,036 ± 0,001
3	0,151 ± 0,002	0,029 ± 0,001	0,042 ± 0,003
4	0,140 ± 0,006	0,016 ± 0,000	0,018 ± 0,000
5	0,069 ± 0,002	0,018 ± 0,003	0,043 ± 0,002

Добавление 0,7-2 мг/кг агента РНКи против ВГВ AD05070, для которого имеется мутированный целевой сайт, присутствующий в данной модели с нокаутированной областью X, не уменьшало активности агента РНКи против ВГВ AD04872 в дозе 2 мг/кг.

#### Пример 15. Агенты РНКи против ВГВ у мышей рНВУ

Использовали мышиную модель рНВУ, описанную в примере 2 выше. Мышей разделяли на различные группы, включая приведенные в табл. 38 ниже, и каждой мышке выполняли одну подкожную инъекцию объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в табл. 38.



Таблица 38. Группы дозирования мышей рНВV для примера 15

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1
2	2,0 мг/кг AD04776	Одиночная инъекция в день 1
3	2,0 мг/кг AD05069	Одиночная инъекция в день 1
4	2,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1
5	2,0 мг/кг AD05071	Одиночная инъекция в день 1
6	2,0 мг/кг AD05073	Одиночная инъекция в день 1
7	2,0 мг/кг AD05074	Одиночная инъекция в день 1
8	2,0 мг/кг AD05075	Одиночная инъекция в день 1
9	2,0 мг/кг AD05076	Одиночная инъекция в день 1
10	2,0 мг/кг AD05077	Одиночная инъекция в день 1
11	2,0 мг/кг AD05078	Одиночная инъекция в день 1
12	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD04776	Одиночная инъекция в день 1
13	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05069	Одиночная инъекция в день 1
14	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1
15	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05071	Одиночная инъекция в день 1
16	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05073	Одиночная инъекция в день 1
17	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05074	Одиночная инъекция в день 1
18	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05075	Одиночная инъекция в день 1
19	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05076	Одиночная инъекция в день 1
20	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05077	Одиночная инъекция в день 1
21	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05078	Одиночная инъекция в день 1

Каждой мышѣ подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в табл. 38. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненатянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе (n=3).

Сыворотку собирали в день -1 до введения, а затем в день 8, день 15, день 22, день 29, день 36, день 43 и день 50. Сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) определяли в соответствии с процедурой, приведенной в примере 2 выше. Данные эксперимента показаны в следующей табл. 39, где средние значения HBsAg отражают нормированные средние значения HBsAg.

Таблица 39. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышѣй рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 15

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
1	1,000 ± 0,119	1,000 ± 0,047	1,000 ± 0,080	1,000 ± 0,027
2	0,339 ± 0,076	0,414 ± 0,126	0,385 ± 0,067	0,450 ± 0,075
3	0,240 ± 0,096	0,361 ± 0,078	0,446 ± 0,073	0,508 ± 0,114
4	0,081 ± 0,026	0,127 ± 0,031	0,223 ± 0,057	0,330 ± 0,112
5	0,452 ± 0,020	0,431 ± 0,126	0,373 ± 0,079	0,383 ± 0,080

## 044937

6	0,375 ± 0,181	0,632 ± 0,192	0,463 ± 0,117	0,567 ± 0,159
7	0,325 ± 0,032	0,438 ± 0,125	0,393 ± 0,056	0,443 ± 0,096
8	0,155 ± 0,031	0,322 ± 0,019	0,333 ± 0,077	0,463 ± 0,043
9	0,245 ± 0,063	0,467 ± 0,090	0,477 ± 0,045	0,562 ± 0,049
10	0,120 ± 0,062	0,173 ± 0,029	0,289 ± 0,019	0,331 ± 0,042
11	0,128 ± 0,042	0,172 ± 0,046	0,179 ± 0,015	0,215 ± 0,049
12	0,040 ± 0,015	0,014 ± 0,004	0,014 ± 0,006	0,015 ± 0,004
13	0,050 ± 0,020	0,015 ± 0,011	0,017 ± 0,008	0,022 ± 0,009
14	0,020 ± 0,011	0,011 ± 0,006	0,015 ± 0,006	0,023 ± 0,004
15	0,043 ± 0,005	0,013 ± 0,005	0,010 ± 0,002	0,011 ± 0,004
16	0,021 ± 0,017	0,008 ± 0,004	0,012 ± 0,003	0,011 ± 0,001
17	0,032 ± 0,011	0,009 ± 0,003	0,007 ± 0,002	0,008 ± 0,0003
18	0,023 ± 0,014	0,010 ± 0,006	0,009 ± 0,006	0,009 ± 0,004
19	0,025 ± 0,006	0,010 ± 0,004	0,009 ± 0,002	0,010 ± 0,003
20	0,061 ± 0,013	0,027 ± 0,006	0,020 ± 0,003	0,029 ± 0,006
21	0,061 ± 0,050	0,013 ± 0,010	0,012 ± 0,005	0,018 ± 0,006
<b>Группа</b>	<b>День 36</b>	<b>День 43</b>	<b>День 50</b>	
1	1,000 ± 0,031	1,000 ± 0,114	1,000 ± 0,112	
2	0,617 ± 0,116	0,643 ± 0,154	0,665 ± 0,199	
3	0,638 ± 0,067	0,743 ± 0,015	0,792 ± 0,115	
4	0,472 ± 0,121	0,515 ± 0,126	0,689 ± 0,167	
5	0,591 ± 0,159	0,604 ± 0,086	0,709 ± 0,115	
6	0,717 ± 0,136	0,686 ± 0,194	0,781 ± 0,301	
7	0,586 ± 0,069	0,775 ± 0,143	0,747 ± 0,095	

8	0,666 ± 0,066	0,803 ± 0,096	0,856 ± 0,180
9	0,801 ± 0,047	0,667 ± 0,055	0,765 ± 0,208
10	0,640 ± 0,059	0,667 ± 0,034	0,742 ± 0,133
11	0,429 ± 0,063	0,383 ± 0,005	0,497 ± 0,060
12	0,037 ± 0,013	0,044 ± 0,012	0,056 ± 0,014
13	0,046 ± 0,011	0,055 ± 0,010	0,070 ± 0,010
14	0,054 ± 0,016	0,070 ± 0,018	0,096 ± 0,012
15	0,029 ± 0,011	0,032 ± 0,015	0,051 ± 0,020
16	0,033 ± 0,005	0,038 ± 0,007	0,062 ± 0,004
17	0,021 ± 0,002	0,031 ± 0,004	0,061 ± 0,005
18	0,034 ± 0,014	0,047 ± 0,016	0,079 ± 0,017
19	0,028 ± 0,005	0,037 ± 0,006	0,060 ± 0,011
20	0,070 ± 0,009	0,063 ± 0,018	0,097 ± 0,018
21	0,040 ± 0,012	0,066 ± 0,007	0,120 ± 0,036

Каждый из агентов РНКи AD0477 6, AD05069, AD05070, AD05071, AD05073 и AD05074 был сконструирован таким образом, чтобы его последовательность антисмысловой цепи была, по меньшей мере, частично комплементарна открытой рамке считывания X в положениях 1781-1799 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2. Каждый из агентов РНКи AD05075, AD05076, AD05077 и AD05078 был сконструирован таким образом, чтобы его последовательность антисмысловой цепи была по меньшей мере частично комплементарна открытой рамке считывания X в положениях 1780-1798 генома ВГВ, как показано в табл. 1 и 2.

В табл. 39 показано, что агенты РНКи против ВГВ AD04776, AD05069, AD05070, AD05071, AD05073 и AD05074, вводимые по отдельности или в комбинации с AD04872 (который включает в себя антисмысловую цепь, которая по меньшей мере частично комплементарна открытой рамке считывания S в положениях 261-279 генома ВГВ), приводили к значительному уменьшению HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени.

Пример 16. Агенты РНКи против ВГВ у мышей рНВV: исследования ответа в зависимости от дозы и комбинированного лечения.

Использовали мышиную модель рНВV, описанную в примере 2 выше. Мышей разделяли на различные группы, как указано в таблице 40 ниже, и каждой мышке выполняли одну подкожную инъекцию объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в табл. 40.

Таблица 40. Группы дозирования мышей рНВV для примера 16

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1
2	3,2 мг/кг AD04872	Одиночная инъекция в день 1
3	3,2 мг/кг AD04872	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
4	3,0 мг/кг AD04872 + 0,8 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1
5	3,0 мг/кг AD04872 + 0,8 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
6	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1
7	3,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
8	2,7 мг/кг AD04872 + 1,3 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1
9	2,7 мг/кг AD04872 + 1,3 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
10	2,0 мг/кг AD04872 + 2,0 мг/кг AD04776	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
11	0,8 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1 и день 22
12	1,3 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1 и день 22

Каждой мышке подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого

буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в табл. 40. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненатянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали шесть (6) мышей в каждой группе (n=6).

Сыворотку собирали перед введением, а затем в день 8, 15, 22 и 29, и определяли сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей табл. 41.

Таблица 41. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 16 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
1	1,000 ± 0,117	1,000 ± 0,213	1,000 ± 0,169	1,000 ± 0,130
2	0,050 ± 0,018	0,015 ± 0,007	0,011 ± 0,005	0,009 ± 0,006
3	0,051 ± 0,037	0,014 ± 0,011	0,010 ± 0,006	0,002 ± 0,001
4	0,029 ± 0,018	0,010 ± 0,006	0,011 ± 0,006	0,010 ± 0,005
5	0,022 ± 0,003	0,007 ± 0,001	0,009 ± 0,003	0,001 ± 0,001
6	0,027 ± 0,012	0,007 ± 0,004	0,008 ± 0,005	0,011 ± 0,005
7	0,028 ± 0,012	0,010 ± 0,005	0,009 ± 0,005	0,001 ± 0,000
8	0,033 ± 0,016	0,016 ± 0,008	0,020 ± 0,009	0,021 ± 0,011
9	0,034 ± 0,025	0,015 ± 0,011	0,018 ± 0,013	0,003 ± 0,002
10	0,038 ± 0,021	0,015 ± 0,005	0,019 ± 0,004	0,003 ± 0,001
11	0,446 ± 0,143	0,376 ± 0,120	0,474 ± 0,149	0,338 ± 0,123
12	0,307 ± 0,111	0,257 ± 0,122	0,236 ± 0,057	0,138 ± 0,031

Исследованные агенты РНКи против ВГВ, как индивидуально, так и в комбинации, приводили к снижению HBsAg по сравнению с контролем PBS во всех отмеченных моментах времени. Экспрессия HBsAg была дополнительно снижена во всех группах, в которых повторно вводили дозу в день 22.

Кроме того, также оценивали сывороточные концентрации е-антигена гепатита В (HBeAg). Для измерения в день 8 объединяли пробы сыворотки от всех шести мышей в каждой группе, а полученные

пробы анализировали в один прием. Для измерений в день -1, день 15, день 22 и день 29 шесть мышей из каждой группы объединяли в пары внутри каждой группы, и их соответствующие пробы сыворотки объединяли, формируя по три подгруппы для каждой группы. Впоследствии проводили анализ проб сыворотки каждой из трех подгрупп для каждой группы. Данные эксперимента показаны в следующей табл. 42.

Таблица 42. Средние концентрации НВеAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 16 (среднеквадратичное отклонение для дней 15, 22 и 29 показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29
1	1,000	1,000 ± 0,011	1,000 ± 0,170	1,000 ± 0,173
2	0,510	0,308 ± 0,031	0,217 ± 0,021	0,226 ± 0,035
3	0,488	0,301 ± 0,065	0,283 ± 0,081	0,147 ± 0,030
4	0,213	0,216 ± 0,067	0,192 ± 0,029	0,141 ± 0,048
5	0,192	0,211 ± 0,053	0,216 ± 0,088	0,047 ± 0,016
6	0,176	0,163 ± 0,022	0,238 ± 0,069	0,117 ± 0,011
7	0,165	0,175 ± 0,046	0,215 ± 0,061	0,028 ± 0,012
8	0,128	0,166 ± 0,065	0,386 ± 0,284	0,167 ± 0,118
9	0,172	0,171 ± 0,037	0,244 ± 0,052	0,032 ± 0,010
10	0,180	0,211 ± 0,012	0,283 ± 0,034	0,034 ± 0,001
11	0,634	0,594 ± 0,082	0,840 ± 0,152	0,271 ± 0,029
12	0,486	0,441 ± 0,066	0,804 ± 0,096	0,214 ± 0,039

Исследованные агенты РНКи против ВГВ, как индивидуально, так и в комбинации, приводили к снижению НВеAg по сравнению с контролем солевым раствором во всех отмеченных моментах времени. Экспрессия НВеAg дополнительно уменьшалась во всех группах, в которых повторно вводили дозу в день 22.

Дополнительно сывороточные концентрации ДНК ВГВ определяли для каждой из групп, приведенных в табл. 40, в пробах сыворотки, собранных в дни -1, 8, 15 и 22, в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Сыворотку от каждой пары мышей объединяли, а затем выделяли ДНК из каждого пула сыворотки в один прием. Данные представлены в следующей таблице.

Таблица 43. Средние сывороточные концентрации ДНК ВГВ, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 16 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 15	День 22
1	1,000 ± 0,122	1,000 ± 0,299	1,000 ± 0,241
2	0,312 ± 0,016	0,126 ± 0,008	0,087 ± 0,018
3	0,264 ± 0,065	0,081 ± 0,023	0,073 ± 0,028
4	0,321 ± 0,254	0,120 ± 0,066	0,134 ± 0,101
5	0,319 ± 0,081	0,108 ± 0,038	0,098 ± 0,051
6	0,260 ± 0,095	0,068 ± 0,010	0,076 ± 0,031
7	0,170 ± 0,028	0,082 ± 0,013	0,062 ± 0,018
8	0,188 ± 0,020	0,192 ± 0,160	0,307 ± 0,309
9	0,242 ± 0,003	0,100 ± 0,042	0,075 ± 0,028
10	0,322 ± 0,028	0,159 ± 0,025	0,086 ± 0,016
11	1,124 ± 0,142	0,742 ± 0,127	0,807 ± 0,192
12	1,004 ± 0,144	0,541 ± 0,340	0,569 ± 0,060

Исследованные агенты РНКи против ВГВ, как по отдельности, так и в комбинации, приводили к снижению сывороточной ДНК ВГВ по сравнению с контролем солевым раствором во всех отмеченных моментах времени, за исключением групп 11 и 12, у которых не наблюдалось снижения сывороточной ДНК ВГВ в день 8.

Пример 17. Агенты РНКи против ВГВ у мышей рНВV

Использовали мышиную модель рНВV, описанную в примере 2 выше. Мышей разделяли на различные группы, как указано в табл. 44 ниже, и каждой мыши выполняли одну подкожную инъекцию объемом 200 мкл в соответствии с режимом дозирования, приведенным в табл. 44.

Таблица 44. Группы дозирования мышей рНВV для примера 17

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1
2	5 мг/кг AD04585 +	Одиночная инъекция в день 1

	1 мг/кг AD04963	
3	5 мг/кг AD04872 + 1 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
4	5 мг/кг AD04585 + 1 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1 и день 8
5	5 мг/кг AD04872 + 1 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1 и день 8
6	2,5 мг/кг AD04585 + 0,5 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
7	2,0 мг/кг AD04585 + 1,0 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
8	2,5 мг/кг AD04872 + 0,5 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
9	2,0 мг/кг AD04872 + 1,0 мг/кг AD04963	Одиночная инъекция в день 1
10	5 мг/кг AD04872 + 1 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1
11	2,5 мг/кг AD04872 + 0,5 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1 и день 8
12	2,5 мг/кг AD04872 + 0,5 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1
13	2 мг/кг AD04872 + 1 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1
14	2,5 мг/кг AD04585 + 0,5 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1
15	2 мг/кг AD04585 + 1 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1
16	0,5 мг/кг AD04981	Одиночная инъекция в день 1

Каждой мышѣ подкожно вводили 200 мкл, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ, как указано в табл. 44. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в натянутую кожу в области шеи и плеч. Исследовали три (3) мыши в каждой группе (n=3).

Сыворотку собирали перед введением, а затем в день 8, день 14, день 21, день 29 и день 36, и определяли сывороточные концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с процедурой, описанной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей табл. 45.

Таблица 45. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВV после введения агентов РНКi против ВГВ из примера 17 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 14	День 21	День 29
1	1,000 ± 0,068	1,000 ± 0,125	1,000 ± 0,152	1,000 ± 0,110
2	0,058 ± 0,033	0,059 ± 0,022	0,085 ± 0,023	0,158 ± 0,021
3	0,025 ± 0,009	0,014 ± 0,006	0,015 ± 0,008	0,026 ± 0,015
4	0,032 ± 0,007	0,005 ± 0,001	0,006 ± 0,002	0,014 ± 0,002
5	0,024 ± 0,009	0,003 ± 0,001	0,001 ± 0,0004	0,001 ± 0,0005
6	0,063 ± 0,020	0,077 ± 0,013	0,131 ± 0,011	0,214 ± 0,026
7	0,041 ± 0,018	0,059 ± 0,017	0,091 ± 0,016	0,140 ± 0,045
8	0,070 ± 0,008	0,046 ± 0,016	0,043 ± 0,009	0,055 ± 0,012
9	0,043 ± 0,006	0,027 ± 0,003	0,064 ± 0,017	0,064 ± 0,014
10	0,015 ± 0,008	0,005 ± 0,003	0,005 ± 0,003	0,005 ± 0,003
11	0,047 ± 0,014	0,005 ± 0,003	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,003
12	0,062 ± 0,006	0,025 ± 0,007	0,027 ± 0,005	0,033 ± 0,005
13	0,092 ± 0,029	0,050 ± 0,021	0,050 ± 0,022	0,054 ± 0,0019
14	0,310 ± 0,180	0,056 ± 0,010	0,081 ± 0,010	0,112 ± 0,0018
15	0,304 ± 0,044	0,083 ± 0,021	0,115 ± 0,013	0,165 ± 0,025
16	1,667 ± 0,217	0,416 ± 0,163	0,341 ± 0,179	0,511 ± 0,0011
Группа	День 36			
1	1,000 ± 0,225			
2				
3	0,049 ± 0,019			
4				
5	0,004 ± 0,0004			
6				
7				
8	0,081 ± 0,010			
		9	0,108 ± 0,026	
		10	0,009 ± 0,004	
		11	0,005 ± 0,003	
		12	0,060 ± 0,014	
		13	0,094 ± 0,027	
		14		
		15		
		16	0,634 ± 0,005	

Исследованные комбинации агентов РНКi против ВГВ приводили к снижению HBsAg по сравнению с контролем солевым раствором во всех отмеченных моментах времени. Комбинации, содержащие AD04872, приводили к более значительному снижению, чем аналогичные комбинации, содержащие AD04585 вместо AD04872.

Кроме того, сывороточные концентрации ДНК ВГВ определяли в пробах сыворотки, собранных в дни 8, 14, 21 и 29, в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Сывороточную ДНК ВГВ выделяли у каждого животного в каждый момент времени. Данные представлены в следующей табл. 46.

Таблица 46. Средние сывороточные концентрации ДНК ВГВ, нормированные к уровню до лечения и контролю PBS, у мышей рНВВ после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 17 (среднеквадратичное отклонение показано в виде (+/-))

Группа	День 8	День 14	День 21	День 29
1	1,000 ± 0,280	1,000 ± 0,269	1,000 ± 0,418	1,000 ± 0,383
2	0,136 ± 0,068	0,192 ± 0,071	0,173 ± 0,032	0,292 ± 0,039
3	0,097 ± 0,034	0,068 ± 0,016	0,076 ± 0,034	0,131 ± 0,061
4	0,061 ± 0,039	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,019 ± 0,013
5	0,068 ± 0,025	0,003 ± 0,002	0,0009 ± 0,0003	0,0009 ± 0,0003
6	0,354 ± 0,299	0,345 ± 0,187	0,522 ± 0,234	0,509 ± 0,106
7	0,103 ± 0,064	0,291 ± 0,025	0,203 ± 0,043	0,203 ± 0,015
8	0,336 ± 0,142	0,185 ± 0,071	0,183 ± 0,065	0,162 ± 0,064
9	0,198 ± 0,055	0,093 ± 0,023	0,118 ± 0,054	0,143 ± 0,032
10	0,122 ± 0,071	0,024 ± 0,026	0,023 ± 0,020	0,014 ± 0,017
11	0,160 ± 0,069	0,016 ± 0,023	0,003 ± 0,001	0,005 ± 0,004
12	0,158 ± 0,039	0,120 ± 0,044	0,100 ± 0,049	0,091 ± 0,034
13	0,190 ± 0,038	0,169 ± 0,025	0,066 ± 0,015	0,081 ± 0,015
14	0,434 ± 0,136	0,318 ± 0,104	0,144 ± 0,094	0,240 ± 0,029
15	0,358 ± 0,185	0,287 ± 0,108	0,279 ± 0,080	0,303 ± 0,038
16	0,713 ± 0,085	0,674 ± 0,140	0,496 ± 0,128	0,590 ± 0,093

Исследованные комбинации агентов РНКи против ВГВ приводили к снижению сывороточной ДНК ВГВ по сравнению с контролем солевым раствором во всех отмеченных моментах времени. Комбинации, содержащие AD04872, приводили к более значительному снижению, чем аналогичные комбинации, содержащие AD04585 вместо AD04872. Эти более выраженные уменьшения наблюдали в день 22 и день 29.

Пример 18. Агенты РНКи против ВГВ в инфицированной ВГВ гуманизированной мышинной модели

Для данного исследования самцам FRG® (мыши с тройным нокаутом генотипа Fan *-/-* Rag2 *-/-* Il2rg *-/-*, полученные из мышей C57BL/6 (Yecuris)) в возрасте 1-2 месяца пересаживали человеческие гепатоциты. Человеческим гепатоцитам позволяли повторно заселять печень в течение около 6 месяцев с периодической обработкой NTBC для предотвращения роста мышинных гепатоцитов. В возрасте 9 месяцев мышам внутривенно инокулировали  $4 \times 10^8$  геномов/кг ВГВ генотипа С, которые инфицировали человеческие гепатоциты. Через 2-3 месяца сывороточные концентрации ДНК ВГВ достигли плато, что указывает на максимальное инфицирование гепатоцитов человека (мышинные гепатоциты не могут быть инфицированы ВГВ). Возраст мышей составлял один год в начале лечения агентами РНКи против ВГВ, т. е. продолжительность их жизни приближался к завершению.

Пробы сыворотки до лечения отбирали в день -10 и день -3. Начиная с дня 1 каждой мышам принудительно перорально ежедневно вводили через зонд 0,01 мг/кг энтекавира, растворенного в воде, для ингибирования репликации ВГВ. Ежедневное дозирование энтекавира продолжалось до дня умерщвления мышей. Ожидали, что введение энтекавира уменьшит сывороточную ДНК ВГВ у хронически инфицированных пациентов-людей, но не уменьшит HBsAg.

Мышей разделяли на различные группы, включая группы, приведенных в табл. 47 ниже.



Таблица 47. Группы дозирования ВГВ-инфицированных гуманизированных модельных мышей FRG для примера 18

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования	Последний день
А - мышь 1	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1	Умерщвлена в день 21 (нездоровое животное)
А - мышь 2	PBS (без агента РНКи)	Одиночная инъекция в день 1 и день 29	Умерщвлена в день 36
В - мышь 1	4,0 мг/кг AD04872 + 2,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1 и день 29	Умерщвлена в день 36
В - мышь 2	4,0 мг/кг AD04872 + 2,0 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1 и день 29	Умерщвлена в день 40
С - мышь 1	4,5 мг/кг AD04872 + 1,5 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1	Умерщвлена в день 15
С - мышь 2	4,5 мг/кг AD04872 + 1,5 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1 и день 29	Умерщвлена в день 36
С - мышь 3	4,5 мг/кг AD04872 + 1,5 мг/кг AD05070	Одиночная инъекция в день 1 и день 29	Умерщвлена в день 40

Каждой мышке также подкожно вводили 100 мкл на 20 грамм массы тела, содержащих определенное количество агента (-ов) РНКи против ВГВ в фосфатно-солевом буферном растворе, или аналогичный объем фосфатно-солевого буферного раствора без агента РНКи против ВГВ в день 1 или день 29 (если животное было еще живым в день 29) в соответствии с графиком, приведенным в табл. 47 выше. Каждый из агентов РНКи против ВГВ включал в себя N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие лиганды, конъюгированные с 5'-концом кодирующей цепи, как показано в табл. 4 и 5. Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т.е. инъекции были подкожными) в ненатянутую кожу в области шеи и плеч.

Сыворотку собирали в день 8, день 15, день 22, день 29, день 36 и день 40 и определяли концентрации поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующей таблице.

Таблица 48. Средние концентрации HBsAg, нормированные к уровню до лечения (день -3), для каждой отдельной инфицированной ВГВ гуманизированной модельной мыши FRG из примера 18

Группа	День 8	День 15	День 22	День 29	День 36	День 40
А-1	0,830	0,828	0,932	0,858	1,107	
А-2	1,303	1,328				
В-1	0,548	0,314	0,272	0,207	0,138	
В-2	0,592	0,337	0,243	0,215	0,160	0,175
С-1	0,643	0,460	0,415	0,251	0,164	
С-2	0,353	0,228	0,182	0,172	0,224	0,216
С-3	0,814	0,674				

Кроме того, сывороточные концентрации ДНК ВГВ определяли в пробах сыворотки, собранных в дни -10, -3, 8, 15, 22, 29, 36 и 40, в соответствии с процедурой, описанной выше в примере 2. Данные представлены в следующей табл. 49.

Таблица 49. Сывороточные концентрации ДНК ВГВ нормировали к среднему значению до лечения (в день -10 и день -3) для каждой инфицированной ВГВ гуманизированной мыши FRG после введения агентов РНКи против ВГВ из примера 14

Группа	День -10	День -3	День 8	День 15	День 22	День 29	День 36	День 40
А-1	0,883	1,117	0,072	0,038	0,015	0,027	0,060	
А-2	1,070	0,930	0,130	0,075				
В-1	1,538	0,462	0,032	0,017	0,011	0,006	0,010	
В-2	1,350	0,650	0,042	0,018	0,012	0,007	0,008	0,007
С-1	1,348	0,652	0,041	0,020	0,016	0,005	0,004	
С-2	1,030	0,970	0,031	0,015	0,006	0,011	0,008	0,008

Как ожидалось, введение энтекавира уменьшало репликацию вируса как в отсутствие, так и в присутствии агентов РНКи против ВГВ.

#### Другие варианты осуществления

Следует понимать, что, хотя настоящее изобретение описано подробно, приводимое выше описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем настоящего изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент РНКи для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В у субъекта, причем агент РНКи содержит:

(a) антисмысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидных оснований согласно любой из следующих: SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 179 и SEQ ID NO: 180, и

(b) смысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидных оснований согласно любой из следующих: SEQ ID NO: 302 и SEQ ID NO: 319.

2. Агент РНКи по п.1, где агент РНКи не содержит модифицированный нуклеотид или модифицированную межнуклеозидную связь.

3. Агент РНКи по п.1, где агент РНКи содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид или по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

4. Агент РНКи по п.3, где по существу все из нуклеотидов в агенте РНКи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

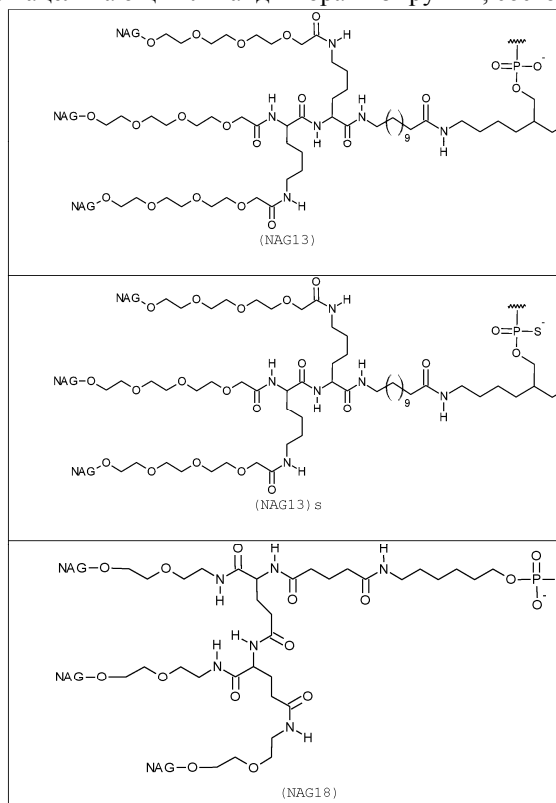
5. Агент РНКи по п.1, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с любой из следующих: SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127 и SEQ ID NO: 128.

6. Агент РНКи по п.1, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с любой из следующих: SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253 и SEQ ID NO: 273.

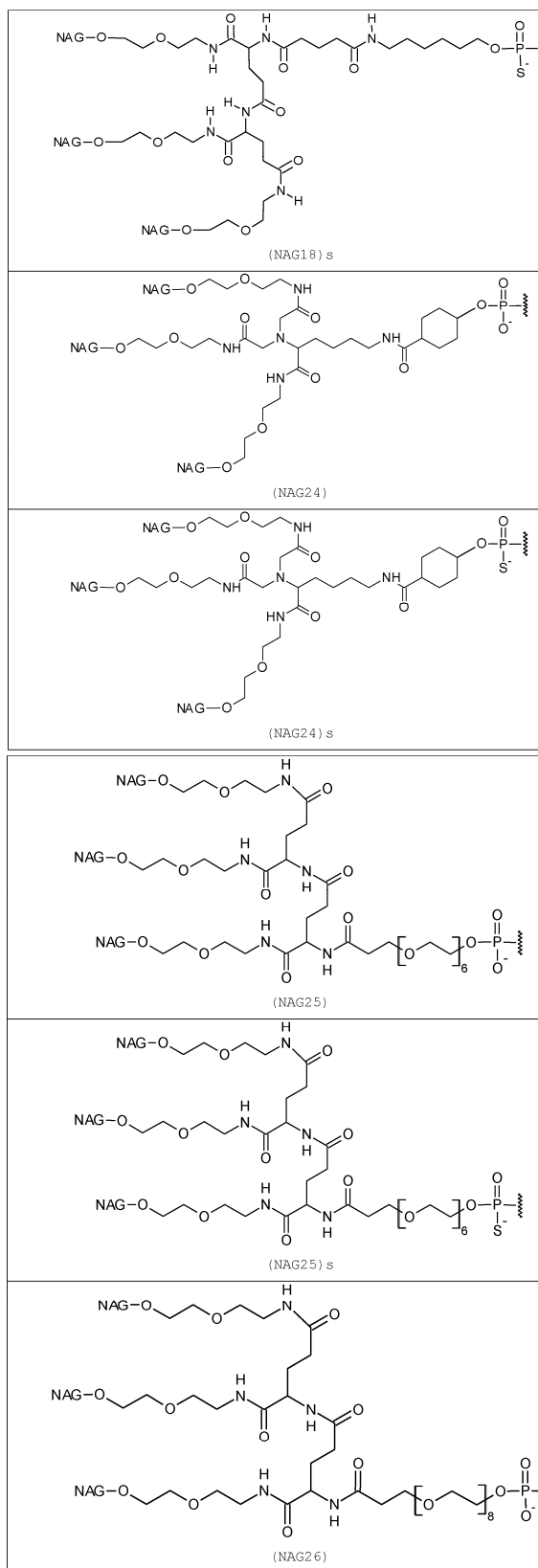
7. Агент РНКи по п.1, где агент РНКи дополнительно содержит нацеливающий лиганд, где нацеливающий лиганд содержит N-ацетилгалактозамин (NAG).

8. Агент РНКи по п.7, где нацеливающий лиганд содержит тример N-ацетилгалактозамина или тетрамер N-ацетилгалактозамина.

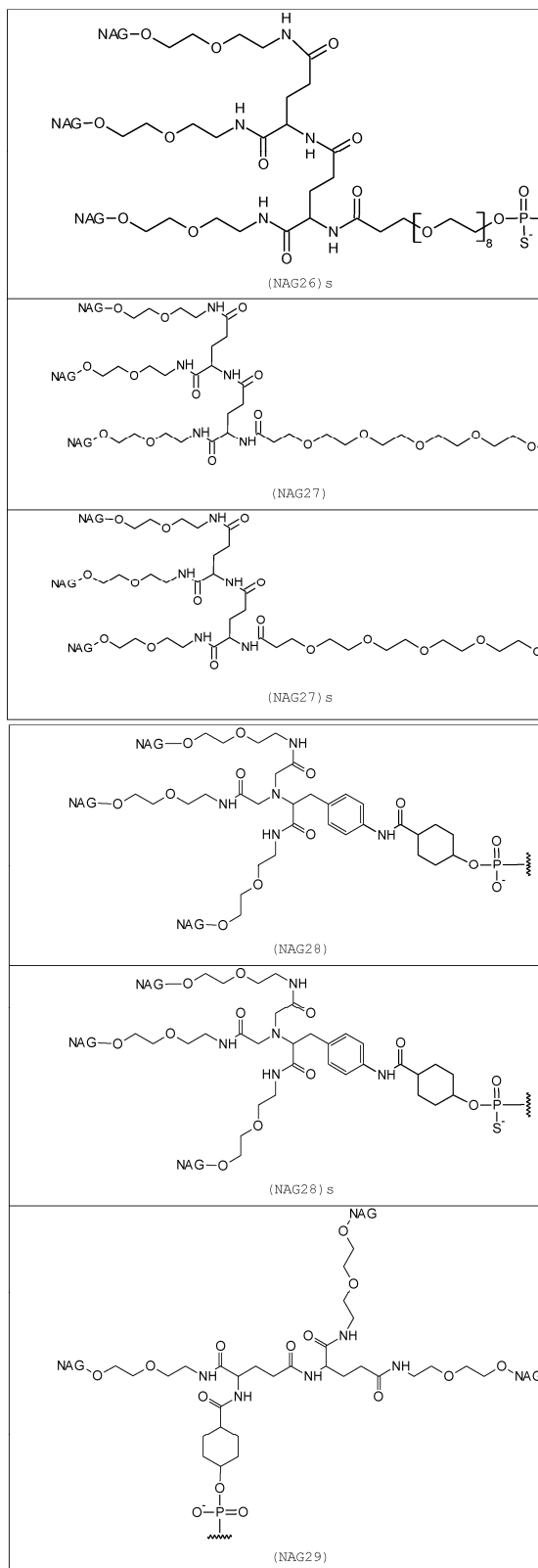
9. Агент РНКи по п.8, где нацеливающий лиганд выбран из группы, состоящей из

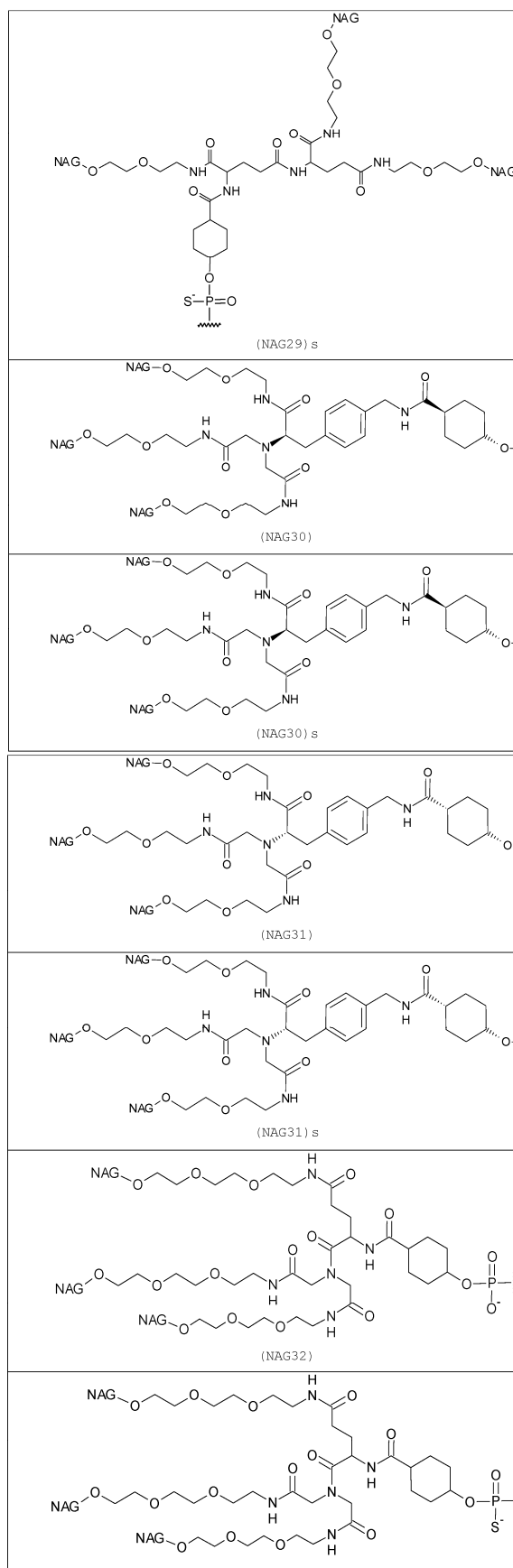


044937

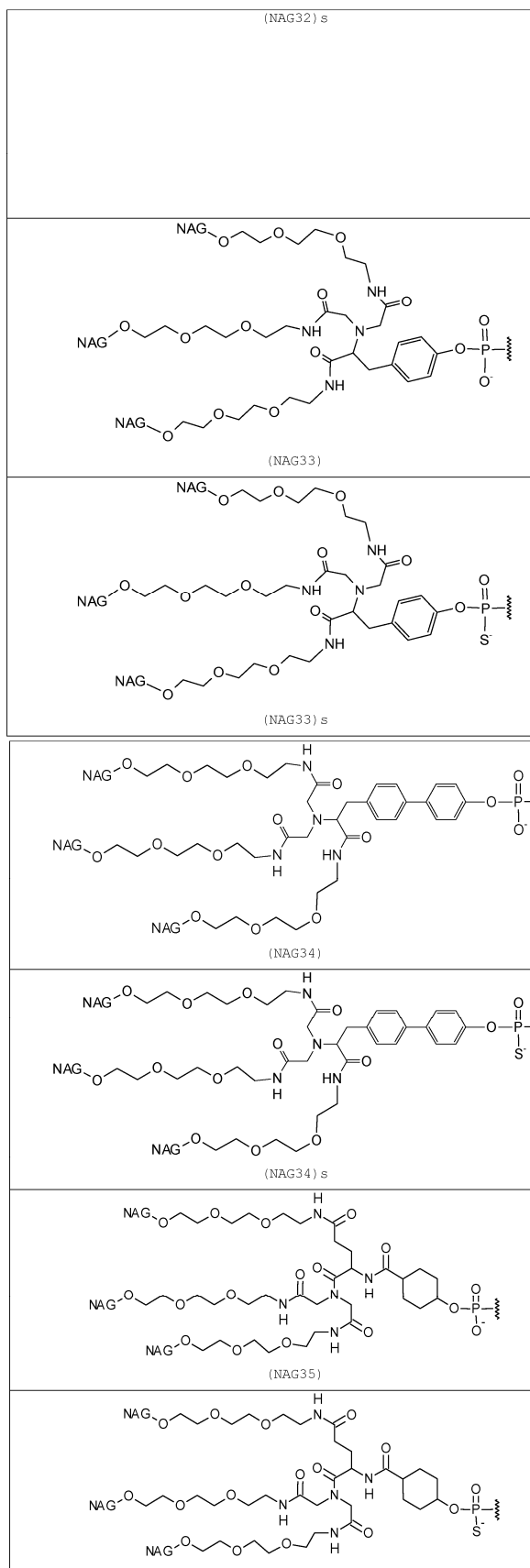


044937



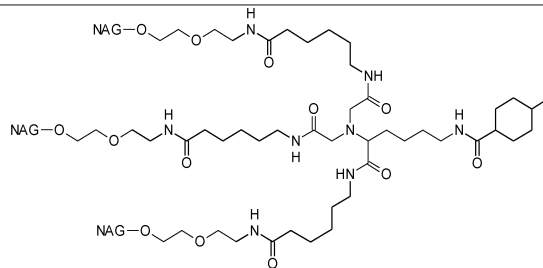


044937

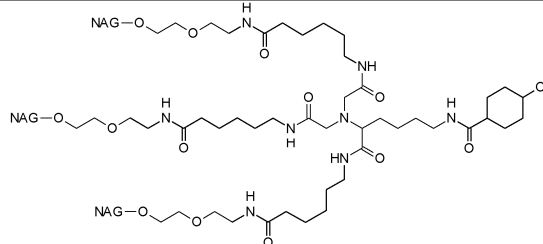


044937

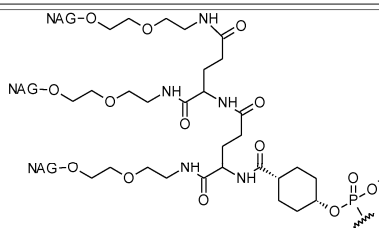
(NAG35) s



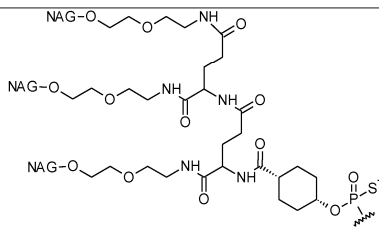
(NAG36)



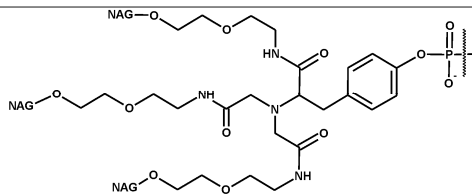
(NAG36) s



(NAG37)

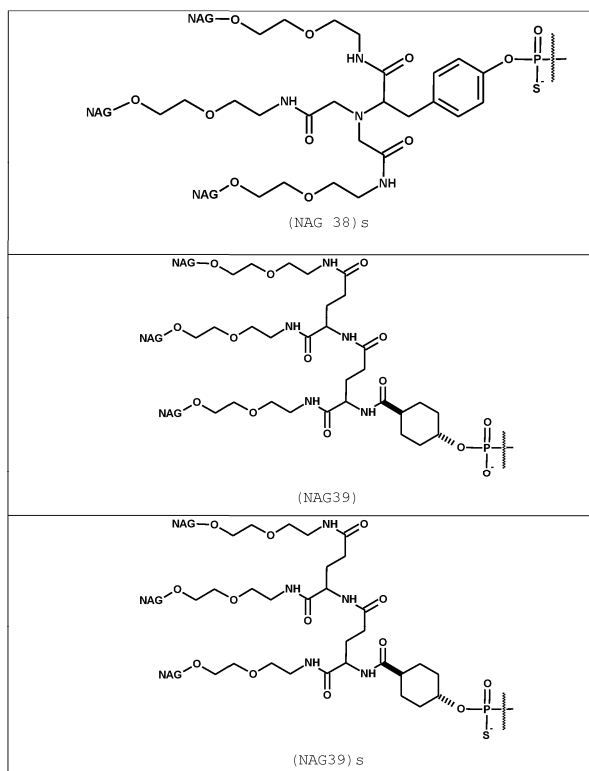


(NAG37) s

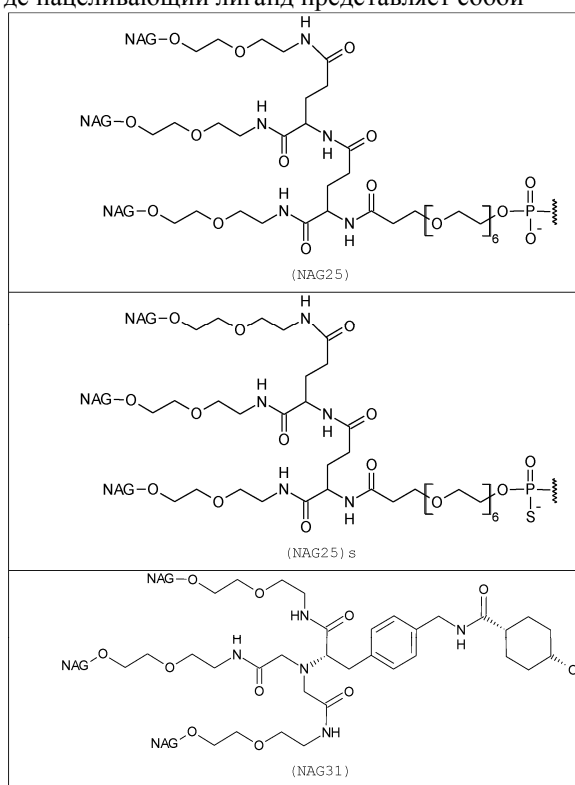


(NAG 38)

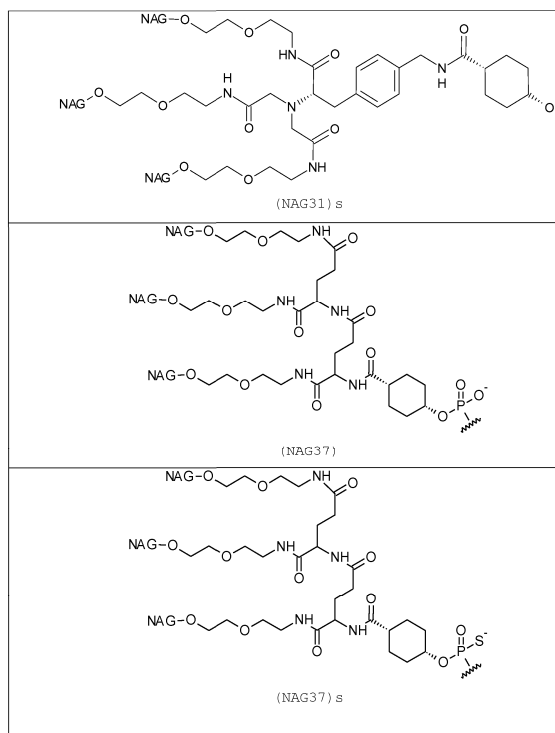
044937



10. Агент РНКи по п.9, где нацеливающий лиганд представляет собой







11. Агент РНКи по п.7, где нацеливающий лиганд конъюгирован со смысловой цепью агента РНКи.
12. Агент РНКи по п.7, где нацеливающий лиганд конъюгирован с антисмысловой цепью агента РНКи.
13. Агент РНКи по п.11, где нацеливающий лиганд конъюгирован с 5'-концом смысловой цепи агента РНКи.
14. Агент РНКи по п.12, где нацеливающий лиганд конъюгирован с 5'-концом антисмысловой цепи агента РНКи.
15. Агент РНКи по п.1, где смысловая цепь дополнительно содержит один или более инвертированных нуклеозидов, лишенных азотистого основания.
16. Агент РНКи по п.1, где агент РНК-интерференции содержит смысловую цепь, связанную на 5'-конце с NAG37 и имеющую структуру (NAG37)s(invAb)sguggacuuCfUfCfucauuuuucus(invAb) (SEQ ID NO: 252), и антисмысловую цепь, имеющую структуру asGfsasAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcasc (SEQ ID NO: 126).
17. Композиция для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В у субъекта, содержащая:
- первый агент РНКи, содержащий агент РНКи по любому из пп.1-16; и
  - второй агент РНКи, причем второй агент РНКи содержит:
    - антисмысловую цепь, содержащую любую из следующих нуклеотидных последовательностей: SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 188, и
    - смысловую цепь, содержащую любую из следующих нуклеотидных последовательностей: SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 274 и SEQ ID NO: 328.
18. Композиция по п.17, где композиция содержит первый агент РНКи и/или второй агент РНКи, независимо выбранные из группы, состоящей из AD04571 (SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 229), AD04776 (SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 248), AD04872 (SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 252), AD04873 (SEQ ID NO: 127 и SEQ ID NO: 252), AD04874 (SEQ ID NO: 128 и SEQ ID NO: 253), AD04982 (SEQ ID NO: 137 и SEQ ID NO: 248), AD05070 (SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 262), AD05148 (SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 271), AD05164 (SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 273) и AD05165 (SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 274).
19. Композиция по п.18, в которой весовое отношение первого агента РНКи ко второму агенту РНКи составляет от 1:2 до 5:1.
20. Композиция по п.19, в которой весовое отношение первого агента РНКи ко второму агенту РНКи составляет 2:1 или 3:1.
21. Композиция по п.20, в которой первый агент РНКи содержит антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 126, и смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 252, и второй агент РНКи содержит антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 140, и смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 262.
22. Композиция по п.21, где первый агент РНКи содержит смысловую цепь, связанную на 5'-конце с NAG37 и имеющую структуру (NAG37)s(invAb)sguggacuuCfUfCfucauuuuucus(invAb) (SEQ ID NO: 252), и антисмысловую цепь, имеющую структуру asGfsasAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcasc (SEQ ID №: 126), и второй агент РНКи содержит смысловую цепь, связанную на 5'-конце с NAG37 и имеющую

структуру (NAG37)s(invAb)scgcuguagGfCfAfuaaaugguas(invAb) (SEQ ID NO: 262), и комплементарную антисмысловую цепь, имеющую структуру usAfsCsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsg (SEQ ID NO: 140).

23. Композиция по п.20, в которой первый агент РНКи содержит антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 126, и смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 252, и второй агент РНКи содержит антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 102, и смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 248.

24. Композиция по п.23, где

первый агент РНКи содержит смысловую цепь, связанную на 5'-конце с NAG37 и имеющую структуру (NAG37)s(invAb)sguggacuuCfUfCfucaauuuucus(invAb) (SEQ ID NO: 252), и антисмысловую цепь, имеющую структуру asGfsasAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcasc (SEQ ID №: 126),

и второй агент РНКи содержит смысловую цепь, связанную на 5'-конце с NAG37 и имеющую структуру (NAG37)s(invAb)sggcuguagGfCfAfuaaaugguas(invAb) (SEQ ID NO: 248), и комплементарную антисмысловую цепь, имеющую структуру usAfsCsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgcsc (SEQ ID NO: 102).

25. Композиция по п.20, в которой первый агент РНКи содержит антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 126, и смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 252, и второй агент РНКи содержит антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 137, и смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 248.

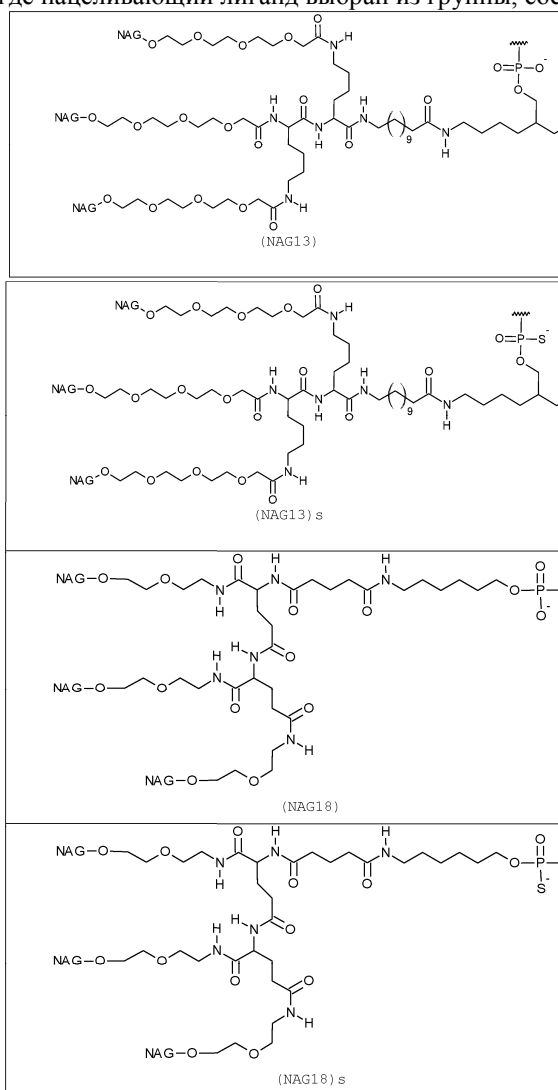
26. Композиция по п.25, где

первый агент РНКи содержит смысловую цепь, связанную на 5'-конце с NAG37 и имеющую структуру (NAG37)s(invAb)sguggacuuCfUfCfucaauuuucus(invAb) (SEQ ID NO: 252), и антисмысловую цепь, имеющую структуру asGfsasAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcasc (SEQ ID №: 126),

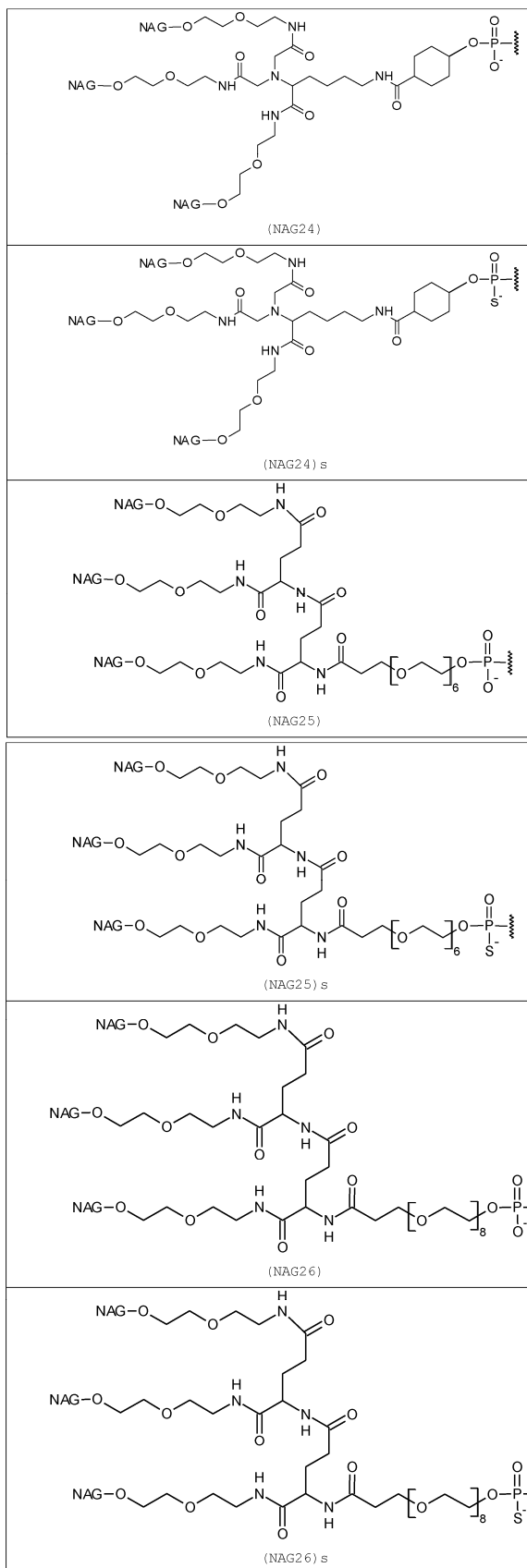
и второй агент РНКи содержит смысловую цепь, связанную на 5'-конце с NAG37 и имеющую структуру (NAG37)s(invAb)sggcuguagGfCfAfuaaaugguas(invAb) (SEQ ID NO: 248), и комплементарную антисмысловую цепь, имеющую структуру usAfsCsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc (SEQ ID NO: 137).

27. Композиция по п.18, в которой первый агент РНКи и/или второй агент РНКи, каждый независимо, конъюгированы с нацеливающим лигандом, содержащим N-ацетилгалактозамин.

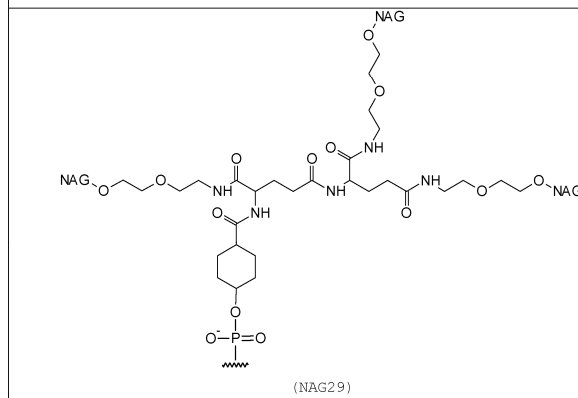
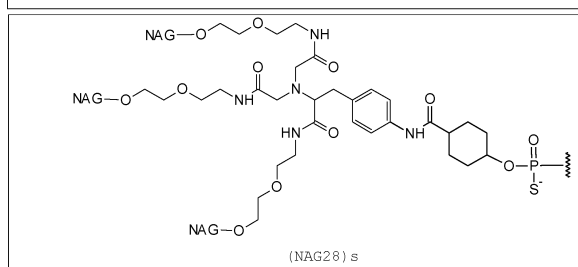
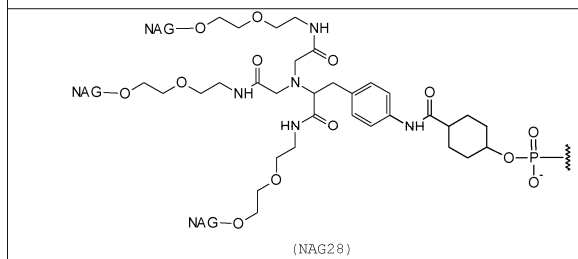
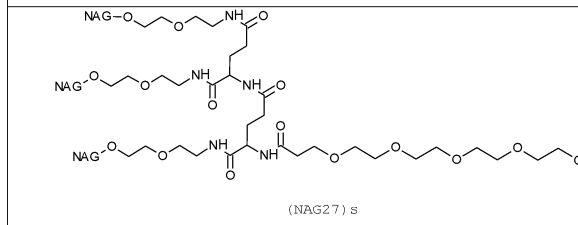
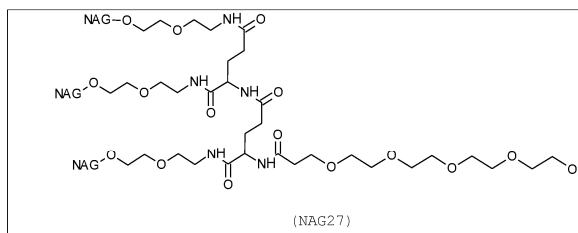
28. Композиция по п.27, где нацеливающий лиганд выбран из группы, состоящей из



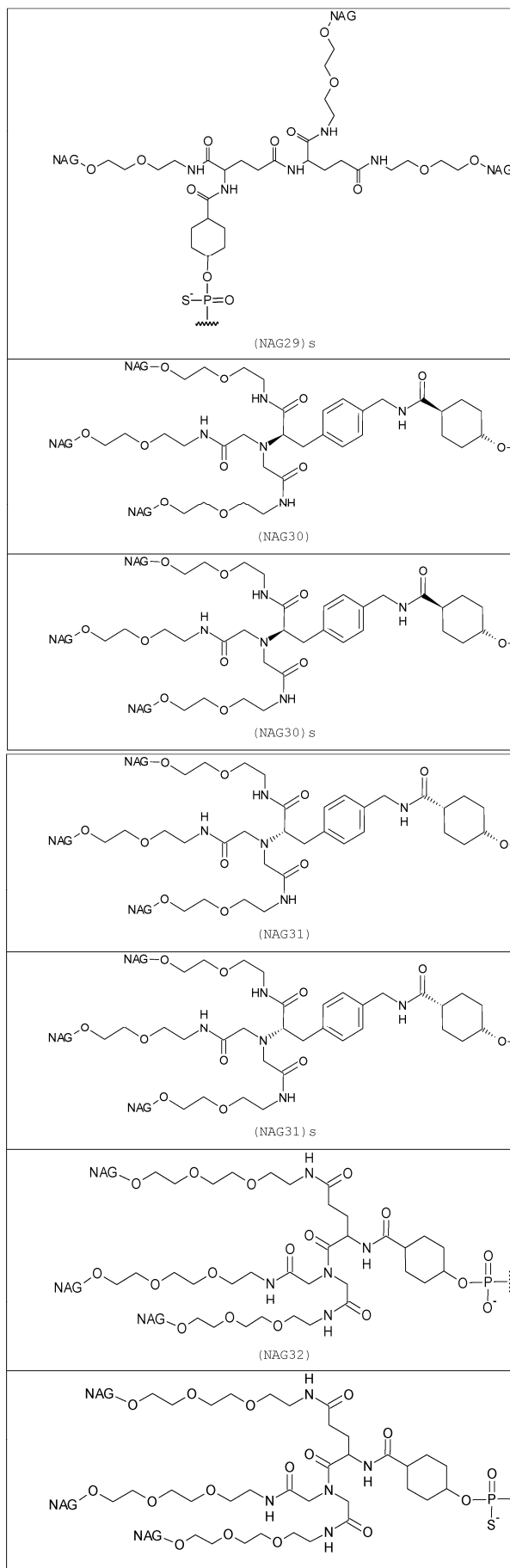
044937



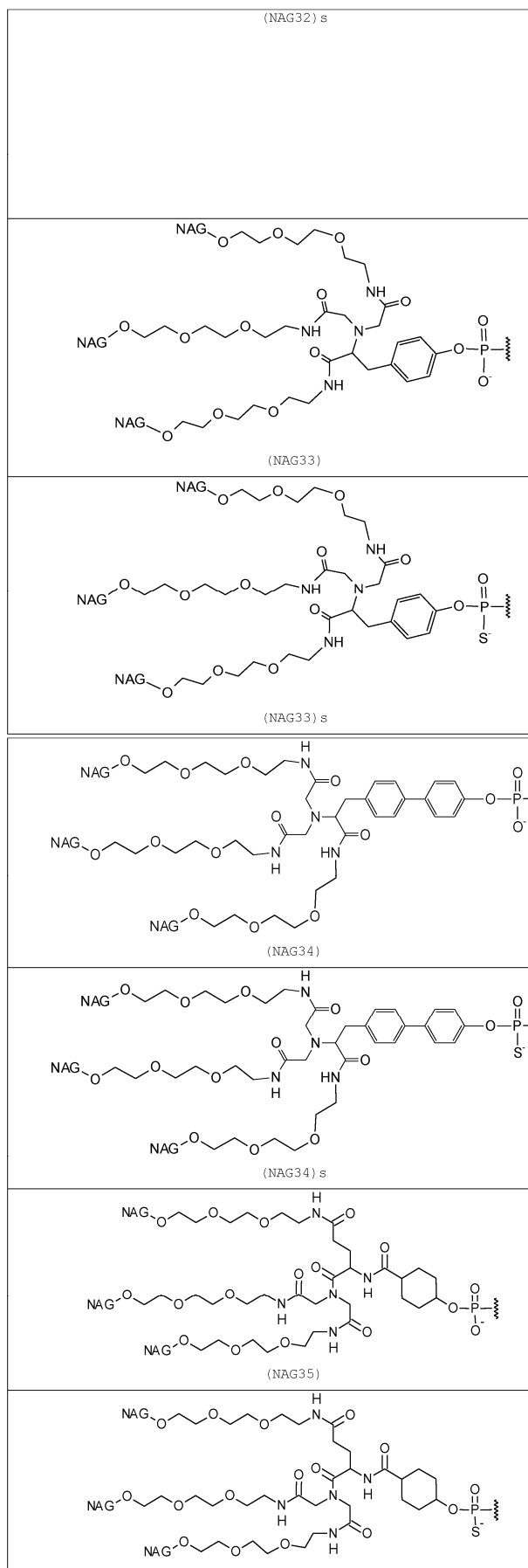
044937



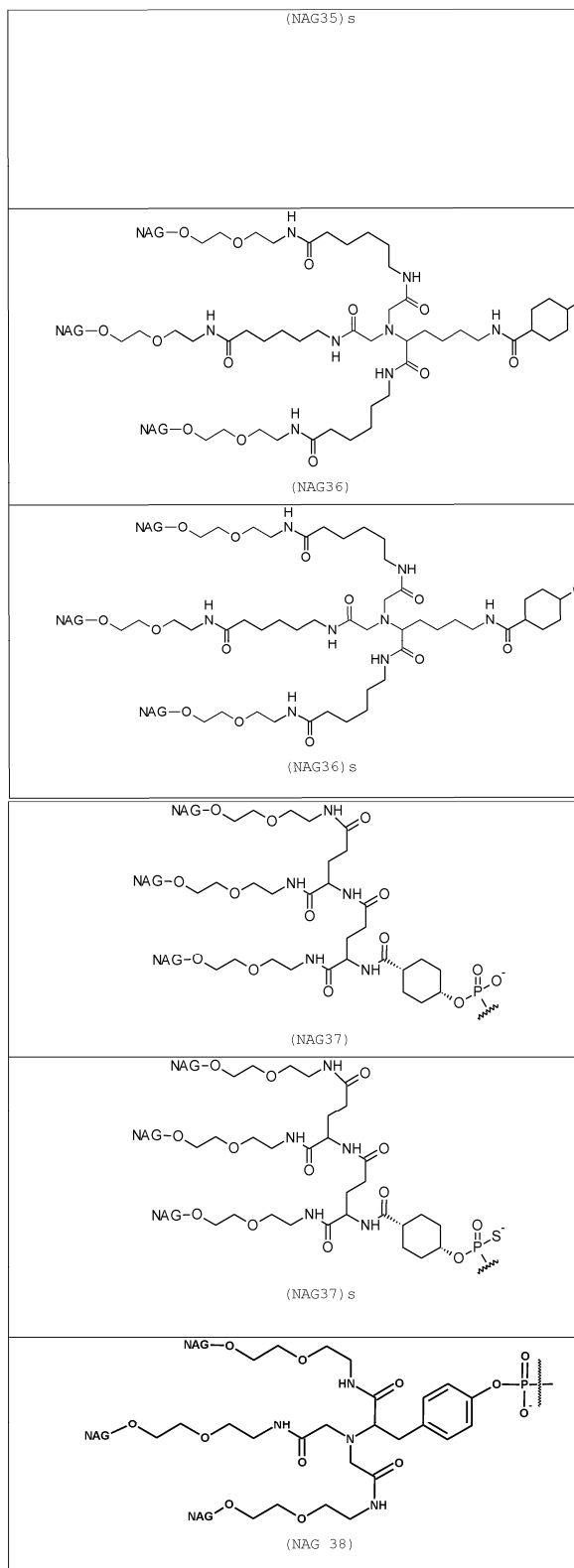
044937



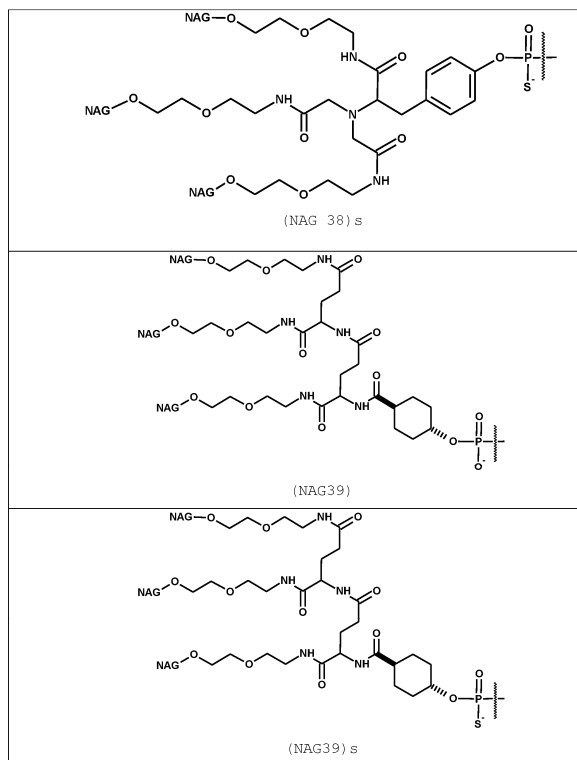
044937



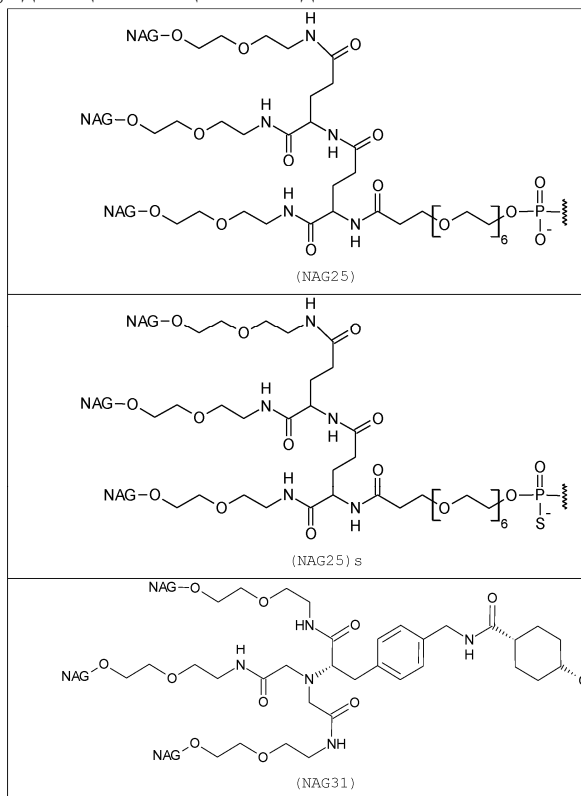
044937



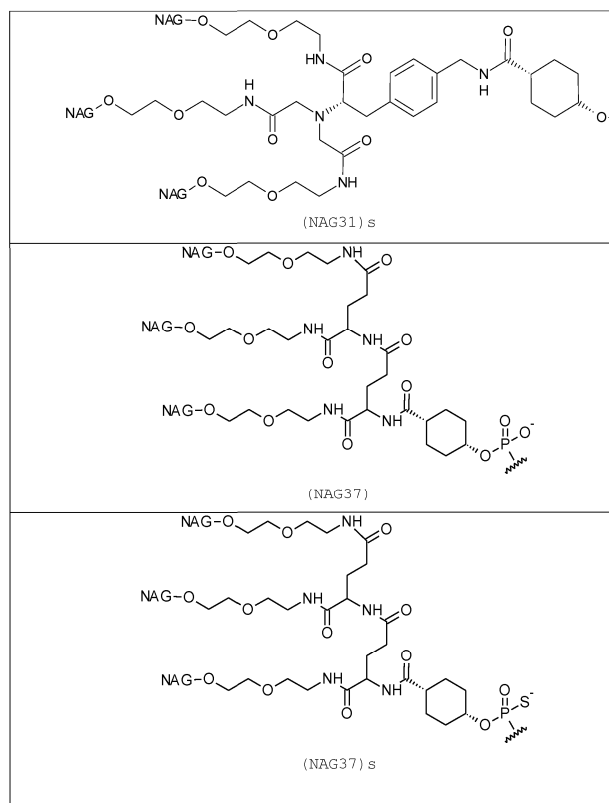
044937



29. Композиция по п.28, где нацеливающим лигандом является







30. Композиция по п.29, в которой нацеливающий лиганд конъюгирован со смысловой цепью первого агента РНКи и/или второго агента РНКи.

31. Композиция по п.29, в которой нацеливающий лиганд конъюгирован с антисмысловой цепью первого агента РНКи и/или второго агента РНКи.

32. Композиция по п.31, в которой нацеливающий лиганд конъюгирован с 5'-концом первого агента РНКи и/или второго агента РНКи.

33. Композиция по п.32, в которой нацеливающий лиганд конъюгирован с 5'-концом антисмысловой цепи первого агента РНКи и/или второго агента РНКи.

34. Композиция по п.17, в которой смысловая цепь дополнительно содержит один или более инвертированных нуклеозидов, лишенных азотистого основания.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая агент РНКи по п.1 и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель.

36. Набор для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В у субъекта, содержащий:

- фармацевтическую композицию по п.35 и
- шприц или ампулу.

37. Применение агента РНКи по любому из пп.1-16 для лечения субъекта, страдающего инфекцией ВГВ, хроническим заболеванием печени, нарушением или состоянием, вызванным инфекцией ВГВ или инфекцией вирусом гепатита В и по меньшей мере одним из вируса гепатита D и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

38. Применение по п.37 для лечения субъекта, имеющего инфекцию ВГВ.

39. Применение по п.38, где инфекция ВГВ представляет собой хроническую инфекцию ВГВ.

40. Применение по п.37 для лечения субъекта, имеющего хроническое заболевание печени, расстройство или состояние, вызванное инфекцией ВГВ.

41. Применение по п.40, где хроническое заболевание, нарушение или состояние печени, вызванное инфекцией ВГВ, представляет собой воспаление печени.

42. Применение по п.40, где хроническое заболевание, нарушение или состояние печени, вызванное инфекцией ВГВ, представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

43. Применение по п.40, где хроническое заболевание, нарушение или состояние печени, вызванное инфекцией ВГВ, представляет собой хронический гепатит.

44. Применение по п.37 для лечения субъекта, инфицированного вирусом гепатита В и по меньшей мере одним из вируса гепатита D и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

45. Применение по п.44 для лечения субъекта, инфицированного вирусом гепатита В и вирусом гепатита D.

46. Применение по п.45, где субъект имеет хроническую инфекцию, вызванную вирусом гепатита D.

47. Применение композиции по любому из пп.17-35 для лечения субъекта, страдающего инфекцией

HBV; хроническим заболеванием печени, расстройством или состоянием, вызванным инфекцией HBV; или инфицированным вирусом гепатита В и по меньшей мере одним из вирусов гепатита D и вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

48. Применение по п.47 для лечения субъекта, имеющего инфекцию HBV.

49. Применение по п.48, где инфекция HBV представляет собой хроническую инфекцию HBV.

50. Применение по п.47 для лечения субъекта, имеющего хроническое заболевание печени, расстройство или состояние, вызванное инфекцией HBV.

51. Применение по п.50, где хроническое заболевание, нарушение или состояние печени, вызванное инфекцией HBV, представляет собой воспаление печени.

52. Применение по п.50, где хроническое заболевание, нарушение или состояние печени, вызванное инфекцией HBV, представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

53. Применение по п.50, где хроническое заболевание, нарушение или состояние печени, вызванное инфекцией HBV, представляет собой хронический гепатит.

54. Применение по п.47 для лечения субъекта, инфицированного вирусом гепатита В и по меньшей мере одним из вирусов гепатита D и вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

55. Применение по п.54 для лечения субъекта, инфицированного вирусом гепатита В и вирусом гепатита D.

56. Применение по п.55, где субъект имеет хроническую инфекцию, вызванную вирусом гепатита D.

57. Композиция по любому из пп.17-34, в которой первый агент РНКи и/или второй агент РНКи находятся в форме соли.

58. Композиция по п.57, где форма соли представляет собой форму соли натрия.

59. Применение по п.37, дополнительно включающее одно или более дополнительных терапевтических средств.

60. Применение по п.59, где одно или более дополнительных терапевтических средств включают ламивудин, тенофовир, тенофовир алафенамид, тенофовир дизопроксил или энтекавир.

61. Применение по п.59, где одно или более дополнительных терапевтических средств включают интерферон.

62. Применение по п.59, где одно или более дополнительных терапевтических средств представляют собой низкомолекулярные лекарственные средства, антитела, фрагменты антител и/или вакцины.

