

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390002** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.05.29**

(51) Int. Cl. *A61K 31/713* (2006.01)  
*A61P 31/20* (2006.01)  
*C12N 15/113* (2010.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.06.07**

---

(54) **КОНЬЮГАТ С ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМ АНАЛОГОМ siRNA**

---

(31) 202010524584.8; 202010522407.6;  
202010529520.7; PCT/CN2020/133982;  
202011524835.9; 202011524307.3

(32) 2020.06.10; 2020.06.10; 2020.06.11;  
2020.12.04; 2020.12.21; 2020.12.21

(33) CN

(86) PCT/CN2021/098682

(87) WO 2021/249352 2021.12.16

(71) Заявитель:

**ЧИА ТАЙ ТЯНЬЦИН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ ГРУП КО.,  
ЛТД.; МЕДШАЙН ДИСКАВЕРИ  
ИНК. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Ань Кэ, Сунь Фэй, Дин Чарлз З., Чэнь  
Шухуэй (CN)**

(74) Представитель:

**Кузнецова С.А. (RU)**

---

(57) Предусмотрены двухцепочечный аналог siRNA со встроенным производным рибавирина, конъюгат, содержащий его, и его соль и применение. Предусмотренный двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат, содержащий его, и его соль могут эффективно ингибировать множество вирусных индикаторов, таких как ДНК, pgRNA, антиген S и антиген E вируса гепатита В, что обеспечивает эффективный и осуществимый способ лечения гепатита В.

**A1**

**202390002**

**202390002**

**A1**

**КОНЬЮГАТ С ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМ АНАЛОГОМ siRNA**

Настоящая заявка испрашивает приоритет

CN202010529520.7, поданной 11 июня 2020 г.;

CN202011524835.9, поданной 21 декабря 2020 г.;

CN202010524584.8, поданной 10 июня 2020 г.;

PCT/CN2020/133982, поданной 4 декабря 2020 г.;

CN202010522407.6, поданной 10 июня 2020 г.; и

CN202011524307.3, поданной 21 декабря 2020 г.

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Настоящее изобретение относится к области биомедицины и относится к аналогу г'-встроенной siRNA, двухцепочечному аналогу siRNA, конъюгату, содержащему их, и их соли и применению; при этом применение предусматривает специфическое применение для получения лекарственного препарата для лечения вирусного гепатита В.

**ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Вирусный гепатит В, сокращенно гепатит В, представляет собой заболевание, вызванное инфицированием организма вирусом гепатита В (HBV). Вирус гепатита В является гепатотропным вирусом и в основном находится в гепатоцитах и повреждает их, вызывая воспаление, некроз и фиброз гепатоцитов. Вирусный гепатит В подразделяется на острый и хронический. Острый гепатит В по большей части может излечиваться у взрослых за счет собственных иммунных механизмов. Однако хронический гепатит В (СНВ) стал серьезной проблемой для здравоохранения во всем мире, а также является основной причиной хронического заболевания печени, цирроза и карциномы печени (HCC) (Edward J. G., et al., The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* (2015);

63: 320-328). Подсчитано, что 2 миллиарда человек во всем мире инфицированы вирусом CHB, более чем у 350 миллионов из них развился гепатит В, и почти 600000 человек ежегодно умирают от осложнений CHB (Edward J. G., et al., The oral toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* (2015)). Китай является регионом с высокой заболеваемостью гепатитом В и имеет большое количество пациентов с гепатитом В, что наносит большой вред. Из данных видно, что в настоящее время в Китае насчитывается приблизительно 93 миллионов пациентов, инфицированных вирусом гепатита В, и приблизительно 20 миллионов из них имеют диагноз хронического гепатита В, у 10-20% из которых может развиваться цирроз печени, и у 1-5% из которых может развиваться карцинома печени. (Zhang Chunhong, Application of interferon in the treatment of hepatitis B. *Guide of China Medicine* (2013); 11: 475–476).

Ключом к функциональному излечению гепатита В является клиренс HBsAg (поверхностного антигена гепатита В) и выработка поверхностных антител. Количественное определение уровня HBsAg является очень важным биологическим индикатором. У хронически инфицированных пациентов редко наблюдают снижение уровня HBsAg и сероконверсию, что является конечной точкой проводимого лечения.

В настоящее время на рынке одобренными лекарственными средствами против HBV являются, в основном, иммуномодуляторы (интерферон- $\alpha$  и полиэтиленгликоль-интерферон- $\alpha$ -2 $\alpha$ ) и противовирусные терапевтические лекарственные средства (ламивудин, адефовир, дипивоксил, энтекавир, телбивудин, тенофовир, клебудин и др.). Среди них противовирусные терапевтические лекарственные средства относятся к нуклеотидным лекарственным средствам, механизм действия которых заключается в ингибировании синтеза ДНК HBV, но при этом уровень HBsAg не может быть снижен напрямую. Как и в случае пролонгированного лечения, нуклеотидные лекарственные средства демонстрируют скорость клиренса HBsAg, аналогичную наблюдаемой в естественных условиях (Janssen et al., *Lancet* (2005), 365, 123–129; Marcellin et al., *N. Engl.J.Med.* (2004), 351, 1206–1217; Buster et al., *Hepatology* (2007), 46, 388–394).

В клинике применяют виды терапии для снижения уровня HBsAg, но исцеляющий эффект является слабым. Следовательно, если экспрессию гена вируса можно подавить на генном уровне, чтобы заблокировать выработку и репликацию HBV, в частности

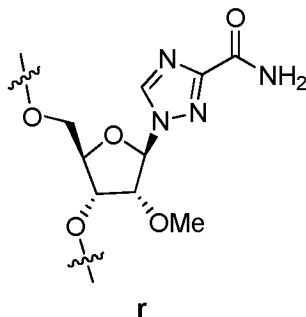
продуцирование HBsAg и HBeAg (антиген BS гепатита и антиген E), то метаболизм вируса и степень инфицирования клеток печени вирусом можно существенно снизить. Малая интерферирующая РНК (siRNA), основываясь на механизме РНК-интерференции (RNAi), может ингибировать или блокировать экспрессию гена-мишени специфичным для последовательности образом и оказывать ингибирующее действие в отношении трансляции mRNA в белок, тем самым достигая цели лечения заболеваний (WO2016077321, WO2018195165). Что касается этих наиболее идеальных терапевтических средств против гепатита В, то для повышения метаболической стабильности необходимы стабилизированная модификация siRNA и вспомогательные соответствующие системы доставки к органам- и клеткам-мишеням, однако существующие siRNA не могут эффективно снижать содержание антигена S и антигена E вируса гепатита В.

В то же время siRNA может посредством частичного комплементарного спаривания с определенными фрагментами mRNA принимать участие в регуляции экспрессии гена, соответствующего mRNA. В частности, комплементарное спаривание начального участка на 5'-конце антисмысловой цепи siRNA с нецелевым геном частично или полностью подавляет экспрессию гена, и такое явление является основной причиной нецелевого эффекта siRNA *in vivo* и *in vitro* (Jackson et al., *RNA* (2006), 12, 1179–1187). siRNA для лечения гепатита В продемонстрировали данный недостаток как на клинической, так и на доклинической стадиях (WO2020036862). Хотя риск нецелевого воздействия можно снизить за счет некоторых модификаций нуклеотидов (Iribe et al., *ACS Omega* (2017), 2, 2055–2064; Janas et al., *Nat. Commun.* 2018, 9, 723–732), эффективность сайленсинга также снижается, и терапевтическое окно безопасности по-прежнему нуждается в совершенствовании.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к двухцепочечному аналогу siRNA со встроенным производным рибавирина, конъюгату, содержащему его, и его соли и применению. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат, содержащий его, и его соль по настоящему изобретению могут эффективно ингибировать множество вирусных индикаторов, таких как ДНК, антиген S и антиген E вируса гепатита В, и обеспечивать эффективные и осуществимые средства для лечения (например, функционального излечения) гепатита В, такого как хронический гепатит В.

Следовательно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечному аналогу siRNA, содержащему смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит последовательность, полученную посредством замены одного или более нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, на *r*, и *r* представляет собой



где каждый из нуклеотидов и *r* в аналоге siRNA являются независимо модифицированными или немодифицированными.

В некоторых вариантах осуществления один или более из нуклеотидов и *r* в аналоге siRNA являются модифицированными, в то время как другие нуклеотиды и *r* являются немодифицированными. Модификация предусматривает, например, метокси-модификацию, фтор-модификацию, фосфотиоатную связь, замену нуклеотида на (*S*)-глицериновую нуклеиновую кислоту и т. п.

В некоторых вариантах осуществления один или более из нуклеотидов и *r* в аналоге siRNA являются модифицированными, в то время как другие нуклеотиды и *r* являются немодифицированными. Модификация предусматривает, например, метокси-модификацию, фтор-модификацию, фосфотиоатную связь, замену нуклеотида на (*S*)-глицериновую нуклеиновую кислоту, замену нуклеотида на (*E*)-винилфосфат и т. п.

В некоторых вариантах осуществления по сути все из нуклеотидов и *r* в аналоге siRNA являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления все из нуклеотидов и *r* в аналоге siRNA являются модифицированными.

В некоторых вариантах осуществления 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более из нуклеотидов и *r* в двухцепочечном аналоге siRNA являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления все из нуклеотидов и *r* в двухцепочечном аналоге

siRNA являются модифицированными.

В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 2 необязательно содержит выступ на 5'-конце и/или 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 2 содержит выступ из 0, 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов на 5'-конце и/или 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления, когда SEQ ID NO: 2 содержит выступ из 2 нуклеотидов на 5'-конце и/или 3'-конце, между 3 нуклеотидами на конце необязательно присутствуют 2 фосфотиоатные связи, где 2 из 3 нуклеотидов представляют собой выступ, а другой 1 нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид, примыкающий к выступу. В некоторых вариантах осуществления выступ предпочтительно выбран из модифицированного или немодифицированного UU. В некоторых вариантах осуществления выступ предпочтительно выбран из uu. В некоторых вариантах осуществления присутствуют 2 фосфотиоатных связи между выступающим uu и 1 соседним с ним парным нуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 2 содержит выступ на 3'-конце, и выступ предпочтительно выбран из модифицированного или немодифицированного UU. В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 2 содержит выступ на 3'-конце, и выступ предпочтительно выбран из uu. В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 2 содержит выступ на 3'-конце, и присутствуют 2 фосфотиоатные связи между выступом uu и 1 соседним с ним парным нуклеотидом (например, с•u•u).

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь в двухцепочечном аналоге siRNA содержит последовательность, полученную посредством замены одного или более нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, на г. Например, антисмысловая цепь содержит последовательность, полученную посредством замены одного нуклеотидного остатка в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, на г.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь в двухцепочечном аналоге siRNA содержит последовательность, полученную посредством замены одного или более нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, на г. Например, антисмысловая цепь содержит последовательность, полученную посредством замены одного, двух, трех, четырех или пяти нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, на г.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь в двухцепочечном аналоге siRNA содержит последовательность, полученную посредством замены одного или более нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, на г, и замена г происходит в любом положении SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, замена г происходит в положениях с 1 по 21 или с 1 по 19 от 5'-конца SEQ ID NO: 2. Например, замена г происходит в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 от 5'-конца SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, замена г происходит в положениях 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 16 или 18 от 5'-конца SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь в двухцепочечном аналоге siRNA содержит или состоит из последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления последовательность предусматривает дополнительные модификации нуклеотидов, такие как метокси-модификация, фтор-модификация, фосфотиоатная связь или замена нуклеотида (*S*)-глицериновой нуклеиновой кислотой и т. п.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь в двухцепочечном аналоге siRNA содержит или состоит из последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления последовательность предусматривает дополнительные модификации нуклеотидов, такие как метокси-модификация, фтор-модификация, фосфотиоатная связь, замена нуклеотида (*S*)-глицериновой нуклеиновой кислотой или замена нуклеотида на (*E*)-винилфосфат или т. п.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь в двухцепочечном аналоге

siRNA содержит или состоит из последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь в двухцепочечном аналоге siRNA содержит последовательность, полученную посредством замены одного или более нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, на г. Например, смысловая цепь содержит последовательность, полученную посредством замены одного нуклеотидного остатка в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, на г.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь в двухцепочечном аналоге siRNA содержит последовательность, полученную посредством замены одного или более нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, на г. Например, смысловая цепь содержит последовательность, полученную посредством замены 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, на г.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь в двухцепочечном аналоге siRNA содержит последовательность, полученную посредством замены одного или более нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, на г, и замена г происходит в положениях с 1 по 19 от 5'-конца SEQ ID NO: 1. Например, замена г происходит в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 от 5'-конца SEQ ID NO: 1. Предпочтительно замена г происходит в положениях 2, 3, 7, 12, 15, 17 или 19 от 5'-конца SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления последовательность смысловой цепи в двухцепочечном аналоге siRNA содержит или состоит из последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления последовательность предусматривает дополнительные модификации нуклеотидов, такие как метокси-модификация, фтор-модификация или фосфотиоатная связь и т. п.

В некоторых вариантах осуществления последовательность смысловой цепи в двухцепочечном аналоге siRNA содержит или состоит из последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16,



SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления последовательность предусматривает дополнительные модификации нуклеотидов, такие как метокси-модификация, фтор-модификация, фосфотиоатная связь, замена нуклеотида (*S*)-глицериновой нуклеиновой кислотой или замена нуклеотида на (*E*)-винилфосфат или т. п.

В некоторых конкретных вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь двухцепочечного аналога siRNA содержат последовательность, полученную посредством замены одного или более нуклеотидных остатков в последовательности на г, такой как последовательность, изложенная в антисмысловой цепи SEQ ID NO: 2 (замена г в положении 2 от 5'-конца SEQ ID NO: 2) и последовательность, изложенная в смысловой цепи под SEQ ID NO: 1 (замена г происходит в положении 7 от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный аналог siRNA представляет собой любой из S18-S28:

S18: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17,

S19: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19,

S20: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 20,

S21: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 21,

S22: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22,

S23: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23,

S24: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24,

S25: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 33,

S26: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 34,

S27: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 35, и

S28: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный аналог siRNA представляет собой любой из S1-S17:

S1: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17,

S2: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17,

S3: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19,

S4: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19,

S5: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 20,

S6: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 20,

S7: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 21,

S8: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 21,

S9: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22,

S10: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22,

S11: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23,

S12: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23,

S13: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24,

S14: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24,

S15: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 25, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17,

S16: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 26, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17, и

S17: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 27, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления аналог двухцепочечной siRNA представляет собой любой из S29-S35:

S29: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 42, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23,

S30: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 43, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23,

S31: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 44,

S32: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 45,

S33: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 46,

S34: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 47, и

S35: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный аналог siRNA выбран из следующих: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 6, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 6, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 7, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 7, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 8, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 8, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 9, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 9, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 12, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 13, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 14,

и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 6, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 7, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 8, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 9, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 29, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 30, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 31, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 32, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 37, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 38, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 39, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10, и смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 40, и каждый из нуклеотидов и г в двухцепочечном аналоге siRNA является независимо модифицированным или немодифицированным.

В некоторых вариантах осуществления аналог двухцепочечной siRNA выбран из приведенного ниже.

| Порядковый номер | SEQ ID NO | Последовательность смысловой цепи (5'-3') | SEQ ID NO | Последовательность антисмысловой цепи (5'-3') |
|------------------|-----------|---|-----------|---|
| 1                | 3         | GrGUGCACUUCGCUUCACA                       | 4         | UGUGArGCGAAGUGCACACUU                         |
| 2                | 5         | GUrUGCACUUCGCUUCACA                       | 4         | UGUGArGCGAAGUGCACACUU                         |
| 3                | 3         | GrGUGCACUUCGCUUCACA                       | 6         | UrUGAAGCGAAGUGCACACUU                         |

|    |    |                         |    |                        |
|----|----|-------------------------|----|------------------------|
| 4  | 5  | GUrUGCACUUCGCUUCACA     | 6  | UrUGAAGCGAAGUGGCACACUU |
| 5  | 3  | GrGUGCACUUCGCUUCACA     | 7  | UGrGAAGCGAAGUGGCACACUU |
| 6  | 5  | GUrUGCACUUCGCUUCACA     | 7  | UGrGAAGCGAAGUGGCACACUU |
| 7  | 3  | GrGUGCACUUCGCUUCACA     | 8  | UGUrAAGCGAAGUGGCACACUU |
| 8  | 5  | GUrUGCACUUCGCUUCACA     | 8  | UGUrAAGCGAAGUGGCACACUU |
| 9  | 3  | GrGUGCACUUCGCUUCACA     | 9  | UGUGrAGCGAAGUGGCACACUU |
| 10 | 5  | GUrUGCACUUCGCUUCACA     | 9  | UGUGrAGCGAAGUGGCACACUU |
| 11 | 3  | GrGUGCACUUCGCUUCACA     | 10 | UGUGAArCGAAGUGGCACACUU |
| 12 | 5  | GUrUGCACUUCGCUUCACA     | 10 | UGUGAArCGAAGUGGCACACUU |
| 13 | 3  | GrGUGCACUUCGCUUCACA     | 11 | UGUGAAGrGAAGUGGCACACUU |
| 14 | 5  | GUrUGCACUUCGCUUCACA     | 11 | UGUGAAGrGAAGUGGCACACUU |
| 15 | 12 | GUGUGCrCUUCGCUUCACA     | 4  | UGUGArGCGAAGUGGCACACUU |
| 16 | 13 | GUGUGCACUUCGCUUCrCA     | 4  | UGUGArGCGAAGUGGCACACUU |
| 17 | 14 | GUGUGCACUUCGCUUCACr     | 4  | UGUGArGCGAAGUGGCACACUU |
| 18 | 1  | GUGUGCACUUCGCUUCAC<br>A | 4  | UGUGArGCGAAGUGGCACACUU |
| 19 | 1  | GUGUGCACUUCGCUUCAC<br>A | 6  | UrUGAAGCGAAGUGGCACACUU |
| 20 | 1  | GUGUGCACUUCGCUUCAC<br>A | 7  | UGrGAAGCGAAGUGGCACACUU |
| 21 | 1  | GUGUGCACUUCGCUUCAC<br>A | 8  | UGUrAAGCGAAGUGGCACACUU |
| 22 | 1  | GUGUGCACUUCGCUUCAC<br>A | 9  | UGUGrAGCGAAGUGGCACACUU |
| 23 | 1  | GUGUGCACUUCGCUUCAC<br>A | 10 | UGUGAArCGAAGUGGCACACUU |
| 24 | 1  | GUGUGCACUUCGCUUCAC<br>A | 11 | UGUGAAGrGAAGUGGCACACUU |
| 25 | 1  | GUGUGCACUUCGCUUCAC<br>A | 29 | UGUGAAGCGrAGUGGCACACUU |
| 26 | 1  | GUGUGCACUUCGCUUCAC<br>A | 30 | UGUGAAGCGArGUGGCACACUU |
| 27 | 1  | GUGUGCACUUCGCUUCAC<br>A | 31 | UGUGAAGCGAAGUGCrCACUU  |
| 28 | 1  | GUGUGCACUUCGCUUCAC<br>A | 32 | UGUGAAGCGAAGUGCACrCUU  |
| 29 | 37 | GrGUGCACUUCGCUrCACA     | 10 | UGUGAArCGAAGUGGCACACUU |
| 30 | 38 | GrGUGCACUUCrCUUCACA     | 10 | UGUGAArCGAAGUGGCACACUU |

|           |          |                     |           |                       |
|-----------|----------|---------------------|-----------|-----------------------|
| <b>31</b> | <b>3</b> | GrGUGCACUUCGCUUCACA | <b>39</b> | UGUrAArCGAAGUGCACACUU |
| <b>32</b> | <b>3</b> | GrGUGCACUUCGCUUCACA | <b>10</b> | UGUGAArCGAAGUGCACACUU |
| <b>33</b> | <b>3</b> | GrGUGCACUUCGCUUCACA | <b>40</b> | UGUGAAGCGAArUGCACACUU |

Каждый из нуклеотидов и г в двухцепочечном аналоге siRNA является независимо модифицированным или немодифицированным.

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный аналог siRNA выбран из следующих: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 17, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 17, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 19, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 19, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 20, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 20, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 21, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 21, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 22, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 22, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 23, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 23, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 24, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 24, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 25, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 17, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 26, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 17, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 27, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 17, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 17, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 19, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO:

28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 20, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 21, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 22, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 23, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 24, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 33, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 34, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 35, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 36, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 42, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 23, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 43, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 23, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 44, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 45, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 46, смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 47, и смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления аналог двухцепочечной siRNA выбран из приведенного ниже.

| Порядковый номер | SEQ ID NO | Последовательность смысловой цепи (5'-3') | SEQ ID NO | Последовательность антисмысловой цепи (5'-3') |
|------------------|-----------|---|-----------|---|
| 1                | 16        | g•r•guGcACUucgcuucasa                     | 17        | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u                     |
| 2                | 18        | g•u•ruGcACUucgcuucasa                     | 17        | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u                     |
| 3                | 16        | g•r•guGcACUucgcuucasa                     | 19        | u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u                     |
| 4                | 18        | g•u•ruGcACUucgcuucasa                     | 19        | u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u                     |
| 5                | 16        | g•r•guGcACUucgcuucasa                     | 20        | u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u                     |
| 6                | 18        | g•u•ruGcACUucgcuucasa                     | 20        | u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u                     |
| 7                | 16        | g•r•guGcACUucgcuucasa                     | 21        | u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u                     |

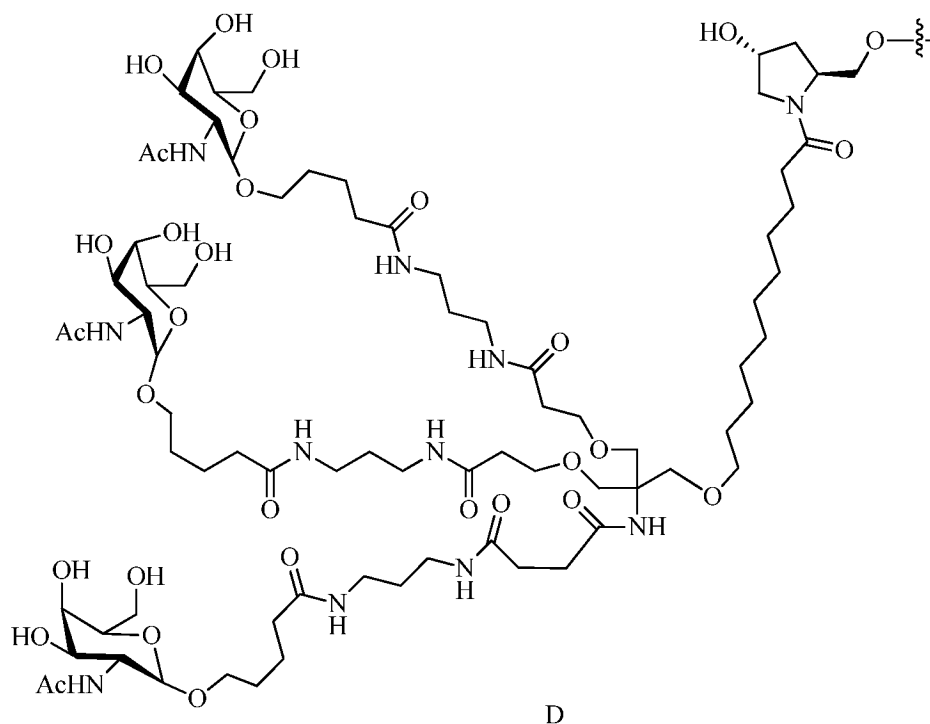


|    |    |                       |    |                                 |
|----|----|-----------------------|----|---------------------------------|
| 8  | 18 | g•u•ruGcACUucgcuucaca | 21 | u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u       |
| 9  | 16 | g•r•guGcACUucgcuucaca | 22 | u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u       |
| 10 | 18 | g•u•ruGcACUucgcuucaca | 22 | u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u       |
| 11 | 16 | g•r•guGcACUucgcuucaca | 23 | u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u       |
| 12 | 18 | g•u•ruGcACUucgcuucaca | 23 | u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u       |
| 13 | 16 | g•r•guGcACUucgcuucaca | 24 | u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u       |
| 14 | 18 | g•u•ruGcACUucgcuucaca | 24 | u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u       |
| 15 | 25 | g•u•guGcrCUucgcuucaca | 17 | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u       |
| 16 | 26 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 17 | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u       |
| 17 | 27 | g•u•guGcACUucgcuucacr | 17 | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u       |
| 18 | 28 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 17 | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u       |
| 19 | 28 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 19 | u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u       |
| 20 | 28 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 20 | u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u       |
| 21 | 28 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 21 | u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u       |
| 22 | 28 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 22 | u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u       |
| 23 | 28 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 23 | u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u       |
| 24 | 28 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 24 | u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u       |
| 25 | 28 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 33 | u•G•uga(Agn)gCGraguGcAcac•u•u   |
| 26 | 28 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 34 | u•G•uga(Agn)gCGarguGcAcac•u•u   |
| 27 | 28 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 35 | u•G•uga(Agn)gCGaaguGcAcac•u•u   |
| 28 | 28 | g•u•guGcACUucgcuucaca | 36 | u•G•uga(Agn)gCGaaguGcAcac•u•u   |
| 29 | 42 | g•r•guGcACUucgcurcaca | 23 | u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u       |
| 30 | 43 | g•r•guGcACUucrcuucaca | 23 | u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u       |
| 31 | 16 | g•r•guGcACUucgcuucaca | 44 | u•G•uraArCGaaguGcAcac•u•u       |
| 32 | 16 | g•r•guGcACUucgcuucaca | 45 | u•G•uga(Agn)rCGaaguGcAcac•u•u   |
| 33 | 16 | g•r•guGcACUucgcuucaca | 46 | u•G•uga(Agn)gCGaaruGcAcac•u•u   |
| 35 | 16 | g•r•guGcACUucgcuucaca | 47 | VPu•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u     |
| 36 | 16 | g•r•guGcACUucgcuucaca | 48 | VPu•G•uga(Agn)rCGaaguGcAcac•u•u |

Во втором аспекте настоящего изобретения предусмотрен конъюгат с двухцепочечным аналогом siRNA, который содержит двухцепочечный аналог siRNA в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения и фармацевтически приемлемую конъюгированную группу, конъюгированную с двухцепочечным аналогом siRNA.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая конъюгированная группа в конъюгате с двухцепочечным аналогом siRNA содержит от 1 до 5 групп GalNAc, (N-ацетилгалактозамин). Предпочтительно фармацевтически приемлемая конъюгированная группа содержит 1, 2, 3, 4 или 5 групп GalNAc. Более предпочтительно фармацевтически приемлемая конъюгированная группа содержит 3 или 4 группы GalNAc.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая конъюгированная группа в конъюгате с двухцепочечным аналогом siRNA содержит группу D, представленную соединением



В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая конъюгированная группа в конъюгате с двухцепочечным аналогом siRNA связана с 3'-концом смысловой цепи двухцепочечного аналога siRNA.

В некоторых вариантах осуществления фосфотиоатный фрагмент двухцепочечного аналога siRNA или конъюгата с двухцепочечным аналогом siRNA включает (*R*)- и (*S*)-энантиомеры, диастереоизомеры и/или их рацемические смеси.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат с двухцепочечным аналогом siRNA выбран из приведенного ниже.

| Порядковый номер | Последовательность смысловой цепи (5'-3')-конъюгированной группы | SEQ ID NO: | Последовательность антисмысловой цепи (5'-3') | SEQ ID NO: |
|------------------|--|------------|---|------------|
| 1                | g•r•guGcACUucgcuucacaD   | 16         | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u                     | 17         |
| 2                | g•u•ruGcACUucgcuucacaD   | 18         | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u                     | 17         |
| 3                | g•r•guGcACUucgcuucacaD   | 16         | u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 19         |
| 4                | g•u•ruGcACUucgcuucacaD   | 18         | u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 19         |
| 5                | g•r•guGcACUucgcuucacaD   | 16         | u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 20         |
| 6                | g•u•ruGcACUucgcuucacaD   | 18         | u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 20         |
| 7                | g•r•guGcACUucgcuucacaD   | 16         | u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 21         |
| 8                | g•u•ruGcACUucgcuucacaD   | 18         | u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 21         |
| 9                | g•r•guGcACUucgcuucacaD   | 16         | u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 22         |
| 10               | g•u•ruGcACUucgcuucacaD   | 18         | u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 22         |
| 11               | g•r•guGcACUucgcuucacaD   | 16         | u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u                     | 23         |
| 12               | g•u•ruGcACUucgcuucacaD   | 18         | u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u                     | 23         |
| 13               | g•r•guGcACUucgcuucacaD   | 16         | u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u                     | 24         |
| 14               | g•u•ruGcACUucgcuucacaD   | 18         | u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u                     | 24         |
| 15               | g•u•guGcrCUucgcuucacaD   | 25         | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u                     | 17         |
| 16               | g•u•guGcACUucgcuucaca<br>D                                       | 26         | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u                     | 17         |
| 17               | g•u•guGcACUucgcuucacr<br>D                                       | 27         | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u                     | 17         |
| 18               | g•u•guGcACUucgcuucaca<br>D                                       | 28         | u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u                     | 17         |
| 19               | g•u•guGcACUucgcuucaca<br>D                                       | 28         | u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 19         |
| 20               | g•u•guGcACUucgcuucaca<br>D                                       | 28         | u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 20         |
| 21               | g•u•guGcACUucgcuucaca<br>D                                       | 28         | u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 21         |
| 22               | g•u•guGcACUucgcuucaca<br>D                                       | 28         | u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u                     | 22         |
| 23               | g•u•guGcACUucgcuucaca<br>D                                       | 28         | u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u                     | 23         |
| 24               | g•u•guGcACUucgcuucaca<br>D                                       | 28         | u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u                     | 24         |
| 25               | g•u•guGcACUucgcuucaca  | 28         | u•G•uga(Agn)gCGraguGcAcac•                    | 33         |

|    | D   |    | u•u  |    |
|----|---|----|--|----|
| 26 | $g\bullet u\bullet gu\text{GcACUucgcuucaca}$<br>D | 28 | $u\bullet \underline{G}\bullet uga(Agn)gCG\text{GarguGcAcac}\bullet$<br>u•u      | 34 |
| 27 | $g\bullet u\bullet gu\text{GcACUucgcuucaca}$<br>D | 28 | $u\bullet \underline{G}\bullet uga(Agn)gCG\text{GaaguGcrcac}\bullet u$<br>•u     | 35 |
| 28 | $g\bullet u\bullet gu\text{GcACUucgcuucaca}$<br>D | 28 | $u\bullet \underline{G}\bullet uga(Agn)gCG\text{GaaguGcAcr}\bullet$<br>u•u       | 36 |
| 29 | $g\bullet r\bullet gu\text{GcACUucgcurcacaD}$     | 42 | $u\bullet \underline{G}\bullet ugaArCG\text{GaaguGcAcac}\bullet u\bullet u$      | 23 |
| 30 | $g\bullet r\bullet gu\text{GcACUucrcuucacaD}$     | 43 | $u\bullet \underline{G}\bullet ugaArCG\text{GaaguGcAcac}\bullet u\bullet u$      | 23 |
| 31 | $g\bullet r\bullet gu\text{GcACUucgcuucacaD}$     | 16 | $u\bullet \underline{G}\bullet uraArCG\text{GaaguGcAcac}\bullet u\bullet u$      | 44 |
| 32 | $g\bullet r\bullet gu\text{GcACUucgcuucacaD}$     | 16 | $u\bullet \underline{G}\bullet uga(Agn)rCG\text{GaaguGcAcac}\bullet u$<br>•u     | 45 |
| 33 | $g\bullet r\bullet gu\text{GcACUucgcuucacaD}$     | 16 | $u\bullet \underline{G}\bullet uga(Agn)gCG\text{GaaruGcAcac}\bullet u$<br>•u     | 46 |
| 34 | $g\bullet r\bullet gu\text{GcACUucgcuucacaD}$     | 16 | $VPu\bullet \underline{G}\bullet ugaArCG\text{GaaguGcAcac}\bullet u\bullet$<br>u | 47 |
| 35 | $g\bullet r\bullet gu\text{GcACUucgcuucacaD}$     | 16 | $VPu\bullet \underline{G}\bullet uga(Agn)rCG\text{GaaguGcAca}$<br>c•u•u          | 48 |

D соответствует описанному выше.

В третьем аспекте в настоящем изобретении предусмотрена соль двухцепочечного аналога siRNA в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или конъюгат с двухцепочечным аналогом siRNA в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления соль, описанная выше, выбрана из основно-аддитивной соли, кислотнo-аддитивной соли и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления основно-аддитивная соль выбрана из солей натрия, калия, кальция, аммония, органического амина, магния и их комбинаций, и кислотнo-аддитивная соль выбрана из солей, полученных из неорганических кислот, солей, полученных из неорганических кислот, и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления неорганическая кислота выбрана из хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, азотной кислоты, угольной кислоты, бикарбонатного радикала, фосфорной кислоты, моногидрофосфата,

дигидрофосфата, серной кислоты, гидросульфата, йодистоводородной кислоты, фосфористой кислоты и их комбинаций, и органическая кислота выбрана из уксусной кислоты, пропионовой кислоты, изомасляной кислоты, малеиновой кислоты, малоновой кислоты, бензойной кислоты, янтарной кислоты, пробковой кислоты, фумаровой кислоты, молочной кислоты, миндальной кислоты, фталевой кислоты, бензолсульфоновой кислоты, *n*-толуолсульфоновой кислоты, лимонной кислоты, винной кислоты, метансульфонокислоты и их комбинаций.

В четвертом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, которая содержит двухцепочечный аналог siRNA в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, конъюгат с двухцепочечным аналогом siRNA в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения или соль согласно третьему аспекту настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

В пятом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено применение двухцепочечного аналога siRNA согласно первому аспекту настоящего изобретения, конъюгата с двухцепочечным аналогом siRNA согласно второму аспекту настоящего изобретения, соли согласно третьему аспекту настоящего изобретения или фармацевтической композиции согласно четвертому аспекту настоящего изобретения для получения лекарственного препарата для лечения гепатита В.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен двухцепочечный аналог siRNA в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, конъюгат с двухцепочечным аналогом siRNA в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, соль в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения или фармацевтическая композиция в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения, которую применяют для лечения гепатита В у субъекта.

В шестом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения вирусного гепатита В у субъекта, который включает стадию введения субъекту двухцепочечного аналога siRNA в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, конъюгата с двухцепочечным аналогом siRNA в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, соли в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения или фармацевтической композиции в соответствии с четвертым аспектом настоящего

изобретения.

В седьмом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены двухцепочечный аналог siRNA в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, конъюгат с двухцепочечным аналогом siRNA в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, соль в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения или фармацевтическая композиция в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения для применения при лечении гепатита В у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гепатит В может быть на любой стадии заболевания, такой как острый гепатит В, хронический гепатит В или цирроз или карцинома печени, вызванные инфекцией, обусловленной вирусом гепатита В. В некоторых вариантах осуществления гепатит В представляет собой хронический гепатит В.

### **Определения и описание**

Если не указано иное, то предполагается, что нижеперечисленные термины и фразы, используемые в данном документе, имеют следующие значения. Определенный термин или фраза, если конкретно не указано иное, не следует считать неопределенным или неясным, а следует понимать в соответствии со значением, понятным специалистам в данной области. Предполагается, что ссылка на торговое наименование в данном документе, относится к соответствующему ему коммерческому продукту или его активному ингредиенту.

В настоящем изобретении, если не указано иное, то термины «содержать», «содержит» и «содержащий» или их эквиваленты являются открытыми утверждениями и означают, что элементы, компоненты или стадии, которые не определены, могут быть включены в дополнение к перечисленным.

В настоящем изобретении ген HBV относится к гену, имеющему последовательность ДНК, которая показана под номером доступа в Genbank NC\_003977.1. Ген, показанный под номером доступа в Genbank NC\_003977.1, представляет собой полный геном HBV.

В некоторых вариантах осуществления аналог двухцепочечной siRNA может нацеливаться на X-открытую рамку считывания (X ORF) HBV.

В настоящем изобретении двухцепочечный аналог siRNA относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты. Он характеризуется двухцепочечной структурой, содержит две антипараллельные и по сути комплементарные цепи нуклеиновой кислоты и имеет «смысловую» и «антисмысловую» ориентацию по отношению к РНК-мишени. В настоящем изобретении термин «комплементарный» имеет значение, хорошо известное специалистам в данной области. То есть в двухцепочечной молекуле нуклеиновой кислоты основания одной цепи комплементарно сочетаются с основаниями другой цепи. Пуриновое основание аденин (A) всегда сочетается с пиримидиновым основанием урацилом (U); пуриновое основание гуанин (C) всегда сочетается с пиримидиновым основанием цитозином (G). Каждая пара оснований включает пурин и пиримидин. Когда аденины на одной цепи всегда спарены с урацилами на другой цепи, а гуанины всегда спарены с цитозинами, тогда две цепи считаются комплементарными друг другу, и последовательность цепи может быть выведена из последовательности ее комплементарной цепи.

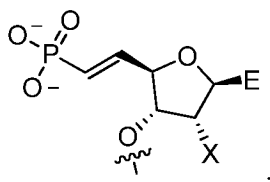
В настоящем изобретении, если не указано иное, то C, G, U и A в виде заглавных букв обозначают состав оснований нуклеотида. c, g, u и a в виде строчных букв обозначают нуклеотиды, представленные соответствующими заглавными буквами с метокси-модификацией; подчеркивание      представляет собой нуклеотиды, представленные заглавными буквами с фтор-модификацией; средняя точка «•» означает наличие тиофосфатной связи между двумя нуклеотидными остатками, смежными с левой и правой сторонами средней точки «•»; VP означает, что один нуклеотид справа от букв VP представляет собой нуклеотид, модифицированный (*E*)-винилфосфатом. Например, "a•g" указывает на то, что остатки a и g связаны посредством фосфотиоатной группы.

"Модификации" нуклеотидов, описанные в настоящем изобретении, предусматривают без ограничения метокси-модификацию, фтор-модификацию, (*E*)-винилфосфатную модификацию, тиофосфатную связь, замену нуклеотида на (*S*)-глицериновые нуклеиновые кислоты или т.п. Последовательности, описанные в настоящем изобретении, могут включать последовательности, перечисленные в качестве «дополнительных модифицированных последовательностей» в таблице 1 ниже.

Фтор-модифицированный нуклеотид, описанный в настоящем изобретении, относится к нуклеотиду, в котором 2'-гидроксил рибозной группы заменен фтором, и

метокси-модифицированный нуклеотид относится к нуклеотиду, в котором 2'-гидроксил рибозной группы заменен с помощью метокси.

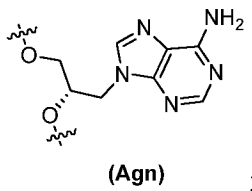
Нуклеотиды, модифицированные (*E*)-винилфосфатом, описанные в настоящем изобретении, представляют собой следующую структурную единицу:



где E выбран из

X выбран из OCH<sub>3</sub> и F.

(*S*)-Глицериновая нуклеиновая кислота (Agn), описанная в настоящем изобретении, представляет собой следующую структурную единицу:



(Agn) и другие нуклеотидные остатки связаны друг с другом посредством фосфата или тиофосфата. Например, «a•(Agn)» означает, что остатки a и (Agn) связаны с помощью тиофосфата, и «a(Agn)» означает, что остатки a и (Agn) связаны с помощью фосфата.

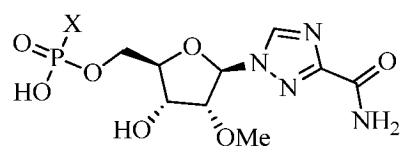
В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный аналог siRNA содержит смысловую цепь или смысловую цепь со встроенным г' и антисмысловую цепь со встроенным г'. Каждая из смысловой цепи, смысловой цепи со встроенным г' и антисмысловой цепи со встроенным г' содержат нуклеотидную группу в качестве основной структурной единицы. Специалистам в данной области хорошо известно, что нуклеотидная группа включает фосфатную группу, рибозную группу и основание, которые не будут подробно описываться в данном документе.



Последовательность со встроенным  $\gamma'$ , описанная в настоящем изобретении, относится к последовательности, в которой по меньшей мере один нуклеотидный остаток связан с  $\gamma$ , в том числе последовательностям, полученным посредством замены одного нуклеотидного остатка в последовательности (например, SEQ ID NO: 2) на  $\gamma$ . Последовательности со встроенным  $\gamma'$ , описанные в настоящем изобретении, включают без ограничения: двухцепочечную siRNA со встроенным  $\gamma'$ , смысловую цепь со встроенным  $\gamma'$  и антисмысловую цепь со встроенным  $\gamma'$ . Например, 5'-aGUrrA•C-3', 5'-rGgAAC-3' и 5'-AG•UrAAcCuCr-3' являются таковыми со встроенным  $\gamma'$ .

Двухцепочечная siRNA со встроенным  $\gamma'$ , описанная в настоящем изобретении, относится к двухцепочечной siRNA, в которой по меньшей мере один нуклеотидный остаток связан с  $\gamma$ , в том числе двухцепочечным siRNA, полученным посредством замены одного нуклеотидного остатка в последовательности двухцепочечной siRNA на  $\gamma$ . Смысловая цепь со встроенным  $\gamma'$ , описанная в настоящем изобретении, относится к смысловой цепи, в которой по меньшей мере один нуклеотидный остаток связан с  $\gamma$ , в том числе замене одного или более нуклеотидов в смысловой цепи на  $\gamma$ . Антисмысловая цепь со встроенным  $\gamma'$ , описанная в настоящем изобретении, относится к антисмысловой цепи, в которой по меньшей мере один нуклеотидный остаток связан с  $\gamma$ , в том числе замене одного или более нуклеотидов в антисмысловой цепи на  $\gamma$ .

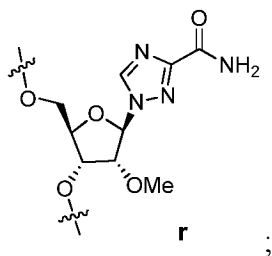
$\gamma'$ , описанный в настоящем изобретении, представляет собой



(где X выбран из SH и OH). Он является аналогом

природного нуклеотидного основания и отличается от любого из раскрытых природных нуклеотидных оснований, и его введение в последовательность нуклеиновой кислоты приводит к неожиданной активности.

Описанный в настоящем изобретении  $\gamma$  представляет собой следующую структурную единицу:



г и другие нуклеотидные остатки связаны друг с другом посредством фосфата или тиофосфата. Например, «а•г» означает, что остатки а и г связаны с помощью тиофосфата, и «аг» означает, что остатки а и г связаны с помощью фосфата.

«Множество», описанное в настоящем изобретении, относится к целому числу от 2 или более, в том числе без ограничения 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, вплоть до теоретического верхнего предела аналога siRNA.

В настоящем изобретении смысловая цепь или антисмысловая цепь двухцепочечного аналога siRNA может также содержать «выступ», такой как неспаренные выступающие нуклеотиды, которые не участвуют непосредственно в двойной спирали РНК, где двойная спираль РНК, как правило, образована парой «смысловой цепи» и «антисмысловой цепи», как определено в данном документе. Такие выступы могут содержать один или более модифицированных или немодифицированных U, T и A. Например, SEQ ID NO: 2 может содержать модифицированные или немодифицированные выступы UU на 5'- и/или 3'-конце.

В настоящем изобретении конъюгат с двухцепочечным аналогом siRNA представляет собой соединение, образованное посредством связывания двухцепочечного аналога siRNA и фармацевтически приемлемой конъюгированной группы, при этом двухцепочечный аналог siRNA и фармацевтически приемлемая конъюгированная группа связаны ковалентно.

В настоящем изобретении фармацевтически приемлемая конъюгированная группа может быть связана с 3'-концом смысловой цепи или смысловой цепью со встроенным г' двухцепочечного аналога siRNA.

В целом, фармацевтически приемлемая конъюгированная группа включает фармацевтически приемлемую нацеливающуюся молекулу и необязательно линкер. Примеры типов конъюгированных групп, линкеров и нацеливающихся молекул можно











найти в раскрытии WO2015006740A2. Примеры конъюгированных групп включают без ограничения L96 или группу D, представленную соединением.

В контексте настоящего изобретения, если не указано иное, то «конъюгированный» означает, что два или более химических фрагмента, каждый из которых выполняет определенную функцию, ковалентно связаны друг с другом; соответственно «конъюгат» относится к соединению, образованному ковалентным связыванием различных химических фрагментов.

Соединения по настоящему изобретению могут существовать в форме определенного геометрического изомера или стереоизомера. Все такие соединения предусмотрены в данном документе, в том числе (*R*)- и (*S*)-энантиомеры, диастереоизомеры и рацемические смеси, и другие смеси, такие как обогащенные энантиомерами или диастереоизомерами смеси, все из которых охвачены объемом настоящего изобретения. Заместители, такие как алкил, могут иметь дополнительный асимметрический атом углерода. Все такие изомеры и их смеси охвачены объемом настоящего изобретения.

Если не указано иное, то термин «энантиомер» или «оптический изомер» относится к стереоизомерам, которые являются зеркальными отражениями друг друга.

Если не указано иное, то термин «диастереомер» относится к стереоизомерам, молекулы которых имеют два или более хиральных центров, и не являются зеркальными отражениями друг друга.

Если не указано иное, то абсолютная конфигурация стереогенного центра представлена клиновидной сплошной связью () и клиновидной пунктирной связью () , а относительная конфигурация стереогенного центра представлена прямой сплошной связью () и прямой пунктирной связью () . Волнистая линия () представляет собой сплошную клиновидную связь () или сплошную пунктирную связь () , или волнистая линия () представляет собой прямую сплошную связь () и/или прямую пунктирную связь () .

Если не указано иное, то термин «обогащенный одним изомером», «обогащенный изомером», «обогащенный одним энантиомером» или «обогащенный энантиомером» означает, что содержание одного из изомеров или энантиомеров составляет менее 100% и более чем или равно 60%, или более или равно 70%, или более или равно 80%, или

более или равно 90%, или более или равно 95%, или более или равно 96%, или более или равно 97%, или более или равно 98%, или более или равно 99%, или более или равно 99,5%, или более или равно 99,6%, или более или равно 99,7%, или более или равно 99,8%, или более или равно 99,9%.

Если не указано иное, то термин «изомерный избыток» или «энантиомерный избыток» относится к разности значений относительного процентного содержания двух изомеров или энантиомеров. Например, если содержание одного из изомеров или энантиомеров составляет 90%, а содержание другого изомера или энантиомера составляет 10%, то изомерный или энантиомерный избыток (значение ее) составляет 80%.

Оптически активные (*R*)- и (*S*)-изомеры, а также *D*- и *L*-изомеры могут быть получены посредством хирального синтеза, или хиральных реагентов, или других общепринятых методик. Энантиомер конкретного соединения по настоящему изобретению может быть получен посредством асимметрического синтеза или дериватизации с применением хирального вспомогательного вещества, где полученную диастереоизомерную смесь разделяют, а вспомогательную группу отщепляют таким образом, чтобы обеспечить получение необходимого чистого энантиомера. В качестве альтернативы, если молекула содержит основную функциональную группу (такую как аминогруппа) или кислотную функциональную группу (такую как карбоксильная группа), то соединение вступает в реакцию с соответствующими оптически активными кислотой или основанием с образованием соли диастереоизомера, которую затем подвергают диастереоизомерному разделению посредством общепринятых в уровне техники способов с последующим выделением с получением чистого энантиомера. Кроме того, энантиомер и диастереоизомер, как правило, выделяют посредством хроматографии с применением хиральной неподвижной фазы, необязательно в сочетании с химической дериватизацией (например, карбамат, получаемый из аминов). Соединение согласно настоящему изобретению может содержать не встречающуюся в природе долю изотопов атомов у одного или более атомов, которые образуют соединение. Например, соединение может быть меченым с помощью радиоактивного изотопа, такого как тритий ( $^3\text{H}$ ), йод-125 ( $^{125}\text{I}$ ) или С-14 ( $^{14}\text{C}$ ). В качестве другого примера, водород может быть замещен дейтерием с образованием дейтерированного лекарственного средства и связь, образованная между дейтерием и углеродом, прочнее связи, образованной между обычным водородом и углеродом. По сравнению с недейтерированным лекарственным

средством дейтерированное лекарственное средство имеет преимущества в виде сниженных токсических побочных эффектов, повышенной стабильности, увеличенной эффективности, продленного биологического времени полужизни и т. п. Все изотопные варианты соединения согласно настоящему изобретению, вне зависимости от того, радиоактивные они или нет, включены в объем настоящего изобретения.

Термин «соль» относится к соли соединения по настоящему изобретению, которую получают из соединения, содержащего конкретные заместители, обнаруженные в настоящем изобретении, и относительно нетоксичной кислоты или основания. Если соединение согласно настоящему изобретению содержит относительно кислотную функциональную группу, то соль присоединения основания может быть получена посредством приведения в контакт такого соединения с достаточным количеством основания в чистом растворе или подходящем инертном растворителе. Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания включают соли натрия, калия, кальция, аммония, органического амина или магния или подобные соли. Если соединение по настоящему изобретению содержит относительно основную функциональную группу, то соль присоединения кислоты может быть получена посредством приведения такого соединения в контакт с достаточным количеством кислоты в чистом растворе или подходящем инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, азотная кислота, угольная кислота, бикарбонатный радикал, фосфорная кислота, моногидрофосфат, дигидрофосфат, серная кислота, гидросульфат, йодистоводородная кислота и фосфористая кислота или т. п.; и соли, полученные из органических кислот, таких как уксусная кислота, пропионовая кислота, изомасляная кислота, малеиновая кислота, малоновая кислота, бензойная кислота, янтарная кислота, субериновая кислота, фумаровая кислота, молочная кислота, миндальная кислота, фталевая кислота, бензолсульфоновая кислота, *n*-толуолсульфоновая кислота, лимонная кислота, винная кислота и метансульфоновая кислота или т. п. Также включены соли аминокислот (например, аргинина) и соли органических кислот, таких как глюконовая кислота или т. п. Определенные конкретные соединения по настоящему изобретению содержат как основную, так и кислотную функциональные группы, которые позволяют превращать соединения либо в соли присоединения основания, либо в соли присоединения кислоты.

Соли согласно настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, содержащего кислотную или основную группу, с помощью традиционных способов химического синтеза. В целом такие соли получают с помощью следующего способа: приводят в реакцию соединение в форме свободной кислоты или основания со стехиометрическим количеством подходящих основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в их смеси.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть получены с помощью разнообразных способов синтеза, которые хорошо известны специалистам в данной области, в том числе конкретных вариантов осуществления, перечисленных ниже, вариантов осуществления, полученных путем их комбинирования с другими способами химического синтеза, и их эквивалентов, известных специалистам в данной области. Предпочтительные варианты осуществления включают без ограничения примеры настоящего изобретения.

Растворители, применяемые в настоящем изобретении, являются коммерчески доступными.

Если не указано иное, то соотношения растворителей, применяемые в колоночной хроматографии и препаративной тонкослойной хроматографии на силикагеле в настоящем изобретении, являются объемными соотношениями.

#### Список сокращений

|                  |   |
|------------------|---|
| Ac               | Ацетил  |
| Boc              | <i>tert</i> -Бутилоксикарбонил                          |
| DMSO             | Диметилсульфоксид                                       |
| DMT/DMTr         | 4,4'-Диметокситрифенилметил                             |
| dsRNA            | Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота                  |
| EC <sub>50</sub> | Концентрация, вызывающая половину максимального эффекта |
| EDTA             | Динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты      |
| i-Pr             | Изопропил   |
| Me               | Метил   |
| Ms               | Метансульфонил  |

|              |   |
|--------------|---|
| Ph           | Фенил   |
| p-HPLC       | Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография для очистки соединений |
| PHK          | Рибонуклеиновая кислота   |
| RNAi         | Технология интерференции рибонуклеиновой кислотой                               |
| siRNA        | Малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота                                   |
| <i>t</i> -Bu | <i>трет</i> -Бутил  |
| Tris         | Трис(гидроксиметил)аминометан   |

Соединения названы в соответствии с общепринятыми в уровне техники правилами номенклатуры или с применением программного обеспечения ChemDraw®, а для коммерчески доступных соединений приведены названия согласно каталогу производителя.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показан эффект WRG01 в отношении HBsAg в плазме крови мышей AAV/HBV.

На фиг. 2 показан эффект WRG01 в отношении HBeAg в плазме крови мышей AAV/HBV.

На фиг. 3 показан эффект WRG01 в отношении ДНК HBV в плазме крови мышей AAV/HBV.

На фиг. 4 показан эффект WRG01 в отношении pgPHK HBV в плазме крови мышей AAV/HBV.

На фиг. 5 показано изменение веса мышей после введения WRG01.

На фиг. 6 показаны эффекты WR007 и WR012 в отношении HBsAg в плазме крови мышей AAV/HBV.

На фиг. 7 показаны эффекты WR007 и WR012 в отношении HBeAg в плазме крови мышей AAV/HBV.

На фиг. 8 показаны эффекты WR007 и WR012 в отношении ДНК HBV в плазме крови мышей AAV/HBV.

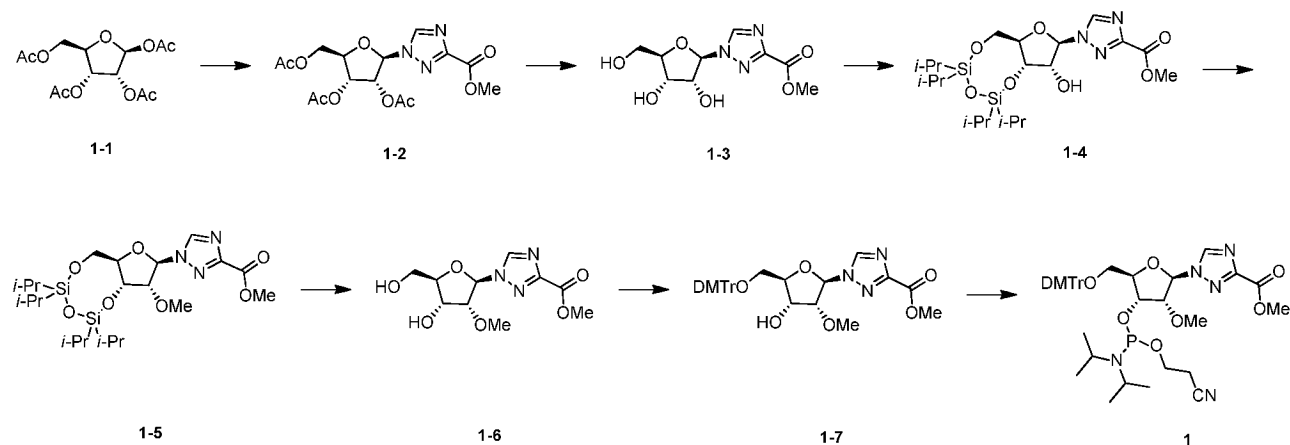
На фиг. 9 показан эффект WRG01 в различных дозах в отношении HBsAg в плазме крови мышей AAV/HBV.

На фиг. 10 показана концентрация WRG01 в плазме крови, печени и почках мышей.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Ниже настоящее изобретение подробно описано с помощью примеров. Однако это не ограничивает объем настоящего изобретения неблагоприятным образом. Соединения согласно настоящему изобретению могут быть получены с помощью разнообразных способов синтеза, хорошо известных специалистам в данной области, в том числе конкретных вариантов осуществления, перечисленных ниже, вариантов осуществления, полученных путем их комбинирования с другими способами химического синтеза, и их эквивалентов, известными специалистам в данной области. Предпочтительные варианты осуществления включают без ограничения примеры настоящего изобретения. Специалистам в данной области будет очевидно, что могут быть сделаны различные изменения и модификации в отношении конкретных вариантов осуществления по настоящему изобретению без отступления от сути и объема настоящего изобретения.

### Пример 1. Синтез фосфорамидитного мономера



Стадия А: раствор (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-3-ацетидамо-6-(ацетоксиметил)тетрагидро-2*H*-пирани-2,4,5-триилтриацетата (т. е. формулы 1-1) (30 г, 94,26 ммоль) и метил-1,2,4-триазол-3-карбоксилата (11,98 г, 94,26 ммоль) в метилацетате (220 мл) концентрировали почти до полного высыхания на масляной бане при 90°C под давлением, составлявшим 1 бар. К смеси добавляли



раствор трифторметансульфоновой кислоты (141,46 мг, 0,94 ммоль) в метилацетате (2 мл) и полученную смесь перемешивали на масляной бане при 125°C в течение 4 ч под давлением, составляющим 30 мбар. Реакционный раствор охлаждали до 70°C и добавляли этанол (70 мл). Смесь перемешивали при 70°C до образования гомогенного раствора, затем перемешивание прекращали и раствор охлаждали до 50°C. После образования осадка реакционный раствор оставляли стоять и охлаждали до 25°C, а затем реакционный раствор оставляли стоять при 0°C в течение 16 ч. Реакционный раствор фильтровали через воронку Бюхнера, осадок на фильтре промывали 180 мл (60 мл x 3) этанола и высушивали в вакууме с получением формулы 1-2. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,40 (s, 1H), 6,04 (d, *J* = 3,42 Гц, 1H), 5,69-5,81 (m, 1H), 5,54 (t, *J* = 5,38 Гц, 1H), 4,42-4,51 (m, 2H), 4,16-4,30 (m, 1H), 3,98 (s, 3H), 2,05-2,18 (m, 9H).

Стадия В: соединение формулы 1-2 (15 г, 38,93 ммоль) и триэтиламин (4,14 г, 40,87 ммоль) растворяли в метаноле (100 мл). Смесь перемешивали при 50°C в течение 17 ч в атмосфере азота. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением формулы 1-3. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,87 (s, 1H), 5,93 (d, *J* = 3,42 Гц, 1H), 4,48 (dd, *J* = 3,48, 4,83 Гц, 1H), 4,33 (t, *J* = 5,26 Гц, 1H), 4,10-4,16 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,84 (dd, *J* = 3,24, 12,29 Гц, 1H), 3,70 (dd, *J* = 4,46, 12,29 Гц, 1H).

Стадия С: соединение формулы 1-3 (10 г, 38,58 ммоль) растворяли в пиридине (250 мл) и добавляли по каплям 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисиоксан (12,29 г, 38,97 ммоль) при 0°C. Смесь постепенно нагревали до 25°C и перемешивали в течение 16 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и концентрат суспендировали в этилацетате (250 мл). Смесь фильтровали через воронку Бюхнера. Фильтрат промывали 750 мл (250 мл x 3) 3 М хлористоводородной кислоты и 250 мл (250 мл x 1) насыщенного раствора соли, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир/дихлорметан/этилацетат = 3/1/1) с получением формулы 1-4. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,43 (s, 1H), 5,95 (s, 1H), 4,73 (dd, *J* = 4,75, 8,00 Гц, 1H), 4,41 (d, *J* = 4,75 Гц, 1H), 4,09-4,19 (m, 2H), 3,94-4,03 (m, 4H), 2,71-3,34 (m, 1H), 1,01-1,15 (m, 28H).

Стадия D: йодметан (11,64 г, 82,02 ммоль) добавляли к смешанному раствору соединения формулы 1-4 (8,23 г, 16,40 ммоль), карбоната калия (11,34 г, 82,02 ммоль) и

оксида серебра(I) (19,01 г, 82,02 ммоль) в *N,N*-диметилформамиде (50 мл) и смесь перемешивали при 25°C в течение 3 часов. Реакционный раствор разбавляли этилацетатом (300 мл) и фильтровали через воронку Бюхнера. Фильтрат промывали 250 мл (250 мл x 1) водного раствора тиосульфата натрия, 250 мл (250 мл x 1) воды и 250 мл (250 мл x 1) насыщенного солевого раствора, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир/этилацетат = 5/1) с получением формулы 1-5. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,58 (s, 1H), 5,91 (s, 1H), 4,46 (dd, *J* = 4,22, 9,35 Гц, 1H), 4,17-4,28 (m, 2H), 3,96-4,06 (m, 5H), 3,68 (s, 3H), 0,99-1,13 (m, 28H).

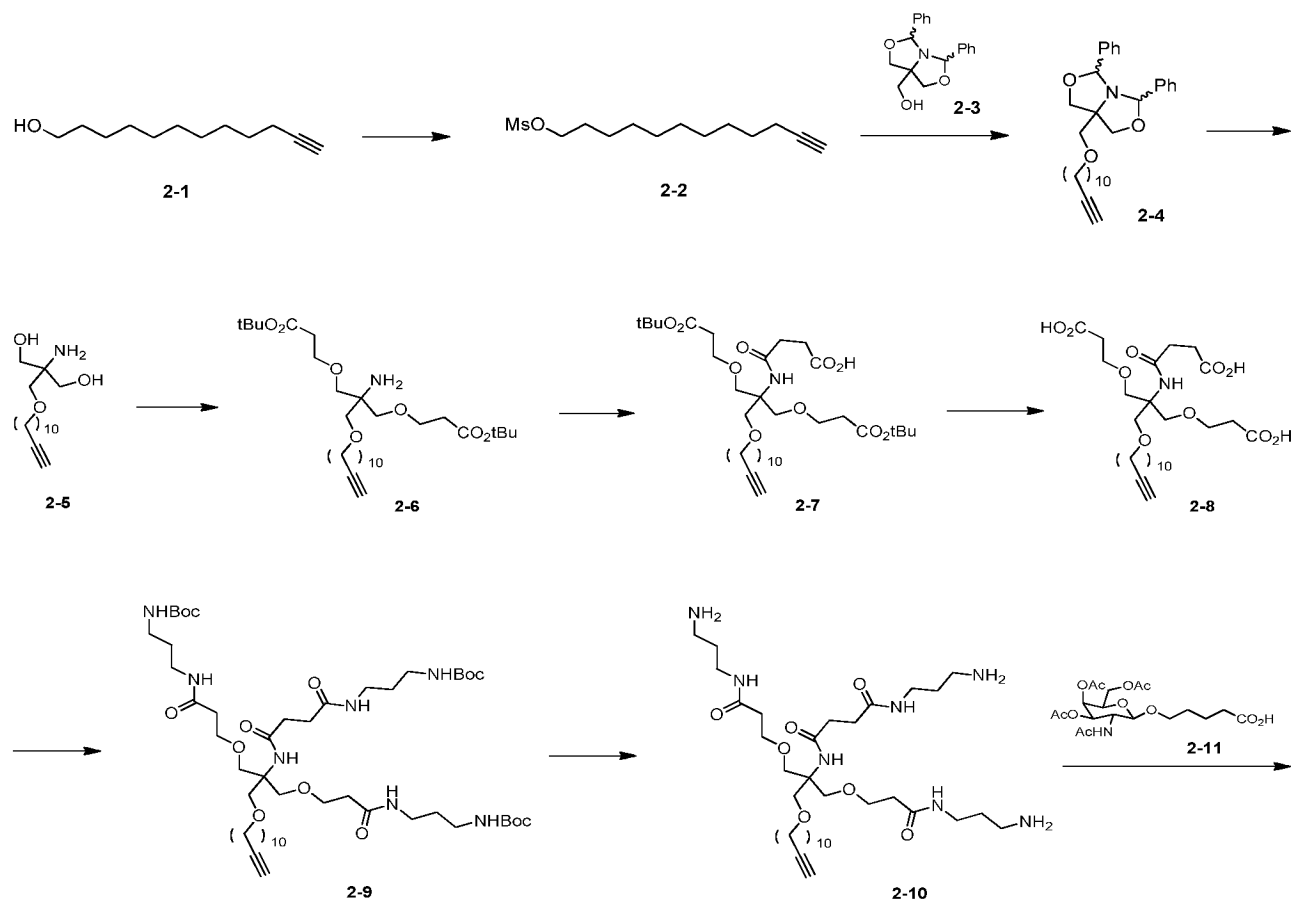
Стадия E: к раствору соединения формулы 1-5 (3,27 г, 6,34 ммоль) в тетрагидрофуране (50 мл) при 0°C по каплям добавляли триэтиламинтригидрофторид (2,25 г, 13,95 ммоль) и смесь постепенно нагревали до 25°C и перемешивали в течение 16 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO<sub>2</sub>, дихлорметана/метанола = 20/1) с получением формулы 1-6. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,88 (s, 1H), 6,04 (d, *J* = 3,26 Гц, 1H), 4,44 (t, *J* = 5,33 Гц, 1H), 4,20 (dd, *J* = 3,33, 4,83 Гц, 1H), 4,07-4,14 (m, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,84 (dd, *J* = 3,20, 12,36 Гц, 1H), 3,69 (dd, *J* = 4,39, 12,30 Гц, 1H), 3,52 (s, 3H).

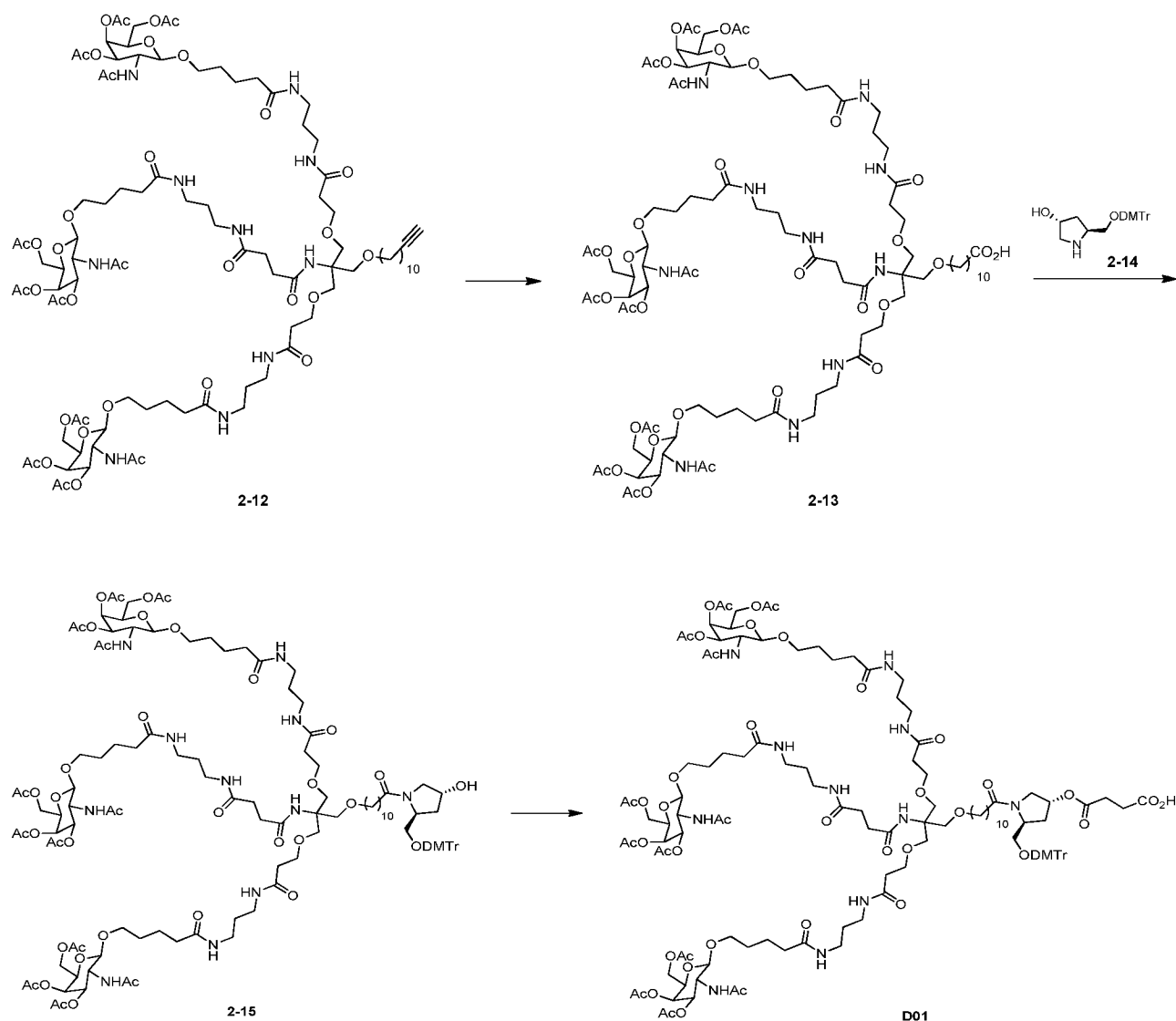
Стадия F: 4,4-диметокситритилхлорид (2,42 г, 7,14 ммоль) добавляли к раствору соединения формулы 1-6 (1,30 г, 4,76 ммоль) в пиридине (20 мл) при 0°C и смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Реакционный раствор разбавляли этилацетатом (70 мл), гасили насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (20 мл) при 25°C и затем разбавляли водой (40 мл). После разделения жидкостей органические фазы объединяли, промывали 60 мл (60 мл x 1) воды и 60 мл (60 мл x 1) насыщенного солевого раствора, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью *p*-HPLC (разделительная колонка: Phenomenex luna C18 (спецификация: 250 мм x 50 мм, размер частицы: 10 мкм); подвижная фаза: [вода(10 mM бикарбонат аммония)-ацетонитрил]; градиент элюирования: 35%-65%, 20 мин) с получением формулы 1-7. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,44 (s, 1H), 7,38-7,45 (m, 2H), 7,28-7,34 (m, 5H), 7,18-7,27 (m, 2H), 6,70-6,92 (m, 4H),

5,97 (d,  $J = 2,88$  Гц, 1H), 4,37-4,43 (m, 1H), 4,33 (dd,  $J = 2,88, 5,00$  Гц, 1H), 4,19-4,25 (m, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,80 (s, 6H), 3,58 (s, 3H), 3,43-3,49 (m, 1H), 3,33-3,40 (m, 1H), 2,55 (d,  $J = 6,88$  Гц, 1H). LCMS (ESI) масса/заряд: 574,2 [M-H]<sup>-</sup>.

Стадия G: 2-цианоэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфамидит (678,45 мг, 2,87 ммоль) и *N,N*-диизопропилэтиламин добавляли к раствору соединения формулы 1-7 (1,10 г, 1,91 ммоль) в дихлорметане (8 мл) при 0°C, и смесь перемешивали при 20°C в течение 0,5 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир/этилацетат = от 50/1 до 1/2) с получением соединения формулы 1. LCMS (ESI) масса/заряд: 776,3 [M+H]<sup>+</sup>.

### Пример 2. Синтез D01





Стадия А: 11-додецин-1-ол (25 г, 137,14 ммоль) и триэтиламин (16,65 г, 164,56 ммоль) растворяли в дихлорметане (250 мл) и добавляли метансульфонилхлорид (18,85 г, 164,56 ммоль) при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч. Реакционный раствор разбавляли с помощью воды (400 мл) и экстрагировали с помощью 800 мл (400 мл x 2) дихлорметана. Органические фазы объединяли, промывали с помощью 400 мл (200 мл x 2) воды и насыщенного солевого раствора, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением формулы 2-2.

Стадия В: соединение формулы 2-3 (20 г, 67,26 ммоль) растворяли в *N,N*-диметилформамиде (200 мл) и добавляли гидрид натрия (чистота 60%, 4,04 г, 100,89 ммоль) при 0°C с последующим добавлением соединения формулы 2-2 (19,27 г,

73,99 ммоль). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Реакционный раствор гасили с помощью воды (1 л) и экстрагировали с помощью 1,6 л (800 мл x 2) дихлорметана. Органические фазы объединяли, промывали с помощью 800 мл (800 мл x 1) насыщенного солевого раствора, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением формулы 2-4. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,63-6,89 (m, 10H), 5,64-5,52 (m, 2H), 4,27-4,01 (m, 2H), 3,98-3,77 (m, 2H), 3,72-3,18 (m, 4H), 2,23-2,14 (m, 2H), 1,98-1,92 (m, 1H), 1,54-1,23 (m, 16H).

Стадия C: соединение формулы 2-4 (48 г, 103,98 ммоль) растворяли в метаноле (870 мл) и добавляли раствор хлористого водорода в метаноле (4 моль/л, 400 мл, 1,6 моль). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 ч. К реакционному раствору добавляли раствор хлороводорода в метаноле (4 моль/л, 350 мл, 1,4 моль). Смесь перемешивали при 30°C в течение 16 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и добавляли 200 мл (100 мл x 2) хлороформа. Смесь концентрировали при пониженном давлении до появления белого твердого вещества. Добавляли толуол (130 мл) и петролейный эфир (130 мл), и смесь перемешивали при 15°C в течение 16 ч. Реакционный раствор фильтровали через воронку Бюхнера, осадок на фильтре собирали и высушивали в вакууме с получением твердого вещества белого цвета. Белое твердое вещество растворяли в дихлорметане (50 мл), добавляли водный раствор (50 мл) гидроксида натрия (6,59 г, 164,66 ммоль) и смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. Реакционный раствор разбавляли с помощью воды (500 мл) и экстрагировали с помощью 1 л (500 мл x 2) дихлорметана. Органические фазы объединяли, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением формулы 2-5.

Стадия D: *трет*-бутилакрилат (22,72 г, 177,28 ммоль) добавляли к смешанному раствору соединения формулы 2-5 (23 г, 80,58 ммоль) и гидроксида натрия (322,31 мг, 8,06 ммоль) в диметилсульфоксиде (70 мл) и воды (6 мл) и смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч в атмосфере азота. Реакционный раствор разбавляли с помощью воды (500 мл) и экстрагировали с помощью 1 л (500 мл x 2) этилацетата. Органические фазы объединяли, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO<sub>2</sub>,

петролейный эфир/этилацетат/этанол (содержание 0,1% аммиачной воды) = от 36/3/1 до 16/3/1) с получением формулы 2-6.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  3,60-3,54 (m, 4H), 3,32 (br s, 5H), 3,15 (s, 5H), 2,74-2,66 (m, 1H), 2,40 (t,  $J = 6,0$  Гц, 4H), 2,18-2,11 (m, 2H), 1,58-1,38 (m, 22H), 1,34-1,23 (m, 12H).

Стадия Е: триэтиламин (9,15 г, 90,45 ммоль) и янтарный ангидрид (6,79 г, 67,83 ммоль) добавляли к раствору соединения формулы 2-6 (24,5 г, 45,22 ммоль) в дихлорметане (250 мл) и смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч. К реакционному раствору добавляли дихлорметан (1 л) и хлористоводородную кислоту (1 моль/л, 1 л) и после разделения жидкости органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением формулы 2-7.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6,49-6,37 (m, 1H), 3,72 (s, 2H), 3,70-3,57 (m, 8H), 3,37 (t,  $J = 6,7$  Гц, 2H), 2,69-2,51 (m, 4H), 2,50-2,36 (m, 4H), 2,22-2,13 (m, 2H), 1,96-1,90 (m, 1H), 1,57-1,47 (m, 4H), 1,46-1,40 (m, 18H), 1,40-1,31 (m, 2H), 1,30-1,21 (m, 10H).

Стадия F: соединение формулы 2-7 (27,4 г, 42,69 ммоль) растворяли в муравьиной кислоте (140 мл) и смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч в атмосфере азота. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и добавляли 300 мл (150 мл x 2) толуола. Смесь концентрировали при пониженном давлении с получением формулы 2-8.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9,79-9,22 (m, 3H), 6,44-6,23 (m, 1H), 3,88-3,43 (m, 10H), 3,39-3,20 (m, 2H), 2,77-2,31 (m, 8H), 2,15-2,06 (m, 2H), 1,87 (t,  $J = 2,6$  Гц, 1H), 1,48-1,28 (m, 6H), 1,26-1,12 (m, 10H).

Стадия G: соединение формулы 2-8 (22,6 г, 42,67 ммоль), *N,N*-диизопропилэтиламин (33,09 г, 256,03 ммоль) и *O*-(7-азабензотриазол-1-ил)-*N,N,N,N*-тетраметилурония гексафторфосфат (51,92 г, 136,55 ммоль) растворяли в *N,N*-диметилформамиде (250 мл) и добавляли *трет*-бутил-*N*-(3-аминопропил)карбамат (29,74 г, 170,69 ммоль). Смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч. К реакционному раствору добавляли дихлорметан (1 л) и хлористоводородную кислоту (1 моль/л, 1 л) и после разделения жидкости, органическую фазу последовательно промывали с помощью 1 л (1 л x 1) воды, 1 л (1 л x 1) водного раствора бикарбоната натрия и 1 л (1 л x 1) насыщенного солевого раствора, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии ( $\text{SiO}_2$ ,

петролейный эфир/этилацетат/этанол = от 40/3/1 до 10/3/1) с получением формулы 2-9.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,22-6,79 (m, 3H), 6,77-6,44 (m, 1H), 5,45-5,00 (m, 3H), 3,86-3,73 (m, 2H), 3,72-3,63 (m, 4H), 3,62-3,45 (m, 4H), 3,41-3,32 (m, 2H), 3,32-3,20 (m, 6H), 3,19-3,03 (m, 6H), 2,56-2,47 (m, 4H), 2,47-2,39 (m, 4H), 2,21-2,12 (m, 2H), 1,95-1,90 (m, 1H), 1,70-1,57 (m, 6H), 1,56-1,47 (m, 4H), 1,46-1,38 (m, 29H), 1,30-1,25 (m, 10H).

Стадия H: соединение формулы 2-9 (15 г, 15,03 ммоль) растворяли в дихлорметане (114 мл) и добавляли трифторуксусную кислоту (38 мл). Смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и добавляли 600 мл (250 мл x 3) смеси толуол/ацетонитрил = 3/1. Смесь концентрировали при пониженном давлении с получением формулы 2-10 (трис(трифторацетат)).

Стадия I: соединение формулы 2-11 (22,15 г, 49,50 ммоль), *N,N*-диизопропилэтиламин (7,75 г, 60,00 ммоль), 1-гидрокси-7-азабензотриазол (6,12 г, 45,00 ммоль) и *O*-(7-азабензотриазол-1-ил)-*N,N,N,N*-тетраметилурония гексафторфосфат (20,53 г, 54,00 ммоль) растворяли в *N,N*-диметилформамиде (90 мл) и добавляли в смесь раствор соединения формулы 2-10 (трис(трифторацетат), 15,6 г, 15,00 ммоль) и *N,N*-диизопропилэтиламина (21,32 г, 165,00 ммоль) в *N,N*-диметилформамиде (120 мл). Смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч. К реакционному раствору добавляли дихлорметан (1,2 л) и хлористоводородную кислоту (1 моль/л, 1 л) и после разделения жидкости, органическую фазу последовательно промывали с помощью 1 л (1 л x 1) воды, 1 л (1 л x 1) водного раствора бикарбоната натрия и 1 л (1 л x 1) насыщенного солевого раствора, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии ( $\text{SiO}_2$ , дихлорметан/метанол = от 100/1 до 10/1 до дихлорметан/этанол = 1/1) с получением формулы 2-12.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7,87-7,66 (m, 9H), 7,09 (s, 1H), 5,21 (d,  $J = 3,4$  Гц, 3H), 4,96 (dd,  $J = 3,4, 11,3$  Гц, 3H), 4,48 (d,  $J = 8,5$  Гц, 3H), 4,06-3,98 (m, 9H), 3,91-3,82 (m, 3H), 3,74-3,66 (m, 3H), 3,58-3,46 (m, 12H), 3,31 (br s, 3H), 3,07-2,98 (m, 12H), 2,71 (t,  $J = 2,6$  Гц, 1H), 2,33-2,22 (m, 8H), 2,16-2,12 (m, 2H), 2,10 (s, 9H), 2,04 (br t,  $J = 7,1$  Гц, 6H), 1,99 (s, 9H), 1,89 (s, 9H), 1,81-1,74 (m, 9H), 1,54-1,39 (m, 22H), 1,32 (br dd,  $J = 4,5, 6,7$  Гц, 2H), 1,24 (s, 10H).

Стадия J: соединение формулы 2-12 (1,00 г, 0,50 ммоль) и хлорид *N*-метил-*N,N,N*-три-*n*-октиламмония (20,35 мг, 50,35 мкмоль) растворяли в смеси

уксусной кислоты (2,7 мл) и *n*-пентана (6,3 мл) и к смеси по каплям добавляли раствор перманганата калия (0,40 г, 2,52 ммоль) в воде (9 мл) при 0°C. Смесь перемешивали при 0-15°C в течение 2 ч. Реакцию гасили с помощью бисульфита натрия (1,27 г) и добавляли хлористоводородную кислоту (2 моль/л, 5 мл) и воду (30 мл). Смесь экстрагировали с помощью 120 мл (40 мл x 3) смеси хлороформа/изопропанола (3/1). Органические фазы объединяли, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, а затем добавляли 180 мл (30 мл x 6) смеси толуол/ацетонитрил (1/1). Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением формулы 2-13. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CD<sub>3</sub>OD): δ 5,34 (d, *J* = 2,9 Гц, 3H), 5,06 (dd, *J* = 3,3, 11,2 Гц, 3H), 4,56 (d, *J* = 8,4 Гц, 3H), 4,19-4,06 (m, 9H), 4,04-3,98 (m, 3H), 3,87 (td, *J* = 5,7, 9,9 Гц, 4H), 3,72-3,64 (m, 9H), 3,57-3,50 (m, 3H), 3,39 (br t, *J* = 6,4 Гц, 2H), 3,22 (q, *J* = 6,4 Гц, 12H), 2,51-2,40 (m, 9H), 2,21 (br t, *J* = 7,3 Гц, 6H), 2,14 (s, 9H), 2,03 (s, 9H), 1,94 (d, *J* = 7,9 Гц, 18H), 1,72-1,57 (m, 22H), 1,39 (br s, 12H).

Стадия К: *N,N*-диизопропилэтиламин (0,26 г, 1,99 ммоль) и *O*-(7-азабензотриазол-1-ил)-*N,N,N,N*-тетраметилурония гексафторфосфат (0,23 г, 0,60 ммоль) добавляли к раствору соединения формулы 2-13 (1,00 г, 0,50 ммоль) в *N,N*-диметилформамиде (10 мл). После перемешивания смеси добавляли соединение формулы 2-14 (0,23 г, 0,55 ммоль). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 ч. К реакционному раствору добавляли дихлорметан (50 мл) и воду (50 мл) и после разделения жидкости, органическую фазу последовательно промывали с помощью 50 мл (50 мл x 1) насыщенного водного раствора бикарбоната натрия, 50 мл (50 мл x 1) воды и 50 мл (50 мл x 1) насыщенного солевого раствора, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO<sub>2</sub>, дихлорметан/метанол (содержание 0,1% триэтиламина) = от 20/1 до 10/1) с получением формулы 2-15. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,90-7,82 (m, 6H), 7,78 (br d, *J* = 4,8 Гц, 3H), 7,40-7,26 (m, 10H), 6,91 (br dd, *J* = 3,1, 9,0 Гц, 4H), 5,26 (d, *J* = 3,4 Гц, 3H), 5,03-4,99 (m, 3H), 4,53 (d, *J* = 8,4 Гц, 3H), 4,43 (br d, *J* = 3,8 Гц, 1H), 4,23-4,14 (m, 1H), 4,12-4,02 (m, 9H), 3,92 (td, *J* = 9,0, 11,0 Гц, 3H), 3,78 (s, 6H), 3,77-3,71 (m, 3H), 3,66-3,51 (m, 13H), 3,49-3,41 (m, 4H), 3,11-3,01 (m, 16H), 2,38-2,37 (m, 1H), 2,32 (br s, 9H), 2,14 (s, 9H), 2,08 (br t, *J* = 6,9 Гц, 7H), 2,04 (s, 9H), 1,93 (s, 9H), 1,82 (s, 9H), 1,57-1,46 (m, 22H), 1,31-1,26 (m, 12H).



Стадия L: к раствору соединения формулы 2-15 (0,80 г, 0,33 ммоль) последовательно добавляли триэтиламин (67,24 мг, 0,64 ммоль), 4-*N,N*-диметиламинопиридин (0,12 г, 1,00 ммоль) и янтарный ангидрид (83,13 мг, 0,83 ммоль) в дихлорметане (8 мл). Смесь перемешивали при 10°C в течение 16 ч. К реакционному раствору добавляли дихлорметан (50 мл), воду (30 мл) и насыщенный раствор соли (30 мл), и после разделения жидкости органическую фазу последовательно промывали с помощью 30 мл (30 мл x 1) воды и 30 мл (30 мл x 1) насыщенного солевого раствора, высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью *p*-HPLC (разделительная колонка: Waters Xbridge C18 (спецификация: 150 мм x 50 мм, размер частицы: 10 мкм); подвижная фаза: [вода(10 mM бикарбонат аммония)-ацетонитрил]; градиент элюирования: 27%-57%, 11 мин) с получением примера 2 (соединение D01). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,96-7,69 (m, 9H), 7,33-7,09 (m, 10H), 6,90-6,78 (m, 4H), 5,21 (d, *J* = 3,3 Гц, 3H), 4,97 (dd, *J* = 3,3, 11,2 Гц, 3H), 4,49 (d, *J* = 8,4 Гц, 3H), 4,06-3,97 (m, 9H), 3,91-3,83 (m, 3H), 3,79-3,66 (m, 11H), 3,63-3,45 (m, 18H), 3,02 (br d, *J* = 4,6 Гц, 14H), 2,46-2,37 (m, 4H), 2,35-2,14 (m, 12H), 2,10 (s, 9H), 2,04 (br t, *J* = 7,0 Гц, 6H), 1,99 (s, 9H), 1,88 (s, 9H), 1,77 (s, 9H), 1,57-1,37 (m, 22H), 1,22 (br s, 12H).

### Пример 3. Синтез двухцепочечного аналога siRNA или конъюгатов с ним

Синтез D-содержащих одноцепочечных олигорибонуклеотидов: олигорибонуклеотиды синтезировали по методике фосфорамидитного твердофазного синтеза. Синтез проводили на твердом носителе, полученном путем ковалентного связывания контролируемого пористого стекла (амино CPG, 500 Å) с D01. Все 2'-модифицированные РНК-фосфорамидиты и вспомогательные реагенты были коммерчески доступными реагентами. Все амиды растворяли в безводном ацетонитриле и добавляли молекулярное сито (3 Å), и время связывания при использовании 5-этилтио-1*H*-тетразола (ЕТТ) в качестве активирующего средства составляло 5 мин. Фосфотиоатные связи генерировали с использованием 50 mM раствора 3-((диметиламинометил)амино)-3*H*-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT) в безводном ацетонитриле/пиридине (об./об. = 1/1), и время реакции составляло 3 мин. Последовательности синтезировали, наконец, после удаления группы DMT.

Синтез одноцепочечных олигорибонуклеотидов, не содержащих D:

олигорибонуклеотиды синтезировали по методике фосфорамидитного твердофазного синтеза. Синтез проводили на универсальном контролируемом пористом стекле CPG (500 Å). Все 2'-модифицированные РНК-фосфорамидиты и вспомогательные реагенты были коммерчески доступными реагентами. Все амиды растворяли в безводном ацетонитриле и добавляли молекулярное сито (3 Å), и время связывания при использовании 5-этилтио-1*H*-тетразола (ЕТТ) в качестве активирующего средства составляло 5 мин. Фосфотиоатные связи генерировали с использованием 50 мМ раствора 3-((диметиламинометил)амино)-3*H*-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT) в безводном ацетонитриле/пиридине (об./об. = 1/1), и время реакции составляло 3 мин. Последовательности синтезировали, наконец, после удаления группы DMT.

Расщепление и снятие защиты со связанных олигомеров на CPG: после прекращения твердофазного синтеза защитную группу удаляли с помощью обработки 20% раствором диэтиламина в ацетонитриле в течение 30 мин, не отщепляя олигонуклеотид от CPG. Затем высушенный CPG обрабатывали с помощью концентрированной аммиачной воды при 40°C в течение 18 ч. После центрифугирования супернатант переносили в новую пробирку и CPG промывали с помощью аммиачной воды. Комбинированный раствор концентрировали с получением твердой смеси.

Очистка одноцепочечных олигорибонуклеотидов: олигомеры, очищенные с помощью HPLC, заменяли с применением анионов NanoQ. Буфер А представлял собой 10 мМ раствор перхлората натрия, 20 мМ Трис, 1 мМ EDTA, pH 7,4 и содержал 20% ацетонитрила, и буфер В представлял собой 500 мМ перхлората натрия, 20 мМ Трис, 1 мМ EDTA, pH 7,4 и содержал 20% ацетонитрила. Необходимый продукт разделяли и обессоливали, применяя колонку C18 с обращенной фазой.

Отжиг одноцепочечных олигорибонуклеотидов с получением siRNA: одноцепочечные олигорибонуклеотиды, подлежащие отжигу, составляли до концентрации 200 мкМ с применением стерильной H<sub>2</sub>O без РНКазы (без РНК-гидролазы). Систему реакции отжига устанавливали следующим образом: всего 100 мкл 10 нмоль смешанного раствора помещали в водяную баню при 95°C на 10 мин (для 100 нмоль и более требовалось 20 мин при высокой температуре) → раствор быстро помещали в водяной бане при 60°C и естественном охлаждении → раствор после отжига нельзя хранить при высокой температуре. Комплементарные цепи формировали посредством комбинирования эквимольных растворов одноцепочечных олигорибонуклеотидов.

**Таблица 1. Двухцепочечные аналоги siRNA, нацеленные на гены вируса гепатита В, конъюгаты, содержащие их, и их соответствующие основные последовательности**

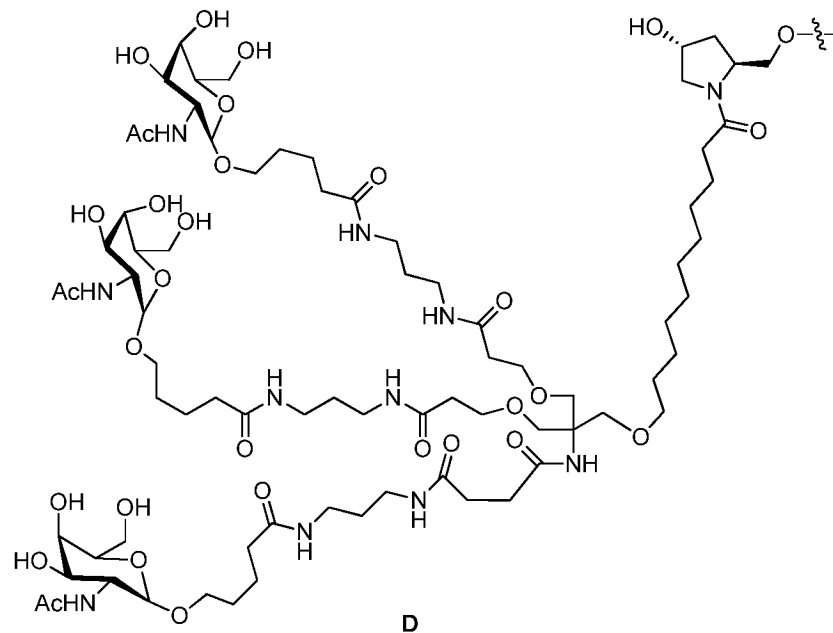
| Основные последовательности |   |           |   | Последовательности со встроенным r <sup>1,**</sup> |  |           |   | Дополнительные модифицированные последовательности |  |           |  |
|-----------------------------|---|-----------|---|--|--|-----------|---|--|--|-----------|--|
| SEQ ID NO                   | Последовательность смысловой цепи (5'-3') | SEQ ID NO | Последовательность антисмысловой цепи (5'-3') | SEQ ID NO  | Последовательность смысловой цепи (5'-3') <sup>***</sup> | SEQ ID NO | Последовательность антисмысловой цепи (5'-3') | SEQ ID NO  | Последовательность смысловой цепи (5'-3') <sup>***</sup> | SEQ ID NO | Последовательность антисмысловой цепи (5'-3')          |
| 1                           | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A           | 2         | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C               | 3  | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD*                        | 4         | UGUGAr<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU             | 16   | <u>g•r•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD*            | 17        | <u>u•G•ugarg</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u> |
| 1                           | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A           | 2         | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C               | 5  | GUrUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD                         | 4         | UGUGAr<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU             | 18   | <u>g•u•ruGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD             | 17        | <u>u•G•ugarg</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u> |
| 1                           | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A           | 2         | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C               | 3  | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD                         | 6         | UrUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU             | 16   | <u>g•r•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD             | 19        | <u>u•r•ugaAg</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u> |
| 1                           | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A           | 2         | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C               | 5  | GUrUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD                         | 6         | UrUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU             | 18   | <u>g•u•ruGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD             | 19        | <u>u•r•ugaAg</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u> |
| 1                           | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A           | 2         | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C               | 3  | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD                         | 7         | UGrGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU             | 16   | <u>g•r•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD             | 20        | <u>u•G•rgaAg</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u> |
| 1                           | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A           | 2         | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C               | 5  | GUrUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD                         | 7         | UGrGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU             | 18   | <u>g•u•ruGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD             | 20        | <u>u•G•rgaAg</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u> |
| 1                           | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A           | 2         | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C               | 3  | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD                         | 8         | UGUrAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU             | 16   | <u>g•r•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD             | 21        | <u>u•G•uraAg</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u> |
| 1                           | GUGUGC<br>ACUUCG                          | 2         | UGUGAA<br>GCGAAG                              | 5  | GUrUGC<br>ACUUC  | 8         | UGUrAA<br>GCGAAG                              | 18   | <u>g•u•ruGc</u><br><u>ACUucgc</u>                        | 21        | <u>u•G•uraAg</u><br><u>CGaaguGc</u>                    |

|   |                                 |   |                                 |    |                                  |    |                                   |    |   |    |  |
|---|---------------------------------|---|---------------------------------|----|----------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--|
|   | CUUCAC<br>A                     |   | UGCACA<br>C                     |    | GCUUC<br>ACAD                    |    | UGCACA<br>CUU                     |    | uucacaD                                       |    | <u>A</u> cac•u•u   |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 3  | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 9  | UGUGrA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 16 | g•r•gu <u>Gc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 22 | u• <u>G</u> •ugr <u>Ag</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>A</u> cac•u•u  |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 5  | GUrUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 9  | UGUGrA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 18 | g•u•ru <u>Gc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 22 | u• <u>G</u> •ugr <u>Ag</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>A</u> cac•u•u  |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 3  | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 10 | UGUGAA<br>rCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 16 | g•r•gu <u>Gc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 23 | u• <u>G</u> •uga <u>Ar</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>A</u> cac•u•u  |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 5  | GUrUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 10 | UGUGAA<br>rCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 18 | g•u•ru <u>Gc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 23 | u• <u>G</u> •uga <u>Ar</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>A</u> cac•u•u  |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 3  | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 11 | UGUGAA<br>GrGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 16 | g•r•gu <u>Gc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 24 | u• <u>G</u> •uga <u>Ag</u><br>r <u>GaaguGc</u><br><u>A</u> cac•u•u |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 5  | GUrUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 11 | UGUGAA<br>GrGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 18 | g•u•ru <u>Gc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 24 | u• <u>G</u> •uga <u>Ag</u><br>r <u>GaaguGc</u><br><u>A</u> cac•u•u |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 12 | GUGUG<br>CrCUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 4  | UGUGAr<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 25 | g•u•gu <u>Gc</u><br>r <u>CUucgc</u><br>ucacaD | 17 | u• <u>G</u> •ugarg<br><u>CGaaguGc</u><br><u>A</u> cac•u•u          |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 13 | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CrCAD | 4  | UGUGAr<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 26 | g•u•gu <u>Gc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucraD  | 17 | u• <u>G</u> •ugarg<br><u>CGaaguGc</u><br><u>A</u> cac•u•u          |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 14 | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CACrD | 4  | UGUGAr<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 27 | g•u•gu <u>Gc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacrD | 17 | u• <u>G</u> •ugarg<br><u>CGaaguGc</u><br><u>A</u> cac•u•u          |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 1  | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CACAD | 4  | UGUGAr<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 28 | g•u•gu <u>Gc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 17 | u• <u>G</u> •ugarg<br><u>CGaaguGc</u><br><u>A</u> cac•u•u          |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC      | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA      | 1  | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU          | 6  | UrUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA        | 28 | g•u•gu <u>Gc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 19 | u•r•uga <u>Ag</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>A</u> cac•u•u           |

|   |                                 |   |                                 |    |                                  |    |                                   |    |  |    |   |
|---|---------------------------------|---|---------------------------------|----|----------------------------------|----|-----------------------------------|----|--|----|---|
|   | A                               |   | C                               |    | CACAD                            |    | CUU                               |    |  |    |   |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 1  | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CACAD | 7  | UGrGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 28 | <u>g•u•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 20 | <u>u•G•rgaAg</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u>                |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 1  | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CACAD | 8  | UGUrAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 28 | <u>g•u•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 21 | <u>u•G•uraAg</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u>                |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 1  | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CACAD | 9  | UGUGrA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 28 | <u>g•u•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 22 | <u>u•G•ugrAg</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u>                |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 1  | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CACAD | 10 | UGUGAA<br>rCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 28 | <u>g•u•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 23 | <u>u•G•ugaAr</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u>                |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 1  | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CACAD | 11 | UGUGAA<br>GrGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 28 | <u>g•u•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 24 | <u>u•G•ugaAg</u><br><u>rGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u>                |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 1  | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CACAD | 29 | UGUGAA<br>GCGrAG<br>UGCACA<br>CUU | 28 | <u>g•u•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 33 | <u>u•G•uga(A</u><br><u>gn)gCGrag</u><br><u>uGcAcac•u</u><br><u>•u</u> |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 1  | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CACAD | 30 | UGUGAA<br>GCGArG<br>UGCACA<br>CUU | 28 | <u>g•u•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 34 | <u>u•G•uga(A</u><br><u>gn)gCGarg</u><br><u>uGcAcac•u</u><br><u>•u</u> |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 1  | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CACAD | 31 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCrCA<br>CUU | 28 | <u>g•u•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 35 | <u>u•G•uga(A</u><br><u>gn)gCGaag</u><br><u>uGrcrac•u</u><br><u>u</u>  |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 1  | GUGUG<br>CACUU<br>CGCUU<br>CACAD | 32 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACr<br>CUU | 28 | <u>g•u•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>uucacaD | 36 | <u>u•G•uga(A</u><br><u>gn)gCGaag</u><br><u>uGcAcre•u</u><br><u>•u</u> |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 37 | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUrCA<br>CAD | 10 | UGUGAA<br>rCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 42 | <u>g•r•guGc</u><br><u>ACUucgc</u><br>urcacaD | 23 | <u>u•G•ugaAr</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u>                |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 38 | GrGUGC<br>ACUUCr<br>CUUCA<br>CAD | 10 | UGUGAA<br>rCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 43 | <u>g•r•guGc</u><br><u>ACUucrc</u><br>uucacaD | 23 | <u>u•G•ugaAr</u><br><u>CGaaguGc</u><br><u>Acac•u•u</u>                |

|   |                                 |   |                                 |   |                                  |    |                                   |    |  |    |  |
|---|---------------------------------|---|---------------------------------|---|----------------------------------|----|-----------------------------------|----|--|----|--|
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 3 | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 39 | UGUrAAr<br>CGAAGU<br>GCACAC<br>UU | 16 | $\underline{g \cdot r \cdot guGc}$<br>$\underline{ACUucgc}$<br>uucacaD | 44 | $\underline{u \cdot G \cdot uraAr}$<br>$\underline{CGaaguGc}$<br>$\underline{Acac \cdot u \cdot u}$                        |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 3 | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 10 | UGUGAA<br>rCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 16 | $\underline{g \cdot r \cdot guGc}$<br>$\underline{ACUucgc}$<br>uucacaD | 45 | $\underline{u \cdot G \cdot uga(A}$<br>$\underline{gn)rCGaag}$<br>$\underline{uGcAcac \cdot u}$<br>$\underline{\cdot u}$   |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 3 | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 40 | UGUGAA<br>GCGAAr<br>UGCACA<br>CUU | 16 | $\underline{g \cdot r \cdot guGc}$<br>$\underline{ACUucgc}$<br>uucacaD | 46 | $\underline{u \cdot G \cdot uga(A}$<br>$\underline{gn)gCGaar}$<br>$\underline{uGcAcac \cdot u}$<br>$\underline{\cdot u}$   |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 3 | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 10 | UGUGAA<br>rCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 16 | $\underline{g \cdot r \cdot guGc}$<br>$\underline{ACUucgc}$<br>uucacaD | 47 | $\underline{VPu \cdot G \cdot uga}$<br>$\underline{ArCGaagu}$<br>$\underline{GcAcac \cdot u \cdot}$<br>$\underline{u}$     |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 3 | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 10 | UGUGAA<br>rCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 16 | $\underline{g \cdot r \cdot guGc}$<br>$\underline{ACUucgc}$<br>uucacaD | 48 | $\underline{VPu \cdot G \cdot uga}$<br>$\underline{(Agn)rCGa}$<br>$\underline{aguGcAcac}$<br>$\underline{\cdot u \cdot u}$ |
| 1 | GUGUGC<br>ACUUCG<br>CUUCAC<br>A | 2 | UGUGAA<br>GCGAAG<br>UGCACA<br>C | 3 | GrGUGC<br>ACUUC<br>GCUUC<br>ACAD | 10 | UGUGAA<br>rCGAAG<br>UGCACA<br>CUU | 15 | $\underline{g \cdot u \cdot guGc}$<br>$\underline{ACUucgc}$<br>uuracaD | 41 | $\underline{VPu \cdot G \cdot uga}$<br>$\underline{(Agn)gCGa}$<br>$\underline{rguGcAcac}$<br>$\underline{\cdot u \cdot u}$ |

\*: D представляет собой остаток, полученный после химической реакции низкомолекулярного фрагмента D01, связанный с нуклеиновой кислотой посредством ковалентной связи, и характеризуется следующей структурой:



\*\*: Последовательность антисмысловой цепи в последовательностях со встроенным г' получают посредством встраивания г' на основе последовательности антисмысловой цепи с UU на 3'-конце в основных последовательностях. Например, SEQ ID NO: 4 получен посредством встраивания г' на основе SEQ ID NO: 2 с UU на 3'-конце.

\*\*\*: Когда последовательность содержит D, то D применяют для обозначения положения связывания конъюгированной группы D. Например,  $g \cdot r \cdot gu \underline{GcACUucgscuucasaD}$  (5'-3') указывает, что последовательность, изложенная под SEQ ID NO. 16,  $g \cdot r \cdot gu \underline{GcACUucgscuucasa}$ , связана с D на 3'-конце.

### Пример 3. Анализ HBV *in vitro*

#### 1. Цель эксперимента.

Содержание антигенов HBV (HBsAg и HBeAg) в супернатанте клеточной культуры HepG2-NTCP определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), и ингибирующую активность соединения в отношении HBV оценивали, принимая значение  $EC_{50}$  соединения в качестве показателя; тем временем жизнеспособность клеток определяли с помощью Cell-titer Glo для оценки цитотоксичности соединения.

#### 2. Экспериментальные материалы.

2.1. Клеточная линия: клетки HepG2-NTCP.

Среда для культивирования клеток HepG2-NTCP (DMEM, Invitrogen-11330032; 10% сыворотка крови, Invitrogen-10099141; 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, Hyclone-SV30010; 1% заменимых аминокислот, Invitrogen-11140050; 2 mM L-глутамин, Invitrogen-25030081; 1 mM пируват натрия, Gibco-11360-070; 500 мкг/мл генетицина, Invitrogen-10131027)

## 2.2. Реагенты

Панкреатин (Invitrogen-25300062); DPBS (Corning-21031CVR); DMSO (Sigma-D2650-100 мл); клеточный титр Glo (Promega-G7573); набор для количественного анализа HBsAg (Autobio-CL 0310); набор для количественного анализа HBeAg (Autobio-CL 0312).

## 2.3. Расходные материалы и инструмент:

96-луночные планшеты для культивирования клеток (Corning-3599); CO<sub>2</sub>-инкубатор (HERA-CELL-240),

микропланшетный ридер (BioTek Synergy 2).

## 3. Экспериментальные процедуры и способ

3.1. В день 0 клетки HepG2-NTCP ( $7,5 \times 10^4$  клеток/лунка) высевали на 48-луночный планшет и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

3.2. В 1 день для смены среды использовали среду, содержащую 1% DMSO.

3.3. В день 2 HepG2-NTCP (2000 GE/клетка) инфицировали HBV/D (концентрированным из супернатанта клеточной культуры HepG2.2.15).

3.4. В день 3 инфекционный раствор отбирали пипеткой и добавляли свежую среду, содержащую 1% DMSO.

3.5. В день 6 конъюгат с siRNA трансфицировали в соответствии с инструкциями Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMax (Invitrogen). Конъюгат подвергали 5-кратному градиентному разведению для получения 7 концентраций, ставили лунки в трех экземплярах, и конечная концентрация составляла 0,16 пМ. Соединение представляло собой комбинацию смысловой и антисмысловой цепей и представляло собой единую



химическую единицу с максимальной концентрацией, составлявшей 2,5 нМ.

3.6. В день 12 супернатант из культуральных лунок собирали и анализировали в отношении HBsAg и HBeAg с помощью ELISA. После сбора супернатанта добавляли Cell-titer Glo для измерения жизнеспособности клеток.

3.7. Была сделана ссылка на инструкции продукта для конкретных процедур анализа ELISA на HBsAg и HBeAg, и краткое описание процедур приведено ниже. В реакционный планшет добавляли по 50 мкл образца и 50 мкл стандартного вещества, затем добавляли ферментный конъюгат из расчета 50 мкл/лунка, смесь хорошо перемешивали встряхиванием и инкубировали при 37°C в течение 60 мин; планшет промывали 5 раз с помощью промывочного раствора, затем добавляли люминесцентный субстрат из расчета 50 мкл на лунку, смесь хорошо перемешивали и оставляли реагировать при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин, и, наконец, интенсивность хемилюминесценции определяли с помощью микропланшетного ридера.

3.8. Анализ данных.

Расчет процента жизнеспособности клеток:

$\% \text{ жизнеспособности} = (\text{значение люминесценции образца} - \text{значение люминесценции контрольной среды}) / (\text{значение люминесценции контроля DMSO} - \text{значение люминесценции контрольной среды}) \times 100.$

Расчет процента ингибирования для HBsAg и HBeAg:

$\% \text{ Inh.} = (1 - \text{значение антигена в образце} / \text{значение антигена в контроле DMSO}) \times 100.$

Расчет  $CC_{50}$  и  $EC_{50}$ : Значения  $CC_{50}$  и 50% ингибирующей концентрации для HBV ( $EC_{50}$ ) соединений рассчитывали с применением программного обеспечения GraphPad Prism.

**4. Результаты экспериментов:** см. таблицу 2.

**Таблица 2. Результаты применения тестовых последовательностей в отношении снижения уровней HBsAg и HBeAg в клетках**

| Тестовые последовательности | Результаты эксперимента |
|-----------------------------|-------------------------|
|-----------------------------|-------------------------|

| SEQ ID NO | Последовательность смысловой цепи (5'-3') | SEQ ID NO | Последовательность антисмысловой цепи (5'-3') | HBsAg EC <sub>50</sub> (пМ) | HBeAg EC <sub>50</sub> (пМ) | Жизнеспособность клеток CC <sub>50</sub> (нМ) |
|-----------|---|-----------|---|-----------------------------|-----------------------------|---|
| 16        | g•r•guGcACUucgc uucacaD                   | 17        | u•G•ugargCGaagu GcAcac•u•u                    | 13,75                       | 20,84                       | > 2,5   |
| 16        | g•r•guGcACUucgc uucacaD                   | 20        | u•G•rgaAgCGaagu GcAcac•u•u                    | 17,40                       | 34,21                       | > 2,5   |
| 16        | g•r•guGcACUucgc uucacaD                   | 23        | u•G•ugaArCGaagu GcAcac•u•u                    | 12,44                       | 21,07                       | > 2,5   |
| 28        | g•u•guGcACUucg суucacaD                   | 17        | u•G•ugargCGaagu GcAcac•u•u                    | 13,09                       | 22,68                       | > 2,5   |
| 28        | g•u•guGcACUucg суucacaD                   | 20        | u•G•rgaAgCGaagu GcAcac•u•u                    | 14,69                       | 28,90                       | > 2,5   |
| 28        | g•u•guGcACUucg суucacaD                   | 23        | u•G•ugaArCGaagu GcAcac•u•u                    | 14,99                       | 34,72                       | > 2,5   |
| 28        | g•u•guGcACUucg суucacaD                   | 34        | u•G•uga(Agn)gCG arguGcAcac•u•u                | 30,72                       | 52,56                       | > 2,5   |

\* Тестовые образцы представляли собой конъюгаты с двухцепочечными аналогами siRNA.

#### **Пример 4. Исследование активности и безопасности вируса гепатита В на мышинной модели вируса гепатита В, опосредованного вектором рекомбинантного аденоассоциированного вируса 8-го типа (AAV-HBV)**

Цель эксперимента.

Модель мышей, трансфицированных HBV, опосредованным вектором AAV, представляет собой быструю и эффективную модель HBV. Используя высокий гепатотропизм вектора AAV8, рекомбинантный аденоассоциированный вирус 8-го типа, несущий 1,3 копии генома HBV (rAAV8-1,3HBV), вводят через хвостовую вену мышей, что может эффективно вводить переносимые 1,3 копии генома HBV в клетки печени. Благодаря характеристикам вирусного вектора AAV, опосредованный им вектор может непрерывно экспрессироваться в течение длительного периода времени, и ДНК HBV может непрерывно реплицироваться, и HBsAg и HBeAg могут экспрессироваться в печени мышей с применением модели AAV/HBV.

Используя модель мышей AAV/HBV, HBsAg, HBeAg, ДНК и pgRNA в сыворотке крови мышей и вес мышей определяли после лечения мышей тестируемым соединением, таким образом оценивая эффект против HBV и безопасность тестового соединения *in vivo*.

Экспериментальные материалы.

Мыши C57BL/6, PBS (без РНКазы) в качестве носителя, тестируемые соединения, рекомбинантный вирус rAAV8-1.3HBV. Основные реагенты проекта включают набор ДНК QIAamp96 (Qiagen, 51162), FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche, 04914058001), набор для анализа HBsAg (Autobio-CL0310); набор для анализа HBeAg (Autobio-CL0918), набор PureLink™ Pro 96 Viral RNA/DNA (Invitrogen, 12280-096A) и набор FastQuant RT (с gDNase) (TIANGEN, KR106-02). Основные инструменты включают центрифугу (Beckman Allegra X-15R), многофункциональный считыватель микропланшетов (BioTek, Synergy 2), флуоресцентный прибор для количественной ПЦР (Applied Biosystems, система быстрой ПЦР в реальном времени 7900HT) и микропланшетный ридер (Molecular Devices, SpectraMax 340PC384).

#### **Способ проведения эксперимента.**

а) Мышей подвергали подкожной инъекции на день 34 после инъекции вируса, и этот день устанавливали в качестве дня 0. Перед введением у всех мышей брали образец крови из подчелюстной вены для сбора плазмы крови. Конкретный режим введения показан в таблице 3.

б) У мышей брали кровь через подчелюстную вену на день 0, 14, 21, 28 и 32 после введения для сбора плазмы крови, образцы крови подвергали антикоагуляции с помощью K<sub>2</sub>-EDTA и центрифугировали при 4°C и 7000 г/мин в течение 10 мин для сбора плазмы крови. Конкретное время для забора крови показано в таблице 3.

с) На день 35 или день 42 у всех мышей брали кровь через подчелюстную вену для сбора плазмы крови, после чего мышей подвергали эвтаназии с помощью ингаляции CO<sub>2</sub>. Образцы плазмы крови собирали путем забора крови из сердца, при этом собирали образцы печени.

д) Образцы плазмы крови отправляли для обнаружения.

Таблица 3. Схема эксперимента *in vivo*

| Количество мышей | План введения       |                             |                        |   | Схема забора крови без конечной точки  | Конечная точка эксперимента   |
|------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------|---|--|---|
|                  | Тестовое соединение | Количество введения (мг/кг) | Объем введения (мл/кг) | Режим введения  |  |   |
| 5                | Носитель            | /                           | 5                      | <p>День 34 после инъекции вируса устанавливал и в качестве дня 0, а введение лекарственного средства осуществлял и однократно путем подкожной инъекции в день 0 и день 29.</p> <p>День 34 после инъекции вируса устанавливал и в качестве дня 0, и в день 0 введение лекарственного средства осуществлял и однократно путем подкожной инъекции.</p> | <p>День 34 после инъекции вируса устанавливали в качестве дня 0, а временем забора крови являлись дни 0, 7, 14, 21, 28, 32 и 35.</p> | <p>На день 35 после введения у мышей брали кровь через подчелюстное венозное сплетение для сбора плазмы крови, после чего мышей подвергали эвтаназии с помощью ингаляции CO<sub>2</sub>. Образцы плазмы крови собирал путем забора крови из сердца, при этом собирали образцы печени.</p> |
| 5                | WRG01 <sup>*1</sup> | 3                           |                        |   |  |   |
| 5                | WR007 <sup>*2</sup> | 3                           |                        |   |  |   |
| 5                | WR012 <sup>*3</sup> | 3                           |                        |   |  |   |

<sup>\*1</sup>: WRG01 представляет собой конъюгат, в котором смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 23, и

конъюгированной группой является D.

\*2: WR007 представляет собой конъюгат, в котором смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 42, антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 23, и конъюгированной группой является D.

\*3: WR012 представляет собой конъюгат, в котором смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 47, и конъюгированной группой является D.

/: конечная точка не достигнута.

### **Анализ образца.**

Анализ ELISA в отношении содержания HBsAg и HBeAg в сыворотке крови мышей: сделана ссылка на инструкции набора для ELISA HBsAg (Autobio, CL 0310) и набора для ELISA HBeAg (Autobio, CL0918) в отношении экспериментальных процедур.

Анализ qPCR в отношении содержания ДНК HBV в плазме крови мышей. Экстрагировали ДНК HBV из плазмы крови и ссылались на инструкции набора для забора ДНК из крови QIAamp 96 в отношении экспериментальных процедур, таким образом определяя содержание ДНК HBV в плазме крови мышей с помощью qPCR.

Анализ RT-qPCR в отношении содержания ДНК HBV в плазме крови мышей. pgRNA HBV экстрагировали из плазмы крови и ссылались на инструкции набора PureLink™ Pro 96 Viral RNA/DNA в отношении экспериментальных процедур. ДНК расщепляли, и РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с использованием праймера 3'RACE, содержащего специфическую последовательность вируса гепатита В, и ссылались на инструкции набора FastQuant RT (с gDNase) в отношении экспериментальных процедур. Наконец, содержание cDNA определяли количественно с помощью qPCR, а именно определяя содержание pgRNA HBV в плазме крови мышей.

Среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего использовали для выражения значения каждой группы образцов мышей, и  $n = 5$ , если не указано иное. Статистический анализ проводили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента.

### **Результаты эксперимента.**

а) Активность против HBV тестируемых соединений на моделях мышей AAV/HBV оценивали по содержанию HBsAg в сыворотке крови. Результаты показаны в таблице 4, в таблице 4-1, на фиг. 1 и фиг. 6. Содержание HBsAg в плазме крови мышей определяли с помощью ELISA. Шкалы погрешностей представляют собой стандартную ошибку. День 0: всем мышам впервые вводили носитель или соединение. День 29: мышам в экспериментальной группе WRG01 и мышам в соответствующей контрольной группе инокулировали носитель или соединение во второй раз.

**Таблица 4. Log<sub>10</sub> [HBsAg (МЕ/мл)] мышей в разные дни после введения**

| Дни обнаружения (день) | Контроль (SC) | WRG01 (SC) |
|------------------------|---------------|------------|
| 0                      | 4,70          | 4,72       |
| 7                      | 4,82          | 2,90       |
| 14                     | 4,43          | 2,90       |
| 21                     | 4,94          | 3,28       |
| 28                     | 4,84          | 3,77       |
| 35                     | 4,78          | 2,83       |

**Таблица 4-1. Log<sub>10</sub> [HBsAg (МЕ/мл)] мышей в разные дни после введения**

| Дни обнаружения (день) | Контроль (SC) | WR007 (SC) | WR012 (SC) |
|------------------------|---------------|------------|------------|
| 0                      | 4,58          | 4,19       | 4,47       |
| 7                      | 4,15          | 1,92       | 2,00       |
| 14                     | 4,57          | 2,29       | 2,20       |
| 21                     | 4,41          | 2,63       | 2,36       |
| 28                     | 4,76          | 2,94       | 3,10       |
| 35                     | 4,62          | 3,31       | 3,19       |

б) Активность против HBV тестируемых соединений на моделях мышей AAV/HBV оценивали по содержанию HBeAg в сыворотке крови. Результаты показаны в таблице 5, в таблице 5-1, на фиг. 2 и фиг. 7. Содержание HBeAg в плазме крови мышей определяли с помощью ELISA. Шкалы погрешностей представляют собой стандартную ошибку. День 0: всем мышам впервые вводили носитель или соединение.

**Таблица 5. Log<sub>10</sub> [HBeAg (PEIU/мл)] мышей в разные дни после введения**

| Дни обнаружения<br>(день) | Контроль (SC) | WRG01 (SC) |
|---------------------------|---------------|------------|
| 0                         | 3,56          | 3,51       |
| 7                         | 3,37          | 2,89       |
| 14                        | 3,56          | 3,06       |
| 21                        | 3,66          | 3,22       |

**Таблица 5-1. Log<sub>10</sub> [HBeAg (PEIU/мл)] мышей в разные дни после введения**

| Дни обнаружения<br>(день) | Контроль (SC) | WR007 (SC) | WR012 (SC) |
|---------------------------|---------------|------------|------------|
| 0                         | 3,44          | 3,35       | 3,40       |
| 7                         | 3,24          | 2,49       | 2,53       |
| 14                        | 3,57          | 2,80       | 2,89       |
| 21                        | 3,32          | 2,81       | 2,82       |
| 28                        | 3,38          | 2,95       | 2,91       |
| 35                        | 3,37          | 3,09       | 3,02       |

с) Активность против HBV тестируемых соединений на моделях мышей AAV/HBV оценивали по содержанию ДНК в сыворотке корви. Результаты показаны в таблице 6, в таблице 6-1, на фиг. 3 и фиг. 8. Содержание ДНК в плазме крови мышей определяли с помощью количественной ПЦР. Шкалы погрешностей представляют собой стандартную ошибку. День 0: всем мышам впервые вводили носитель или соединение. День 29: всем мышам второй раз инокулировали носитель или соединение.

**Таблица 6. Log<sub>10</sub> [ДНК (количество копий/мкл)] мышей в разные дни после введения**

| Дни обнаружения<br>(день) | Контроль (SC) | WRG01 (SC) |
|---------------------------|---------------|------------|
| 0                         | 5,27          | 4,84       |
| 7                         | 5,39          | 3,93       |

|    |      |      |
|----|------|------|
| 14 | 5,51 | 3,97 |
| 21 | 5,63 | 4,37 |

**Таблица 6-1. Log<sub>10</sub> [ДНК (количество копий/мкл)] мышей в разные дни после введения**

| Дни обнаружения (день) | Контроль (SC) | WR007 (SC) | WR012 (SC) |
|------------------------|---------------|------------|------------|
| 0                      | 5,53          | /          | /          |
| 7                      | 4,98          | /          | /          |
| 14                     | 5,34          | 3,44       | 3,95       |
| 21                     | 5,45          | 3,71       | 4,21       |
| 28                     | 5,63          | 4,08       | 4,66       |
| 35                     | 5,26          | 4,42       | 4,78       |

/: данные не получены.

d) Активность против HBV тестируемых соединений на моделях мышей AAV/HBV оценивали по содержанию pgRNA в сыворотке крови. Результаты представлены в таблице 7 и на фиг. 4. Содержание pgRNA в плазме крови мышей определяли с помощью количественной ПЦР. Шкалы погрешностей представляют собой стандартную ошибку. День 0: всем мышам впервые вводили носитель или соединение. День 29: всем мышам второй раз инокулировали носитель или соединение.

**Таблица 7. Log<sub>10</sub> [pgRNA (количество копий/мкл)] мышей в разные дни после введения**

| Дни обнаружения (день) | Контроль (SC) | WRG01 (SC) |
|------------------------|---------------|------------|
| 0                      | 4,92          | 4,56       |
| 7                      | 4,96          | 3,28       |
| 14                     | 4,93          | 3,26       |
| 21                     | 5,02          | 3,50       |
| 28                     | 5,06          | 4,13       |
| 35                     | 5,17          | 3,37       |



е) изменение веса тела показано на фиг. 5. Сравнение проводили с весом тела в день 0, используемым в качестве исходного уровня. В соответствии с регламентом IACUC потеря 20% веса тела считается гуманной конечной точкой, и любая мышь, потерявшая более 20% веса тела, должна быть исключена из эксперимента. Ни одна из мышей в данном эксперименте не была удалена из-за потери веса.

### **Экспериментальный вывод.**

В данном эксперименте тестируемые соединения были способны значительно снижать уровень HBsAg, ДНК и pgRNA в моделях мышей AAV/HBV. Между тем тестируемые соединения также оказывали определенное ингибирующее действие в отношении HBeAg. Во время лечения тестируемыми соединениями мыши проявляли хорошую переносимость, и вес тела постепенно увеличивался.

### **Пример 5. Анализ клеток HepG2.2.15 в отношении HBV *in vitro***

#### **1. Цель эксперимента.**

Содержание ДНК HBV в супернатанте культуры клеток HepG2.2.15 определяли с помощью qPCR в реальном времени, и содержание HBsAg и HBeAg определяли с помощью ELISA; содержание РНК HBV в клетках определяли с помощью qRT-PCR, значение EC<sub>50</sub> соединения применяли в качестве показателя для оценки ингибирующего действия соединения в отношении HBV, и влияние тестируемого соединения на жизнеспособность клеток определяли с помощью способа ССК8.

#### **2. Экспериментальные материалы.**

2,4. Клеточная линия: клетки HepG2.2.15.

Среда для культивирования клеток HepG2.2.15 (DMEM/F12, Invitrogen-11330032; 10% сыворотки крови, Hyclone-SV30087.0; 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, Hyclone-SV30010; 1% заменимых аминокислот, Invitrogen -11140050; 2 mM L-глутамин, Invitrogen-25030081; 300 мкг/мл генетицина, Invitrogen-10131027).

2,5. Реагенты

Opti-MEM (Gibco-31985-070); Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen-13778-150); ССК8 (Life-iLab-AC11L057); набор для высокопроизводительной очистки ДНК (QIAamp 96

DNA Blood Kit, Qiagen-51162); набор для получения РНК RNEASY (RNeasy 96 Kit (12), Qiagen-74182); количественный реагент для быстрого запуска универсального зонда (FastStart Universal Probe Master, Roche-04914058001); набор FastKing для синтеза первой цепи cDNA (TianGen-KR106-02); набор для количественного анализа HBsAg (Autobio-CL 0310); набор для количественного анализа HBeAg (Autobio-CL 0312).

## 2.6. Расходные материалы и инструмент:

Collagen I 96-луночный белый/прозрачный микропланшет с плоским дном, обработанный TC (Corning BioCoat-356650); CO<sub>2</sub>-инкубатор (HERA-CELL-240); флуоресцентный прибор для количественной ПЦР (система ПЦР в реальном времени Applied Biosystems-7900); флуоресцентный прибор для количественной ПЦР (Applied Biosystems-QuantStudio 6 Flex); микропланшетный ридер (Molecular Device-SpectraMax M2e); микропланшетный ридер (BioTek-Synergy 2).

## 3. Экспериментальные процедуры и способ

3.1. В первый день трансфекцию siRNA и посев клеток проводили одновременно, и краткое описание процедур приведено ниже. Клетки HepG2.2.15 промывали с помощью DPBS и расщепляли с помощью 0,05% трипсина, а затем расщепление завершали средой DMEM/F12, содержащей 10% FBS; затем клетки центрифугировали, ресуспендировали, осторожно переносили пипеткой в отдельные клетки и подсчитывали. Объем необходимого реагента для трансфекции устанавливали в соответствии с определенным соотношением (таблица 8) и клетки инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре.

**Таблица 8. Распределение Lipofectamine® RNAiMAX**

| Реагент                | Соотношение (распределение на одну лунку в качестве примера) |
|------------------------|--|
| Lipofectamine® RNAiMAX | 1,5  |
| Opti-MEM               | 23,5   |

siRNA подвергали 3-кратному градиентному разведению для получения 8 концентраций, и устанавливали две повторяющиеся лунки. 15 мкл смеси

RNAiMAX/Opti-MEM хорошо смешивали с 15 мкл siRNA в различных концентрациях и смесь инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. 10 мкл вышеуказанного смешанного раствора добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток, затем добавляли 90 мкл клеточной суспензии, конечная плотность клеток составляла 15000 клеток/лунку, а конечный объем составлял 100 мкл/лунку. Затем клетки инкубировали в инкубаторе при 37°C и при 5% CO<sub>2</sub>.

3.2. На четвертый день исходную культуральную среду заменяли свежей культуральной средой, содержащей соединение, и процедура трансфекции была такой же, как и в первый день.

3.3. На седьмой день собирали культуральный раствор в культуральной лунке и собирали образцы. Часть образцов использовали для анализа ELISA для определения содержания HBsAg и HBeAg; часть образцов использовали для выделения ДНК с помощью высокопроизводительного набора для очистки ДНК (Qiagen-51162); после сбора супернатанта определяли жизнеспособность клеток в соответствии с инструкциями набора ССК-8 и определяли оптическую плотность (450 нм/650 нм) каждой лунки с помощью устройства для считывания микропланшетов (SpectraMax M2e); РНК HBV экстрагировали из клеточной культуры с использованием набора для экстракции RNeasy 96 (Qiagen-74182) в соответствии с инструкциями к набору.

3.4. Получение реакционного раствора для ПЦР показано в таблице 9.

**Таблица 9. Получение раствора для реакции ПЦР**

| Показатели   | Объем,<br>необходимый для<br>1 лунки (мкл) | Объем,<br>необходимый для<br>100 лунок (мкл) |
|--|--|--|
| Количественный реагент<br>для быстрого запуска<br>универсального зонда | 5  | 500  |
| Прямой праймер (10<br>мкмоль)  | 0,4  | 40   |
| Обратный праймер (10<br>мкмоль)  | 0,4  | 40   |
| Зонд (10 мкмоль)   | 0,2  | 20   |
| АЕ   | 2  | 200  |

В каждую лунку 96-луночного ПЦР-планшета вносили по 8 мкл реакционной смеси, затем в каждую лунку добавляли по 2 мкл образца ДНК или стандартного вещества ДНК HBV.

Условия реакции ПЦР следующие: нагревание в течение 10 мин при 95°C, затем денатурация в течение 15 с при 95°C и удлинение в течение 1 мин при 60°C, всего 40 циклов.

3.5. Была сделана ссылка на инструкции продукта для конкретных процедур анализа ELISA в отношении содержания HBsAg и HBeAg, и краткое описание процедур приведено ниже. В реакционный планшет добавляли по 50 мкл образца и 50 мкл стандартного вещества, затем добавляли ферментный конъюгат из расчета 50 мкл/лунка, смесь хорошо перемешивали встряхиванием и инкубировали при 37°C в течение 60 мин на теплой бане; планшет промывали 5 раз с помощью промывочного раствора, затем добавляли люминесцентный субстрат из расчета 50 мкл на лунку, смесь хорошо перемешивали и оставляли реагировать при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин, и, наконец, интенсивность хемилюминесценции определяли с помощью микропланшетного ридера.

3.6. РНК HBV из клеточной культуры экстрагировали с использованием набора для экстракции RNeasy 96 (Qiagen, 74182) в соответствии с инструкциями к набору. Клетки лизировали с помощью 150 мкл RLT и, наконец, РНК элюировали с помощью 50 мкл воды без РНКазы. Добавляли случайный праймер в соответствии с инструкциями набора для обратной транскрипции (Tiangen, KR106) для обратной транскрипции в cDNA, затем применяли HBV-специфический праймер для выявления тотальной РНК в образце; тем временем праймеры и зонды GAPDH применяли для специфического обнаружения cDNA GAPDH, и способ qPCR применяли для количественного определения cDNA HBV в образце.

Реакция qPCR: 95°C, 10 мин; 95°C, 15 с; 60°C, 1 мин, всего 40 циклов. Содержание РНК HBV в каждом образце рассчитывали по значению Ct образца.

Уровень экспрессии mRNA HBV, целевого гена каждого образца, рассчитывали с помощью способа относительного количественного определения  $\Delta\Delta Ct$ . Относительный уровень экспрессии гена-мишени выражали с помощью  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , и формула расчета выглядит следующим образом:

$\Delta CT$  = среднее значение Ct гена-мишени – среднее значение Ct эталонного гена;

$\Delta\Delta CT$  =  $\Delta CT$  (группа лечения) –  $\Delta CT$  (контрольная группа RNAiMAX);

Относительный уровень экспрессии mRNA HBV =  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### 3.7. Анализ данных.

Расчет процента ингибирования:

$\% Inh. = (1 - \text{значение в образце/контрольное значение PBS}) \times 100$ .

$\% \text{ жизнеспособности клеток} = (\text{значение обнаружения образца} - \text{среднее фоновое значение обнаружения культурального раствора}) / (\text{среднее значение обнаружения контрольной группы} - \text{среднее фоновое значение обнаружения культурального раствора}) \times 100$ .

Расчет  $EC_{50}$  и  $CC_{50}$ : 50% ингибирующая концентрация ( $EC_{50}$ ) соединения для HBV и концентрация лекарственного средства при 50% гибели клеток ( $CC_{50}$ ) рассчитывали с применением программного обеспечения GraphPad Prism.

**Таблица 10. Результаты тестовых последовательностей по снижению уровней HBsAg, HBeAg, ДНК и РНК в клетках**

| Тестовые последовательности |   |           |   | Результаты эксперимента |                      |                    |                    |  |
|-----------------------------|---|-----------|---|-------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--|
| SEQ ID NO                   | Последовательность смысловой цепи (5'-3') | SEQ ID NO | Последовательность антисмысловой цепи (5'-3') | HBsAg $EC_{50}$ (нМ)    | HBeAg $EC_{50}$ (нМ) | ДНК $EC_{50}$ (нМ) | РНК $EC_{50}$ (нМ) | Жизнеспособность клеток $CC_{50}$ (нМ) |
| 16                          | <u>g•r•guGcACU</u><br>ucgcuucacaD         | 23        | u•G•ugaArCG<br>aaguGcAcac•u<br>•u             | 0,179                   | 0,755                | 0,14               | 0,87               | > 50                                   |
| 28                          | <u>g•u•guGcACU</u><br>ucgcuucacaD         | 17        | u•G•ugargCGa<br>aguGcAcac•u•<br>u             | 0,105                   | 0,37                 | 0,16               | 0,567              | > 50                                   |
| 28                          | <u>g•u•guGcACU</u><br>ucgcuucacaD         | 23        | u•G•ugaArCG<br>aaguGcAcac•u<br>•u             | 0,079                   | 0,587                | 0,135              | 3,197              | > 50                                   |
| 28                          | <u>g•u•guGcACU</u>                        | 34        | u•G•uga(Agn)                                  | 0,263                   | 1,268                | 0,553              | 0,963              | > 50                                   |

|    |   |    |  |       |       |       |      |      |
|----|---|----|--|-------|-------|-------|------|------|
|    | ucgcuucacaD   |    | gCG <u>g</u> u <u>G</u> c <u>A</u> c<br>ac <u>•</u> u  |       |       |       |      |      |
| 42 | <u>g</u> • <u>r</u> • <u>g</u> <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> C <u>U</u><br>ucgcurcacaD | 23 | u• <u>G</u> • <u>u</u> g <u>a</u> r <u>C</u> G<br>a <u>a</u> g <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> c <u>•</u> u<br>•u             | 0,07  | 0,389 | 0,019 | 0,65 | > 50 |
| 43 | <u>g</u> • <u>r</u> • <u>g</u> <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> C <u>U</u><br>ucrcuucacaD | 23 | u• <u>G</u> • <u>u</u> g <u>a</u> r <u>C</u> G<br>a <u>a</u> g <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> c <u>•</u> u<br>•u             | 0,231 | /     | /     | /    | > 50 |
| 16 | <u>g</u> • <u>r</u> • <u>g</u> <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> C <u>U</u><br>ucgcuucacaD | 44 | u• <u>G</u> • <u>u</u> r <u>a</u> r <u>C</u> G<br>a <u>a</u> g <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> c <u>•</u> u<br>•u             | 0,072 | 2,202 | 0,06  | /    | > 50 |
| 16 | <u>g</u> • <u>r</u> • <u>g</u> <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> C <u>U</u><br>ucgcuucacaD | 45 | u• <u>G</u> • <u>u</u> g <u>a</u> (Agn)<br>r <u>C</u> G <u>a</u> g <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> c<br>ac <u>•</u> u         | 0,054 | 3,707 | 0,15  | /    | > 50 |
| 16 | <u>g</u> • <u>r</u> • <u>g</u> <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> C <u>U</u><br>ucgcuucacaD | 46 | u• <u>G</u> • <u>u</u> g <u>a</u> (Agn)<br>g <u>C</u> G <u>a</u> r <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> c<br>ac <u>•</u> u         | 0,497 | /     | /     | /    | > 50 |
| 16 | <u>g</u> • <u>r</u> • <u>g</u> <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> C <u>U</u><br>ucgcuucacaD | 47 | V <u>P</u> u• <u>G</u> • <u>u</u> g <u>a</u> r<br>C <u>G</u> a <u>a</u> g <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> c<br>ac <u>•</u> u  | 0,082 | 0,205 | 0,037 | 0,68 | > 50 |
| 16 | <u>g</u> • <u>r</u> • <u>g</u> <u>u</u> <u>G</u> c <u>A</u> C <u>U</u><br>ucgcuucacaD | 48 | V <u>P</u> u• <u>G</u> • <u>u</u> g <u>a</u> (Agn)<br>r <u>C</u> G <u>a</u> g <u>u</u> <u>G</u><br>c <u>A</u> c <u>•</u> u | 0,104 | 3,83  | 0,105 | /    | > 50 |

/: данные не получены.

\* Тестовые образцы представляли собой конъюгаты с двухцепочечными аналогами siRNA.

#### **Пример 6. Исследование дозы для эффективной активности против вируса гепатита В на моделях мышей AAV-HBV**

Используя мышинные модели AAV/HBV, HBsAg в сыворотке крови мышей обнаруживали после лечения мышей тестируемым соединением в различных дозах, таким образом оценивая эффект тестируемого соединения *in vivo* против HBV.

Экспериментальные материалы.

Мыши C57BL/6, PBS (без РНКазы) в качестве носителя, тестируемые соединения, рекомбинантный вирус rAAV8-1.3HBV. Основные реагенты проекта включают FastStart

Universal Probe Master (Rox) (Roche, 04914058001) и набор для анализа HBsAg (Autobio, CL0310). Основные инструменты включают центрифугу (Beckman Allegra X-15R), многофункциональный считыватель микропланшетов (BioTek, Synergy 2) и микропланшетный ридер (Molecular Devices, SpectraMax 340PC384).

Способ проведения эксперимента.

а) Всех мышей подвергали подкожной инъекции на день 34 после инъекции вируса, и этот день устанавливали в качестве дня 0. Перед введением у всех мышей брали образец крови из подчелюстной вены для сбора плазмы крови. Введение лекарственного средства проводили однократно в день 0. Конкретный режим введения показан в таблице 14.

б) У всех мышей брали кровь через подчелюстную вену на день 0, 14, 21, 28 и 35 после введения для сбора плазмы крови, образцы крови подвергали антикоагуляции с помощью K<sub>2</sub>-EDTA и центрифугировали при 4°C и 7000 г/мин в течение 10 мин для сбора плазмы крови. Конкретное время для забора крови показано в таблице 11.

с) На день 42 у всех мышей брали кровь через подчелюстную вену для сбора плазмы крови, после чего мышей подвергали эвтаназии с помощью ингаляции CO<sub>2</sub>. Образцы плазмы крови собирали путем забора крови из сердца, при этом собирали образцы печени.

д) Все образцы плазмы крови отправляли для обнаружения.

**Таблица 11. Схема эксперимента *in vivo***

| Количество мышей | План введения          |                             |                        |  | Схема забора крови без конечной точки   | Конечная точка эксперимента   |
|------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|--|---|---|
|                  | Тестируемое соединение | Количество введения (мг/кг) | Объем введения (мл/кг) | Режим введения   |   |   |
| 5                | Носитель               | /                           | 5                      | День 34 после инъекции вируса устанавливали в качестве дня | День 34 после инъекции вируса устанавливали в качестве дня 0, а временем забора крови | На день 42 после введения у мышей брали кровь через подчелюстное венозное сплетение |
| 5                |                        | 0,3                         |                        |  |   |   |
| 5                | WRG01*                 | 1                           |                        |  |   |   |

|   |  |    |  |                                     |  |
|---|--|----|--|-------------------------------------|--|
|   |  |    | 0, и в день 0 введение лекарственного средства осуществляли и однократно путем подкожной инъекции. | являлись дни 0, 7, 14, 21, 28 и 35. | для сбора плазмы крови, после чего мышей подвергали эвтаназии с помощью ингаляции CO <sub>2</sub> . Образцы плазмы крови собирал путем забора крови из сердца, при этом собирали образцы печени. |
| 5 |  | 3  |  |                                     | /  |
| 5 |  | 10 |  |                                     | /  |

\*: WRG01 представляет собой конъюгат, в котором смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 23, и конъюгированной группой является D.

/: конечная точка не достигнута.

#### Анализ образца.

Анализ ELISA в отношении содержания HBsAg в сыворотке крови мышей: сделана ссылка на инструкции набора для ELISA HBsAg (Autobio, CL 0310) в отношении экспериментальных процедур.

Среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего использовали для выражения значения каждой группы образцов мышей, и  $n = 5$ , если не указано иное. Статистический анализ проводили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента.

#### Результаты эксперимента.

Активность против HBV тестируемого соединения на моделях мышей AAV/HBV оценивали с помощью обнаружения HBsAg в сыворотке. Результаты представлены в таблице 12 и на фиг. 9. Содержание HBsAg в плазме крови мышей определяли с помощью ELISA. Шкалы погрешностей представляют собой стандартную ошибку. День 0: всем мышам впервые вводили носитель или соединение.

**Таблица 12. Log<sub>10</sub> [HBsAg (МЕ/мл)] мышей в разные дни после введения**



| Дни обнаружения (день) | Контроль (SC) | WRG01, 0,3 мг/кг (SC) | WRG01, 1 мг/кг (SC) | WRG01, 3 мг/кг (SC) | WRG01, 10 мг/кг (SC) |
|------------------------|---------------|-----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 0                      | 4,58          | 4,49                  | 4,53                | 4,31                | 4,56                 |
| 7                      | 4,15          | 3,67                  | 2,93                | 2,19                | 1,98                 |
| 14                     | 4,57          | 4,18                  | 3,60                | 2,26                | 2,12                 |
| 21                     | 4,41          | 4,46                  | 3,80                | 2,48                | 2,17                 |
| 28                     | 4,76          | 4,76                  | 4,25                | 3,22                | 2,99                 |
| 35                     | 4,62          | 4,65                  | 4,31                | 3,40                | 3,12                 |

#### Экспериментальный вывод.

В данном эксперименте тестируемое соединение WRG01 продемонстрировало неплохую зависимость от дозы в отношении снижения уровня HBsAg в моделях мышей AAV/HBV; то есть его активность в отношении уменьшения HBsAg увеличивалась вместе с увеличением дозы препарата, и оно проявляло долгосрочную эффективность в ингибировании HBsAg.

#### Пример 7. Тест в отношении концентрации лекарственного средства в плазме крови, печени и почках мышей

В данном исследовании мышам C57BL/6 вводили дозу однократно посредством подкожной инъекции, образцы плазмы крови и тканей собирали в различные моменты времени после введения лекарственного средства, и метаболические уровни соединения у мышей оценивали с помощью SL-qPCR обнаружения уровня siRNA в плазме крови и тканях.

Таблица 13. Схема эксперимента *in vivo*

| Количество мышей | План введения       |                             |                        |   | Схема отбора периферической крови без конечной точки | Конечная точка эксперимента  |
|------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------|---|--|--|
|                  | Тестовое соединение | Количество введения (мг/кг) | Объем введения (мл/кг) | Режим введения                              |  |  |
| 3                | WRG01*              | 3                           | 5                      | Введение лекарственного средства осуществля | Время забора крови составило 0,083 ч                 | Через 0,5 ч после введения у мышей брали кровь через подчелюстное венозное сплетение для сбора |

|   |  |   |  |   |   |   |
|---|--|---|--|---|---|---|
|   |  |   |  | ли<br>однократно<br>путем<br>подкожной<br>инъекции в<br>день 0. | после<br>введения.  | плазмы крови, после<br>чего мышей подвергали<br>эвтаназии с помощью<br>ингаляции CO <sub>2</sub> и<br>собирали образцы<br>печени и почек.   |
| 3 |  | 3 |  |   | Время<br>забора<br>крови<br>составило<br>0,25 ч<br>после<br>введения. | Через 1 ч после<br>введения у мышей брали<br>кровь через<br>подчелюстное венозное<br>сплетение для сбора<br>плазмы крови, после<br>чего мышей подвергали<br>эвтаназии с помощью<br>ингаляции CO <sub>2</sub> и<br>собирали образцы<br>печени и почек. |
| 3 |  | 3 |  |   | /   | Через 2 ч после<br>введения у мышей брали<br>кровь через<br>подчелюстное венозное<br>сплетение для сбора<br>плазмы крови, после<br>чего мышей подвергали<br>эвтаназии с помощью<br>ингаляции CO <sub>2</sub> и<br>собирали образцы<br>печени и почек. |
| 3 |  | 3 |  |   | /   | Через 4 ч после<br>введения у мышей брали<br>кровь через<br>подчелюстное венозное<br>сплетение для сбора<br>плазмы крови, после<br>чего мышей подвергали<br>эвтаназии с помощью<br>ингаляции CO <sub>2</sub> и<br>собирали образцы<br>печени и почек. |
| 3 |  | 3 |  |   | /   | Через 8 ч после<br>введения у мышей брали<br>кровь через<br>подчелюстное венозное<br>сплетение для сбора<br>плазмы крови, после<br>чего мышей подвергали<br>эвтаназии с помощью<br>ингаляции CO <sub>2</sub> и  |

|   |  |   |  |  |   |
|---|--|---|--|--|---|
|   |  |   |  |  | собирали образцы печени и почек.  |
| 3 |  | 3 |  | /  | Через 32 ч после введения у мышей брали кровь через подчелюстное венозное сплетение для сбора плазмы крови, после чего мышей подвергали эвтаназии с помощью ингаляции CO <sub>2</sub> и собирали образцы печени и почек.  |
| 3 |  | 3 |  | Время забора крови составило 48 ч и 96 ч после введения. | Через 168 ч после введения у мышей брали кровь через подчелюстное венозное сплетение для сбора плазмы крови, после чего мышей подвергали эвтаназии с помощью ингаляции CO <sub>2</sub> и собирали образцы печени и почек. |

\*: WRG01 представляет собой конъюгат, в котором смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 16, антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 23, и конъюгированной группой является D.

/: забор крови не проводился во время "не конечной точки", а только в конечной точке.

### Результаты эксперимента.

Уровни siRNA в плазме крови, печени и почках мышей в разные моменты времени после введения определяли с помощью способа SL-qPCR (ссылка: Nair et al., *Nucleic Acids Research* (2017), 45, 10969-10977) и результаты показаны на фиг. 10.

### Экспериментальный вывод.

В данном эксперименте тестируемое соединение WRG01 имело хорошее распределение в тканях и метаболическую стабильность в моделях мышей C57BL/6. WR-G01 характеризуется сильным воздействием на печень, длительным периодом

полувыведения и соотношением печени и крови более чем в 500 раз, что доказывает, что WRG01 обладает метаболической стабильностью и высокой способностью воздействовать на печень.

### Пример 8. Биохимический анализ крови у мышей с гуманизированной печенью FRG-KO

Гуманизированная мышь FRG является одной из наиболее часто используемых гуманизированных моделей печени, обычно со степенью гуманизации до 70%. Поскольку клетки печени человека пересаживают в печень мыши, естественная инфекция HBV и процесс репликации сссDNA в человеческом организме могут быть лучше смоделированы, и, между тем, данная модель может хорошо предсказать фармакокинетику человеческого организма и гепатотоксичность на него.

В данном исследовании гуманизированным мышам FRG несколько раз вводили лекарственное средство, собирали образцы плазмы крови в разные моменты времени после введения, а токсическое и побочное действие соединения на печень мышей оценивали посредством определения ALT, AST и уровня билирубина в плазме крови. В данном эксперименте тестируемое соединение не вызывало значительной воспалительной реакции гуманизированной печени, что свидетельствует о достаточном уровне безопасности для организма человека.

Таблица 14. Схема эксперимента *in vivo*

| Количество мышей | План введения       |                             |                        |   | Схема отбора периферической крови без конечной точки   | Конечная точка эксперимента |
|------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------|---|--|-----------------------------|
|                  | Тестовое соединение | Количество введения (мг/кг) | Объем введения (мл/кг) | Режим введения  |  |                             |
| 3                | Носитель            | /                           | 5                      | Введение лекарственного средства осуществляли однократно путем подкожной инъекции в дни 0, 21, 28, 35 и 42. | Время забора крови составляло 1 день до введения и 7, 14, 21, 28, 35 и 42 дней после введения. | /                           |
| 3                |                     | 15                          |                        |   |  |                             |
| 3                | WRG01*              | 50                          |                        |   |  |                             |

\*: WRG01 представляет собой конъюгат, в котором смысловая цепь представляет собой

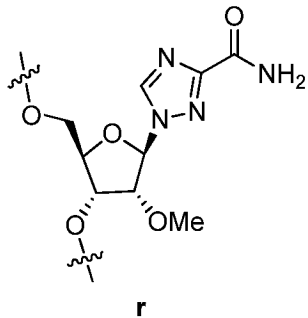
SEQ ID NO: 16, антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 23, и конъюгированной группой является D.

/: конечная точка не достигнута.

В настоящем раскрытии показана неожиданно превосходная ингибирующая активность в отношении HBsAg и HBeAg, при эффективном ингибировании экспрессии ДНК и pgRNA HBV, что указывает на то, что с помощью настоящего изобретения можно ингибировать активность вируса гепатита В. Между тем, настоящее изобретение характеризуется хорошим распределением в тканях и метаболической стабильностью, а также высокой способностью воздействия на печень и, как ожидается, малой степенью влияния на функцию печени мыши. Оно обеспечит эффективное средство лечения гепатита В в клинической практике, например, хронического гепатита В

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль, содержащие смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит последовательность, полученную посредством замены одного или более нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, на г, и г представляет собой



где каждый из нуклеотидов и г в аналоге siRNA являются независимо модифицированными или немодифицированными.

2. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по п. 1, где 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более нуклеотидов и г в двухцепочечном аналоге siRNA являются модифицированными; необязательно все нуклеотиды и г в двухцепочечном аналоге siRNA являются модифицированными.

3. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по п. 1 или п. 2, где модификация предусматривает метокси-модификацию, фтор-модификацию, фосфотиоатную связь, замену нуклеотида на (*S*)-глицериновую нуклеиновую кислоту или замену нуклеотида на (*E*)-винилфосфат.

4. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–3, где антисмысловая цепь содержит последовательность, полученную посредством замены одного, двух, трех, четырех или пяти нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, на г; необязательно антисмысловая цепь содержит последовательность, полученную посредством замены одного нуклеотидного остатка в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, на г.

5. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–4,

где замена г происходит в любом положении SEQ ID NO: 2.

6. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–5, где SEQ ID NO: 2 необязательно содержит выступ на 5'-конце и/или 3'-конце; необязательно SEQ ID NO: 2 содержит выступ из 0, 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов на 5'-конце и/или 3'-конце; необязательно SEQ ID NO: 2 содержит выступ на 3'-конце, и выступ выбран из модифицированного или немодифицированного UU.

7. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–6, где антисмысловая цепь содержит или состоит из последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 48.

8. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–7, где смысловая цепь содержит или состоит из последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28.

9. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–8, где смысловая цепь содержит последовательность, полученную посредством замены одного или более нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, на г; необязательно смысловая цепь содержит последовательность, полученную посредством замены одного, двух, трех, четырех или пяти нуклеотидных остатков в последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, на г.

10. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–9, где замена г происходит в положениях 1–19 от 5'-конца SEQ ID NO: 1.

11. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–10, где последовательность смысловой цепи содержит или состоит из последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 12

или SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 43.

12. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–11, где двухцепочечный аналог siRNA представляет собой любой из S18-S28:

S18: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17,

S19: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19,

S20: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 20,

S21: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 21,

S22: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22,

S23: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23,

S24: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24,

S25: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 33,

S26: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 34,

S27: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 35, и

S28: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 36,



или

где двухцепочечный аналог siRNA представляет собой любой из S1-S17:

S1: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17,

S2: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17,

S3: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19,

S4: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19,

S5: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 20,

S6: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 20,

S7: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 21,

S8: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 21,

S9: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22,

S10: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22,

S11: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23,

S12: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23,

S13: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24,

S14: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24,

S15: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 25, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17,

S16: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 26, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17, и

S17: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 27, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 17,

или

где двухцепочечный аналог siRNA представляет собой любой из S29-S35:

S29: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 42, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23,

S30: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 43, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23,

S31: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 44,

S32: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 45,

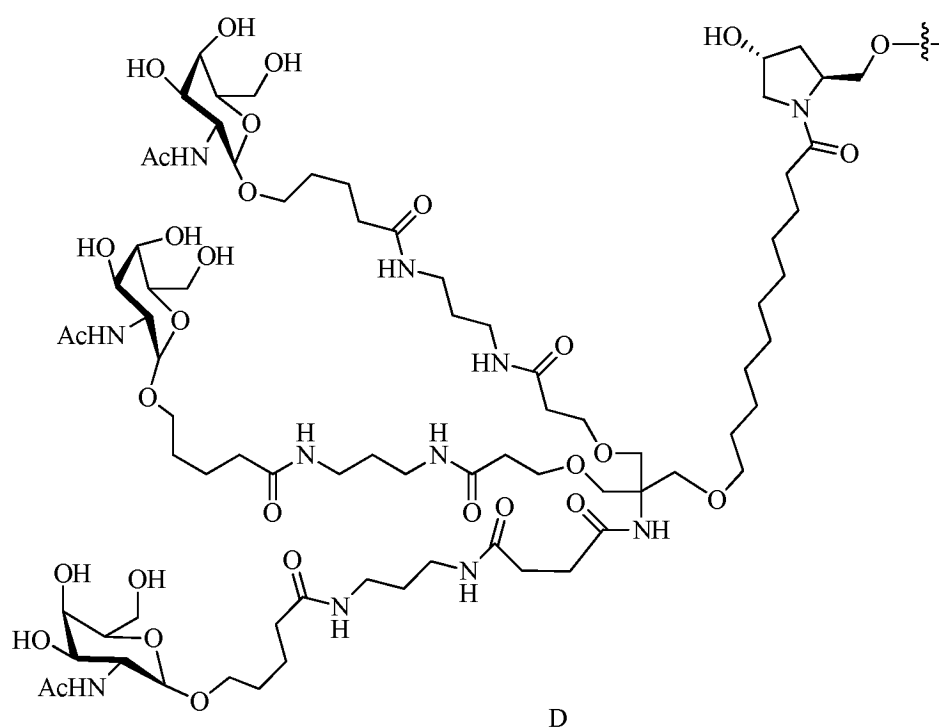
S33: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 46,

S34: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 47, и

S35: смысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, и антисмысловая цепь представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 48.

13. Конъюгат с двухцепочечным аналогом siRNA или его соль по любому из пп. 1–12, где двухцепочечный аналог siRNA связан с фармацевтически приемлемой конъюгированной группой, и фармацевтически приемлемая конъюгированная группа содержит группу GalNAc; необязательно фармацевтически приемлемая конъюгированная группа содержит от 1 до 5 групп GalNAc.

14. Конъюгат с двухцепочечным аналогом siRNA или его соль по любому из пп. 1–13, где двухцепочечный аналог siRNA связан с фармацевтически приемлемой конъюгированной группой, и фармацевтически приемлемая конъюгированная группа содержит группу D, представленную соединением,



15. Конъюгат с двухцепочечным аналогом siRNA или его соль по п. 13 или п. 14, где фармацевтически приемлемая конъюгированная группа связана с 3'-концом смысловой цепи двухцепочечного аналога siRNA.

16. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–15, где фосфотиоатный фрагмент двухцепочечного аналога siRNA или конъюгата с ним содержит (*R*)- и (*S*)-энантиомеры, диастереоизомеры и/или их рацемические смеси.

17. Двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–16, где соль выбрана из основно-аддитивных солей, кислотнo-аддитивных солей и их

комбинаций; необязательно основно-аддитивная соль выбрана из солей натрия, калия, кальция, аммония, органического амина, магния и их комбинаций, а кислотнo-аддитивная соль выбрана из солей, полученных из неорганических кислот, солей, полученных из органических кислот и их комбинаций; необязательно неорганическая кислота выбрана из хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, азотной кислоты, угольной кислоты, бикарбонатного радикала, фосфорной кислоты, моногидрофосфата, дигидрофосфата, серной кислоты, гидросульфата, йодистоводородной кислоты, фосфористой кислоты и их комбинаций, и органическая кислота выбрана из уксусной кислоты, пропионовой кислоты, изомасляной кислоты, малеиновой кислоты, малоновой кислоты, бензойной кислоты, янтарной кислоты, пробковой кислоты, фумаровой кислоты, молочной кислоты, миндальной кислоты, фталевой кислоты, бензолсульфоновой кислоты, *n*-толуолсульфоновой кислоты, лимонной кислоты, винной кислоты, метансульфоновой кислоты и их комбинаций.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая двухцепочечный аналог siRNA, конъюгат с ним или его соль по любому из пп. 1–17 и необязательно фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

19. Применение двухцепочечного аналога siRNA, конъюгата с ним или его соли по любому из пп. 1–17 или фармацевтической композиции по п. 18 для получения лекарственного препарата для лечения гепатита В.

20. Способ лечения гепатита В у субъекта, включающий стадию введения субъекту двухцепочечного аналога siRNA, конъюгата с ним или его соли по любому из пп. 1–17 или фармацевтической композиции по п. 18.