

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048263**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.11.13

(21) Номер заявки
202190528

(22) Дата подачи заявки
2019.08.12

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

(54) **КОМПОЗИЦИИ АГЕНТОВ ДЦРНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/718,314**

(32) **2018.08.13**

(33) **US**

(43) **2021.04.23**

(86) **PCT/US2019/046142**

(87) **WO 2020/036862 2020.02.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Джадхав Васант Р., Майер Мартин А.,
Милстейн Стюарт, Шлегель Марк К.
(US)**

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

(56) **WO-A1-2016077321**
WO-A2-2017027350
WO-A2-2018027106
**MARK K. SCHLEGEL ET AL.: "Chirality
Dependent Potency Enhancement and Structural
Impact of Glycol Nucleic Acid Modification
on siRNA", JOURNAL OF THE AMERICAN
CHEMICAL SOCIETY, vol. 139, no. 25, 19 June 2017
(2017-06-19), pages 8537-8546, XP055602525, US
ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/jacs.7b02694**

(57) Настоящее изобретение относится к агентам с двухцепочечной РНК, нацеленным на геном вируса гепатита В (HBV), и способам использования таких агентов для ингибирования экспрессии одного или нескольких генов HBV, а также способам лечения субъектов, страдающих инфекцией HBV или HBV-ассоциированным заболеванием, например хронической инфекцией гепатита В.

B1

048263

048263

B1

Перечень последовательностей, связанный с этим заявкой, предоставлен в текстовом формате вместо бумажной копии и, таким образом, включен в спецификацию посредством ссылки. Имя текстового файла, содержащего список последовательностей, -930385_410WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Текстовый файл размером 83,1 КБ был создан 4 августа 2019 г. и отправлен в электронном виде via EFS-Web.

Введение

Во всем мире более 400 млн человек постоянно инфицированы вирусом HBV и, таким образом, находятся в группе повышенного риска развития серьезных заболеваний печени, таких как хронический гепатит, цирроз, печеночная недостаточность и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), приводящих к примерно 600000 смертей ежегодно.

При естественном развитии хронической инфекции HBV наблюдаются четыре последовательных фазы: (1) ранняя "иммунотолерантная" фаза, характеризующаяся высоким уровнем репликации вируса и минимальным воспалением печени; (2) иммунореактивная фаза, где наблюдается значительное воспаление печени и повышение уровня аминотрансфераз в сыворотке крови; и у некоторых пациентов развивается (3) "нерепликативная" фаза, при которой наблюдается сероконверсия к анти-НВе, неопределяемый или низкий уровень вiremии (ниже 2000 МЕ/мл по результатам анализа на основе ПЦР) и разрешение воспаления печени; и (4) НВеAg-отрицательный хронический гепатит В вследствие появления специфических вирусных мутаций, препятствующих выработке НВеAg, но не препятствующих репликации вируса. Эта форма хронического гепатита В (СНВ) характеризуется колебаниями уровня ДНК HBV и сывороточных аминотрансфераз (ALT и AST) в сочетании с прогрессирующим заболеванием печени. Важно отметить, что СНВ может проявляться как НВеAg-положительный или НВеAg-отрицательный СНВ. Лонгитюдные исследования пациентов с СНВ показали, что 5-летняя кумулятивная частота развития цирроза составляет от 8 до 20%. Кумулятивная частота печеночной декомпенсации за 5 лет составляет примерно 20%. Заболеваемость НСС во всем мире увеличилась, и в настоящее время он занимает пятое место по распространенности. Ежегодная заболеваемость НСС, вызванной HBV, высока и колеблется от 2 до 5% при установленном циррозе.

Основной целью лечения HBV является полное (навсегда) подавление репликации HBV и улучшение симптомов заболевания печени. Клинически важными краткосрочными целями являются достижение сероконверсии НВеAg, нормализация сывороточных ALT и AST, разрешение воспаления печени и предотвращение печеночной декомпенсации. Конечной целью лечения является получение стойкого ответа для предотвращения развития цирроза и рака печени для продления выживаемости. Инфекцию HBV невозможно искоренить полностью из-за сохранения определенной формы вирусной ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (сccHBV ДНК или сccDNA) в ядрах инфицированных гепатоцитов. Однако, вызванный лечением клиренс сывороточного HBsAg является маркером прекращения хронической инфекции HBV и ассоциируется с наилучшим долгосрочным прогнозом.

Современные стандартные методы лечения HBV включают иммунотерапию на основе интерферона или тимозина $\alpha 1$ и подавление вирусной продукции путем ингибирования полимеразы HBV. Ингибиторы полимеразы HBV эффективны в снижении вирусной продукции, но практически не влияют на быстрое снижение HBsAg или способны медленно снижать HBsAg при длительном лечении у ограниченного числа пациентов (например, при лечении тенофовир дизопроксилфумаратом). Иммунотерапия на основе интерферона позволяет снизить как продукцию вирусов, так и приводит к быстрому удалению HBsAg из крови, но только у небольшого процента пациентов. Общепринятая роль HBsAg в крови состоит в том, чтобы изолировать анти-НBsAg антитела и позволить инфекционным вирусным частицам ускользнуть от иммунного обнаружения, что, вероятно, является одной из причин, по которым инфекция HBV остается хроническим заболеванием. Кроме того, HBsAg, НВеAg и НВсAg обладают иммуноингибирующими свойствами, и стойкость этих вирусных белков в крови пациентов после применения любого из доступных в настоящее время способов лечения HBV, вероятно, оказывает значительное влияние на предотвращение достижения пациентами иммунологического контроля инфекции HBV.

Хотя все три основных белка HBV (НBsAg, НВеAg и НВсAg) обладают иммуноингибирующими свойствами, НBsAg составляет подавляющее большинство белка HBV в кровотоке субъектов, инфицированных HBV. Кроме того, хотя удаление НВеAg (посредством сероконверсии) или снижение вiremии в сыворотке крови не коррелирует с развитием устойчивого контроля инфекции HBV после лечения, удаление сывороточного НBsAg из крови (и сероконверсия) при инфекции HBV признано хорошим прогностическим индикатором противовирусного ответа на лечение, приводящего к контролю HBV-инфекции после лечения (хотя это происходит только у небольшой части пациентов, получающих иммунотерапию). Таким образом, хотя уменьшение всех трех основных белков HBV (НBsAg, НВеAg и НВсAg) может привести к оптимальному устранению ингибирующего эффекта, удаление только одного НBsAg, вероятно, само по себе является достаточным для устранения в значительной степени вирусного ингибирования иммунной функции у субъектов с инфекцией HBV.

Следовательно, в отсутствие какой-либо текущей схемы лечения, способной восстановить иммунологический контроль HBV у значительной части пациентов, существует потребность в эффективном лечении инфекции HBV, в процессе которого у большинства пациентов ингибируется репликация вируса, а также восстанавливается иммунологический контроль. Соответственно, в данной области существует

потребность в альтернативных и комбинированных терапиях для субъектов, инфицированных HBV или имеющих заболевание, связанное с HBV.

Сущность изобретения

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлены композиции агентов с двухцепочечной рибонуклеиновой кислотой (дцРНК), влияющих на расщепление РНК-транскриптов гена вируса гепатита В (HBV), опосредованное РНК-индуцированным сайленсинг-комплексом (RISC), также называемым РНК-индуцированным комплексом молчания (RISC). Ген HBV может находиться внутри клетки, например, клетки, локализованной внутри субъекта, такого как человек.

В настоящем описании также представлены способы и терапии для лечения субъекта, страдающего расстройством, для которого может оказаться эффективным ингибирование экспрессии гена HBV, например, при инфекции HBV или связанном с HBV заболеванием, таким как хроническая инфекция гепатита В (CHB, chronic Hepatitis B), при использовании композиции агентов дцРНК, влияющих на опосредованное РНК-индуцированным комплексом молчания (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена HBV для ингибирования экспрессии гена HBV.

В одном аспекте настоящее изобретение предоставляет агенты дцРНК для ингибирования экспрессии HBV. Например, в настоящем описании предложен агент дцРНК, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующую двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит модифицированную нуклеотидную последовательность, как изложено в:

5'-usGfsuga (Agn) gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 16),

5'-usGfsuga (Agn) gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 18),

5'-usGfsudGa (Agn) gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 20),

5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 23),

5'-usGfsuga (Agn) dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 24),

5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO: 25), или

5'-usGfsuga (Agn) gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 28),

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

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

dA, dC, dG и dT представляют собой 2'-дезоксаденозин-3'-фосфат, 2'-дезоксцитидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат и 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой нуклеиновую кислоту аденозингликоля (GNA); и

s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucasa-3' (SEQ ID NO: 29),

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

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

s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь и смысловая цепь содержат модифицированные нуклеотидные последовательности, как указано в:

(a) 5'-usGfsuga (Agn) gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 16) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);

(b) 5'-usGfsuga (Agn) gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 18) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);

(c) 5'-usGfsudGa (Agn) gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 20) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);

(d) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 23) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);

(e) 5'-usGfsuga (Agn) dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 24) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);

(f) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO: 25) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO: 29); или

(g) 5'-usGfsuga (Agn) gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 28) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);

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

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

dA, dC, dG и dT представляют собой 2'-дезоксаденозин-3'-фосфат, 2'-дезоксцитидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат и 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой нуклеиновую кислоту аденозингликоля (GNA); и

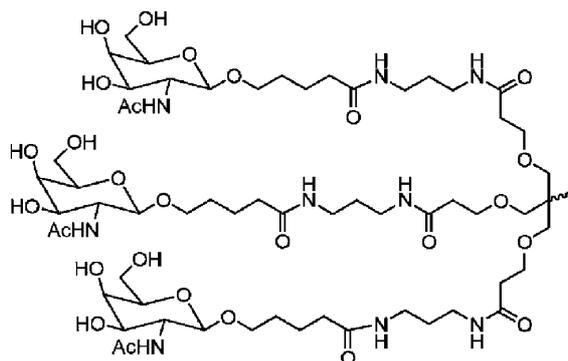
s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь агента дцРНК содержит 3'-выступ, состоящий по меньшей мере из 1 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мер, e одна цепь агента дцРНК содержит 3'-выступ из 2 нуклеотидов.

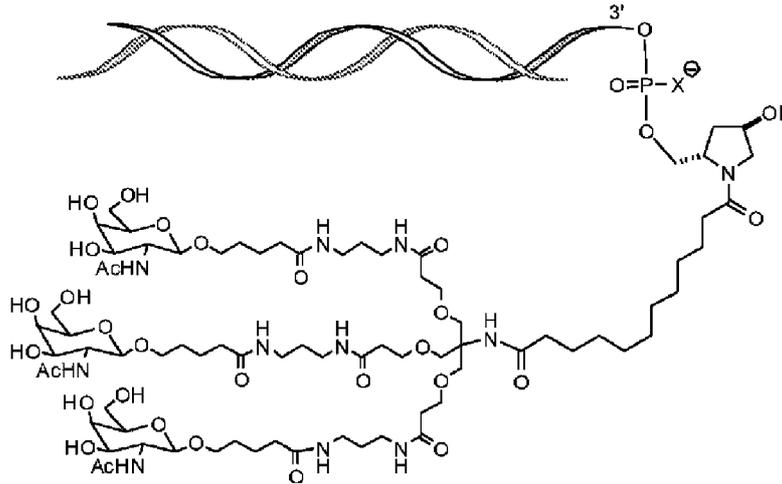
В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область агента дцРНК имеет длину 19-21 пар нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления каждая цепь агента дцРНК независимо имеет 19-23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь агента дцРНК независимо имеет 19-21 нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК дополнительно содержит лиганд. В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи агента дцРНК. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc). В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой



В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме.



где X представляет собой O или S. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой O. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности, как изложено в:

- 5'-usGfsuga (Agn) gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3'(SEQ ID NO: 16),
 5'-usGfsuga (Agn) gcgaaguGfdCAfcacsusu-3'(SEQ ID NO: 18),
 5'-usGfsudGa (Agn) gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3'(SEQ ID NO: 20),
 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3'(SEQ ID NO: 23),
 5'-usGfsuga (Agn) dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3'(SEQ ID NO: 24),
 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3'(SEQ ID NO: 25), или
 5'-usGfsuga (Agn) gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3'(SEQ ID NO: 28),

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

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

dA, dC, dG и dT представляют собой 2'-дезоксаденозин-3'-фосфат, 2'-дезоксцитидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат и 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой нуклеиновую кислоту аденозингликоля (GNA); и
 s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается агент дцРНК, в котором смысловая цепь и антисмысловая цепь состоят из модифицированных нуклеотидных последовательностей, как изложено в:

- (a) 5'-usGfsuga (Agn) gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 16) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);
 (b) 5'-usGfsuga (Agn) gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 18) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);
 (c) 5'-usGfsudGa (Agn) gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 20) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);
 (d) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 23) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);
 (e) 5'-usGfsuga (Agn) dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 24) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);
 (f) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO: 25) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29); или
 (g) 5'-usGfsuga (Agn) gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 28) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);

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

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

dA, dC, dG и dT представляют собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфат, 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат и 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, соответственно;
(Agn) представляет собой нуклеиновую кислоту аденозингликоля (GNA);
s представляет собой фосфоротиоатную связь; и
3'-конец смысловой цепи конъюгирован с лигандом N-[трис (GalNAc-алкил) амидодеканойл] - 4-гидроксипролинол (L96).

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к клетке, содержащей агент дцРНК, раскрытому в данном документе.

В настоящем описании также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая агент дцРНК, описанный в данном документе и фармацевтический наполнитель.

В настоящем раскрытии также предлагается способ ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В (HBV) в клетке, при этом способ включает контактирование клетки с агентом дцРНК или фармацевтической композицией, как раскрыто в данном документе, что тем самым ингибирует экспрессию гена HBV в клетке. В некоторых вариантах осуществления клетка находится внутри субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает заболеванием, связанным с HBV. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена HBV ингибируется по меньшей мере на 80%, 90%, 95% или 98% или падает ниже уровня обнаружения аналитического метода.

В настоящем описании также предлагается способ ингибирования репликации вируса гепатита В (HBV) в клетке, при этом способ включает контактирование клетки с агентом дцРНК или фармацевтической композицией, как раскрыто в данном документе, что тем самым ингибирует репликацию HBV в клетке. В некоторых вариантах осуществления клетка находится внутри субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает заболеванием, связанным с HBV. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления репликация HBV в клетке ингибируется по меньшей мере на 80%, 90%, 95% или 98% или падает ниже уровня обнаружения метода анализа.

В настоящем документе также предлагается способ снижения уровня антигена вируса гепатита В (HBV) у субъекта, инфицированного HBV, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента дцРНК или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, что тем самым снижает уровень антигена HBV у субъекта. В некоторых вариантах осуществления антигеном HBV является HBsAg. В некоторых вариантах осуществления антигеном HBV является HBeAg. В некоторых вариантах осуществления антиген HBV измеряется в сыворотке, полученной от субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект является HBeAg-положительным. В некоторых вариантах осуществления субъект является HBeAg-отрицательным. В некоторых вариантах осуществления уровень антигена HBV снижен в сыворотке по меньшей мере на 1 log₁₀, по меньшей мере на 2 log₁₀, по меньшей мере на 3 log₁₀ или по меньшей мере на 4 log₁₀; или находится ниже уровня обнаружения метода анализа.

В настоящем раскрытии также предлагается способ снижения вирусной нагрузки вируса гепатита В (HBV) у субъекта, инфицированного HBV, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента дцРНК или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, что тем самым снижает вирусную нагрузку HBV у субъекта. В некоторых вариантах осуществления уровень вирусной нагрузки HBV измеряется в сыворотке субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект является HBeAg-положительным. В некоторых вариантах осуществления субъект является HBeAg-отрицательным. В некоторых вариантах осуществления вирусная нагрузка HBV снижается в сыворотке по меньшей мере на 1 log₁₀, по меньшей мере на 2 log₁₀, по меньшей мере на 3 log₁₀ или по меньшей мере на 4 log₁₀; или падает ниже уровня обнаружения методом анализа.

В настоящем документе также предоставляется способ лечения субъекта, страдающего инфекцией вируса гепатита В (HBV) или связанного с HBV расстройства, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента дцРНК или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, таким образом способствующий лечению субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект является HBeAg-положительным. В некоторых вариантах осуществления субъект является HBeAg-отрицательным. В некоторых вариантах осуществления ассоциированное с HBV расстройство представляет собой хронический гепатит, и субъект является HBeAg-положительным. В некоторых вариантах осуществления ассоциированное с HBV расстройство представляет собой хронический гепатит, и субъект является HBeAg-отрицательным.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов агент дцРНК вводят субъекту в дозе от 0,01 мг/кг до 10 мг/кг, от 0,5 мг/кг до 50 мг/кг или от 3 мг/кг до 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления способов агент дцРНК вводят субъекту в дозе от 3 мг/кг до 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления способов агент дцРНК вводят субъекту в фиксированной дозе от 50 мг до 200 мг.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов агент дцРНК вводят субъекту подкожно.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов агент дцРНК вводят субъекту в двух или более дозах.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов агент дцРНК вводят субъекту один раз в месяц, один раз каждые два месяца или один раз каждые три месяца. В некоторых вариантах осуществления способов агент дцРНК вводят субъекту не чаще одного раза в месяц.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов способ дополнительно включает введение субъекту дополнительного терапевтического агента, например, одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. Дополнительный терапевтический агент может включать, помимо прочего, противовирусный агент, ингибитор обратной транскриптазы, иммуностимулятор, терапевтическую вакцину, ингибитор проникновения вируса, олигонуклеотид, ингибирующий секрецию или высвобождение HbsAg, ингибитор капсида, и ковалентно замкнутый кольцевой (ccc) ингибитор ДНК HBV, а также комбинацию любых из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор обратной транскриптазы.

В некоторых вариантах осуществления вводят более одного дополнительного терапевтического агента, и дополнительные терапевтические агенты представляют собой ингибитор обратной транскриптазы и иммуностимулятор. Ингибитор обратной транскриптазы может включать, без ограничения такими, тенофовир дизопроксил фумарат (TDF), тенофовир алафенамид, ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин и AGX-1009. Иммуный стимулятор может включать, без ограничения таковыми, пегилированный интерферон альфа 2a (ПЕГ-ИФН- α 2a), интерферон альфа-2b, рекомбинантный человеческий интерлейкин-7 и агонист Toll-подобного рецептора 7 (TLR7).

В данном документе также представлены композиции для практического применения любого из способов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается агент дцРНК или фармацевтическая композиция, раскрытые в настоящем документе, для применения при лечении инфекции вируса гепатита В (HBV) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается агент дцРНК или фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, для применения при лечении расстройства, связанного с вирусом гепатита В (HBV), у субъекта. В некоторых вариантах осуществления ассоциированное с HBV расстройство представляет собой хронический гепатит, и субъект является HBeAg-положительным. В некоторых вариантах осуществления ассоциированное с HBV расстройство представляет собой хронический гепатит, и субъект является HBeAg-отрицательным. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят или вводили дополнительный терапевтический агент, например, противовирусный агент, ингибитор обратной транскриптазы, иммуностимулятор, терапевтическую вакцину, ингибитор проникновения вируса, олигонуклеотид, ингибирующий секрецию или высвобождение HbsAg, ингибитор капсида или ингибитор ковалентно замкнутой кольцевой ДНК HBV, или комбинацию любых из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор обратной транскриптазы, например тенофовир дизопроксил фумарат (TDF), тенофовир алафенамид, ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин или AGX-1009. В некоторых вариантах осуществления вводимые дополнительные терапевтические агенты представляют собой ингибитор обратной транскриптазы (например, тенофовир дизопроксил фумарат (TDF), тенофовир алафенамид, ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин или AGX-1009) и иммуностимулятор (например, пегилированный интерферон альфа 2a (PEG-IFN- α 2a), интерферон альфа-2b, рекомбинантный человеческий интерлейкин-7 или агонист Toll-подобного рецептора 7 (TLR7)).

Настоящее изобретение предусматривает использование агента дцРНК или фармацевтической композиции, как раскрыто в данном документе, для практического применения любого из вышеупомянутых способов.

Настоящее изобретение также предусматривает использование агента дцРНК, как раскрыто в данном документе, для приготовления или производства лекарственного средства для практического применения любого из вышеупомянутых способов.

В настоящем описании также представлены наборы, содержащие агент дцРНК или фармацевтическую композицию, раскрытые в данном документе, необязательно с инструкциями по практическому применению способа, описанного в данном документе.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 схематично изображена структура двухцепочечного генома HBV размером примерно 3,2 т.п.н. Репликация генома HBV происходит с образованием промежуточных продуктов РНК и дает 4 перекрывающихся вирусных транскрипта (транскрипт длиной примерно 3,5 т.п.н., транскрипт длиной примерно 2,4 т.п.н., транскрипт длиной примерно 2,1 т.п.н. и транскрипт длиной примерно 0,7 т.п.н.), кодирующих семь вирусных белков (pre-S1, pre-S2, S, P, X, pre-C и C), транслирующихся с помощью трех рамок считывания.

На фиг. 2А, В показаны (А) концентрации HbsAg в сыворотке (нг/мл) и (В) уровни HbsAg в сыворотке по сравнению с концентрацией таковых до введения дозы (pre-dose) на мышинной модели AAV-HBV. На фиг. 2А показаны уровни HbsAg в сыворотке мышей HBV-AAV до введения дозы (24, -2, 0 дни) или после однократной дозы AD-81890 в количестве 0,3, 1 или 3 мг/кг (Дни 14, 21, 33, 47, 59, 74). Каждая точка представляет собой среднее значение для n=6-9 животных, а столбцы показывают стан-

дартное отклонение. На фиг. 2B показаны уровни HBsAg в сыворотке мышей HBV-AAV относительно таковых до введения дозы (дни -24, -2, 0) или после однократной дозы AD-81890 в количестве 0,3, 1 или 3 мг/кг (дни 14, 21, 33, 47, 59, 74). Каждая точка представляет собой среднее значение n из 6-9 животных, а столбцы показывают стандартное отклонение.

На фиг. 3 показаны уровни сывороточного HBsAg относительно таковых до введения дозы на модели мыши AAV-HBV на -55, -27, -13, 0, 14, 28, 42, 56, 84, 112 и 140 дни. Режимы дозирования включают контроль (PBS) Q2W×6; AD-66810 (1 мг/кг; Q2W×6); AD-81890 (1 мг/кг; Q2W×6); AD-81890 (1 мг/кг; QM×3); AD-81890 (3 мг/кг; Q2W×6); AD-81890 (3 мг/кг; QM×3); и AD-81890 (9 мг/кг; QM×1). Первую дозу вводили в день 0. Каждая точка представляет собой среднее значение n из 4-6 животных, а столбцы показывают стандартное отклонение.

На фиг. 4 показаны прямоугольные диаграммы, показывающие \log_2 кратное изменение (обработка/контроль) для всех генов, экспрессия которых подавлена в значительной степени, (скорректированное значение $p < 0,05$, \log_2 кратное изменение < 0) для AD-66810 или AD-81890. Толстые горизонтальные линии представляют медианное изменение кратности \log_2 , вертикальный диапазон каждого квадрата показывает межквартильный диапазон (IQR), а "усы" простираются до $\pm 1,58 \text{ IQR}/\sqrt{N}$, где N - количество генов в каждой группе. Статистическая значимость оценивалась с помощью двустороннего двухвыборочного t -критерия Уэлча.

На фиг. 5A, B показаны уровни ALT у мышей PXB по временной шкале после введения AD-66810 (фиг. 5A) или AD-81890 (фиг. 5B) по сравнению с мышами, которым вводили PBS. Мышам вводили 12, 36 или 100 мг/кг AD-66810, AD-81890 или PBS (контроль) путем подкожной инъекции ($n=4$ на группу) в дни 0, 21, 28, 35 и 42. Кровь собирали ретроорбитальным кровотоком два раза в неделю, а сыворотку обрабатывали стандартными методами.

Подробное описание

В настоящем описании представлены композиции агентов дцРНК, влияющих на опосредованное РНК-индуцированным комплексом молчания (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена вируса гепатита В (HBV). Ген может находиться внутри клетки, например, клетки, локализованной внутри субъекта, такого как человек. Использование этих дцРНК позволяет целенаправленно расщеплять мРНК соответствующего гена (гена HBV) у млекопитающих.

Описанные здесь дцРНК агенты были разработаны для нацеливания на области генома HBV, являющиеся консервативными по меньшей мере для восьми известных генотипов HBV. Кроме того, агенты дцРНК по настоящему изобретению были разработаны для ингибирования всех стадий жизненного цикла HBV, например, репликации, сборки, секреции вируса и секреции суб-вирусных антигенов, путем подавления экспрессии более чем одного гена HBV. В частности, поскольку транскрипция генома HBV приводит к полицистронным, перекрывающимся РНК, в некоторых вариантах осуществления агент дцРНК, нацеленный на один ген HBV, приводит к значительному ингибированию экспрессии большинства или всех транскриптов HBV. Например, поскольку геном HBV транскрибируется в единственную мРНК, дцРНК-агент по настоящему раскрытию, нацеленный на ген S, приведет к ингибированию не только экспрессии S-гена, но также экспрессии гена полимеразы "ниже по течению". Кроме того, агенты дцРНК по настоящему изобретению были разработаны для ингибирования репликации вируса HBV путем нацеливания на структурные гены HBV, и ген X HBV, тем самым позволяя иммунной системе субъекта выявлять HBsAg и реагировать на его присутствие (HbsAg), чтобы продуцировать анти-HBV антитела для излечения от инфекции HBV. Без ограничения теории, считается, что комбинация или субкомбинация вышеуказанных свойств и конкретных сайтов-мишеней или конкретных модификаций этих агентов дцРНК придает агентам дцРНК по настоящему раскрытию улучшенную эффективность, стабильность, безопасность, эффективность и долговечность.

Проведя анализы *in vitro* и *in vivo*, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что агенты дцРНК, нацеленные на ген HBV, способны эффективно опосредовать РНКи (RNAi), что приводит к значительному ингибированию экспрессии более чем одного гена HBV. Таким образом, способы и композиции, включающие данные агенты дцРНК, применимы для лечения субъектов, диагностированных как имеющих инфекцию HBV или связанное с HBV заболевание, такое как хронический гепатит В (CHB).

Соответственно, в настоящем описании также представлены способы лечения субъекта, страдающего расстройством, для которого может быть эффективно ингибирование или снижение экспрессии гена HBV, например, при наличии связанного с HBV заболевания, такого как хроническая инфекция вируса гепатита В (CHB), с помощью композиции агентов дцРНК, влияющих на опосредованное РНК-индуцированным комплексом молчания (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена HBV.

Агенты дцРНК по настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область комплементарности, которая составляет в длину около 19-21 нуклеотидов, например, около 19 нуклеотидов, которая по существу комплементарна, по меньшей мере, части транскрипта мРНК гена HBV по крайней мере одного генотипа HBV. Понятно, что существует множество генотипов HBV, и, таким образом, агент дцРНК по настоящему раскрытию может различаться по степени комплементарности с различными генотипами HBV.

В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи образуют дуплекс из 19-21 смежных нуклеотидов.

Последующее подробное описание раскрывает, как приготовить и использовать композиции, содержащие агенты дцРНК, для ингибирования экспрессии гена HBV, а также композиции, применения и способы лечения субъектов, страдающих заболеваниями и расстройствами, которые могут выиграть от ингибирования или снижения экспрессии гена HBV.

I. Определения.

Для облегчения понимания настоящего раскрытия сначала даны определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что всякий раз, когда приводится значение или диапазон значений параметра, предполагается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также должны принадлежать этому параметру.

Если контекст не требует иного, во всем настоящем описании и формуле изобретения слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", следует толковать в открытом, включающем смысле, то есть в смысле "содержащий, без ограничения таковым(и)". "Состоит из" означает исключение более чем следовых элементов других ингредиентов или существенных этапов способа, описанных в данном документе. Например, полинуклеотид "состоит из последовательности нуклеотидов", если он не включает никаких дополнительных нуклеотидов, но не препятствует включению лиганда, например, лиганда нацеливания, или модификаций. Термин "состоящий по существу из" ограничивает объем формулы изобретения указанными материалами или этапами или теми материалами, которые существенно не влияют на основные характеристики заявленного изобретения. Например, фармацевтическая композиция, состоящая по существу из элементов, как определено в данном документе, не исключает как следовых примесей, свойственных способу выделения и очистки, так и фармацевтически приемлемых носителей, таких как физиологический раствор на фосфатном буфере, консерванты и тому подобное. Точно так же полинуклеотид "состоит по существу из" нуклеотидной последовательности, если полинуклеотид включает дополнительные нуклеотиды, которые составляют не более 20% длины полинуклеотида и существенно не влияют на активность полинуклеотида (например, не изменяют активность полинуклеотида более чем на 50%). Варианты осуществления, определенные каждым из переходных терминов, входят в объем настоящего изобретения.

Артикли "а" и "ан" используются здесь для обозначения одного или более чем одного (то есть, по меньшей мере, одного) грамматического объекта статьи. Например, "элемент" означает один или более одного элемента, например, множество элементов.

Термин "включающий" используется здесь для обозначения "включающий, без ограничения таковыми таковым(и)" и используется взаимозаменяемо с этой фразой.

Термин "или" используется в данном документе для обозначения "и/или" и используется взаимозаменяемо с термином "и/или", если контекст явно не указывает иное. Например, "смысловая цепь или антисмысловая цепь" понимается как "смысловая цепь или антисмысловая цепь, или смысловая цепь и антисмысловая цепь".

Термин "примерно" используется здесь для обозначения величин в пределах типичных диапазонов допусков, принятых в данной области техники. Например, "примерно" можно понимать как значение в пределах 2 стандартных отклонений от среднего. Когда "примерно" присутствует перед серией чисел или диапазоном, понятно, что "примерно" может изменять каждое из чисел в серии или диапазоне.

Термин "по крайней мере/по меньшей мере" перед числом или серией чисел понимается как каждое число в серии и все последующие числа или целые числа, которые могут быть логически включены, как ясно из контекста. Например, количество нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, "по меньшей мере 18 нуклеотидов из 21 нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты" означает, что указанным свойством обладают 18, 19, 20 или 21 нуклеотид. Когда "по крайней мере" присутствует перед серией чисел или диапазоном, подразумевается, что "по крайней мере" может изменять каждое из чисел в серии или диапазоне.

Используемые здесь термины "не более чем" или "меньше чем" понимаются как значение, смежное с фразой, и логически более низкие значения или целые числа, соответствующие контексту, до нуля. Например, дуплекс с выступом из "не более 2 нуклеотидов" имеет выступ в 2, 1 или 0 нуклеотидов. Когда перед серией чисел или диапазоном присутствует "не более чем", подразумевается, что "не более чем" может изменять каждое из чисел в серии или диапазоне.

Используемые здесь диапазоны включают как верхний, так и нижний предел.

В случае конфликта между последовательностью и ее указанным сайтом в транскрипте или другой последовательности, нуклеотидная последовательность, указанная в описании, имеет приоритет.

Различные варианты осуществления настоящего раскрытия могут быть объединены на основании мнения специалиста в данной области техники.

Используемый здесь термин "вирус гепатита В", используемый взаимозаменяемо с термином "HBV", относится к хорошо известному нецитопатическому, тропному для печени ДНК-вирусу, принадлежащему к семейству *Hepadnaviridae*.

Геном HBV представляет собой частично двухцепочечную кольцевую ДНК с перекрывающимися

рамками считывания (см., например, фиг. 1).

Существует четыре транскрипта разной длины, кодируемые геномом HBV (которые могут упоминаться здесь как "гены" или "открытые рамки считывания"). Они содержат открытые рамки считывания, называемые С, Х, Р и S. Основной белок кодируется геном С (HbcAg). Е-антиген гепатита В (HBeAg) продуцируется протеолитическим процессингом пре-корового (пре-С) белка. ДНК-полимераза кодируется геном Р. Ген S - это ген, кодирующий поверхностные антигены (HBsAg). Ген HBsAg представляет собой одну длинную открытую рамку считывания, которая содержит три "стартовых" кодона в рамке (ATG), в результате чего образуются полипептиды трех разных размеров, называемые большим, средним и малым S-антигенами, пре-S1+пре-S2+S, пре-S2+S, или S. Поверхностные антигены не только находятся на оболочке HBV, но и являются частью субвирусных частиц, которые продуцируются в большом избытке по сравнению с частицами вирионов, и играют заметную роль в иммунной толерантности и секвестрации анти-HbsAg антитела, что позволяет инфекционным частицам ускользать от иммунного обнаружения. Функция неструктурного белка, кодируемого геном Х, до конца не изучена, но он играет роль в транскрипционной трансактивации и репликации и связан с развитием рака печени.

HBV - один из немногих ДНК-вирусов, которые используют обратную транскриптазу в процессе репликации, включающем несколько стадий, включая проникновение, снятие оболочки и транспортировку вирусного генома к ядру. Первоначально репликация генома HBV включает образование промежуточного интермедиата РНК, которая затем подвергается обратной транскрипции с образованием ДНК-вирусного генома.

При инфицировании клетки HBV релаксированная кольцевая ДНК вирусного генома (ДНК, rcDNA) транспортируется в ядро клетки и превращается в эписомальную ковалентно замкнутую кольцевую ДНК (cccDNA), которая служит матрицей транскрипции для вирусных мРНК. После транскрипции и ядерного экспорта цитоплазматическая вирусная прегеномная РНК (пгРНК, pgRNA) собирается в комплекс с полимеразой HBV и белками капсида с образованием нуклеокапсида, внутри которого катализируемая полимеразой обратная транскрипция дает минус-цепь ДНК, которая впоследствии копируется в плюс-цепь ДНК с образованием генома потомства rcDNA. Зрелые нуклеокапсиды затем либо упаковываются с белками вирусной оболочки для выхода в виде частиц вириона, либо перемещаются в ядро для амплификации резервуара cccDNA посредством внутриклеточного пути амплификации cccDNA. cccDNA является важным компонентом цикла репликации HBV и отвечает за формирование инфекции и персистенности вируса.

Инфекция HBV заключается в образовании двух типов различных частиц: 1) частиц инфекционного вируса HBV (или Dane particle), которая состоит из собранного из HbcAg и покрытого оболочкой вирусного капсида, состоящего из липидной мембраны с поверхностными антигенами HBV, и 2) субвирусных частиц (или SVP), которые содержат малую и среднюю формы поверхностного антигена гепатита В HBsAg, и которые не являются инфекционными. На каждую произведенную вирусную частицу в кровь попадает более 10000 SVP. Таким образом, SVP (и белок HBsAg, который они несут) составляют подавляющее большинство вирусного белка в крови. Клетки, инфицированные HBV, также секретируют растворимый протеолитический продукт пре-core белка, называемый е-антигеном HBV (HBeAg).

Было определено восемь генотипов HBV, обозначенных от А до Н и предложены два дополнительных генотипа I и J, каждый из которых имеет свое географическое распространение. Вирус не является цитопатическим, но при этом вирусоспецифический клеточный иммунитет является основным фактором, определяющим исход воздействия острой HBV-инфекции с разрешением заболеваний печени через 6 месяцев или хронической HBV-инфекции, которая часто связана с прогрессирующим поражением печени.

Термин "HBV" включает любой из генотипов HBV (от А до J). Полная кодирующая последовательность эталонной последовательности генома HBV может быть найдена, например, в GenBank под номерами доступа GI: 21326584 (SEQ ID NO: 1) и GI: 3582357 (SEQ ID NO: 3). Антисмысловые последовательности представлены в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 соответственно. Аминокислотные последовательности для белков С, Х, Р и S можно найти, например, по номерам доступа NCBI YP_009173857.1 (белок С) (SEQ ID NO: 37); YP_009173867.1 и BAA32912.1 (Х-белок) (SEQ ID NO: 36 и 40); YP009173866.1 и BAA32913.1 (белок Р) (SEQ ID NO: 32 и 38); и YP_009173869.1, YP_009173870.1, YP_009173871.1 и BAA32914.1 (S-белок) (SEQ ID NO: 33, 34, 35, 39). Последовательности белков и ДНК генотипа D HBV штамма ауw представлены в SEQ ID NO: 36-37. Последовательности белков и ДНК генотипа С HBV представлены в SEQ ID NO: 38-39. Дополнительные примеры последовательностей белка HBV и ДНК или их обратных комплементарных цепей представлены в SEQ ID NO: 41-49.

Дополнительные примеры последовательностей мРНК HBV легко доступны с использованием общедоступных баз данных, например, GenBank, UniProt и OMTM. Доступ к Международному репозиторию данных о штамме вируса гепатита В можно получить по адресу <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/HepSEQ/main.php>.

Используемый здесь термин "HBV" также относится к встречающимся в природе вариациям последовательности ДНК генома HBV, например, генотипам А-J и их вариантам.

Используемый здесь термин "вирус гепатита D", используемый взаимозаменяемо с термином "HDV", относится к хорошо известному нецитопатическому, тропному для печени ДНК-вирусу, принад-

лежащему к семейству Hepadnaviridae. См., например, публикации Ciancio and Rizzetto, *Nat. Rev.* 11:68-71, 2014; Le Gal et al., *Emerg. Infect. Dis.* 12:1447-1450, 2006; и Abbas and Afzal, *World J. Hep.*, 5:666-675, 2013, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Если не указано иное, HDV относится ко всем классам и вариантам HDV.

HDV производит один белок, а именно HDAg. Он бывает двух видов; большой HDAg 27 кДа (также называемый 1HD, L-HDAg и большим антигеном HDV) и малый HDAg 24 кДа (также называемый sHD, S-HDAg и малым антигеном HDV). N-концы обеих форм идентичны; они различаются 19 аминокислотами на С-конце большого HDAg. Обе изоформы продуцируются из одной и той же рамки считывания, которая содержит стоп-кодон UAG в кодоне 196 и обычно продуцирует только small-HDAg. Однако редактирование клеточным ферментом аденозиндезаминазой-1 изменяет стоп-кодон на UCG, позволяя продуцировать большой HDAg. Несмотря на то, что эти последовательности идентичны на 90%, эти два белка играют разные роли в ходе инфекции. HDAg-S продуцируется на ранних стадиях инфекции, проникает в ядро и поддерживает репликацию вируса. HDAg-L, напротив, вырабатывается на более поздних стадиях инфекции, действует как ингибитор репликации вируса и является необходимым для сборки вирусных частиц.

Дополнительные примеры последовательностей мРНК HDV легко доступны с использованием общедоступных баз данных, например, GenBank, UniProt и OMIM.

Используемый здесь термин "HDV" также относится к встречающимся в природе вариациям последовательности ДНК генома HDV.

Используемый здесь термин "аналог нуклеотида(ов)" или "ингибитор обратной транскриптазы" представляет собой ингибитор репликации ДНК, который структурно подобен нуклеотиду или нуклеозиду, специфически ингибирует репликацию сссDNA HBV и не ингибирует в значительной степени репликацию ДНК хозяина (например, человека). Такие ингибиторы включают тенофовир дизопроксил фумарат (TDF), тенофовир алафенамид (TAF), ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин, AGX-1009, эмтрицитабин, клевудин, ритонавир, фамбуцивоксил, фамбуцивоксил, Цистеин (NAC), PC1323, терадигм-HBV, тимозин-альфа, ганцикловир, бесифовир (ANA-380/LB-80380) и тенофовир-эксалиадес (TLX/CMX157). В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеотида(ов) представляет собой энтекавир (ETV). Аналоги нуклеотидов коммерчески доступны из ряда источников и используются в способах, представленных в настоящем документе, в соответствии с указанием на их этикетке (например, обычно вводятся перорально в определенной дозе) или по указанию квалифицированного практикующего врача при лечении HBV.

Используемый здесь термин "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена HBV, и включает мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции. В некоторых вариантах осуществления целевая часть последовательности будет, по меньшей мере, достаточно длинной, чтобы служить субстратом для управляемого агентом дцРНК расщепления в части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена HBV или рядом с ней.

Последовательность-мишень может иметь длину от 19 до 21 нуклеотида, например, 19, 20 или 21 нуклеотид в длину.

Используемый здесь термин "цепь, содержащая последовательность" относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описывается последовательностью, указанной с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждый из "G", "C", "A", "T" и "U" обычно означает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания соответственно. Однако следует понимать, что термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, а также замещающему фрагменту (См., например, табл. 1). Специалисту хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть заменены другими фрагментами без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой замещающий фрагмент. Например, без ограничения таким примером, нуклеотид, содержащий инозин в качестве основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях дцРНК, представленной в настоящем описании, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида можно заменить гуанином и урацилом, соответственно, для образования G-U спаривания при неканоническом Вобл(Wobble)-спаривании с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие замещающие фрагменты, подходят для композиций и способов, представленных в настоящем описании.

Термины "агент дцРНК (dsRNA)", "агент РНКи (RNAi)", "агент иРНК, агент iRNA", "иРНК, iRNA" и "агент РНК-интерференции", используемые здесь взаимозаменяемо, и в значении, принятом в настоящем документе, относятся к агенту, содержащему РНК, и опосредующему нацеленное расщепление РНК-транскрипта посредством вовлечения РНК-индуцированного комплекса молчания (RISC). Агент дцРНК направляет расщепление мРНК, специфичное для последовательности, посредством процесса, известного как РНК-интерференция (РНКи, RNAi). Агент дцРНК модулирует, например, ингибирует

экспрессию гена HBV (например, одного или нескольких генов HBV) в клетке, например, в клетке внутри субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

"Агент дцРНК" для использования в композициях, применениях и способах, раскрытых в данном документе, представляет собой двухцепочечную РНК и упоминается здесь как "агент дцРНК", "агент двухцепочечной РНК", "молекула двухцепочечной РНК (дцРНК, dsRNA)", "dsRNAi", "iRNA", "iRNA agent", "dsRNAi agent", "RNAi agent" или "siRNA". Термин "дцРНК" относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющему дуплексную структуру, включающую две антипараллельные и, по существу, комплементарные цепи нуклеиновой кислоты, упоминаемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентацию по отношению к РНК-мишени, т.е. гену HBV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дцРНК запускает деградацию целевой РНК, например, мРНК, посредством посттранскрипционного механизма подавления гена, называемого здесь РНК-интерференцией или РНКи.

В общем и целом, каждая цепь молекулы дцРНК может содержать рибонуклеотиды, но, как подробно описано в данном документе, каждая или обе цепи могут также включать один или несколько нерибонуклеотидов, например дезоксирибонуклеотид или модифицированный нуклеотид. Кроме того, как используется в данном описании, "агент дцРНК" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; агент дцРНК может включать существенные модификации множества нуклеотидов. Используемый здесь термин "модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, имеющему, независимо, модифицированный фрагмент сахара, модифицированную межнуклеотидную связь или модифицированное азотистое основание. Таким образом, термин "модифицированный нуклеотид" включает замены, добавления или удаления, например, функциональной группы или атома, межнуклеозидных связей, фрагментов сахара или азотистых оснований. Модификации, подходящие для использования в агентах настоящего раскрытия, включают все типы модификаций, раскрытые в данном документе или известные в данной области. Любые такие модификации, используемые в молекуле типа агента дцРНК, охватываются "агентом дцРНК" для целей данного описания и формулы изобретения.

Термин "ингибирование" в контексте данного документа используется взаимозаменяемо с терминами "уменьшение", "подавление", "сайленсинг", "даунрегуляция" и другими подобными терминами и включает любой уровень ингибирования. Предпочтительно, ингибирование включает статистически значимое или клинически значимое ингибирование.

Фраза "подавление экспрессии HBV" или "подавление экспрессии гена HBV" в контексте настоящего описания включает ингибирование экспрессии любого гена HBV (например, гена HBV, экспрессированного из HBV при вирусной инфекции HBV или гена HBV, экспрессированного из экспрессирующей конструкции в клетке), а также ингибирование экспрессии вариантов или мутантов по гену HBV, кодирующих белок HBV. Термины включают нокдаун любого транскрипта HBV (например, транскрипта 3,5 т.п.н., 2,4 т.п.н., 2,1 т.п.н. или 0,7 т.п.н.), кодирующего один или несколько вирусных белков HBV (таких как, например, preS1/2-S, preS, S, P, X, preC и C), а также нокдаун вариантов или мутантов гена HBV.

"Ингибирование экспрессии гена HBV" включает любой уровень ингибирования гена или транскрипта HBV, например, по меньшей мере, частичное подавление экспрессии гена HBV, например Гена S, P, X или C HBV или любой комбинации таковых, например S, P и C. Экспрессия гена HBV может быть оценена на основе уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена HBV, например, уровня мРНК HBV или уровня белка HBV, или уровня сссDNA HBV. Этот уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, включая, например, образец, полученный от субъекта, например, уровни можно отслеживать в сыворотке. Ингибирование можно оценить по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может быть любым типом контрольного уровня, который используется в данной области, например, базовым уровнем перед введением дозы или уровнем, определенным для подобного субъекта, или средним уровнем по популяции для соответствующего контрольного субъекта, уровнем клетки или образца, которые либо не были подвергнуты обработке, либо обработанных контрольным агентом (например, только буфером или неактивным агентом).

В некоторых вариантах осуществления способов настоящего раскрытия экспрессия гена HBV ингибируется по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, например, ингибируется у субъекта по меньшей мере на 1 log 10, 2 log 10, 3 log 10, или 4 log 10, или падает ниже уровня обнаружения анализа. В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование экспрессии гена HBV у субъекта приводит к клинически значимому ингибированию уровня экспрессии гена, например, ингибируется в достаточной степени для обеспечения эффективного иммунного ответа против белка HBV, как при введении отдельно, так и в комбинации с другими агентами для стимулирования или усиления иммунного ответа.

В клеточном анализе *in vitro* или экспрессии гетерологичного гена в модели *in vivo*, например, на модели AAV-hHBV мыши, представленной в настоящем документе, предпочтительно ингибирование общей экспрессии HBV по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 1 log 10, 2 log 10 или 3 log 10. При лечении субъекта с инфекцией HBV предпочтительно снижение уровня гена или белка HBV по меньшей мере на 90%, т.е. наблюдается 90% разница в уровне гена или белка HBV до и после лечения. Для достижения желаемого уровня ингибирования может потребоваться более одной дозы.

Ингибирование экспрессии гена HBV может проявляться в уменьшении количества РНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется HBV ген и которые были обработаны или получены от субъекта, подвергшегося лечению (например, путем контакта клетки или клеток с агентом дцРНК по настоящему раскрытию или путем введения агента дцРНК по настоящему раскрытию субъекту, у которого такие клетки присутствуют или присутствовали) таким образом, что экспрессия гена HBV ингибируется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичными первой клетке или группе клеток, но которые не подвергались обработке или получены от субъекта, не подвергавшегося такому лечению (контрольная клетка (клетки)). В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование оценивается методом rtPCR, представленным в Примере 2 WO2016/077321 (этот метод включен в настоящий документ посредством ссылки), при этом анализы *in vitro* выполняются на подходящей клеточной линии при концентрации дуплекса 10 нМ и выражают уровень мРНК в обработанных клетках как процент от уровня мРНК в контрольных клетках, рассчитанный по следующей формуле:

$$\frac{(\text{мРНК контрольных клеток}) - (\text{мРНК обработанных клеток})}{(\text{мРНК контрольных клеток})} \times 100\%$$

Альтернативно ингибирование экспрессии гена HBV можно оценивать с точки зрения снижения параметра, функционально связанного с экспрессией гена HBV. Сайленсинг гена HBV можно определить в любой клетке, экспрессирующей ген HBV, либо конститутивно, либо с помощью геномной инженерии, а также с помощью любого анализа, известного в данной области техники.

Ингибирование экспрессии белка HBV может проявляться снижением уровня белка HBV, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессированного в образце, полученном от субъекта). Как объяснено выше, для оценки ингибирования мРНК ингибирование уровня экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток можно аналогичным образом выразить как процентное содержание белка в контрольной клетке или группе клеток или в сыворотке.

Контрольная клетка или группа клеток, которые можно использовать для оценки ингибирования экспрессии гена HBV, включают клетку или группу клеток до контакта с агентом дцРНК по настоящему раскрытию. Например, контрольная клетка или группа клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, человека или животного) до лечения субъекта дцРНК агентом. В альтернативных вариантах осуществления этот уровень можно сравнивать с таковым в соответствующей контрольной выборке, например, в известной контрольной выборке популяции.

Уровень РНК HBV, который экспрессируется клеткой или группой клеток, или уровень циркулирующей РНК HBV, может быть определен с использованием любого метода, известного в данной области техники для оценки экспрессии мРНК, предпочтительно с использованием метода rtPCR, представленного в Примере 2 WO2016./077321. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена HBV (например, общей РНК HBV, транскрипта HBV, например, транскрипта HBV 3,5 т.п.н.) в образце определяется путем обнаружения транскрибированного полинуклеотида или его части, например, РНК Гена HBV. РНК можно экстрагировать из клеток с использованием методов экстракции РНК, включая, например, экстракцию кислым фенолом/гуанидин-изотиоцианатом (RNAzol B; Biogenesis), наборов для приготовления РНК RNeasy (Qiagen®) или PAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализов, использующих гибридизацию рибонуклеиновой кислоты, включают методы повторного использования ядер (nuclear run-on assays), RT-PCR, анализы защиты от РНКазы (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12: 7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и анализ микрочипов. Циркулирующая мРНК HBV может быть обнаружена с использованием методов, описанных в WO 2012/177906, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена HBV определяется с использованием зонда нуклеиновой кислоты. Используемый здесь термин "зонд" относится к любой молекуле, способной избирательно связываться с конкретным геном HBV. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области техники или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды могут быть специально разработаны для маркировки. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают, без ограничения таковыми, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Изолированная РНК может использоваться в анализах гибридизации или амплификации, которые включают, без ограничения таковыми, нозерн-анализ, анализ полимеразной цепной реакции (ПНР) и наборы зондов. Один из методов определения уровня мРНК включает контактирование выделенной мРНК с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), способной гибридизоваться с мРНК HBV. В некоторых вариантах осуществления мРНК иммобилизована на твердой поверхности и приводится в контакт с зондом, например, путем прогона выделенной мРНК на агарозном геле и переноса мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В некоторых других вариантах реализации зонд(ы) иммобилизован(ы) на твердой поверхности, и мРНК контактирует с зондом(ами), например, в матрице генного чипа Affymetrix®. Квалифицированный специалист может легко адаптировать известные методы обнаружения мРНК для использования при определении уровня мРНК HBV.

Альтернативный метод определения уровня экспрессии гена HBV в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты или метод обратной транскриптазы (для получения кДНК), например, для определения мРНК в образце, например, с помощью RT-PCR (набор экспериментальных вариантов осуществления см. далее в Mullis, 1987, патент США № 4683202), цепной реакции лигазы (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193), самоподдерживающейся репликации последовательности (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878), системы транскрипционной амплификации (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6: 1197), репликации по типу катящегося кольца (rolling circle replication) (Lizardi et al., патент США № 5854033) или любого другого метода амплификации нуклеиновых кислот с последующим обнаружением амплифицированных молекул с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Эти схемы обнаружения особенно полезны для обнаружения молекул нуклеиновой кислоты тогда, когда такие молекулы присутствуют в очень небольшом количестве. В конкретных аспектах настоящего раскрытия уровень экспрессии гена HBV определяется с помощью количественной флуоресцентной RT-PCR (ОТ-ПЦР) (т.е. системы TaqMan™), например, с использованием метода, представленного в настоящем документе.

Уровни экспрессии РНК HBV можно контролировать с помощью мембранного блоттинга (например, используемого в гибридизационном анализе, таком как Нозерн-блоттинг, точечная гибридизация и т.п.) или гибридизации в микролунах, пробирках для образцов, гелях, гранулах или волокон (или на любой твердой подложке, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в настоящий документ посредством ссылки для получения информации, относящейся к таким способам. Определение уровня экспрессии HBV также может включать использование зондов нуклеиновых кислот в растворе.

В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии РНК оценивается с помощью ПЦР в реальном времени (qPCR). Использование этих способы описаны и проиллюстрированы в Примере 2 WO 2016/077321.

Уровень экспрессии белка HBV можно определить с помощью любого известного в данной области метода измерения уровней белка. Такие методы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC, ВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (TLC, ТСХ), гипердиффузионную хроматографию, реакции осаждения жидкости или геля, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), иммуноферментный анализ (ELISA), иммунофлуоресцентный анализ, электрохемилюминесцентный анализ и тому подобное.

дцРНК агенты.

Дуплексная область может иметь любую длину, допускающую специфическую деградацию желаемой РНК-мишени посредством RISC, и может составлять от примерно 19 до 21 пары оснований в длину, например, примерно составлять 19, 20 или 21 пару оснований в длину. Типичные агенты дцРНК, представленные в настоящем документе, включают дуплексы длиной 19-21 пар оснований.

Если две по существу комплементарные цепи дцРНК состоят из отдельных молекул РНК, эти молекулы не обязательно, но могут быть ковалентно связаны. Если две цепи ковалентно связаны посредством иных средств, чем непрерывная цепь нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующей дуплексную структуру, соединительная структура называется "линкер". Цепи РНК могут иметь одинаковое или разное количество нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований - это количество нуклеотидов в самой короткой цепи дцРНК за вычетом любых выступов, которые присутствуют в дуплексе. В дополнение к дуплексной структуре агент дцРНК может содержать один или несколько выступающих нуклеотидов.

Используемый здесь термин "нуклеотидный выступ" относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры двухцепочечного агента дцРНК. Например, когда 3'-конец одной цепи дцРНК выходит за пределы 5'-конца другой цепи или vice versa, то возникает нуклеотидный выступ. дцРНК может содержать выступ, по крайней мере, из одного нуклеотида; и, альтернативно, выступ может содержать два нуклеотида. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступающей части может присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах либо антисмысловой, либо смысловой цепи дцРНК. В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидный выступ находится на 3'-конце антисмысловой цепи.

"Тупой" или "тупой конец" означает, что на данном конце двухцепочечного агента дцРНК нет неспаренных нуклеотидов, то есть нет нуклеотидного выступа. Агент дцРНК с "тупыми концами" представляет собой дцРНК, которая является двухцепочечной по всей своей длине, то есть не имеет нуклеотидных выступов на любом конце молекулы. В некоторых вариантах осуществления агенты дцРНК настоящего раскрытия включают агенты дцРНК с выступами нуклеотидов на одном конце (т.е. агенты с одним выступом и одним тупым концом) или с выступами нуклеотидов на обоих концах.

Термин "антисмысловая цепь" или "направляющая цепь" относится к цепи агента дцРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна целевой последовательности, например, мРНК HBV. Используемый здесь термин "область комплементарности" относится к области на антисмысловой цепи, которая по существу комплементарна последовательности, например последовательности-мишени, например, нуклеотидной последовательности HBV, как определено здесь. Если область комплементарности неполностью комплементарна целевой последовательности, несовпадения могут быть во внутренних или концевых областях молекулы. Как правило, наиболее переносимые несовпадения находятся в концевых областях, например, в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от 5'- или 3'-конца агента дцРНК. В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК по настоящему раскрытию включает несовпадение нуклеотидов в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК по настоящему раскрытию включает несовпадение нуклеотидов в смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидное несоответствие находится, например, в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от 3'-конца агента дцРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидное несоответствие находится, например, в 3'-концевом нуклеотиде агента дцРНК.

Термин "смысловая цепь" или "цепь-пассажира", используемый в данном документе, относится к цепи агента дцРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи, как этот термин определен в данном документе.

В данном контексте, если не указано иное, термин "комплементарный", когда он используется для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться и образовывать дуплекс в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как должно быть понятно специалисту в данной области техники. Такими условиями могут быть, например, строгие условия, где строгие условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующей промывкой (См., например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Могут применяться и другие условия, такие как физиологически релевантные условия, которые могут присутствовать внутри организма. Квалифицированный специалист сможет определить набор условий, наиболее подходящих для теста комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизованных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности агента дцРНК, например, агента дцРНК, описанного здесь, подразумевают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности могут называться здесь "полностью комплементарными" по отношению друг к другу. Однако, если первая последовательность упоминается как "по существу комплементарная" по отношению ко второй последовательности в данном документе, две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одну или несколько, но обычно не более 4, 3 или 2 несовпадающих пар оснований (мисматчей) при гибридизации дуплекса до 21 пары оснований, сохраняя при этом способность гибридизоваться в условиях, наиболее подходящих для их конечного применения, например, для ингибирования экспрессии гена посредством RISC. Однако, если два олигонуклеотида предназначены для образования одного или нескольких одноцепочечных выступов после гибридизации, такие выступления не следует рассматривать как "несовпадающие" с точки зрения определения комплементарности. Например, агент дцРНК, содержащий один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, при этом более длинный олигонуклеотид включает последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может также называться "полностью комплементарным" для целей, описанных здесь.

"Комплементарные" последовательности, используемые в данном документе, также могут включать в себя или полностью формироваться из не-Watson-Crick пар оснований или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, в той мере, в какой исполняются вышеуказанные требования относительно их способности к гибридизации. Такие пары оснований, отличные от Уотсон-Крик (Watson-Crick) пар, включают, без ограничения таковыми, G: U Вобл (Wobble) или пары оснований Hoogsteen.

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по существу комплементарный" в данном документе могут использоваться в отношении совпадения оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью дцРНК или между антисмысловой цепью агента дцРНК и последовательностью-мишенью, как будет понятно из контекста их использования. Понятно, что известны множественные генотипы HBV. Следовательно, средство дцРНК, разработанное так, чтобы быть полностью комплементарным одному генотипу HBV, может не быть полностью комплементарным ко всем генотипам HBV. Агент дцРНК, нацеленный на конкретный сайт, эффективен при нокдауне мишени для нескольких генотипов, не будучи полностью комплементарным для всех генотипов.

В данном контексте полинуклеотид, который "в значительной степени комплементарен по меньшей

мере части" матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен непрерывной части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей ген HBV). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК HBV, если последовательность существенно комплементарна непрерываемой части мРНК, кодирующей ген HBV.

Соответственно в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой цепи, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны целевой последовательности HBV. В некоторых других вариантах реализации полинуклеотиды антисмысловой цепи, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны целевой последовательности HBV и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, или по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% комплементарна фрагменту SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК по настоящему раскрытию включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен целевой последовательности HBV, и где полинуклеотид смысловой цепи включает непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, например, комплементарна по меньшей мере на 85%, 90% или 95%.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК включает антисмысловую цепь, которая по существу комплементарна последовательности-мишени HBV и включает непрерывную нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% комплементарна по всей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности любой из смысловых нуклеотидных последовательностей в табл. 2 или например, по меньшей мере, на 85%, 90% или 95% комплементарна фрагменту одной из смысловых нуклеотидных последовательностей в табл. 2.

Как подробно описано в данном документе, каждая или обе цепи могут также включать один или несколько нерибонуклеотидов, например дезоксирибонуклеотид или модифицированный нуклеотид. Кроме того, агент дцРНК может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытые здесь или известные в данной области техники. Любые такие модификации, используемые в агенте дцРНК, могут быть охвачены термином "агент дцРНК" для целей данного описания и формулы изобретения.

В некоторых вариантах осуществления большинство нуклеотидов каждой цепи представляют собой рибонуклеотиды, но, как подробно описано в данном документе, каждая или обе цепи могут также включать один или несколько нерибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид или модифицированный нуклеотид. Кроме того, агент дцРНК может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытые здесь или известные в данной области техники. Любые такие модификации, используемые в агенте дцРНК, охватываются термином "агент дцРНК" для целей данного описания и формулы изобретения.

Термин "более низкий" в контексте уровня экспрессии гена HBV или продукции белка HBV у субъекта, маркера заболевания или симптома относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95%, или падать ниже уровня обнаружения методом, или более, или двигаться к значениям нормального уровня (который может быть или не быть нулевым). При мониторинге инфекции HBV обычно используется шкала \log_{10} для описания уровня антигенемии (например, уровня HBsAg в сыворотке) или вирусемии (уровня ДНК HBV в сыворотке). Понятно, что уменьшение на 1 \log_{10} представляет собой уменьшение на 90% (остается 10%), уменьшение на 2 \log_{10} представляет собой уменьшение на 99% (остается 1%) и т. д. В некоторых вариантах осуществления маркер заболевания падает до уровня ниже уровня обнаружения метода. В некоторых вариантах осуществления способы включают клинически значимое ингибирование экспрессии HBV, например, если оно подтверждается клинически значимым результатом после лечения субъекта агентом для снижения экспрессии HBV. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена HBV оценивается по уменьшению количества мРНК HBV, которая может быть выделена или обнаружена в одной клетке или группе клеток, в которых транскрибируется ген HBV, и которые были обработаны таким образом, что экспрессия гена HBV подавляется, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичными первой клетке или группе клеток, но которые не были обработаны подобным образом (контрольные клетки).

В некоторых вариантах осуществления "снизить" или "уменьшить" понимается как понижение или уменьшение уровня в направлении нормального уровня или до нормального уровня, то есть нормализация уровня. В некоторых вариантах осуществления целевая экспрессия нормализуется до уровня, находящегося в пределах нормы для человека без такого расстройства, например, когда уровень маркера заболевания, такого как ALT или AST, снижается до приемлемого уровня в пределах нормы для человека без такого расстройства. Когда уровень, связанный с заболеванием, повышается по сравнению с нормальным уровнем, изменение рассчитывается от верхнего уровня нормы (ULN). Когда уровень, связанный с заболеванием, снижается с нормального уровня, изменение рассчитывается от более низкого уровня нормы (LLN). Снижение - это процентная разница в изменении между тестовым значением и нор-

мальным значением. Например, нормальный уровень AST может составлять от 10 до 40 единиц на литр. Если у субъекта с уровнем AST 200 единиц на литр до лечения, т.е. с уровнем в 5 раз выше ULN, т.е. имеющим 160 единиц на литр выше верхнего уровня нормы до лечения, уровень AST составляет 120 единиц на литр, то есть в 3 раза выше ULN, т.е. 80 единиц на литр выше верхнего уровня нормы после лечения, то считается, что повышенный уровень AST снижен до нормального на 50% (80/160).

В качестве другого примера приводится нормальный уровень ALT, обычно составляющий от 7 до 55 единиц на литр (Ед/л), где верхний уровень нормы составляет 55 Ед/л. Для субъекта с уровнем ALT 100 Ед/л до лечения (45 Ед/л выше верхнего уровня нормы) и 75 Ед/л после лечения (сниженным на 25 Ед/л) считается, что ALT субъекта снизился к нормальному уровню на 55% ($25/45 \times 100\%$). В данном контексте, если заболевание связано с повышенным значением симптома, "нормальным" считается верхний уровень нормы. Если заболевание связано со снижением значения симптома, "нормальным" считается нижний уровень нормы.

Фраза "контактирование клетки с агентом дцРНК", таким как дцРНК, в контексте настоящего описания включает контактирование клетки любыми возможными способами. Контакт клетки с агентом дцРНК включает контактирование клетки *in vitro* с агентом дцРНК или контактирование клетки *in vivo* с агентом дцРНК. Контактирование может осуществляться прямо или косвенно. Таким образом, например, агент дцРНК может быть помещен в физический контакт с клеткой субъектом, работником, исполняющим метод, или, альтернативно, агент дцРНК может быть помещен в ситуацию, которая позволит или заставит его впоследствии войти в контакт с клеткой.

Контакт с клеткой *in vitro* может быть осуществлен, например, путем инкубации клетки с агентом дцРНК. Контакт с клеткой *in vivo* может осуществляться, например, путем инъекции агента дцРНК в ткань или рядом с ней, или путем инъекции агента дцРНК в другую область, например, кровоток или подкожное пространство, так что агент впоследствии достигнет ткани, где находится контактирующая клетка. Например, агент дцРНК может содержать или быть связанным с лигандом, например, GalNAc3, направляющим агент дцРНК в интересующий сайт, например, печень. Также возможны комбинации методов контакта *in vitro* и *in vivo*. Например, клетка также может контактировать *in vitro* с агентом дцРНК и впоследствии трансплантирована субъекту.

В некоторых вариантах осуществления приведение клетки в контакт с агентом дцРНК включает "введение" или "доставку агента дцРНК в клетку" путем облегчения или воздействия на захват агента клеткой или абсорбцию в клетку. Абсорбция или захват агента дцРНК может происходить за счет самостоятельных диффузных или активных клеточных процессов или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Введение агента дцРНК в клетку может происходить *in vitro* или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* агент дцРНК можно вводить в участок ткани или вводить системно. Введение *in vitro* в клетку включает методы, известные в данной области техники, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны ниже или известны в данной области техники.

В данном контексте "субъект" означает животное, такое как млекопитающее, включая любое млекопитающее, которое может быть инфицировано HBV, например примата (человекообразного примата, или примата, не являющегося человеком, например, макака или шимпанзе), или животное, которое считается приемлемой клинической моделью инфекции HBV, модель мыши HBV-AAV (См., например, Yang et al. (2014) Cell and Mol Immunol 11:71) или модель трансгенной мыши HBV 1.3xfs (Guidotti et al. (1995) J. Virol. 69: 6158). В некоторых вариантах осуществления субъект инфицирован вирусом гепатита В (HBV). В некоторых вариантах осуществления субъект болен как инфекцией вируса гепатита В (HBV), так и инфекцией вируса гепатита D (HDV). В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека, такого как человек с инфекцией HBV, особенно с инфекцией хронического вируса гепатита В (HBV).

Используемые здесь термины "лечение" или "подвергать лечению" относятся к положительному или желаемому результату, включая, без ограничения таковыми, облегчение или улучшение одного или нескольких признаков или симптомов из списка симптомов, связанных с нежелательной экспрессией гена HBV или репликацией HBV, например, наличие сссDNA HBV в сыворотке или печени; наличие сывороточной ДНК HBV; наличие сывороточного или печеночного антигена HBV, например HBsAg или HBeAg; повышенный ALT; повышенный уровень AST (нормальный диапазон обычно составляет от 10 до 34 Ед/л); отсутствие или низкий уровень антител к HBV, повреждение печени; цирроз печени; дельта-гепатит, острый гепатит В; острый фульминантный гепатит В; хронический гепатит В; фиброз печени; терминальная стадия заболевания печени; гепатоцеллюлярная карцинома; синдром, подобный сывороточной болезни; анорексия; тошнота; рвота, субфебрильная температура; миалгия; утомляемость; нарушение остроты вкуса и обоняния (отвращение к пище и сигаретам); боль в правом подреберье или эпигастрическая боль (периодическая, от легкой до умеренной); печеночная энцефалопатия; сонливость; нарушения режима сна; спутанность сознания; кома; асцит; желудочно-кишечное кровотечение; коагулопатия; желтуха; гепатомегалия (умеренно увеличенная, мягкая печень); спленомегалия; ладонная эритема; паутинные невусы; атрофия мышц; паучьи ангиомы; васкулит; варикозное кровотечение; периферические отеки; гинекомастия; атрофия яичек; коллатеральные вены брюшной полости (caput medusa); уровни ALT выше, чем уровни AST; повышенный уровень гамма-глутамилтранспептидазы (GGT) (нор-

мальный диапазон обычно составляет от 8 до 65 Ед/л) и повышенный уровень щелочной фосфатазы (ALP) (нормальный диапазон обычно составляет от 44 до 147 МЕ/л (международные единицы на литр), но не более чем в 3 раза ULN); немного низкий уровень альбумина; повышенный уровень железа в сыворотке; лейкопения (то есть гранулоцитопения); лимфоцитоз; повышенная скорость оседания эритроцитов (СОЭ); сокращение выживаемости красных кровяных телец; гемолиз; тромбоцитопения; увеличение международного нормализованного отношения (INR); наличие в сыворотке или печени HBsAg, HBeAg или корового антитела против гепатита В (анти-HBc), иммуноглобулина М (IgM); наличие поверхностных антител к гепатиту В (анти-HBs), антител к гепатиту В е (анти-HBe) или ДНК HBV; повышенный уровень билирубина; гиперглобулинемия; наличие тканеспецифических антител, таких как антитела против гладких мышц (ASMA) или антинуклеарные антитела (ANA) (10-20%); наличие тканеспецифических антител, например антител против щитовидной железы (10-20%); повышенный уровень ревматоидного фактора (RF); низкий уровень тромбоцитов и лейкоцитов; дегенеративные и регенеративные гепатоцеллюлярные изменения в лобулах с сопутствующим воспалением; и преимущественно центрилобулярный некроз, обнаруживаемый или необнаруживаемый. Вероятность развития фиброза печени снижается, например, если у человека, имеющего один или несколько факторов риска фиброза печени, например, хроническую инфекцию гепатита В, либо вообще не развивается фиброз печени, либо развивается фиброз печени с меньшей степенью тяжести по сравнению с популяцией, имеющей те же факторы риска и не получающей лечения, как описано в данном документе. Невозможность прогрессии заболевания, нарушения или состояния, или уменьшение степени развития признака или симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (например, при клинически значимых количествах), или проявление отсроченных признаков или отсроченных симптомов (например, на несколько дней, недель, месяцев или лет) считаются эффективной профилактикой. "Лечение" также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения. Для профилактики может потребоваться введение более одной дозы.

В предпочтительных вариантах осуществления лечение инфекции HBV приводит к "функциональному излечению" гепатита В. В данном контексте функциональное излечение понимается как клиренс циркулирующего HBsAg и предпочтительно сопровождается переходом в состояние, при котором антитела HBsAg становятся обнаруживаемыми при использовании клинически соответствующего анализа. Например, выявляемые антитела могут включать сигнал выше 10 мМЕ/мл, измеренный с помощью иммуноанализа на хемилюминесцентных микрочастицах (СМИА) или любого другого иммуноанализа, называемый анти-HBs сероконверсией. Функциональное излечение не требует удаления всех репликативных форм HBV (например, cccDNA из печени). Анти-

HBs сероконверсия происходит спонтанно примерно у 0,2-1% хронически инфицированных пациентов в год. Однако даже после анти-HBs сероконверсии в течение десятилетий наблюдается низкий уровень персистенции HBV, что свидетельствует о функциональном, а не полном излечении. Без привязки к механизму действия, предполагается, что иммунная система способна сдерживать HBV. Функциональное излечение позволяет прекратить любое лечение инфекции HBV. Однако понятно, что "функционального излечения" инфекции HBV может быть недостаточно для предотвращения или лечения заболеваний или состояний, которые возникают в результате инфекции HBV, например фиброза печени, НСС, цирроза.

Используемый здесь термин "заболевание, связанное с вирусом гепатита В" или "заболевание, связанное с HBV", означает заболевание или расстройство, которое вызвано или связано с инфекцией или репликацией HBV. Термин "HBV-ассоциированное заболевание" включает заболевание, расстройство или состояние, при котором снижение экспрессии или репликации гена HBV может оказаться эффективным. Неограничивающие примеры заболеваний, связанных с HBV, включают, например, вирусную инфекцию гепатита D, дельта-гепатит, острый гепатит В; острый фульминантный гепатит В; хронический гепатит В; фиброз печени; терминальная стадия заболевания печени; и гепатоцеллюлярная карцинома.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с HBV, представляет собой вирусную инфекцию гепатита D. Вирус гепатита D или вирус гепатита дельта (HDV) является патогеном человека. Однако вирус является дефектным и зависит от обязательных вспомогательных функций, обеспечиваемых вирусом гепатита В (HBV) для передачи заражения; действительно, HDV требует, чтобы ассоциированная или существующая ранее инфекция HBV стала инфекционной и продуцировала, в частности, вирусную оболочку, содержащую поверхностный антиген гепатита В. HDV может приводить к тяжелым острым и хроническим формам заболевания печени в сочетании с HBV. Инфекция гепатита D или дельта-гепатита очень эндемична для нескольких африканских стран, региона Амазонки и Ближнего Востока, в то время как ее распространенность низка в промышленно развитых странах, за исключением Средиземноморья.

Передача HDV может происходить либо при одновременном инфицировании HBV (коинфекция), либо при наличии хронического гепатита В или носительства гепатита В (суперинфекция). И суперинфекция, и коинфекция HDV приводят к более серьезным осложнениям по сравнению с инфекцией, обусловленной только HBV. Эти осложнения включают большую вероятность возникновения печеночной недостаточности при острых инфекциях и быстрое прогрессирование цирроза печени с повышенным

риском развития рака печени при хронических инфекциях. В сочетании с вирусом гепатита В, у гепатита D самый высокий уровень смертности среди всех инфекций гепатита, составляющий 20%.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с HBV, представляет собой острый гепатит В. Острый гепатит В включает воспаление печени, которое длится менее шести месяцев. Типичные симптомы острого гепатита В - утомляемость, анорексия, тошнота и рвота. Часто наблюдаются очень высокие значения аминотрансферазы (>1000 Ед/л) и гипербилирубинемия. Тяжелые случаи острого гепатита В могут быстро прогрессировать до острой печеночной недостаточности, характеризующейся плохой синтетической функцией печени. Это часто определяется как протромбиновое время (РТ), равное 16 с, или международное нормализованное отношение (INR), равное 1.5 при отсутствии предшествующего заболевания печени. Острый гепатит В может перерасти в хронический гепатит В.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с HBV, представляет собой хронический гепатит. Хронический гепатит В (СНВ) включает воспаление печени, которое длится более шести месяцев. Субъекты с СНВ являются HBsAg-положительными и имеют либо высокую вирусную нагрузку (>10⁴ копий ДНК HBV/мл крови), либо низкую вирусную нагрузку (<10³ копий ДНК HBV/мл крови). В некоторых вариантах осуществления субъекты инфицированы HBV в течение не менее пяти лет. В некоторых вариантах осуществления субъекты инфицированы HBV не менее десяти лет. В некоторых вариантах осуществления субъекты инфицировались HBV при рождении. Субъекты, страдающие хроническим гепатитом В, могут иметь иммунную толерантность или иметь неактивную хроническую инфекцию без каких-либо признаков активного заболевания, а также инфекция может протекать бессимптомно. Пациенты с хроническим активным гепатитом, особенно в репликативном состоянии, могут иметь симптомы, сходные с симптомами острого гепатита. Субъекты, страдающие хроническим гепатитом В, могут иметь активную хроническую инфекцию, сопровождающуюся некровоспалительным заболеванием печени, иметь повышенный обмен гепатоцитов при отсутствии обнаруживаемого некровоспаления или иметь неактивную хроническую инфекцию без каких-либо признаков активного заболевания, а также инфекция может протекать бессимптомно. Сохранение инфекции HBV у субъектов с СНВ является результатом ДНК сссHBV. В некоторых вариантах осуществления субъект с СНВ является HBeAg-положительным. В другом воплощении субъект, страдающий СНВ, является HBeAg-отрицательным. Субъекты с СНВ имеют уровень сывороточной ДНК HBV менее 10⁵ и стойкое повышение уровня трансаминаз, например ALT, AST и гамма-глутамилтрансферазы. Субъект, страдающий СНВ, может иметь показатель биопсии печени менее 4 (например, показатель некровоспалительного процесса).

В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с HBV, представляет собой острый фульминантный гепатит В. У субъекта, страдающего острым фульминантным гепатитом В, наблюдаются симптомы острого гепатита и дополнительные симптомы спутанности сознания или комы (из-за неспособности печени детоксицировать химические вещества), наличие гематом или кровотечений (из-за отсутствия факторов свертывания крови).

У субъектов, инфицированных HBV, например, СНВ, может развиваться фиброз печени. Соответственно, В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с

HBV, представляет собой фиброз печени. Фиброз печени или цирроз печени определяется гистологически как диффузный печеночный процесс, характеризующийся фиброзом тканей (избыток волокнистой соединительной ткани) и преобразованием нормальной архитектуры печени в структурно аномальные узелки.

У субъектов, инфицированных HBV, например СНВ, может развиваться терминальная стадия заболевания печени. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с HBV, представляет собой заболевание печени на конечной стадии. Например, фиброз печени может прогрессировать до такой степени, что организм больше не может компенсировать снижение функции печени в результате фиброза печени (то есть декомпенсированной печени), что приводит, например, к психическим и неврологическим симптомам и печеночной недостаточности.

У субъектов, инфицированных HBV, например, СНВ, может развиваться гепатоцеллюлярная карцинома (НСС), также называемая злокачественной гепатомой. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с HBV, представляет собой НСС. Гепатоцеллюлярная карцинома (НСС) обычно развивается у пациентов с СНВ и может быть фиброламмеллярной, псевдоглангулярной (аденоидной), плеоморфной (гигантоклеточной) или светлоклеточной.

"Связанное с HDV расстройство" или расстройство, связанное с вирусом гепатита D" представляет собой заболевание или расстройство, связанное с экспрессией HDV. Примеры заболеваний, связанных с HDV, включают вирусную инфекцию гепатита В, острый гепатит В, острый гепатит D; острый фульминантный гепатит D; хронический гепатит D; фиброз печени; терминальная стадия заболевания печени; и гепатоцеллюлярная карцинома.

Используемый здесь термин "терапевтически эффективное количество" предназначен для включения такого количества агента дцРНК, которое при введении пациенту для лечения субъекта, страдающего инфекцией HBV или заболеванием, связанным с HBV, является достаточным для эффективного лечения заболевания (например, для облегчения или стабилизации существующего состояния или одного или нескольких симптомов заболевания). "Терапевтически эффективное количество" может варьироваться в

зависимости от агента дцРНК, способа введения агента, заболевания и его тяжести, а также анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического состава, стадии патологических процессов, опосредованных экспрессией гена HBV, типов предшествующего или сопутствующего лечения, если таковые имеются, и других индивидуальных характеристик пациента, подлежащего лечению. Терапевтически эффективное количество может потребовать введения более одной дозы.

"Терапевтически эффективное количество" также включает количество агента дцРНК, которое дает некоторый желаемый эффект при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому лечению. Агенты дцРНК, используемые в способах настоящего раскрытия, могут вводиться в количестве, достаточном для получения разумного соотношения польза/риск, применимого к такому лечению.

Термин "образец", как он используется в данном документе, включает набор аналогичных жидкостей, клеток или тканей, выделенных от субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, лимфу, мочу, слюну и т.п. Образцы тканей могут включать образцы тканей, органов или локализованных областей. Например, образцы могут быть взяты из определенных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. В некоторых вариантах осуществления образцы могут быть получены из печени (например, из всей печени или определенных сегментов печени или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В предпочтительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" относится к крови, или плазме, или сыворотке, полученным из крови, взятой от субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" относится к ткани печени (или ее субкомпонентам) или ткани крови (или ее субкомпонентам, например, сыворотке), полученной от субъекта.

II. дцРНК агенты.

В настоящем описании предлагаются агенты дцРНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких генов HBV. В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии гена HBV в клетке, такой как клетка, находящаяся внутри субъекта, например млекопитающего, такого как человек, имеющего ассоциированное с HBV заболевание, например хронический гепатит В. Агенты дцРНК включают анти-смысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере части мРНК, образованной при экспрессии гена HBV. Область комплементарности составляет около 19-21 нуклеотидов в длину. При контакте с клеткой, экспрессирующей ген HBV, агент дцРНК ингибирует экспрессию гена HBV по меньшей мере на 80%, как это было определено, например, с помощью ПЦР или метода на основе разветвленной ДНК (bdNA, branched DNA), или метода на основе белка, такого как иммунофлуоресцентный анализ, при использовании, например, вестерн-блоттинга или методов проточной цитометрии. В предпочтительных вариантах осуществления процент ингибирования определяется методом ПЦР в реальном времени, описанным в примере 2, где используется предоставленные в таковом линии клеток, обработанные агентом дцРНК, используемым при трансфекции в концентрации 10 нМ.

дцРНК включает две цепи РНК, которые комплементарны и гибридизуются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых будет использоваться дцРНК. Одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) включает область комплементарности, которая по существу комплементарна и обычно полностью комплементарна целевой последовательности. Однако, из-за вариаций последовательностей генотипов HBV, дцРНК может быть полностью комплементарной некоторым, но не всем генотипам HBV. Целевая последовательность может происходить из последовательности мРНК, образованной в процессе экспрессии гена HBV. Другая цепь (смысловая цепь) включает область, которая комплементарна антисмысловой цепи, так что две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в другом месте в данном документе и как известно в данной области, комплементарные последовательности дцРНК могут также представлять собой самокомплементарные области одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не отдельные олигонуклеотиды.

Обычно дуплексная структура имеет длину 19-21 пару оснований, например 19, 20 или 21 пару оснований в длину.

Точно также область комплементарности целевой последовательности составляет 19-23 нуклеотидов в длину, например 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-23, 20-22, 20-21, 21-22, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида в длину. В некоторых вариантах осуществления длина области комплементарности составляет 21 нуклеотид. Специалист в данной области техники также поймет, что область РНК, предназначенная для расщепления, чаще всего является частью более крупной молекулы РНК, обычно молекулы мРНК. В соответствующих случаях "часть" мРНК-мишени представляет собой непрерывную последовательность мРНК-мишени достаточной длины, для того, чтобы она могла представлять собой субстрат для РНКи-направленного расщепления (то есть расщепления посредством пути RISC).

Специалист в данной области также поймет, что дуплексная область представляет собой первичную функциональную часть дцРНК, например дуплексную область из примерно 19-21 пары оснований, например, 19-21, 19-20, 20-21, 19, 20 или 21 пары оснований. В некоторых вариантах осуществления дуплексная область составляет 19 пар оснований.

дцРНК, как описано в данном документе, может дополнительно включать один или несколько вы-

ступов одноцепочечных нуклеотидов, например, 1 или 2 нуклеотида в длину. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозид, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(-ы) может находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступающей части может присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах одной или обеих антисмысловой или смысловой цепи дцРНК. В некоторых вариантах осуществления дцРНК включает 2-нуклеотидный выступ на 3'-конце антисмысловой цепи.

дцРНК может быть синтезирована стандартными методами, известными в данной области техники, как дополнительно обсуждается ниже, например, с использованием автоматического синтезатора ДНК, который коммерчески доступен, например, от Biosearch, Applied Biosystems™, Inc. Способы синтеза дцРНК для использования в фармацевтических композициях также известны специалистам в данной области техники.

Соединения-агенты дцРНК настоящего раскрытия могут быть получены с использованием двухэтапной процедуры. Сначала отдельные цепи двухцепочечной молекулы РНК получают по-отдельности. Затем цепи компонентов отжигаются. Отдельные цепи соединения-агента дцРНК могут быть получены с использованием органического синтеза в растворе или твердой фазе, или и того и другого. Органический синтез предлагает по преимуществу, что цепи олигонуклеотидов, содержащие неприродные или модифицированные нуклеотиды, получить очень просто. Одноцепочечные олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть получены с использованием органического синтеза в фазе раствора или твердой фазы, или того и другого.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК по настоящему раскрытию включает по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, последовательность смысловой цепи и последовательность антисмысловой цепи. Смысловая цепь может содержать нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи любого из дуплексов, представленных в табл. 2. Антисмысловая цепь может содержать нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи любого из дуплексов, представленных в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК не является AD-66810.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК по раскрытию содержит, состоит по существу из или состоит из смысловой цепи и антисмысловой цепи, указанных в табл. 2.

III. Модифицированные агенты дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления РНК агента дцРНК по настоящему раскрытию является немодифицированной и не содержит, например, химических модификаций или конъюгации, известных в данной области техники и описанных здесь. В других вариантах осуществления РНК агента дцРНК по настоящему изобретению химически модифицирована для повышения стабильности или придания других полезных характеристик. В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия практически все нуклеотиды дцРНК агента настоящего раскрытия модифицированы. В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия все или практически все нуклеотиды дцРНК-агента модифицированы, т.е. не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида присутствует в цепи агента дцРНК.

Нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем описании, могут быть синтезированы или модифицированы способами, хорошо известными в данной области, такими как методы, описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, и включенных в настоящий документ посредством ссылки. Модификации включают, например, модификации концов, например, модификации 5'-конца (фосфорилирование, конъюгацию, инвертированные связи) или модификации 3'-конца (конъюгацию, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т.д.); модификации оснований, например, замена стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые спариваются с расширенным репертуаром партнеров по спариванию, удаленные основания (нуклеотиды без оснований) или конъюгированные основания; модификации сахара (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара; или модификации основной цепи, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений-агентов дцРНК, применимых в вариантах осуществления, описанных в данном документе, включают, без ограничения таковыми, РНК, содержащие модифицированные основы-скелеты или не содержащие естественных межнуклеозидных связей. РНК, имеющие модифицированную основу-скелет, включают, среди прочего, те, которые не имеют атома фосфора в основе. Для целей данного описания и, как иногда упоминается в данной области, модифицированные РНК, не имеющие атома фосфора в своем межнуклеозидном остове, также могут рассматриваться как олигонуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления модифицированный дцРНК-агент имеет атом фосфора в своей межнуклеозидной цепи.

Модифицированные основы РНК включают в себя основные цепи, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боронофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'связи, их 2'-5'связанные аналоги, а также аналоги с обратной полярностью, в которых соседние пары нуклеозидных

единиц связаны 3'-5' с 5'-3' или от 2'-5' до 5'-2'. Также сюда включены различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот.

Типичные патенты США, которые описывают получение вышеуказанных фосфорсодержащих связей, включают, без ограничения таковыми, патенты США №№ 3687808; 4469863; 4 476 301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5 264 423; 5,276,019; 5 278 302; 5 286 717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5 536 821; 5,541,316; 5,550,111; 5 563 253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6 028 188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6, 239 265; 6 277 603; 6,326,199; 6 346 614; 6 444,4 23; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6 878 805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029; и патент США RE39464, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки на указания, относящиеся к таким способам получения.

Модифицированные основы РНК, не содержащие атом фосфора, имеют скелеты, образованные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомами и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомами или гетероциклическими межнуклеозидными связями. К ним относятся те, которые имеют: морфолиновые связи (образованные частично из моносахарида нуклеозида); силоксановые основы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые основы; формацетиловый и тиоформацетиловый основы; метиленаформацетиловый и тиоформацетиловый основы; алкеносодержащие основы; сульфаматные основы; основы метиленимино и метиленигидразино; сульфонатные и сульфонамидные основы; амидные основы; и другие, содержащие смешанные компоненты N, O, S и CH_2 .

Типичные патенты США, описывающие получение вышеуказанных олигонуклеозидов, включают, без ограничения таковыми, патенты США №№ 5034506; 5,166,315; 5,185,444; 5 214 134; 5,216,141; 5 235 033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5610289; 5618704; 5,623,070; 5,663,312; 5633360; 5,677,437; и 5677439, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки на концепции, относящиеся к таким способам.

Подходящие РНК-миметики также могут быть рассмотрены для использования в представленных в настоящем документе дцРНК-агентах, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т.е. остов нуклеотидных единиц заменены новыми группами. Основные единицы сохраняются для гибридизации с подходящим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, в котором миметик РНК, который, как было показано, обладает превосходными гибридизационными свойствами, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA, peptide nucleic acid). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен амид-содержащим остовом, в частности, аминоэтилглициновым остовом. Азотистые основания сохраняются и связаны прямо или косвенно с "аза"-атомами азота амидной части основной цепи. Типичные патенты США, которые описывают получение соединений PNA, включают, без ограничения таковыми, патенты США №№ 5539082; 5714331; и 5719262, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки на идеи, относящиеся к таким способам. Дополнительные соединения PNA, подходящие для использования в агентах дцРНК по настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в настоящем раскрытии, включают РНК с фосфотиоатными основами-скелетами и олигонуклеозиды с гетероатомными скелетами, и, в частности, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [известный как метилен (метиленимино) или основная цепь ММИ], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [где нативный фосфоэфирный каркас представлен как $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$] в упомянутом выше патенте США № 5,489,677, и амидные основы из упомянутого выше патента США № 5,602,240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в настоящем документе, имеют в основе структуры морфолино из указанного выше патента США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько замещенных фрагментов сахара. Агенты дцРНК, представленные здесь, могут включать в 2'-положение одно из списка: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными C_1 - C_{10} алкилом или C_2 - C_{10} алкенилом и алкинилом. Примеры подходящих модификаций включают $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$, and $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, где n и m составляют от 1 до примерно 10. В других вариантах осуществления дцРНК включают одно из списка в положении 2': низший алкил с C_1 по C_{10} , замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O- аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂ гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино, полиалкиламино, замещенный силил, группа расщепления РНК, репортерная группа, интеркалятор, группа для улучшения фармакокинетических свойств агента дцРНК или группа для улучшения фармакодинамических свойств агента дцРНК и другие заместители, имеющие аналогичные свойства. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78: 486-504), т.е. алкокси-алкоксигруппу. Другой иллюстративной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтокси, то есть группа $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, также известная как 2'-DMAOE, как описано в примерах ниже, и 2'-

диметиламиноэтоксизтокси (также известная в данной области как 2'-О-диметиламиноэтоксизтил или 2'-DMAEOE), то есть 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂. Дополнительные типичные модификации включают: нуклеотиды 5'-Me-2'-F, нуклеотиды 5'-Me-2'-OMe, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды (как R-, так и S-изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил; и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'- OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Аналогичные модификации также могут быть сделаны в других положениях РНК агента дцРНК, в частности, в положении 3' сахара на 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5' связанных дцРНК и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. Агенты дцРНК могут также иметь миметики Сахаров, такие как циклобутильные фрагменты вместо пентофуранозилового сахара. Типичные патенты США, которые описывают получение таких модифицированных структур сахара, включают, без ограничения таковыми, патенты США №№ 4981957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; и 5,700,920; некоторые из них обычно общедоступны. Содержание каждой из вышеупомянутых патентных публикаций включено в настоящее описание в качестве ссылки на указания, относящиеся к таким способам.

Агент дцРНК может также включать модификации или замены азотистых оснований (часто называемых в данной области просто "основанием"). В контексте настоящего описания "немодифицированные" или "природные/нативные" азотистые основания включают пуриновые основания, аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые основания, тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные азотистые основания включают другие синтетические и природные азотистые основания, такие как дезокситимин (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил, другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, особенно 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезазагуанин и 7-дазааденин, а также 3-дезазагуанин и 3-дезааденин. Дополнительные нуклеотидные основания включают те, которые раскрыты в патенте США № 3687808, в Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; те, что раскрыты в The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, раскрыты в Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, и те, что раскрыты в Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих азотистых оснований особенно эффективны для увеличения сродства связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем описании. К ним относятся 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и 0-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что замещения 5-метилцитозином увеличивают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2°C (Sanghvi, YS, Crooke, ST and Lebleu, B., Eds., DsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) и представляют собой типичные замены оснований, особенно в сочетании с модификациями 2'-О-метоксизтилсахара.

Типичные патенты США, раскрывающие получение некоторых из указанных выше модифицированных азотистых оснований, а также других модифицированных азотистых оснований, включают, без ограничения таковыми, указанные выше патенты США №№ 3687808, 4845205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5 432 272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5 594 121, 5 596 091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6 147 200; 6,166,197; 6,222,025; 6 235 887; 6,380,368; 6,528,640; 6 639 062; 6,617,438; 7,045,610; 7 427 672; и 7 495 088, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки на указания, относящиеся к таким методам.

В некоторых вариантах осуществления РНК агента дцРНК также может быть модифицирована для включения одного или нескольких бициклических сахарных фрагментов. "Бициклический сахар" представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное мостиковым соединением двух атомов. "Бициклический нуклеозид" ("BNA") представляет собой нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент, содержащий мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, тем самым образуя бициклическую кольцевую систему. В некоторых вариантах осуществления мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод сахарного кольца. Таким образом, В некоторых вариантах осуществления агент настоящего раскрытия может включать одну или несколько заблокированных нуклеиновых кислот (LNA, locked nucleic acids). Закрытая нуклеиновая кислота - это нуклеотид, содержащий модифицированный фрагмент рибозы, в котором фрагмент рибозы включает дополнительный мостик, соединяющий 2 'и 4' атомы углерода. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH₂-O-2'. Эта структура эффективно "блокирует" рибозу в структурной конформации 3'-эндо. Было показано, что добавление заблокированных нуклеиновых кислот к агентам дцРНК увеличивает стабильность агента дцРНК в сыворотке и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33 (1): 439-447 ; Mook, OR. Et al., (2007) Mol Cane Ther 6 (3): 833-843;

Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31 (12): 3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для использования в полинуклеотидах по настоящему изобретению включают, без ограничения, нуклеозиды, содержащие мостик между 4' и 2' атомами рибозного кольца. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотидные агенты по настоящему раскрытию включают один или несколько бициклических нуклеозидов, содержащих мостик от 4' до 2'. Примеры таких бициклических нуклеозидов с мостиком от 4' до 2' включают, без ограничения таковыми, 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также называемый "напряженный этил", *constrained ethyl* или "сEt") и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и их аналоги; см., например, патент США № 7,399,845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8 278 283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C₁-C₁₂ алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, Chattopadhyaya et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и их аналоги; см., например, патент США № 8278426). Содержание каждого патента из вышеизложенных, относящихся к модифицированным нуклеиновым кислотам, включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Дополнительные репрезентативные патенты США и патентные публикации США, в которых описано получение заблокированных нуклеотидов нуклеиновых кислот, включают, без ограничения таковыми, следующие патенты США №№ 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133; 7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; US 2008/0039618; и US 2009/0012281, которые тем самым включены в настоящий документ посредством ссылки на указания, относящиеся к таким способам.

Любой из вышеперечисленных бициклических нуклеозидов может быть получен имеющим одну или несколько стереохимических конфигураций сахара, включая, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

РНК агента дцРНК также может быть модифицирована для включения одного или нескольких ограниченных этилнуклеотидов. Используемый здесь термин "напряженный этилнуклеотид" или "сEt" означает заблокированную нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH(CH₃)-O-2'. В некоторых вариантах осуществления напряженный этилнуклеотид находится в S-конформации, называемой здесь "S-сEt".

Агент дцРНК по настоящему раскрытию может также включать один или несколько "конформационно ограниченных нуклеотидов, *conformationally restricted nucleotides*" ("CRN"). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим атомы углерода C2' и C4' рибозы или атомы углерода C3' и C5' рибозы. CRN фиксирует рибозное кольцо в стабильной конформации и увеличивает сродство к мРНК при гибридизации. Линкер имеет достаточную длину, чтобы разместить кислород в оптимальном положении для стабильности и сродства, что приводит к меньшему сморщиванию кольца рибозы.

Репрезентативные публикации, в которых рассказывается о получении некоторых из вышеупомянутых CRN, включают, помимо прочего, публикацию патента США № 2013/0190383; и публикацию РСТ WO 2013/036868, которые тем самым включены в настоящее описание посредством ссылки на указания, относящиеся к таким методам.

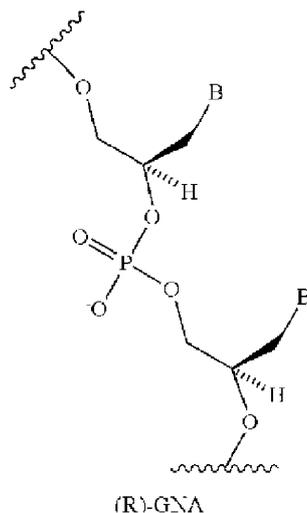
В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК по настоящему раскрытию содержит один или несколько мономеров, которые представляют собой нуклеотиды UNA (разблокированная нуклеиновая кислота). UNA - это разблокированная ациклическая нуклеиновая кислота, в которой любая из связей сахара может быть удалена, образуя незафиксированный "сахарный" остаток. В одном примере UNA также включает мономер, у которого удалены связи между C1'-C4' (т.е. ковалентные связи углерод-кислород-углерод между атомами углерода C1' и C4'). В другом примере связь C2'-C3' (т.е. ковалентная связь углерод-углерод между атомами углерода C2' и C3') сахара удалена (см. *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) и Fluiter et al., *Mol. Biosyst*, 2009, 10, 1039, которые, таким образом, включены в настоящее описание посредством ссылки на указания, относящиеся к разблокированным нуклеотидам нуклеиновых кислот).

Типичные публикации США, которые описывают получение UNA, включают, помимо прочего, патент США № 8 314 227; и публикации патентов США № 2013/0096289; 2013/0011922; и 2011/0313020, которые тем самым включены в настоящий документ посредством ссылки на указания, относящиеся к таким способам.

Потенциально стабилизирующие модификации концов молекул РНК могут включать в себя N-(ацетиламинокапроил) -4-гидроксипролинол (Нур-С6-ННАс), N-(капроил-4-гидроксипролинол). 1 (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-ННАс), тимидин-2'-О-дезокситимидин (эфир), N-(аминокапроил) -4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноил-уридин-3'-фосфат, инвертированное основание dT (idT) и др. Описание этих модификации можно найти в публикации РСТ № WO 2011/005861.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК модифицирован для включения одной или нескольких нуклеиновых кислот аденозин-гликоля ("GNA"). Термин "GNA" относится к нуклеиновой кислоте гликоля, которая представляет собой полимер, подобный ДНК или РНК, но отличающийся составом своей "основной цепи", состоящей из повторяющихся единиц глицерина, связанных фосфодиэфир-

НЫМИ СВЯЗЯМИ:



Описание аденозин-GNA можно найти, например, у Zhang, et al. (JACS 127 (12): 4174-75 (2005)).

Другие модификации нуклеотидов агента дцРНК, как раскрыто в данном документе, включают 5'-фосфатный или 5'-фосфатный имитатор, например, 5'-концевой фосфатный или фосфатный имитатор на антисмысловой цепи агента дцРНК. Подходящие имитаторы фосфата раскрыты, например, в публикации патента США № 2012/0157511, и тем самым включены в настоящий документ посредством ссылки на указания, относящиеся к таким модификациям.

Дополнительные модифицированные агенты дцРНК, нацеленные на HBV, представлены, например, в WO 2016/077321, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки для рекомендаций, относящихся к модификациям.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК содержит, состоит в основном из или состоит из модифицированной смысловой цепи и модифицированной антисмысловой цепи, как указано в табл. 2.

IV. Агенты дцРНК, конъюгированные с лигандами.

Агенты дцРНК по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с лигандом. Лиганд может изменять распределение, нацеливание или время жизни агента дцРНК, в который он включен. В предпочтительных вариантах реализации лиганд обеспечивает повышенное сродство к выбранной мишени, например молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, клеточному или органному компартменту, ткани, органу или области тела, например, по сравнению с видами, в которых такой лиганд отсутствует. Предпочтительные лиганды не будут участвовать в спаривании дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Конъюгированные с лигандом олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть синтезированы с использованием олигонуклеотида, который несет придаточную реактивную функциональность, например, полученную в результате присоединения связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описанному ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид может непосредственно взаимодействовать с коммерчески доступными лигандами, или лигандами, которые синтезированы несущими любую из множества защитных групп, или лигандами, которые имеют присоединенный к ним связывающий фрагмент.

В олигонуклеотидах, конъюгированных с лигандом, и специфичной последовательностью нуклеозидов связанных с молекулами-лигандами, согласно настоящему раскрытию, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с использованием стандартных нуклеотидов или предшественников нуклеозидов, либо нуклеотидов, которые уже содержат связывающий фрагмент, или предшественников лиганд-нуклеотидов или нуклеозид-конъюгатов, уже несущих молекулу лиганда или строительные блоки, не содержащие нуклеозидный лиганд.

Обычно при использовании предшественников нуклеотидных конъюгатов, уже несущих связывающий фрагмент, синтез связанных нуклеозидов со специфичной последовательностью завершается, и затем молекула лиганда реагирует со связывающим фрагментом с образованием олигонуклеотида, конъюгированного с лигандом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды по настоящему раскрытию синтезируются с помощью автоматического синтезатора с использованием фосфорамидитов, полученных из конъюгатов лиганд-нуклеозид, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, коммерчески доступным и обычно используемым в синтезе олигонуклеотидов.

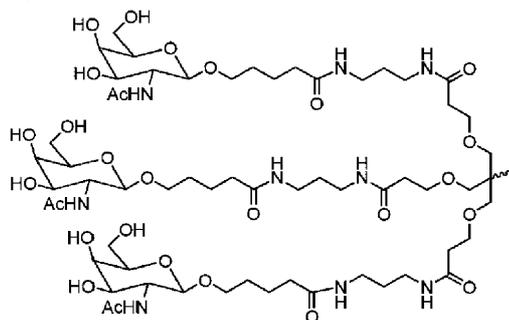
Типичные патенты США, которые описывают получение конъюгатов РНК, включают, без ограничения таковыми, патенты США №№ 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717; 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873;

5317098; 5371241 5391723; 5416203 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928; 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; 8106022, которые тем самым включены в настоящий документ посредством ссылки на указания, относящиеся к таким способам получения.

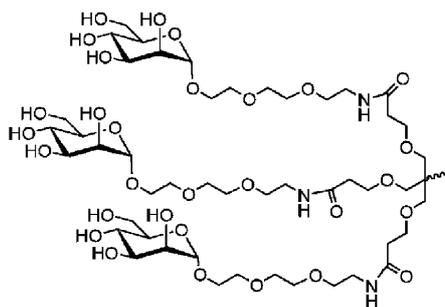
А. Углеводные конъюгаты.

В предпочтительных вариантах раскрытых здесь композиций и способов олигонуклеотид дцРНК-агента дополнительно содержит углевод. Агент дцРНК, конъюгированный с углеводами, нужен для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также для композиций, подходящих для терапевтического использования *in vivo*, как описано здесь. Используемый в настоящем документе, "углевод" относится к соединению, которое является либо углеводом как таковым, состоящим из одной или нескольких моносахаридных единиц, содержащих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), где каждый атом углерода связан с атомом кислорода, азота или серы; либо соединением, имеющем в качестве части углеводный фрагмент, состоящий из одной или нескольких моносахаридных единиц, каждая из которых имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), где каждый атом углерода связан с атомом кислорода, азота или серы. Репрезентативные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных единиц) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают сахара C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды включают сахара, содержащие две или три моносахаридных единицы (например, C5, C6, C7 или C8).

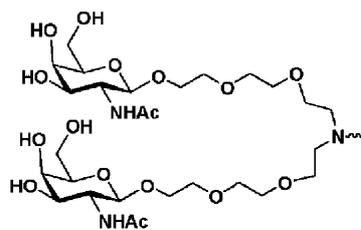
В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат для использования в композициях и способах по настоящему раскрытию представляет собой моносахарид. В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат для использования в композициях и способах по настоящему раскрытию выбран из группы, состоящей из:



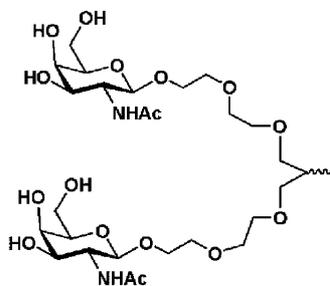
Формула I,



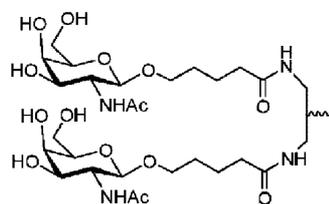
Формула II,



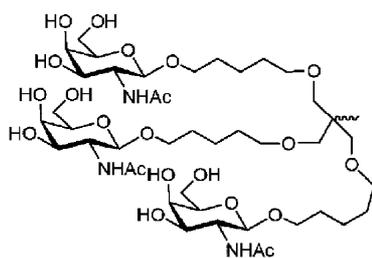
Формула III,



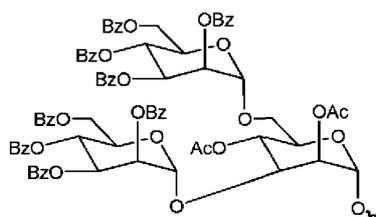
Формула IV,



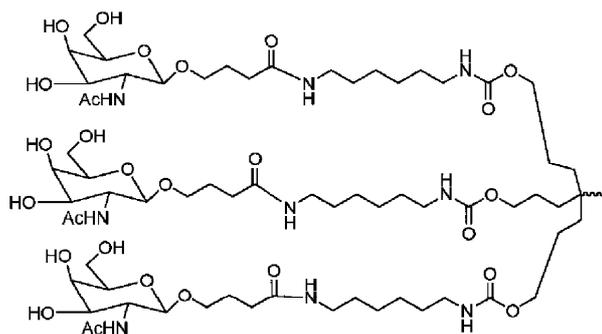
Формула V,



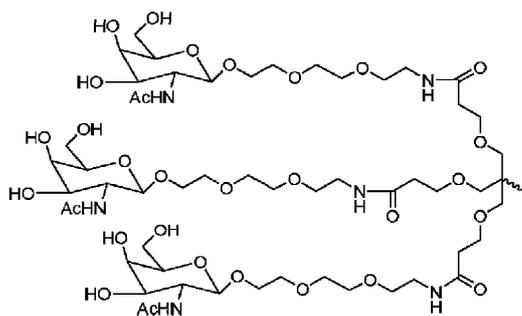
Формула VI,



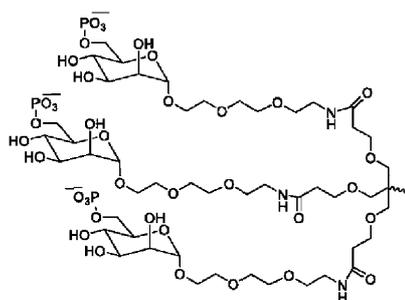
Формула VII,



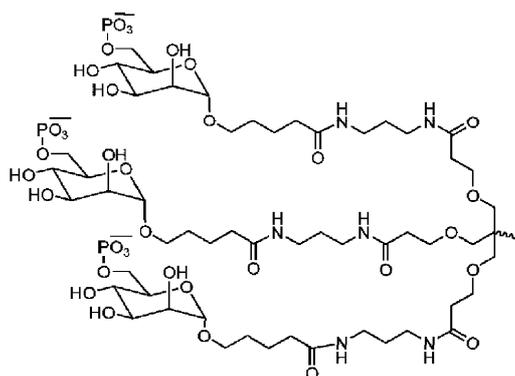
Формула VIII,



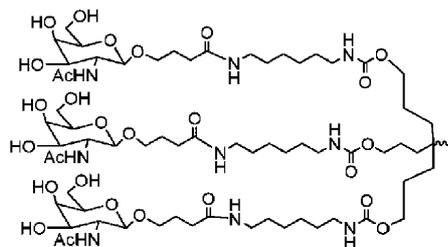
Формула IX,



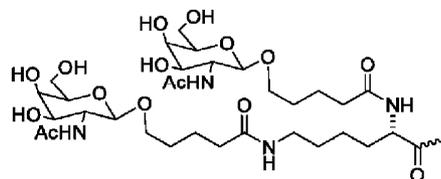
Формула X,



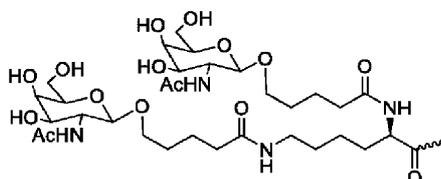
Формула XI,



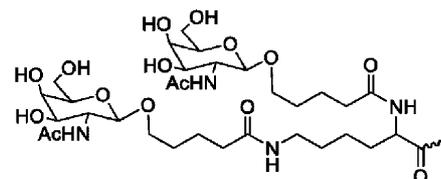
Формула XII,



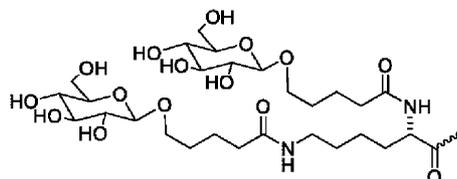
Формула XIII,



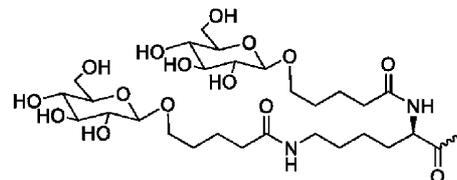
Формула XIV,



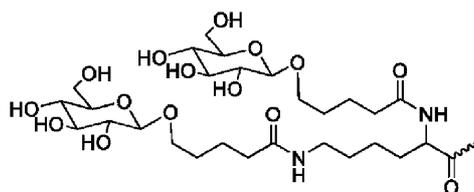
Формула XV,



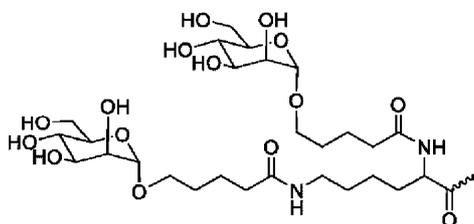
Формула XVI,



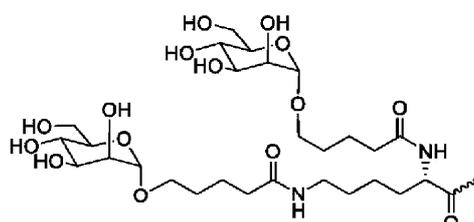
Формула XVII,



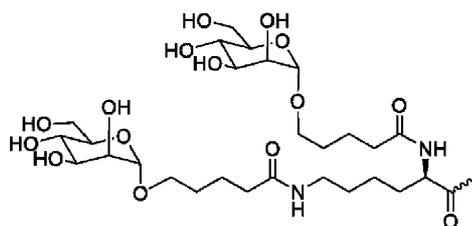
Формула XVIII,



Формула XIX,

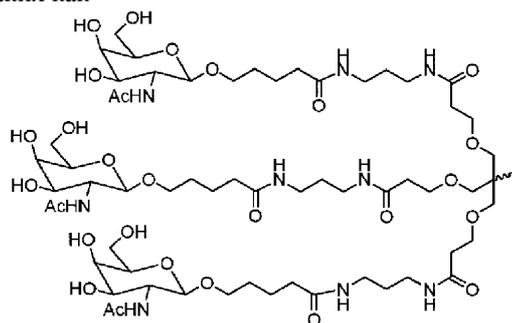


Формула XX, и



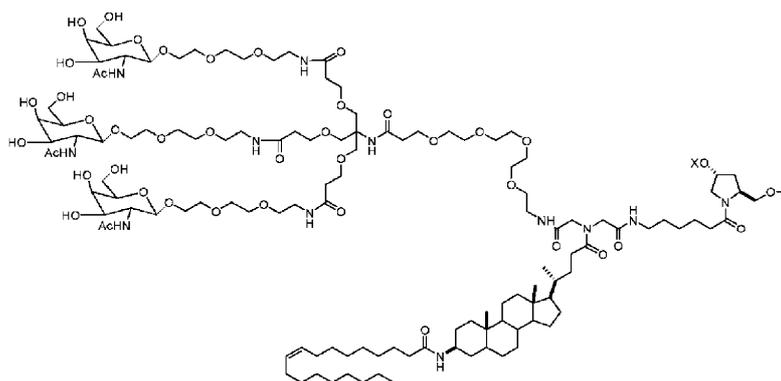
Формула XXI.

В некоторых вариантах осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). В некоторых вариантах осуществления углевод включает несколько единиц N-ацетилгалактозамина, таких как



Формула I.

Другой типичный углеводный конъюгат, который может быть использован в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включает, без ограничения таковым,



Формула XXII,

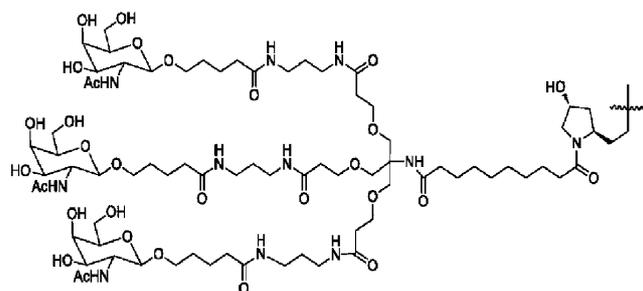
где, когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия, GalNAc или производное GalNAc присоединено к дцРНК-агенту настоящего раскрытия через моновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединено к дцРНК-агенту согласно настоящему раскрытию через двухвалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия, GalNAc или производное GalNAc присоединено к дцРНК-агенту настоящего раскрытия через трехвалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления углеводный лиганд содержит три единицы N-ацетилгалактозамина, присоединенные через трехвалентный линкер ("GalNAc₃").

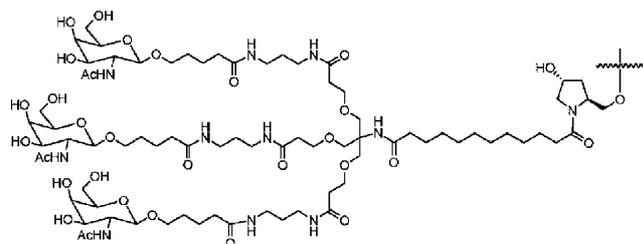
В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный агент дцРНК содержит один GalNAc или GalNAc- производное, присоединенные к агенту дцРНК. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный агент дцРНК включает множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или GalNAc- производных, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов двухцепочечного агента дцРНК через множество моновалентных линкеров.

Дополнительные углеводные конъюгаты, подходящие для использования в настоящем раскрытии, включают конъюгаты, описанные в публикациях РСТ №№ WO 2014/179620 и WO 2014/179627, которые включены в настоящий документ посредством ссылки на указания, относящиеся к таким конъюгатам.

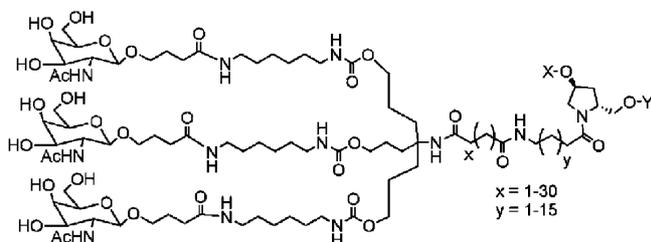
Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов дцРНК агента с линкерами, которые могут быть использованы в композициях и способах, раскрытых в настоящем документе, включают, без ограничения таковыми,



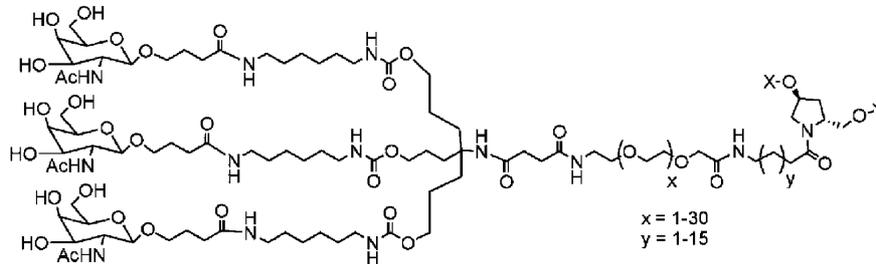
Формула XXIII,



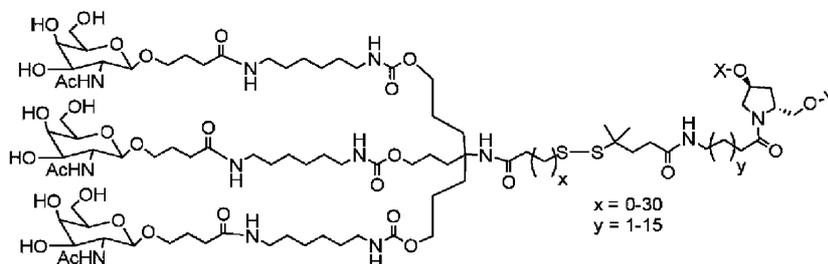
Формула XXIV,



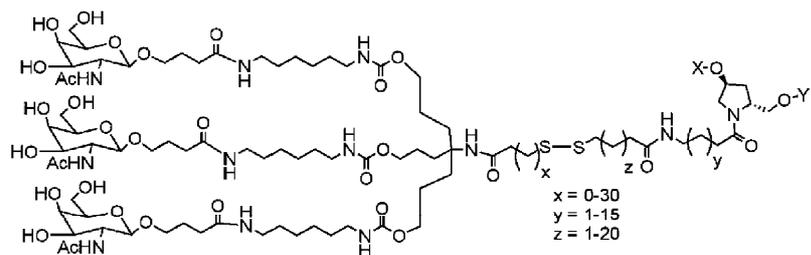
Формула XXV,



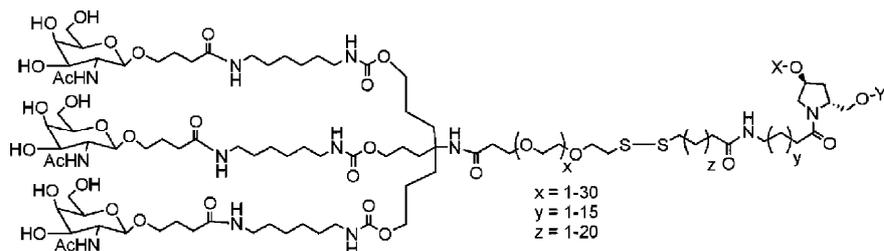
Формула XXVI,



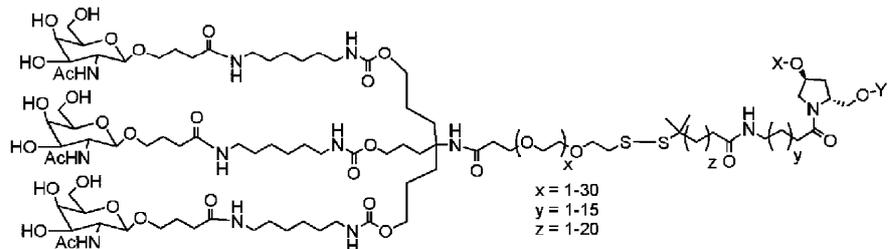
Формула XXVII,



Формула XXVIII,



Формула XXIX, и

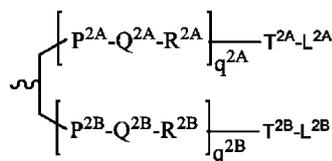


Формула XXX,

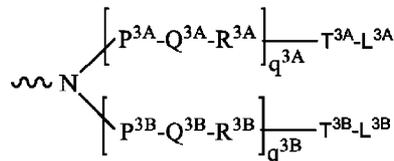
где, когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов, раскрытых в данном документе, лиганд представляет собой одно или несколько производных "GalNAc" (N-ацетилгалактозамина), присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

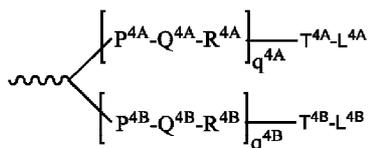
В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК, описанный в настоящем документе, конъюгирован с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, представленных в любой из формул (XXXI)-(XXXIV):



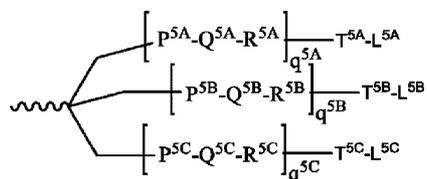
Формула XXXI,



Формула XXXII,



Формула XXXIII, или



Формула XXXIV;

в которой:

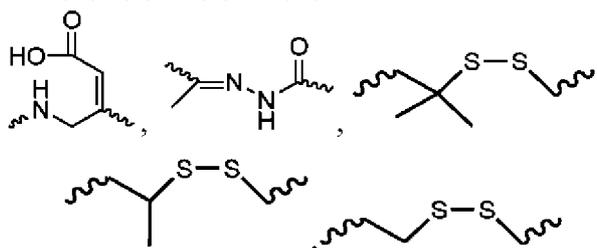
q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} представляют независимо для каждого случая 0-20, и где повторяющаяся единица может быть одинаковой или различной;

P^{2A} , P^{2B} , P^{3A} , P^{3B} , P^{4A} , P^{4B} , P^{5A} , P^{5B} , P^{5C} , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{5A} , T^{5B} , T^{5C} ,

каждый независимо для каждого случая отсутствует, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH or CH₂O;

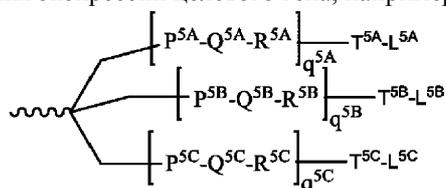
Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} каждый независимо для каждого случая отсутствует, алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из списка: O, S, S(O), SO₂, N(R), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} каждый независимо для каждого случая отсутствует, NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



или гетероцикл;

L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} and L^{5C} представляют собой лиганд; то есть каждый независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (например, GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетра-сахарид, олигосахарид или полисахарид; а R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгированные производные GalNAc особенно полезны для использования с агентами дцРНК для ингибирования экспрессии целевого гена, например, такие как формула (XXXIV):



Формула XXXIV,

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

ра может быть оценена путем тестирования способности разрушающего агента (или условия) расщеплять связывающую группу линкера-кандидата. Также будет желательно протестировать предлагаемую расщепляемую связывающую группу на способность противостоять расщеплению в крови или при контакте с другой тканью, не являющейся мишенью. Таким образом, можно определить относительную предрасположенность к расщеплению при первом и втором условии, где первое выбрано для указания на расщепление в клетке-мишени, а второе выбрано для указания на расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке. Оценки можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на интактных животных. Может оказаться полезным провести первоначальную оценку в условиях бесклеточных систем или в условиях культивированных клеток и подтвердить дальнейшими оценками на интактных животных. В предпочтительных вариантах осуществления полезные соединения-кандидаты расщепляются по меньшей мере примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой (то есть в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

i. Редокс-расщепляемые связывающие группы.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой редокс-расщепляемую связывающую группу, которая отщепляется при восстановлении или окислении. Примером восстанавливаемой связывающей группы является дисульфидная связывающая группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли расщепляемая линкерная группа-кандидат подходящей "восстановительно расщепляемой связывающей группой" или, например, подходит ли она для использования с определенной частью агента дцРНК и конкретным нацеливающим агентом, можно обратиться к методам, описанным здесь. Например, линкер-кандидат можно оценить путем инкубации с дитиотрептолом (DTT) или другим восстанавливающим агентом с использованием реагентов, известных в данной области техники, имитирующих скорость расщепления, которая может наблюдаться в клетке, например, в клетке-мишени. Кандидатов также можно оценивать в условиях, выбранных для имитации условий в крови или сыворотке. В некоторых вариантах осуществления соединения-кандидаты расщепляются максимум примерно на 10% в крови. В некоторых вариантах осуществления подходящие соединения-кандидаты расщепляются по меньшей мере примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления соединений-кандидатов может быть определена с использованием стандартных анализов кинетики ферментов в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и в условиях, выбранных для имитации внеклеточной среды для сравнения.

ii. Расщепляемые линкерные группы на основе фосфатов.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную связывающую группу на основе фосфата. Расщепляемая линкерная группа на основе фосфата расщепляется агентами, разрушающими или гидролизующими фосфатную группу. Примером агента, расщепляющего фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как клеточные фосфатазы. Примерами связывающих групп на основе фосфата являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-S-. В некоторых вариантах осуществления связывающая линкерная группа на основе фосфата представляет собой -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S- или -O-P(S)(H)-S-. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа на основе фосфата представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

iii. Кислотно расщепляемые связывающие группы.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой связывающую группу. Расщепляемая кислотой связывающая линкерная группа представляет собой связывающую группу, которая расщепляется в кислых условиях. В некоторых вариантах осуществления расщепляемые кислотой связывающие группы расщепляются в кислой среде с рН примерно 6,5 или ниже (например, примерно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже) или такими агентами, как ферменты, которые могут действовать как общая кислота. В клетке специфические органеллы с низким рН, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать расщепляющую среду для расщепляемых кислотой связывающих групп. Примеры отщепляемых кислотой связывающих групп включают, без ограничения таковыми, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Кислотные расщепляемые группы могут иметь общую -C=NN-, C(O)O, или -OC(O). В некоторых вариантах осуществления углерод, присоединенный к кислороду сложного эфира (алкоксигруппа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такая как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

iv. Связывающие группы на основе эфиров.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе сложного эфира. Расщепляемая линкерная группа на основе сложного эфира расщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы в клетках. Примеры расщепляемых связывающих групп на основе сложных эфиров включают, без ограничения таковыми, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемые сложным эфиром связывающие группы имеют общую формулу -C(O)O- или -OC(O)-. Такие группы-кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

v. Отщепляющие группы на основе пептидов.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе пептида. Расщепляемая линкерная группа на основе пептидов расщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с образованием олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептидов не включают амидную группу (-C(O)NH-). Амидная группа может быть образована любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь - это особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами при формировании пептидов и белков. Группа расщепления на основе пептидов обычно ограничивается пептидной связью (т.е. амидной связью), образованной между аминокислотами, составляющими пептиды и белки, и не включает всю амидную функциональную группу. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов имеют общую формулу -NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, где RA и RB представляют собой группы R двух соседних аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

V. Доставка агента дцРНК.

Доставка агента дцРНК по настоящему раскрытию в клетку, например, в клетку, находящуюся внутри субъекта, такого как человек, может быть достигнута рядом различных способов. Например, доставка может быть осуществлена путем контактирования клетки с агентом дцРНК согласно настоящему раскрытию либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставка *in vivo* также может быть осуществлена непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей агент дцРНК. Альтернативно, доставка *in vivo* может осуществляться косвенно путем введения одного или нескольких векторов, кодирующих агент дцРНК и направляющих его экспрессию. Эти альтернативы подробнее обсуждаются ниже.

В общем и целом, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для использования с агентом дцРНК по настоящему раскрытию (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2 (5): 139-144 и WO 94/02595, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки на указания, относящиеся к таким способам доставки). Для доставки *in vivo* факторы, которые следует учитывать для доставки молекулы дцРНК-агента, включают, например, биологическую стабильность доставленной молекулы, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставленной молекулы в ткани-мишени.

Для системного введения агента дцРНК для лечения заболевания РНК может быть модифицирована или альтернативно доставлена с использованием системы доставки лекарственного средства; оба метода действуют для предотвращения быстрой деградации дцРНК эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК, фармацевтического носителя или фармацевтического наполнителя также способствует нацеливанию композиции агента дцРНК на ткань-мишень и позволяет избежать нежелательных эффектов вне мишени. Молекулы агента дцРНК можно модифицировать химической конъюгацией, например, углеводным конъюгатом, как описано выше.

VI. Фармацевтические композиции.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, включающие агенты дцРНК настоящего раскрытия. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены фармацевтические композиции, содержащие агент дцРНК, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие агент дцРНК, используются для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией или активностью гена HBV. Такие фармацевтические композиции составляются с учетом способа доставки. Одним из примеров являются композиции, которые составлены для системного введения посредством парентеральной доставки, например, путем подкожной (SC), внутримышечной (IM) или внутривенной (IV) доставки. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, составленным для органоспецифичных (например, печеночных) внутриартериальных, внутриопухолевых, внутрикожных, интравитреальных инъекций, глазных местных, офтальмологических (глазные капли), распыления небулайзером, глазных местных или других местных путей введения, путем введения суппозитория или перорального приема. В предпочтительных вариантах осуществления композиции вводят подкожно.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена HBV. В некоторых вариантах осуществления вводится агент дцРНК в дозе примерно от 0,5 мг/кг до 50 мг/кг, или от 0,3 мг/кг до 20 мг/кг, или от 3 мг/кг до 10 мг/кг, или

предпочтительно в дозе от 3 мг/кг до 10 мг/кг. Например, дцРНК можно однократно вводить в дозах примерно 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг или 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК вводят в дозе от 50 мг до 900 мг.

Композиции также могут быть приготовлены и упакованы в виде фиксированной дозы для субъекта независимо от веса. Типичные уровни дозировки могут быть рассчитаны путем умножения дозы на килограмм веса среднестатистического субъекта. Например, среднестатистический взрослый человек обычно весит около 70 кг.

Режим повторного введения может включать введение терапевтического количества агента дцРНК на регулярной основе, например, один раз в месяц, один раз в два месяца или один раз каждые три месяца. В предпочтительных вариантах реализации агент дцРНК вводят не чаще, чем один раз в месяц. После начального курса лечения лечение можно проводить реже.

Фармацевтическую композицию можно вводить в течение неопределенного периода времени, например, субъекту с одним или несколькими признаками или симптомами инфекции HBV, например, выявляемым антигеном HBV или ДНК HBV, включая сссDNA HBV. В некоторых вариантах осуществления лечение агентом дцРНК проводится в течение дискретного или определенного периода времени и обеспечивает функциональное излечение.

Квалифицированный специалист поймет, что определенные факторы могут влиять на дозировку и время, необходимые для эффективного лечения субъекта, при учете, помимо прочего, тяжести заболевания или нарушения, предыдущих методов лечения, общего состояния здоровья или возраста субъекта и других присутствующих заболеваний. Более того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать однократное лечение или серию курсов лечения. Оценки эффективных доз и периодов полураспада *in vivo* для отдельных агентов дцРНК, охватываемых настоящим описанием, могут быть сделаны с использованием обычных методологий или на основе тестирования *in vivo* с использованием соответствующей модели животных, как описано в другом месте в настоящем документе.

А. Вспомогательные вещества.

"Фармацевтический носитель" или "фармацевтический эксципиент" представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующий агент или любой другой фармакологически инертный носитель для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот животному. Такие агенты хорошо известны в данной области техники.

В. Другие компоненты.

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно присутствующие в фармацевтических композициях, на основе установленных в данной области принципах использования. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные, совместимые, фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные, вяжущие, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные материалы, полезные для физического составления различных лекарственных форм композиции по настоящему изобретению, такие как консерванты, антиоксиданты и стабилизаторы. Однако, такие материалы при добавлении не должны чрезмерно влиять на биологическую активность компонентов композиций по настоящему изобретению. Составы можно стерилизовать и, при желании, смешивать со вспомогательными агентами, например, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульгаторами, солями для воздействия на осмотическое давление или буферами и т.п., которые не взаимодействуют с нуклеиновой кислотой лекарственного средства отрицательным образом.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем раскрытии, включают (а) одно или несколько соединений агента дцРНК и (б) один или несколько агентов, которые действуют по механизму, не связанному с РНКи, и которые полезны при лечении расстройства, связанного с HBV. Примеры таких агентов включают, без ограничения таковыми, противовоспалительный агент, агент против стеатоза, противовирусный агент и агент против фиброза.

Кроме того, другие вещества, обычно используемые для защиты печени, такие как силимарин, также можно использовать в сочетании с описанными здесь агентами дцРНК. Другие агенты, полезные для лечения заболеваний печени, включают телбивудин, энтекавир и ингибиторы протеаз, такие как теллапревир и другие, описанные, например, в US 2005/0148548, US 2004/0167116, US 2003/0144217 и US 2004/0127488.

Токсичность и терапевтическую эффективность таких соединений можно определить стандартными фармацевтическими процедурами на культурах клеток или экспериментальных животных, например, при определении LD50 (смертельная доза для 50% популяции) и ED50 (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции). Соотношение доз, дающих токсический и терапевтический эффект, представляет собой терапевтический индекс, который можно выразить как отношение LD50/ED50. В некоторых вариантах осуществления предпочтительны соединения, имеющие высокие терапевтические индексы.

Данные, полученные из анализа клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при разработке диапазона доз для применения на людях. Дозировка композиций, представленных в настоящем описании обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который

включает ED50 с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, используемого в способах, представленных в настоящем описании, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена исходя из анализа клеточных культур. Доза может быть подобрана на моделях животных для определения диапазона концентрации соединения в циркулирующей плазме или, при необходимости, для определения полипептидного продукта целевой последовательности (например, для достижения пониженной концентрации полипептида), с учетом IC50 (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается половинное подавление симптомов), определенного на культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения полезных доз для применения на человеке. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к введению дцРНК-агентов, как обсуждалось выше, представленные здесь дцРНК-агенты можно вводить в комбинации с другими известными агентами, эффективными при лечении инфекции HBV. В любом случае лечащий врач может отрегулировать количество и схему (время) введения агента дцРНК на основе результатов, наблюдаемых при использовании стандартных мер эффективности, известных в данной области техники или описанных здесь.

VII. Способы.

В настоящем раскрытии также представлены способы ингибирования экспрессии HBV в клетке. Способы включают контактирование клетки с агентом дцРНК, например, с агентом двухцепочечной дцРНК, в количестве, эффективном для подавления экспрессии HBV в клетке, для достижения подавления экспрессии HBV в клетке.

Контакт клетки с агентом дцРНК, например, с двухцепочечным агентом дцРНК, может осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Контакт клетки *in vivo* с агентом дцРНК включает контактирование клетки или группы клеток внутри субъекта, например, человека, с агентом дцРНК. Также возможны комбинации методов контакта с клеткой *in vitro* и *in vivo*. Контакт с клеткой может быть прямым или косвенным, как обсуждалось выше. Кроме того, контактирование с клеткой может осуществляться через нацеливающий лиганд, что включает любой лиганд, описанный здесь или известный в данной области техники. В предпочтительных вариантах осуществления целевой лиганд представляет собой углеводную составляющую, например лиганд GalNAc3, или любой другой лиганд, который направляет агент дцРНК в интересующий сайт.

В некоторых вариантах осуществления способов настоящего раскрытия агент дцРНК вводят субъекту таким образом, что агент дцРНК доставляется в конкретный сайт внутри субъекта. Ингибирование экспрессии гена HBV можно оценить с помощью измерений уровня мРНК HBV или белка HBV или изменения такового в образце, полученном из жидкости или ткани из определенного участка локализации внутри субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления этот участок выбирается из печени и крови. Сайт также может представлять собой подгруппу или подгруппу клеток или жидкости, приготовленной из любого из вышеупомянутых участков локализации.

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, полезны для лечения субъекта, страдающего инфекцией HBV, например, субъекта, которому необходимо снижение экспрессии гена HBV или репликации HBV. В одном аспекте настоящее изобретение предоставляет способы снижения уровня сссDNA вируса гепатита В у субъекта, инфицированного HBV. В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет способы снижения уровня антигена HBV, например, HBsAg или HBeAg, у субъекта, инфицированного HBV. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы снижения вирусной нагрузки HBV у субъекта, инфицированного HBV. В настоящем описании также представлены способы снижения уровня аланинаминотрансферазы (ALT) или аспаратаминотрансферазы (AST) у субъекта, инфицированного HBV (хотя временное повышение уровня ALT или AST может быть связано с клиренсом вируса). В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы повышения уровня анти-HBV антител у субъекта, инфицированного HBV. В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет способы лечения субъекта, страдающего инфекцией HBV. В одном аспекте настоящее изобретение предоставляет способы лечения субъекта, страдающего заболеванием, связанным с HBV, например, вирусной инфекцией гепатита D, дельта-гепатитом, острым гепатитом В; острым фульминантным гепатитом В; хроническим гепатитом В; фиброзом печени; гепатоцеллюлярной карциномой; или находящегося на терминальной стадии заболевания печени. Кроме того, поскольку инфекция HDV зависит от обязательных вспомогательных функций, обеспечиваемых HBV для передачи инфекции, и субъекты, инфицированные HBV, также могут быть инфицированы HDV, в некоторых вариантах осуществления способы лечения, описанные в настоящем документе, также будут полезны для лечения субъекта, имеющего инфекцию HDV или заболевание, связанное с HDV, такое как вирусная инфекция гепатита В, хроническая инфекция гепатита В (СНВ), цирроз, печеночная недостаточность и гепатоцеллюлярная карцинома (НСС). В некоторых вариантах осуществления способы (и применение) лечения по настоящему раскрытию включает введение субъекту, например человеку, терапевтически эффективного количества агента дцРНК по настоящему изобретению, нацеленного на ген HBV, или фармацевтической композиции, содержащей агент дцРНК, нацеленный на ген HBV, раскрытых в настоящем документе.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего инфекцией HBV, например, наличие сссDNA HBV в сыворотке или печени; наличие сывороточной ДНК HBV; наличие сывороточного или печеночного антигена HBV, например HBsAg или HBeAg; повышенный ALT; повышенный AST; отсутствие или низкий уровень антител к HBV; травма печени; цирроз печени; дельта-гепатит, острый гепатит В; острый фульминантный гепатит В; хронический гепатит В; фиброз печени; терминальная стадия заболевания печени; гепатоцеллюлярная карцинома; синдром, подобный сывороточной болезни; анорексия; тошнота; рвота, субфебрильная температура; миалгия; утомляемость; нарушение остроты вкуса и обоняния (отвращение к пище и сигаретам); боль в правом подреберье и в эпигастрии (периодическая, от легкой до умеренной); печеночная энцефалопатия; сонливость; нарушения режима сна; спутанность сознания; кома; асцит; желудочно-кишечное кровотечение; коагулопатия; желтуха; гепатомегалия (умеренно увеличенная, мягкая печень); спленомегалия; ладонная эритема; паутинные невусы; атрофия мышц; паучьи ангиомы; васкулит; варикозное кровотечение; периферические отеки; гинекомастия; атрофия яичек; коллатеральные вены брюшной полости (caput medusa); уровни ALT выше, чем уровни AST; повышенные уровни гамма-глутамилтрансферазы (GGT) и щелочной фосфатазы (ALP), но не более чем в 3 раза выше ULN); немного пониженный уровень альбумина; повышенный уровень железа в сыворотке; лейкопения (то есть гранулоцитопения); лимфоцитоз; повышенная скорость оседания эритроцитов (СОЭ); сокращение выживаемости красных кровяных телец; гемолиз; тромбоцитопения; увеличение значения международного нормализованного отношения (INR); наличие в сыворотке или печени HBsAg, HBeAg, ядерных антител против гепатита В (анти-HBc), иммуноглобулина М (IgM); наличие поверхностного антитела гепатита В (анти-HBs), или антитела гепатита В е (анти-HBe), или ДНК HBV; повышенный уровень билирубина; гиперглобулинемия; наличие тканеспецифических антител, таких как антитела против гладких мышц (ASMA) или антинуклеарные антитела (ANA) (10-20%); наличие тканеспецифических антител, например антител против щитовидной железы (10-20%); повышенный уровень ревматоидного фактора (РФ); низкий уровень тромбоцитов и лейкоцитов; дегенеративные и регенеративные гепатоцеллюлярными изменения с сопутствующим воспалением в лобулах; или преимущественно центрилобулярный некроз, обнаруживаемый или необнаруживаемый. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества агента дцРНК, например, дцРНК, или фармацевтических композиций, содержащих агент дцРНК, что предотвращает, по меньшей мере, один симптом у субъекта, страдающего расстройством, и которому было бы полезно снижение экспрессии гена HBV, например, у субъекта, имеющего инфекцию HBV, или у субъекта, имеющего одновременно инфекцию HBV и HDV.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение терапевтически эффективного количества агента дцРНК настоящего раскрытия для лечения субъекта, например субъекта, которому было бы полезно снижение или ингибирование экспрессии гена HBV, например субъекта, имеющего инфекцию HBV или субъекта, имеющего одновременно инфекцию HBV и HDV.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение агента дцРНК, например, дцРНК, нацеленного на ген HBV или фармацевтической композиции, содержащей агент дцРНК, нацеленный на ген HBV, при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, например, субъекта, который может получить пользу от снижения экспрессии гена HBV или репликации HBV, например, субъекта, имеющего инфекцию HBV, или субъекта, имеющего одновременно инфекцию HBV и HDV, или субъекта, страдающего расстройством, при котором будет полезно снижение экспрессии гена HBV, например, заболеванием, связанным с HBV.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение агента дцРНК, как описано в данном документе, для предотвращения по меньшей мере одного симптома у страдающего расстройством субъекта, который может выиграть от снижения или ингибирования экспрессии гена HBV или репликации HBV.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение агента дцРНК, как описано в данном документе, в производстве лекарственного средства для предотвращения по меньшей мере одного симптома у страдающего расстройством субъекта, который может выиграть от снижения или ингибирования экспрессии гена HBV или HBV репликации, например, у имеющего заболевание, связанное с HBV.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНК, нацеленный на HBV, вводят субъекту, имеющему инфекцию HBV или и инфекцию HBV и HDV параллельно, или заболевание, связанное с HBV, таким образом, что экспрессия одного или нескольких генов HBV, уровни сссDNA HBV, уровни антигенов HBV, уровни вирусной нагрузки HBV, ALT или AST, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или жидкости субъекта снижаются или нормализуются по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или более в направлении к норме, если субъекту вводят агент дцРНК.

Способы и применения настоящего раскрытия включают, в некоторых вариантах осуществления, введение композиции, описанной в настоящем документе, так, чтобы экспрессия целевого гена HBV снижалась, например, на протяжении примерно 1 месяца. В некоторых вариантах осуществления экспрессия целевого гена HBV снижается на продолжительный период, например, по меньшей мере, два месяца, три месяца или дольше. В некоторых вариантах осуществления способы и применения настоя-

шего раскрытия включающие введение композиции, описанной в настоящем документе, приводят к функциональному излечению.

Введение дцРНК в соответствии со способами и применениями, описанными в данном документе, может привести к снижению тяжести, признаков, симптомов или маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента, как инфекция HBV, HBV -ассоциированное заболевание, или двойная инфекция вирусами HBV и HDV. Под "снижением" в данном контексте подразумевается клинически значимое снижение данного уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 98% до полного снижения ниже уровня обнаружения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность способов настоящего раскрытия можно контролировать путем обнаружения или мониторинга уменьшения симптома заболевания, связанного с HBV. Эти симптомы можно оценить *in vitro* или *in vivo* с использованием любого метода, известного в данной области техники.

Эффективность лечения заболевания можно оценить, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, оценки качества жизни, дозы лекарства, необходимой для поддержания лечебного эффекта, уровня маркера заболевания или любого другого измеримого параметра, соответствующего лечению данного заболевания. Специалист в данной области техники вполне может контролировать эффективность лечения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения СНВ можно оценить, например, путем периодического мониторинга вирусной нагрузки и уровней трансаминаз. Сравнение более поздних показаний с первоначальными показаниями дает врачу представление о том, эффективно ли лечение. Специалист в данной области техники вполне может контролировать эффективность лечения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В связи с введением агента дцРНК, нацеленного на HBV, или фармацевтической композиции такового, термин "эффективный против" HBV-ассоциированного заболевания указывает на то, что введение клинически приемлемым способом приводит к положительному эффекту, по крайней мере, для статистически значимой части пациентов, такому как улучшение симптомов, излечение, уменьшение заболеваемости, продление жизни, улучшение качества жизни или другому эффекту, обычно признаваемому положительным врачами, занимающимися лечением инфекции HBV или заболеваний, связанных с HBV, и устранением связанных с ними причин.

Эффект лечения считается очевидным, когда наблюдается клинически значимое улучшение одного или нескольких параметров статуса болезни, или когда симптомы не ухудшаются или не разваются там, где этого можно было бы ожидать. Например, благоприятное изменение по меньшей мере на 50% измеряемого параметра заболевания, а, предпочтительно, по меньшей мере на 70% или более, может указывать на эффективное лечение. Эффективность данного лекарственного дцРНК-агента или состава такого лекарственного средства также можно оценить с использованием экспериментальной модели на животных для данного заболевания, как известно в данной области техники. При использовании экспериментальной модели на животных эффективность лечения считается подтвержденной, когда наблюдается статистически значимое уменьшение признака или симптома.

Введение агента дцРНК может снизить присутствие ссcDNA HBV в сыворотке или печени, присутствие сывороточного или печеночного антигена HBV, например, HBsAg или HBeAg; или нормализовать уровни ALT или уровни AST, например, в клетке, ткани, крови, моче или другом образце пациента по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, а также если этот уровень падает ниже уровня обнаружения метода в направлении нормы или до верхнего уровня лабораторных значений нормы.

Введение агента дцРНК может сделать обнаруживаемым или увеличить присутствие сывороточных или печеночных анти-HBV антител, например антител против HBsAg, например, в клетке, ткани, крови или другом образце пациента, по меньшей мере, на 80%. 85%, 90%, 95% или более; или сделать антитела детектируемыми, если до лечения таковые не выявлялись.

Благодаря ингибирующему эффекту на экспрессию HBV В некоторых вариантах осуществления, композиция в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическая композиция, приготовленная на ее основе, может улучшать качество жизни пациента.

Субъектами, которым будет полезно снижение или ингибирование экспрессии гена HBV, являются пациенты с инфекцией HBV или связанным с HBV заболеванием или нарушением, как описано в данном документе.

Лечение субъекта, которому было бы полезно снижение или ингибирование экспрессии гена HBV, включает терапевтическое и профилактическое лечение.

В настоящем раскрытии дополнительно представлены способы и применения агента дцРНК или его фармацевтической композиции для лечения субъектов, которые могли бы выиграть от снижения или ингибирования экспрессии гена HBV, например, субъектов, страдающих HBV-ассоциированным заболеванием, в сочетании с другими фармацевтическими препаратами или другими терапевтическими методами, например, в сочетании с такими известными фармацевтическими препаратами или известными терапевтическими методами, как, например, те, которые в настоящее время используются для лечения этих устройств.

Например, в некоторых вариантах осуществления агент дцРНК, нацеленный на один или несколько генов HBV, вводят в комбинации, например, с агентом, применимым для лечения заболевания, связанного с HBV, как описано в данном документе. Например, дополнительные терапевтические средства и терапевтические методы, подходящие для лечения субъекта, который может выиграть от снижения экспрессии HBV, например субъекта, имеющего связанное с HBV заболевание, включают агент дцРНК, нацеленный на другую часть генома HBV, противовирусный агент, аналог нуклеотида, аналог нуклеозида, ингибитор обратной транскриптазы (например, тенофовир дизопроксил фумарат (TDF), тенофовир алафенамид, ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин, AGX-1009, эмвиронитбуци-табин, клещавирбуцин, клефилоксил, фамвир, FTC, N-ацетил-цистеин (NAC), PC1323, терадигм HBV (theradigm-HBV), тимозин-альфа и ганцикловир), иммуностимулятор (например, пегилированный интерферон альфа 2a (PEG-IFN- α 2a), интерферон альфа-2b, рекомбинантный человеческий интерлейкин-7 и агонист Toll-подобного рецептора 7 (TLR7)), терапевтическую вакцину (например, GS-4774, DV-601 и TG1050), ингибитор проникновения вируса (например, Mycludex), олигонуклеотид, ингибирующий секрецию или высвобождение HbsAg (например, REP 9AC), ингибитор капсида (например, Bay41-4109 и NVR-1221), ингибитор сссDNA (например, IHVR-25) или другие терапевтические агенты или процедуры, например, трансплантацию печени или химиотерапию, для лечения HBV-ассоциированного заболевания или комбинацию любого из вышеперечисленного.

Субъекту, которому вводят дцРНК-агент по настоящему изобретению, можно дополнительно вводить одно или несколько других терапевтических средств, которые действуют по не-РНК механизму и которые полезны при лечении инфекции HBV. Типичные терапевтические средства, которые могут использоваться в комбинированной терапии по настоящему изобретению, включают иммуномодуляторы, стимулирующие иммунную систему, например, путем повышения активности хелперов Т-клеток, созревания В-лимфоцитов, ингибирования супрессоров Т-клеток и повышения HLA экспрессии типа I. Подходящие иммуномодуляторы включают интерфероны, обладающие множеством свойств, включая противовирусные, иммуномодулирующие и антипролиферативные эффекты.

Например, текущее лечение хронического гепатита В - это терапия интерфероном, которую назначают субъектам, у которых есть документально подтвержденная инфекция HBV в течение как минимум шести месяцев, повышенные уровни ферментов печени (AST и ALT) и активно делирующийся вирус в крови (наличие HBeAg, или положительные тесты на ДНК HBV). Терапия интерфероном- α обеспечивает длительную стойкую ремиссию заболевания примерно у 35% пациентов с хроническим гепатитом В с нормализацией ферментов печени и потерей трех маркеров активной инфекции (HBeAg, ДНК HBV и HBsAg). Пациентам с острой инфекцией HBV, циррозом в конечной стадии или другими серьезными медицинскими проблемами обычно не назначается лечение интерфероном.

Кроме того, терапия интерфероном пациентов с циррозом, связанным с HBV, значительно снижает частоту гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), особенно у пациентов с большим количеством сывороточной ДНК HBV. У пациентов с HBeAg-позитивным компенсированным циррозом печени вирусологическая и биохимическая ремиссия после терапии интерфероном связаны с улучшением выживаемости. У пациентов с хронической инфекцией HBV клиренс HBeAg после лечения интерфероном- α связан с улучшенными клиническими результатами. Стандартной продолжительностью терапии считается 16 недель. Пациенты, у которых наблюдается низкий уровень репликации вируса по завершении стандартной схемы лечения, больше всего выигрывают от длительного лечения.

В некоторых вариантах осуществления способы настоящего раскрытия включают введение субъекту, страдающему HBV-инфекцией или HBV-ассоциированным заболеванием, ингибитора обратной транскриптазы. В некоторых вариантах осуществления способы настоящего раскрытия включают введение субъекту, страдающему HBV-инфекцией или HBV-ассоциированным заболеванием, ингибитора обратной транскриптазы и иммуностимулятора.

Агент дцРНК и дополнительный терапевтический агент или лечение можно вводить одновременно или в одной и той же комбинации, например, парентерально, или дополнительный терапевтический агент можно вводить как часть отдельной композиции, или в отдельные моменты времени, или другим известным способом, известным в данной области техники или описанным здесь.

В настоящем раскрытии также представлены способы использования агента дцРНК или композиции, содержащей агент дцРНК, описанные в данном документе, для снижения или ингибирования экспрессии HBV в клетке. В других аспектах предусмотрено использование агента дцРНК или композиции, содержащей агент дцРНК, как описано в данном документе, для производства лекарственного средства для снижения или ингибирования экспрессии гена HBV в клетке. В других аспектах настоящее изобретение предоставляет агент мРНК или композицию, содержащую агент дцРНК, раскрытый в данном документе, для использования для снижения или ингибирования репликации HBV в клетке. В других аспектах предусмотрено применение агента дцРНК или композиции, содержащей агент дцРНК, раскрытой в данном документе, для производства лекарственного средства для снижения или ингибирования репликации HBV в клетке. Способы и применения включают приведение клетки в контакт с агентом дцРНК, как описано в данном документе, и поддержание клетки в течение времени, достаточного для расщепле-

ния мРНК транскрипта гена HBV, что тем самым подавляет экспрессию гена HBV или подавляет репликацию HBV в клетке.

В вышеупомянутых способах и применениях клетка может контактировать *in vitro* или *in vivo*, то есть клетка может находиться внутри субъекта.

Клетка, подходящая для лечения с использованием описанных здесь способов, может быть любой клеткой, экспрессирующей ген HBV, например, клеткой, инфицированной HBV, клеткой, содержащей вектор экспрессии, включающий геном HBV или часть гена HBV, или клеткой трансгенной мыши, экспрессирующей ген HBV. Клетка, подходящая для использования в способах и применениях, раскрытых в настоящем документе, может быть клеткой млекопитающего, например, клеткой приматов (такой как человеческая клетка или клетка нечеловекообразных приматов, например, клетка макаки или клетка шимпанзе) или клеткой неприматов (такая как клетка мыши, клетка крысы или клетка другого млекопитающего). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку, которая может быть инфицирована HBV. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, например клетку печени человека.

Экспрессия гена HBV может подавляться в клетке, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90% или 95% или более, или, например, падать до уровня ниже уровня обнаружения метода анализа.

Репликация HBV может быть ингибирована в клетке по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% или более, например, падать до уровня ниже уровня обнаружения метода анализа.

Способы и применения *in vivo*, раскрытые в настоящем документе, могут включать введение для лечения субъекту композиции, содержащей дцРНК-агент, где дцРНК-агент включает нуклеотидную последовательность, комплементарную, по крайней мере, части РНК-транскрипта гена HBV млекопитающего. Когда организм, подлежащий лечению, представляет собой человека, композицию можно вводить любыми способами, известными в данной области техники, включая, без ограничения таковыми, подкожное, внутривенное или внутримышечное введение. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят подкожной инъекцией. В некоторых вариантах осуществления средство с агентом дцРНК составлено для введения всей дозы в виде однократной инъекции. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, составленным для органоспецифических (например, печеночных) внутриартериальных, внутриопухолевых, внутрикожных, интравитреальных инъекций, глазных местных, офтальмологических (глазные капли), глазных местных или других местных путей введения, распыления небулайзером, суппозиториях или перорального приема.

В одном аспекте настоящее изобретение также предоставляет способы ингибирования экспрессии гена HBV у млекопитающего, например человека. В настоящем описании также предлагается композиция, содержащая агент дцРНК, нацеленная на ген HBV в клетке млекопитающего, для ингибирования экспрессии гена HBV у млекопитающего. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение агента дцРНК, нацеленного на ген HBV в клетке млекопитающего, при производстве лекарственного средства для ингибирования экспрессии гена HBV у млекопитающего.

Способы и применения включают введение млекопитающему, например человеку, композиции, содержащей агент дцРНК, нацеленной на ген HBV в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для расщепления транскрипта мРНК вируса гепатита В, что тем самым подавляет экспрессию гена HBV у млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии гена можно оценить в образце периферической крови субъекта, которому ввели дцРНК-агент, любыми способами, известными в данной области техники, например, qRT-PCR, описанной здесь. Снижение продукции белка можно оценить любыми методами, известными в данной области техники, а также методами, например, ELISA или вестерн-блоттингом, описанными в данном документе. При необходимости используются клинически приемлемые методы определения уровня экспрессии генов и белков. В некоторых вариантах осуществления образец пункционной биопсии печени служит тканевым материалом для мониторинга снижения экспрессии гена или белка HBV. В некоторых других вариантах осуществления образец крови служит тканевым материалом для мониторинга снижения экспрессии гена или белка HBV.

В некоторых вариантах осуществления проверка лекарственного расщепления RISC-мишени *in vivo* после введения агента дцРНК осуществляется путем выполнения 5'-RACE или модификаций протокола, как известно в данной области техники (Lasham A et al., (2010) *Nucleic Acid Res.*, 38 (3) p-e19) (Zimmermann et al. (2006) *Nature* 441:111-4).

Изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие.

Примеры

Пример 1.

Синтез агента dsRNA.

Источник реагентов.

Если источник реагента конкретно не указан здесь, такой реагент можно получить у любого поставщика реагентов молекулярной биологии со стандартом качества/чистоты для применения в молекулярной биологии.

Дизайн агента дцРНК.

Как описано в WO/2016/077321, выбор агентов дцРНК, нацеленных на HBV, обусловлен двумя основными факторами: а) эффективностью и б) желанием использовать агенты с почти идеальным соответствием и с более чем 90% фракционным охватом большого количества общедоступных последовательностей HBV всех известных генотипов (от А до Н). Параметры для выбора РНК-агента определяли относительно эталонной последовательности генома NCBI HBV NC_003977.1 (номер доступа в GenBank GI: 21326584 (SEQ ID NO: 1)). Первая выборка РНК-агентов, содержащих модификации структура-активность, включая различные схемы замещения 2'-О-метил и 2'-фтор, сосредоточенных на двух соседних областях генома HBV, кодирующих поверхностный антиген (HbSAg) и полимеразу HBV, была разработана, синтезирована и проверена *in vitro*. Вторая выборка агентов, нацеленных на дополнительные области в геноме HBV, в частности в положениях 1581-1599 SEQ ID NO: 1, т.е. в области, кодирующей HbSAg, полимеразу и ген X, также была разработана, синтезирована и проверена *in vitro*. Выбранные последовательности были подвергнуты дальнейшей химической модификации и тестированию. Эти дуплексные конструкции представлены в WO 2016/077321 (полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки); подробный список немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи HBV представлен в таблицах 3, 6, 12, 22 и 25 в WO 2016/077321, а подробный список модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи HBV представлен в таблицах 4, 7, 13, 23 и 26 в WO 2016/077321. В нем также представлены результаты скрининговых анализов, проведенных с этими агентами.

В этих исследованиях идентифицирован дуплекс AD-66810, имеющий антисмысловую цепь с модифицированной нуклеотидной последовательностью 5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 13) и смысловую цепь с модифицированной нуклеотидной последовательностью 5'-gsusguGfcAfcUfucgcuucasa-3' (SEQ ID NO: 29), где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно; а s представляет собой фосфоротиоатную связь; и где фрагмент N-ацетилгалактозамина N- [трис (GalNAc-алкил) амидодеканойл)] - 4-гидроксипропинол (также известный как (Нур-(OalNAc-алкил) 3) или упоминаемый здесь как L96) ковалентно связан с 3' концом смысловой нити.

Дальнейшее исследование, представленное в настоящем документе, было выполнено для идентификации эффективных специфических молекул агента дцРНК на основе ранее идентифицированной последовательности AD-66810, нацеленной на транскрипт X вируса гепатита В человека (HBV; U95551). Для достижения этой цели был разработан, синтезирован и протестирован на активность *in vitro* ряд химически модифицированных дцРНК агентов с использованием анализа на основе репортера Dual-Luc и клеточной линии HepG2.2.15. Все соединения конъюгировали с трехантенным лигандом N-ацетилгалактозамина (GalNAc) (L96), ковалентно связанным с 3'-концом смысловой цепи.

Синтез агента дцРНК.

Последовательности смысловой и антисмысловой цепей HBV синтезировали в масштабе 1 мкмоль на синтезаторе Mermade 192 (BioAutomation) с использованием химии фосфорамидита, опосредованной твердой подложкой. Твердый носитель представлял собой стекло с контролируемыми порами (500 Å), загруженное специальным лигандом GalNAc или универсальным твердым носителем (AM biochemical). Реагенты для вспомогательного синтеза, 2'-F и 2'-О-метил РНК, и дезоксифосфорамидиты были получены от Thermo-Fisher™ (Милуоки, Висконсин) и HONGENE (Китай). 2'F 2'-О-Метил, GNA (гликолевые нуклеиновые кислоты), 5'-фосфат и модификации нуклеотидов с удаленным основанием (abasic modifications) были введены с использованием соответствующих фосфорамидитов. Синтез одиночных цепей, конъюгированных с 3'-GalNAc, проводили на носителе CPG с модифицированным GalNAc. Изготовленная на заказ универсальная твердая подложка из CPG была использована для синтеза антисмысловых одиночных цепей. Время связывания для всех фосфорамидитов (100 мМ в ацетонитриле) составляло 5 минут с использованием 5-этилтио-1Н-тетразола (ЭТТ) в качестве активатора (0,6 М в ацетонитриле). Фосфоротиоатные связи генерировали с использованием 50 мМ раствора 3-((Диметиламинометилен)амино)-3Н-1,2,4-дигидро-3-тиона (ДДТТ, полученный от Chemgenes (Уилмингтон, Массачусетс, США)) в безводном ацетонитрил/пиридин (1:1 об./об.). Время окисления составляло 3 мин. Все последовательности были синтезированы с окончательным удалением группы DMT ("DMT off").

После завершения твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды отщепляли от твердого носителя и активировали (убирали защиту) в герметичных 96-луночных планшетах с глубокими лунками, используя 200 мкл реагентов водного метиламина при 60°C в течение 20 минут. В конце стадии расщепления и снятия защиты планшет для синтеза нагревали до комнатной температуры и осаждали добавлением 1 мл смеси ацетонитрил:этанол (9:1). Планшеты охлаждали при -80°C в течение 2 часов, супернатант осторожно декантировали с помощью многоканальной пипетки. Осадок олигонуклеотида ресуспендировали в 20 мМ буфере NaOAc и обессоливали с использованием 5-мл колонки с исключением по размеру Hi-Trap™ (GE Healthcare™) в системе очистки АКТА Purifier System, оснащенной автосамплером A905 и

коллектором фракций Frac 950. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты. Образцы из каждой последовательности были проанализированы с помощью LC-MS для подтверждения идентичности, UV (260 нм) для количественной оценки, и с помощью хроматографии IEX для определения чистоты определенной выборки образцов.

Отжиг одиночных цепей HBV проводили на роботе для обработки жидкостей Tecan (Tecan liquid handling robot). Эквимольную смесь смысловых и бессмысловых одиночных цепей объединяли и отжигали в 96-луночных планшетах. После отжига комплементарных одиночных цепей 96-луночный планшет плотно закрывали и нагревали в печи при 100°C в течение 10 минут и позволяли медленно остужаться до комнатной температуры в течение 2-3 часов. Концентрацию каждого дуплекса нормализовали до 10 мкМ в 1X PBS.

Сокращения для раскрытых здесь модифицированных нуклеотидных мономеров показаны в табл. 1. В табл. 2 показаны агенты AD-66810 и дцРНК HBV, синтезированные с использованием вышеуказанных способов.

Табл. 1. Аббревиатуры нуклеотидных мономеров, используемых в модифицированном последовательности нуклеиновой кислоты.

Следует понимать, что, если не указано иное, эти мономеры, если они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Таблица 1

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

cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат
s	фосфоротиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)амидодеcanoил]-4-гидроксипропиол (или «Нур-(GalNAc-алкил)3»)
(Agn)	аденозин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Asn)	аденозин-серинол-нуклеиновая кислота (SNA)
(Gsn)	гуанозин-серинол-нуклеиновая кислота (SNA)
dA	2'-дезоксиаденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксиаденозин-3'-фосфоротиоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксцитидин-3'-фосфоротиоат
dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфоротиоат
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфоротиоат
dU	2'-деоксиуридин
dUs	2'-деоксиуридин-3'-фосфоротиоат

Таблица 2

Модифицированные нуклеотидные последовательности агента
дцРНК HBV, конъюгированного с GalNAc

ID дуплекса	Смысловая последовательность (от 5' до 3')	SEQ ID	Антисмысловая последовательность (5' to 3')	SEQ ID
AD-66810	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu	13
AD-192282	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfdCacsusu	14
AD-192289	gsusgugcdAcdTucgcuucacaL96	11	usdGsuga(Asn)gcgaadGudGcacacsusu	15
AD-81890	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu	16
AD-81892	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gcgaaguGfcAfcacsusu	17

	96			
AD-192290	gsusgugcadCdTucgcuucacaL96	12	usdGsuga(Asn)gcgaadGudGcacacsusu	15
AD-192283	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu	18
AD-192291	gsusgugcdAcdTucgcuucacaL96	11	usdGsugaa(Gsn)cgaadGudGcacacsusu	19
AD-192277	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu	20
AD-192284	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gcgaaguGfcAfdCacsusu	21
AD-192292	gsusgugcadCdTucgcuucacaL96	12	usdGsugaa(Gsn)cgaadGudGcacacsusu	19
AD-192285	gsusgugcdAcdTucgcuucacaL96	11	usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcacacsusu	22
AD-192293	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu	23
AD-192279	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu	24
AD-192286	gsusgugcadCdTucgcuucacaL96	12	usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcacacsusu	22
AD-192294	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu	25
AD-192280	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gdCGfaaguGfcAfcacsusu	26
AD-192287	gsusgugcdAcdTucgcuucacaL96	11	usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcdAcacsusu	27
AD-192281	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu	28
AD-192288	gsusgugcadCdTucgcuucacaL96	12	usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcdAcacsusu	27

Пример 2.

Скрининг дуплексов агентов дцПНК *in vitro*.

Метод анализа экспрессии люциферазы Dual-Glo®.

Клетки Cos7 (ATCC®, Manassas, VA) выращивали до контакта при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в DMEM (ATCC) с добавлением 10% FBS перед высвобождением из планшета трипсинизацией. Трансфекция клеток Cos7 двухцепочечными агентами и psiCHECK2-HBV (вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую часть консенсусной последовательности HBV дикога типа; SEQ ID NO: 5), или двухцепочечными агентами и векторами psiCHECK2, экспрессирующими нуклеотидную последовательность генотипа HBV A, C, E или F (SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9 соответственно), проводили путем добавления 5 мкл дуплексов ПНК и 5 мкл плазмиды psiCHECK2-HBV (или psiCHECK2-HBV генотипа A, C, E или F) плазмиды на лунку вместе с 5 мкл Opti-MEM® плюс 0,1 мкл Lipofectamine™ RNAiMax на лунку (Invitrogen™, Carlsbad CA, cat # 13778-150), а затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем смесь добавляли к клеткам, которые затем ресуспендировали в 35 мкл свежей полной среды. Трансфицированные клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Через сорок восемь часов после трансфекции агентами дцПНК и плазмидой psiCHECK2 измеряли уровень люциферазы Firefly (на контроль трансфекции) и Renilla (слитую с целевой последовательностью HBV). Сначала из клеток удаляли среду. Затем измеряли активность люциферазы Firefly, добавляя 20 мкл люциферазного реагента Dual-Glo® Luciferase Reagent, равного объему культуральной среды, в каждую лунку и перемешивая. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут перед измерением люминесценции (500 нм) на Spectramax® (Molecular Devices) для обнаружения сигнала люциферазы Firefly. Активность люциферазы Renilla измеряли, добавляя 20 мкл реагента Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent при комнатной температуре в каждую лунку, и планшеты инкубировали в течение 10-15 мин, прежде чем снова измерить люминесценцию для определения сигнала люциферазы Renilla. Реагент Dual-Glo® Stop & Glo® подавляет сигнал люциферазы Firefly и гарантирует устойчивое свечение для люциферазной реакции Renilla. Активность агента дцПНК определяли путем нормализации сигнала Renilla (HBV) к сигналу Firefly (контроль) в каждой лунке. Затем оценивали величину активности агента дцПНК по отношению к клеткам, которые были трансфицированы тем же вектором, но не были обработаны агентом дцПНК или обработаны ненацеленным агентом дцПНК. Все трансфекции были вы-

полнены при $n=2$ или более.

Результаты этих анализов с использованием агентов, перечисленных в табл. 2, представлены в табл. 3.

Скрининг *in vitro* клеток HepG2.2.15 и PLC.

Клетки HepG2.2.15 и PLC (клетки гепатомы человека; ATCC® CRL-8024) выращивали до контакта при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM или EMEM (ATCC), соответственно, с добавлением 10% FBS (ATCC) перед высвобождением его из планшета трипсинизацией. Обратную трансфекцию проводили путем добавления 5 мкл дуплексов дцРНК агента на лунку в 96-луночный планшет вместе с 14,8 мкл Opti-MEM® плюс 0,2 мкл Lipofectamine™ RNAiMax на лунку (Invitrogen™, Carlsbad CA. cat # 13778-150) и инкубировали при комнатной температуре 15 минут. Затем добавляли восемьдесят микролитров полной питательной среды без антибиотика, содержащей 2×10^4 клеток HepG2.2.15 или PLC. Клетки инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч перед очисткой РНК.

Результаты этих анализов с использованием агентов, перечисленных в табл. 2, представлены в табл. 4.

Выделение тотальной РНК с использованием набора для выделения общей РНК MagMAX-96 Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystem, Foster City CA, part #: AM1830).

Клетки собирали и лизировали в 140 мкл раствора для лизиса/связывания, затем перемешивали в течение 1 мин при 850 об/мин с использованием термомиксера Eppendorf TMThermomixer (скорость перемешивания была постоянной на протяжении всего процесса). Двадцать микролитров магнитных гранул и смеси усилителя лизиса/связывания добавляли к клеточному лизату и перемешивали в течение 5 мин. Магнитные гранулы были захвачены с использованием магнитной подставки, и супернатант был удален, не трогая гранулы. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывочным раствором 1 (с добавлением изопропанола) и перемешивали в течение 1 минуты. Гранулы снова собирали и супернатант удаляли. Затем гранулы промывали 150 мкл промывочного раствора 2 (с добавлением этанола), удерживали на магнитной подставке и удаляли супернатант. Затем к гранулам добавляли пятьдесят мкл смеси ДНКаз (MagMax turbo DNase Buffer and Turbo DNase) и перемешивали в течение 10-15 мин. После перемешивания добавляли 100 мкл раствора для повторного связывания РНК и перемешивали в течение 3 минут. Супернатант удаляли, и магнитные гранулы снова промывали 150 мкл промывочного раствора 2 и перемешивали в течение 1 минуты, затем супернатант полностью удаляли. Магнитные гранулы перемешивали в течение 2 минут до высыхания, и затем РНК элюировали 50 мкл воды.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК ABI High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat #4368813):

Мастер-смесь, состоящую из 2 мкл 10-кратного буфера, 0,8 мкл 25-кратного dNTP, 2 мкл рандомизированных (случайных) праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию добавляли к 10 мкл общей РНК. кДНК генерировали с использованием термоциклера Bio-Rad® C-1000 or S-1000 thermal cycler (Hercules, CA) по следующему протоколу: 25°C 10 мин, 37°C 120 мин, 85°C 5 секунд, 4°C хранение.

ПЦР в реальном времени.

Два мкл кДНК добавляли в мастер-микс, содержащий 0,5 мкл зонда человека GAPDH TaqMan Probe (Applied Biosystems Cat # 4319413E), 1 мкл SORF2-специфического зонда TaqMan® и 5 мкл мастер-смеси Lightcycler 480 probe master mix (Roche cat# 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche cat# 04887301001). ПЦР в реальном времени проводили в системе LightCycler480 Real Time PCR (Roche) с использованием анализа DDCT (RQ). Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием метода DDCT и нормализовали для анализа, проводимого с клетками, трансфицированными AD-1955, или ложно трансфицированными клетками.

Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени были проанализированы с использованием метода DDCT и нормализованы для сравнения с данными анализа, проводимого с клетками, трансфицированными нецелевым контрольным дцРНК агентом.

Пример 3.

Трансфекция GALNAC-конъюгированных HBV-нацеленных агентов дцРНК в системе DUAL-LUC

Сайленсинг/подавление мРНК HBV после трансфекции каждым из конъюгированных дцРНК агентов показано в табл. 3. Каждый агент дцРНК тестировали трансфекцией в клетках Cos7 при концентрациях агента дцРНК 50 нМ, 10 нМ и 0,1 нМ. На основании результатов скрининга 7 из 20 агентов дцРНК продемонстрировали эффективность, сравнимую с активностью родительского AD-66810.

Таблица 3. Результаты скрининга по методу анализа Dual-Luc конъюгированных агентов дцРНК HBV, трансфицированных при 50 нМ, 10 нМ или 1 нМ.

ID дуплекса	Среднее значение \pm SD остаточной экспрессии агентов дцРНК HBV (%) ^a		
	50 нМ	10 нМ	0.1 нМ
AD-66810	43.18 \pm 5.33	43.83 \pm 3.07	108.98 \pm 13.64
AD-192282	51.82 \pm 2.45	58.09 \pm 12.10	121.63 \pm 7.49
AD-192289	71.82 \pm 12.28	84.84 \pm 6.00	115.35 \pm 16.01
AD-81890	47.09 \pm 3.36	53.70 \pm 7.58	112.10 \pm 15.95
AD-81892	62.70 \pm 1.42	55.04 \pm 6.21	107.79 \pm 14.23
AD-192290	78.23 \pm 5.63	77.77 \pm 6.00	98.24 \pm 4.13
AD-192283	54.62 \pm 3.97	46.70 \pm 9.86	113.80 \pm 21.17
AD-192291	73.97 \pm 6.80	64.32 \pm 5.52	111.71 \pm 10.18
AD-192277	43.08 \pm 1.58	34.82 \pm 4.23	103.32 \pm 12.95
AD-192284	70.20 \pm 5.87	54.10 \pm 3.08	119.01 \pm 12.73
AD-192292	70.91 \pm 13.89	65.99 \pm 3.57	102.58 \pm 8.12
AD-192285	86.15 \pm 7.45	91.39 \pm 8.92	116.62 \pm 8.93
AD-192293	48.05 \pm 0.45	46.38 \pm 6.26	120.84 \pm 10.62
AD-192279	51.29 \pm 6.93	38.35 \pm 2.50	114.22 \pm 10.41
AD-192286	89.16 \pm 12.87	88.74 \pm 4.44	118.16 \pm 12.97
AD-192294	54.36 \pm 5.03	41.89 \pm 5.61	114.19 \pm 11.55
AD-192280	49.20 \pm 7.13	57.22 \pm 14.47	116.35 \pm 6.87
AD-192287	81.73 \pm 14.38	84.10 \pm 10.24	127.11 \pm 12.61
AD-192281	38.74 \pm 4.01	38.45 \pm 4.54	120.99 \pm 7.00
AD-192288	85.37 \pm 9.30	86.14 \pm 5.32	118.09 \pm 9.30

Сокращения: ID=идентификация; SD=стандартное отклонение

^a Фракция оставшейся относительной экспрессии HBV (по сравнению с контрольными трансфицированными клетками) через 48 часов после трансфекции при скрининге агентов dsRNA HBV.

Пример 4.

Трансфекция GalNAc - конъюгированных агентов дцРНК, нацеленных на HBV, в клетках HEPG2.2.15.

Подавление/сайленсинг мРНК HBV (мРНК PORF1 и SORF2, как определено с использованием прямого и обратного праймеров и зонда TaqMan) в клетках HEPG2.2.15 после трансфекции каждым из конъюгированных дцРНК агентов показано в табл. 4. В целом, более устойчивое подавление PORF1 и SORF2 вирусных транскриптов наблюдалось в клетках HEPG2.2.15 по сравнению с подавлением, наблюдаемым в системе сверхэкспрессии Dual-Luc, с 10 агентами дцРНК, имеющими сравнимую эффективность с родительской молекулой AD-66810. Сходная активность агента дцРНК наблюдалась в отношении мРНК PORF1 и SORF2, что и ожидалось, поскольку сайты-мишени дцРНК агента присутствуют в обоих транскриптах.

Таблица 4

Результаты скрининга в клетках HepG2.2.15 агентов конъюгированной дцРНК HBV, трансфицированных при 50 нМ, 10 нМ или 1 нМ

ID дуплекса	% остаточной экспрессии PORF1 (10нМ) ^a	SD	% остаточной экспрессии PORF1 (0.1нМ) ^a	SD	% остаточной экспрессии SORF2 (10нМ) ^a	SD	% остаточной экспрессии SORF2 (0.1нМ) ^a	SD
AD-66810	22.9	0.2	114.3	22.4	22.2	0.3	110.0	19.3
AD-192282	29.7	2.2	84.9	1.2	28.5	1.3	79.9	1.6
AD-192289	71.1	13.7	83.8	9.9	72.7	16.2	92.1	10.8
AD-81890	34.2	7.1	85.5	19.6	33.7	9.1	93.4	26.6
AD-81892	32.9	0.1	82.2	8.5	28.1	2.6	79.9	9.0
AD-192290	72.9	19.3	86.0	7.6	63.3	9.2	92.9	12.7
AD-192283	38.7	18.5	82.0	18.7	31.0	14.5	80.2	12.9
AD-192291	62.9	16.1	80.2	17.6	54.0	13.3	86.2	20.1
AD-192277	33.9	15.4	74.2	17.4	29.0	11.9	76.9	15.7
AD-192284	33.4	8.5	82.4	6.5	25.9	8.2	78.6	2.7
AD-192292	52.2	5.3	80.1	0.9	47.1	6.2	84.4	7.8
AD-192285	85.5	1.0	85.8	10.6	73.1	8.5	84.8	2.9
AD-192293	26.9	1.8	79.1	21.9	24.0	1.7	79.7	16.3
AD-192279	27.2	4.5	81.0	11.1	22.7	4.7	77.8	13.7
AD-192286	91.6	2.5	92.4	5.8	80.3	4.7	93.1	4.6
AD-192294	25.7	2.1	78.2	4.3	23.1	1.5	78.6	10.8
AD-192280	39.7	11.8	83.9	20.8	30.1	8.6	83.0	8.9
AD-192287	66.1	1.2	81.1	7.5	59.3	6.3	80.9	7.5
AD-192281	28.1	8.0	79.6	11.3	23.2	5.2	78.9	4.6
AD-192288	73.1	0.2	95.4	14.5	62.5	7.6	104.4	13.3

Сокращения: SD=стандартное отклонение.

^a Фракция оставшейся относительной экспрессии HBV (по сравнению с контрольными трансфицированными клетками) через 24 часа после трансфекции при скрининге агентов дцРНК HBV.

На основании приведенных выше исследований, для дальнейшего анализа был выбран дуплекс AD-81890.

Пример 5.

Оценка фармакологии AD-81890 в адено-ассоциационной модели мыши HBV после однократной подкожной инъекции.

Фармакологию AD-81890 исследовали на мышинной модели аденоассоциированного HBV (HBV-AAV). AAV8-HBV (SignaGen Laboratories) разводили в 1×PBS до конечной концентрации 2×10^{12} GC/мл. Самцам мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель внутривенно через боковую хвостовую вену ввели 2×10^{12} GC/мышь в фиксированном объеме 100 мкл.

AD-81890 разводили стерильным 1×PBS и вводили переменный объем 10 мкл/г. Животные получали однократную подкожную дозу AD-81890 в дозе 0, 3, 1 или 3 мг/кг, а кровь собирали на -24, -2, 0, 14, 21, 33, 47, 59 и 74 день после введения дозы через ретроорбитальный синус, как описано в табл. 5.

Таблица 5

Дизайн исследования однократной дозы AAV-HBV AD-81890

Группа	Соединение	Доза в День 0 (мг/кг)	№. (Кол-во животных)	Сбор сыворотки (временная точка)
1	PBS	0	9	Дни -24, -2, 0, 14, 21, 33, 47, 59, 74
2	AD-81890	0.3	9 ^a	
3		1	9	
4		3	9	

Сокращения: № = количество; PBS=физиологический раствор на фосфатном буфере

Группа	Соединение	Доза в День 0 (мг/кг)	№. (Кол-во животных)	Сбор сыворотки (временная точка)

^a n=8 животных на 47 день; n=6 на 59 день; n=5 на 72-й день, животные умерщвлены вследствие полученных ран (драки между животными)

После сбора, крови давали возможность свернуться в течение 30 минут, а затем центрифугировали в микроцентрифуге в течение 10 минут при 13000 об/мин и 4°C. Сыворотку отсасывали и хранили при -20°C.

Уровни белка поверхностного антигена вируса гепатита В оценивали с помощью ELISA (BioTang, Waltham, MA). Белок HBsAg US Biologics (Memphis, TN) использовали для построения стандартной кривой. Образцы сыворотки разводили 1×PBS (Gibco, Gaithersburg, MD) в соотношении 1:2000 или 1:500 и оценивали с использованием протокола ELISA с небольшими модификациями. Вкратце, 50 мкл/лунку разбавленной сыворотки или контроля загружали в планшет и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После этой инкубации в каждую лунку добавляли 50 мкл/лунку ферментного конъюгата, и планшет инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Планшет промывали 3 раза по 300 мкл/лунку 1×промывочным буфером, затем блотировали до тех пор, пока из лунок не удалялась вся жидкость, добавляли 100 мкл/лунку субстрата и планшеты инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Наконец, добавляли дополнительные 100 мкл/лунку стоп-раствора и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. В каждом случае, когда рассчитанный уровень HBsAg падал ниже нижнего предела количественного определения (LLOQ) анализа, значения регистрировали как LLOQ (т.е. 313 нг/мл).

Средние концентрации HBsAg±SD в сыворотке HBV-AAV мышей после однократного подкожного (SC) введения AD-81890 показаны на фиг. 2А. Среднее значение±стандартное отклонение сывороточного уровня HBsAg у HBV-AAV мышей относительно исходного уровня показано на фиг. 2В. Однократная подкожная инъекция AD-81890 в дозе 0, 3, 1 или 3 мг/кг привела к сильному и стойкому снижению концентраций HBsAg в сыворотке у HBV-AAV мышей с максимальным снижением на 92%, наблюдаемым на 7-й день в группе самой высокой (3 мг/кг) дозировки AD-81890. Максимальный уровень снижения сохранялся в группе самой высокой дозировки до 33-го дня, после чего уровни HBsAg начали возвращаться к исходному уровню (фиг. 2В). Промежуточное снижение концентраций HBsAg в сыворотке наблюдалось в группах с дозой 0,3 мг/кг и 1 мг/кг AD081890 с максимальным снижением в день 7 на 23% и 72% соответственно. Уровни HBsAg в группах дозировки 0,3 мг/кг и 1 мг/кг AD-81890 вернулись к исходным уровням к концу исследования (день 74).

Пример 6.

Оценка фармакологии AD-81890 в аденоассоциированной HBV модели мыши, после нескольких подкожных инъекций.

Фармакологию AD-81890 исследовали на мышинной модели аденоассоциированного HBV (HBV-AAV). AAV8-HBV (SignaGen Laboratories) разводили в 1×PBS до конечной концентрации 2×10^{12} GC/мл. Самцам мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель внутривенно через боковую хвостовую вену вводили 2×10^{11} GC/мышь в фиксированном объеме 100 мкл.

Каждый AD-66810 и AD-81890 разбавляли стерильным 1×DPBS и вводили переменным объемом объемом 10 мкл/г. Животные получали AD-66810 в дозе 1 мг/кг при Q2Wx6, или однократную дозу AD-81890 9 мг/кг, или множественные дозы AD-81890 в дозе 1 или 3 мг/кг при условии Q2Wx6 или QMx3. Сыворотку собирали у животных в несколько точек времени, как описано в табл. 6. Кровь собирали через ретроорбитальный синус, как описано в табл. 6.

Таблица 6

Дизайн исследования многократной дозы AAV-HBV AD-81890

Группа	Соединение	Доза в День 0 (мг/кг)	Схема введения	N=	Сбор сыворотки
1	PBS	0	Q2Wx6	6	В Дни -55, -27, -13, 0, 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98, 111, 126
2	AD-66810	1	Q2Wx6	6	
3	AD-81890	1	Q2Wx6	6	
4			QMx3	6	
5		3	Q2Wx6	6	
6			QMx3	6	
7		9	QMx1	6	

Образцы крови были обработаны и анализы ELISA выполнены, как описано в предыдущем примере. Результаты показаны в табл. 7 ниже. Результаты со стандартными отклонениями показаны на фиг. 3.

Таблица 7

Результаты многократной дозы AD-81890 AAV-HBV, выраженные как среднее логарифмическое изменение

дцРНК агент	мг/кг	Схема	Дни														
			-55	-27	-13	0	14	28	42	56	70	84	98	111	125	140	
PBS	-	Q2Wx6	0.04	0.09	0.05	0.00	0.06	0.01	0.11	0.03	0.03	0.03	0.00	0.03	0.01	0.04	0.00
AD-66810	1	Q2Wx6	0.02	0.05	0.00	0.00	0.74	0.77	1.41	1.84	1.91	2.12	1.78	1.29	0.97	0.81	0.80
AD-81890	1	Q2Wx6	0.02	0.04	0.06	0.00	0.59	0.76	0.89	1.02	1.13	1.23	0.95	0.95	0.99	0.33	0.13
	1	QMx3	0.06	0.01	0.06	0.00	0.51	0.32	0.73	0.51	0.79	0.63	0.45	0.20	0.11	0.09	0.00
	3	Q2Wx6	0.03	0.04	0.02	0.00	1.30	1.73	2.49	2.57	2.61	2.72	2.03	1.59	1.11	0.50	0.50
												7			6	3	
	3	QMx3	0.02	0.00	0.03	0.00	1.30	1.06	1.56	1.32	1.75	1.53	1.15	0.75	0.88	0.30	0.30
	9	QMx1	0.06	0.03	0.00	0.00	2.71	2.60	2.03	1.16	0.81	0.45	0.29	0.07	0.44	0.01	0.00

Дозозависимый уровень HBsAg в сыворотке наблюдался на модели мышей AAV8-HBV после введения AD-81890. Максимальное снижение HbsAg, составляющее примерно на 2,7 log 10, наблюдалось после однократного введения дозы 9 мг/кг или 3 мг/кг каждые 2 недели по схеме q2wx6 AD-81890. Животные, получавшие 3 мг/кг каждые 2 недели по схеме q2wx6, продемонстрировали устойчивое снижение HBsAg более чем на 2 log10 в течение примерно 8 недель.

Эти исследования *in vivo* демонстрируют AD-81890 эффективность в снижении HBsAg в сыворотке на мышинной модели HBV-AAV.

Пример 7.

Специальный анализ AD-81890 на нецелевое связывание.

Комбинация методов биоинформатики *in silico* и методов *in vitro* была использована для оценки потенциальной нецелевой активности антисмысловой цепи AD-81890.

Биоинформатика.

Набор агентов дцРНК, нацеленных на ген "X" вируса гепатита В (HBV) подтипа ауw (идентификатор нуклеотида GenBank nucleotide ID U95551; NCBI GeneID: 7276; SEQ ID NO:49), был разработан с использованием пользовательских программ R и Python. Кольцевой геном HBV U95551 имеет длину

3182 оснований, а CDS-область гена "X" кодируется в записи NCBI в положениях 1376-1840. Подробности создания агента дцРНК и метода скрининга представлены выше и в WO 2016/077321.

Скрининг трансфекции GalNAc-конъюгированными дцРНК агентами для обнаружения нецелевой активности таковых в клетках HepG2.2.15.

Для измерения нецелевого ингибирования, реакцию эндогенно экспрессируемых транскриптов с помощью кПЦР (qPCR) тестировали на клеточной линии гепатоцитов HepG2.2.15. Клетки трансфицировали в 96-луночных планшетах (2×10^4 клеток на лунку) с помощью AD-81890 в диапазоне концентраций от 50 нМ до 5 фМ, используя Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher). Через 24 часа РНК экстрагировали из клеток с использованием набора для выделения общей РНК MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (ThermoFisher); и кДНК получали с использованием набора ABI High Capacity cDNA reverse transfection kit (ThermoFisher). Образцы анализировали на ингибирование мРНК HBV и потенциальный сайленсинг вне мишени. Для количественной оценки с помощью кПЦР (qPCR) экспрессию HBV оценивали с помощью двух различных пользовательских тестов TaqMan, PORF-1 и SORF-2, распознающих разные области вирусных транскриптов HBV.

Для количественной оценки сайленсинга вне мишени (нецелевого) использовали зонды TaqMan, специфичные для каждой потенциальной нецелевой мишени (Табл. 8). qPCR выполняли с помощью аппарата LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche).

Таблица 8

Потенциальные нецелевые последовательности AD-81890.

Нецелевой ID	Значение нецелевой активности	Позиция мисматча ^a	Присоединение ^b	Целевой ген
AD-81890_(Off-1)	3	19, 16, 13	NM_001040455.1	SIDT2
AD-81890_(Off-2)	3.4	14,11,10	NM_020861.1	ZBTB2

^a Позиции мисматчей/несовпадений определены по отношению к антисмысловой цепи в направлении 5'-3', следовательно, положение 1 соответствует основанию, комплементарному самому первому 5'-нуклеотиду антисмысловой цепи AD-81890.

^b В случае, если несколько идентификаторов RefSeq ID связаны с одним и тем же целевым геном и нецелевым профилем, отображаются оба идентификатора.

Для определения степени целевого ингибирования (HBV) и ингибирования потенциального нецелевого гена относительные уровни РНК определяли при нормализации экспрессии человеческой РНК GAPDH из того же образца. Результаты сравнивали с контролями трансфицированного неспецифического агента дцРНК, и ошибка выражалась как стандартное отклонение. IC50 AD-81890 составляла 0,803 нМ по сравнению с целевым ингибированием транскрипта PORF1 и 0,766 нМ по сравнению с целевым ингибированием транскрипта SORF2. Не наблюдалось значительного нокдауна транскриптов SIDT2 и ZBTB2 даже при самой высокой концентрации AD-81890.

Степень нецелевого ингибирования AD-81890 оценивали при скрининге доза-ответ для 2 потенциальных нецелевых транскриптов из эндогенно экспрессируемых транскриптов в HepG2.2.15. AD-81890 не подавлял экспрессию SIDT2 или ZBTB2 ни в одной из тестируемых доз, в то время как ингибирование HBV зависело от дозы. Проверка данных доза-реакция с использованием четырехпараметрической модели подбора (XLfit) приводила к значениям IC50 803 и 766 пМ для PORF-1 или SORF-2 соответственно.

Пример 8.

Анализ специфичности AD-81890 *in vitro* с использованием РНК-SEQ в клетках HEPG2.2.15.

Влияние химической модификации агента дцРНК путем сравнения AD-66810 и AD-81890 в экспрессирующей HBV клеточной линии HepG2.2.15 измеряли с учетом изменений уровней экспрессии в масштабе транскриптома с помощью RNA-Seq. Молекулы AD-66810 и AD-81890 имеют одинаковую нуклеотидную последовательность, но отличаются заменой одной гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA) в положении 6 от 5'-конца молекулы антисмысловой цепи (см. табл. 2).

Клетки HepG2.2.15, представляющую собой линию клеток, производных из HepG2, стабильно трансфицированных полногеномным HBV, разбавляли культуральной средой до конечной концентрации 187,500 клеток/мл и пипеткой вносили 80 мкл в 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном (BD Bio-coat, cat#356407), до получения конечной концентрации 15000 клеток/лунку.

Стоковые растворы агентов дцРНК разводили в 1хDPBS до следующих концентраций: 1000 нМ или 100 нМ. RNAiMAX (ThermoFisher, Cat#13778150) разбавляли Opti-MEM (ThermoFisher Cat#31985062) до концентрации 0,3 мкл RNAiMAX/10 мкл Opti-MEM и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. После инкубации в каждую лунку 96-луночных покрытых коллагеном планшетов (BD Bio-coat, Cat#356407) добавляли 10 мкл/лунку вместе с 10 мкл/лунку соответствующего разведения агента дцРНК, осторожно перемешивали и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. 80 мкл приготовленной клеточной суспензии добавляли в каждую лунку для получения конечной плотности клеток 15000 клеток/лунку и конечных концентраций агента дцРНК 100 нМ и 10 нМ. Клетки инкубировали в инкубаторе при 37°C с 5%CO₂ в течение 16-22 ч. Клетки засевали таким образом, чтобы

при каждом экспериментальном условии находилось 16 лунок, и эксперимент проводили два раза.

Набор для выделения общей РНК ThermoFisher RNAqueous-96 Total RNA Isolation Kit использовали для выделения РНК в соответствии с протоколом. Вкратце, через 16-22 часов супернатант отсасывали из каждой лунки, добавляли 100 мкл/лунку 1×DPBS для смывания оставшейся среды, затем отсасывали. 200 мкл раствора для лизиса/связывания добавляли в каждую лунку в ряду 1 и в ряду 5 каждого планшета, пипетировали несколько раз вверх и вниз и переносили в следующий ряд так, чтобы 4 лунки/на каждое экспериментальное условие были объединены для обеспечения адекватного выделения РНК. Это дало четыре повтора для каждого условия. 100 мкл 100% этанола добавляли в каждую лунку культурального планшета, содержащего лизаты, несколько раз перемешивали и переносили в лунки фильтровального планшета. Посредством серии этапов центрифугирования (1900×g, 1 мин) образцы промывали предоставленным промывочным раствором, обрабатывали реагентами ДНКазы и элюировали с помощью 100 мкл воды, свободной от нуклеаз. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 8000 (ThermoFisher).

РНК дополнительно обрабатывали ДНКазой TURBO DNase (Ambion). Каждый образец РНК (≤ 10 мкг РНК/образец) смешивали с 2 мкл ДНКазы, 10 мкл 10× буфера и водой, свободной от нуклеаз, до общего объема 100 мкл, затем инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После обработки ДНКазой РНК дополнительно очищали с помощью набора RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) согласно протоколу. РНК элюировали 30 мкл воды, свободной от нуклеаз, и концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000. РНК хранили при -80°C. Эта РНК впоследствии была использована для подготовки библиотеки кДНК с помощью набора TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit (Illumina) и секвенирована на настольном секвенаторе NextSeq500 (Illumina) в соответствии с инструкциями производителя. Было выполнено два экспериментальных повтора.

Клетки HepG2.2.15 трансфицировали в четырех повторах 10 нМ или 100 нМ AD-66810 или AD-81890 и культивировали вместе с необработанными контролями в течение 24 часов. РНК, экстрагированная с помощью набора Purelink RNA kit (ThermoFisher), была использована для подготовки библиотеки кДНК с помощью набора TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit with Ribo-Zero Human/Mouse/Rat for rRNA depletion (Illumina) для истощения рРНК и секвенирована на настольном секвенаторе NextSeq500 (Illumina), все процедуры были сделаны в соответствии с инструкциями производителя. Всего 40 образцов были объединены в проточную кювету NextSeq 500/550 High Output v2 (75 циклов) (Illumina). Было выполнено два экспериментальных повтора.

Необработанные считывания РНК-Seq отбирали с минимальным средним показателем качества 25 и минимальной оставшейся длиной 36 с использованием fastq-mcf. Отобранные считывания были одновременно сопоставлены с геномами человека (hg19/GRCh37) и HBV (GenBank nucleotide ID U95551; NCBI GeneID: 7276) с использованием программы STAR (версия 2.4.2a). Из-за кольцевой структуры генома HBV, 46 пар оснований были повторены в конце линейаризованной версии последовательности HBV, чтобы позволить считываниям картироваться в точке разрыва. Картирование однозначно выровненных считываний на экзоны проводилось с помощью функции featureCounts (version 1.5.0. Все образцы имели >5М сопоставленных считываний. Анализ дифференциальной экспрессии генов выполнялся в R (версия 3.4.1) с использованием пакета DESeq2 (версия 1.16.1). Многократная коррекция (Multiple Testing Correction) для получения скорректированных значений p была выполнена DESeq2 с использованием метода Benjamini & Hochberg, 1995.

Графики MA использовались для визуализации как целевых эффектов нокдауна HBV, так и нецелевой активности. Анализ химической модификации GNA для смягчения общих нецелевых эффектов был ограничен генами с пониженной регуляцией (\log_2 Fold Change <0). Активные гены (\log_2 Fold Change >0) считались вторичными эффектами. Оценка нецелевых эффектов была ограничена наименьшей дозой (10 нМ), поскольку уже был достигнут почти максимальный нокдаун HBV. Для сравнения транскриптомного шума в AD-66810 и/или AD-81890 были идентифицированы гены, которые были значительно подавлены (скорректированное значение p <0,05). Степень подавления визуализировали с помощью прямоугольной диаграммы \log_2 -кратного изменения (\log_2 Fold Change) (Фиг. 4), при этом статистические различия между AD-66810 и AD-81890 оценивали с помощью двустороннего t -критерия Уэлча с двумя выборками (Табл. 9).

Таблица 9

Статистическое тестирование значительно подавляемых генов

эксп.	доза	среднее значение AD-66810.IFC	среднее значение AD-81890.IFC	t-статистика	p-значение	d.o.f.	N
1	10нМ	-0.353	-0.171	-16.1	3.14E-52	1003	523
1	100нМ	-0.350	-0.102	-25.6	7.35E-123	1743	908
2	10нМ	-0.334	-0.154	-13.4	5.28E-37	757	391
2	100нМ	-0.314	-0.179	-13.1	1.35E-37	1693	858

exp: экспериментальный повтор; среднее значение AD-66 810.IFC: Среднее log₂ кратное изменение значительно подавленных генов при AD-66810 и/или AD-81890; среднее значение AD-81890.IFC: среднее log₂ кратное изменение значительно подавленных генов при AD-81890 и/или AD-66810; Статистика: t-статистика из двустороннего двухвыборочного t-критерия Уэлча; p.value: p-значение из двустороннего двухвыборочного t-критерия Уэлча; d.o.f.: степени свободы; N: Количество значительно подавляемых генов (p < 0,05) в AD-66810 и/или AD-81890.

Последовательное снижение нецелевого эффекта при AD-81890 по сравнению с AD-66810 наблюдалось в обоих экспериментальных повторах (фиг. 4, табл. 9). При 10 нМ AD-81890 показал снижение на 52% (повтор 1) и 54% (повтор 2) в среднем log₂ кратном изменении значительно подавляемых генов по сравнению с AD-66810 (Табл. 9). При 100 нМ AD-81890 показал снижение на 71% (повтор 1) и 43% (повтор 2) в среднем log₂ кратном изменении по сравнению с AD-66810 (Табл. 9). Во всех случаях наблюдаемое снижение log₂ Fold Change было статистически значимым. Следовательно, AD-81890 имеет существенно более низкий уровень транскриптомного шума.

Пример 9.

Оценка человеко-специфичной гепатотоксичности в мышинной модели РХВ.

РХВ-мышь представляет собой химерную мышь с гуманизированной печенью, в значительной степени заселенной гепатоцитами человека (PhoenixBio). Мыши являются мышами с активатором плазмидного урокиназного типа (иРА)/тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID), которым трансплантированы гепатоциты человека (мыши с гуманизированной печенью иРА/SCID) (Mercer et al., Nat. Med. 7: 927-933, 2001). Сообщалось, что у мышей иРА/SCID с гуманизированной печенью индекс замещения (RI), т.е. процент гепатоцитов человека в печени превышает 70%. Мышей можно использовать в качестве модели для прогнозирования метаболизма лекарственных средств человека, фармакокинетики и гепатотоксичности таковых (Naritomi et al., Drug Metab Pharmacokinet. 33: 31-39, 2018).

Было проведено исследование на РХВ-мышях для сравнения гепатотоксичности AD-66810 и AD-81890. В 0, 21, 28, 35 и 42 дни мышам вводили 12, 36 или 100 мг/кг AD-66810, AD-81890 или PBS (контроль) путем подкожной инъекции (n=4 на группу). Наблюдения за общим состоянием и измерение массы тела выполняли два раза в неделю до дня 49. Кровь собирали с помощью ретроорбитального кровотечения два раза в неделю, а сыворотку готовили обычными методами. По завершении эксперимента выполнялось терминальное кровотечение и животных умерщвляли пункцией сердца и обескровливанием. После обескровливания производилось вскрытие. Печень собирали и взвешивали. Печень разделяли для хранения в растворе RNeasy (Qiagen), хранили в формалине перед заливкой в парафин и мгновенно замораживали.

Все животные поддерживали массу тела более 80% от начального уровня на протяжении всего периода исследования. Помимо этого, самые низкие среднеарифметические значения массы тела в группах, обработанных соединением, были выше, чем в контрольной группе, обработанной PBS.

Уровни сывороточного альбумина человека в крови контролировали на протяжении всего исследования. Все выжившие животные поддерживали концентрацию h-Alb в крови более 7,0 мг/мл в течение прижизненной фазы исследования.

Ферменты печени контролировались на протяжении всего исследования. В частности, на протяжении всего исследования отслеживались ALT, AST, ALP, GGT, TBIL и TG. Уровни фермента, измеренные на 49 день у мышей, получавших AD-66810, AD-81890 или PBS, показаны в табл. 10 ниже. На фигурах 5А и 5В показаны уровни ALT во времени после введения AD-66810 (Фиг. 5А) или AD-81890 (Фиг. 5В) по сравнению с введением PBS.

Уровни ферментов печени

Группа	дцРНК агент	Доза (мг/кг)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GTT (U/L)	TBIL (U/L)	TG (U/L)
1	AD-66810	12	391	261	407	17	0.3	102
2	AD-66810	36	505	293	398	22	0.2	85
3	AD-66810	100	611	338	392	26	0.3	83
4	AD-81890	12	293	210	375	13	0.3	95
5	AD-81890	36	267	198	376	11	0.3	112
6	AD-81890	100	330	237	410	14	0.2	103
7	PBS	0	139	146	329	10	0.2	110

Для обеих групп, обработанных тестируемым соединением, ALT, AST, ALP и GGT показали увеличение по сравнению с контрольной группой. Кроме того, было продемонстрировано дозозависимое изменение уровней ALT, AST и GGT в группе, получавшей AD-66810.

При аутопсии ни в одной из групп не было обнаружено неспецифических для исследуемого соединения результатов. При сравнении с контрольной группой у животных в группах, получавших соединение, не было явных изменений в относительной массе печени (печень/масса тела).

Эквиваленты.

Специалисты в данной области поймут или смогут установить, используя не более чем рутинное экспериментирование, многие эквивалентные решения конкретных вариантов осуществления и способов, описанных здесь. Подразумевается, что такие эквиваленты входят в объем следующей формулы изобретения.

Хотя были проиллюстрированы и описаны конкретные варианты осуществления, легко понять, что различные варианты осуществления, описанные выше, могут быть объединены для обеспечения дополнительных вариантов осуществления, и что в них могут быть внесены различные изменения, не выходящие за рамки сущности и объема изобретения.

Все фигуры, патенты США, публикации патентных заявок США, заявки на патенты США, зарубежные патенты, заявки на зарубежные патенты и непатентные публикации, упомянутые в данном описании или перечисленные в таблице данных заявки, включая предварительную заявку на патент США № 62/718314, поданную 13 августа 2018 г., полностью включены в настоящий документ посредством ссылки, если не указано иное. Аспекты вариантов осуществления могут быть изменены при необходимости использования концепций различных патентов, заявок и публикаций для предоставления дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты осуществления в свете приведенного выше подробного описания. В общем и целом, в следующей формуле изобретения используемые термины не должны толковаться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, но должны толковаться как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентных решений, к которым относится данная формула изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничивается раскрытием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК), содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь включает модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-gsusguGfcAfcUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29), и антисмысловая цепь содержит модифицированную нуклеотидную последовательность, как изложено в:

5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16),

5'-usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18),

5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20),

5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24), или

5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28),

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

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

dA, dC, dG и dT представляют собой 2'-дезоксаденозин-3'-фосфат, 2'-дезоксцитидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат и 2'-дезокситимидин-3'-фосфат соответственно;

(Agn) представляет собой нуклеиновую кислоту аденозингликоля (GNA); а

s представляет собой фосфоротиоатную связь; и

где указанный агент дцРНК ингибирует экспрессию гена вируса гепатита В (HBV) в клетке.

2. Агент дцРНК по п.1, где антисмысловая цепь и смысловая цепь содержат модифицированные нуклеотидные последовательности, как изложено в:

(a) 5'-usGfsuga (Agn) gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 16) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);

(b) 5'-usGfsuga (Agn) gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 18) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);

(c) 5'-usGfsudGa (Agn) gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 20) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);

(d) 5'-usGfsuga (Agn) dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 24) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29); или

(e) 5'-usGfsuga (Agn) gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 28) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO: 29);

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

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

dA, dC, dG и dT представляют собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфат, 2'-дезоксцитидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат и 2'-дезокситимидин-3'-фосфат соответственно;

(Agn) представляет собой нуклеиновую кислоту аденозингликоля (GNA); а

s представляет собой фосфоротиоатную связь.

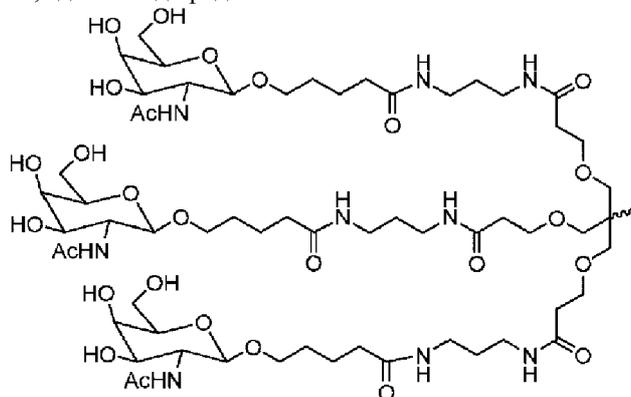
3. Агент дцРНК по п.1 или 2, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ, состоящий по меньшей мере из 1 нуклеотида.

4. Агент дцРНК по любому из пп.1-3, дополнительно содержащий лиганд.

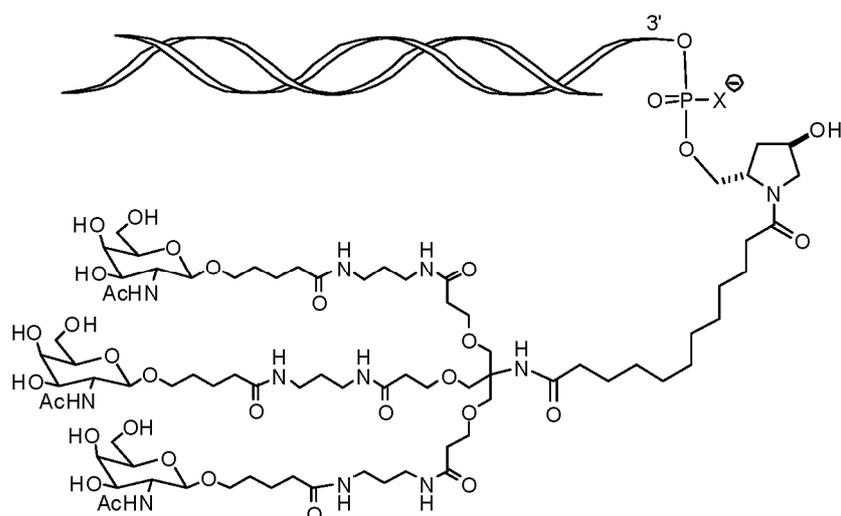
5. Агент дцРНК по п.4, где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи агента дцРНК.

6. Агент дцРНК по п.4 или 5, где лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

7. Агент дцРНК по п.6, где лиганд представляет собой



8. Агент дцРНК по п.7, где агент дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S.

9. Агент дцРНК по п.8, где X представляет собой O.

10. Агент дцРНК по п.1, где антисмысловая цепь и смысловая цепь состоят из модифицированных нуклеотидных последовательностей, как изложено в:

(a) 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10);

(b) 5'-usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10);

(c) 5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10);

(d) 5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10); или

(e) 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10);

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

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

dA, dC, dG и dT представляют собой 2'-дезоксаденозин-3'-фосфат, 2'-дезоксцитидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат и 2'-дезокситимидин-3'-фосфат соответственно;

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

s представляет собой фосфоротиоатную связь; a

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

11. Агент дцРНК по п.1, где антисмысловая цепь и смысловая цепь состоят из модифицированных нуклеотидных последовательностей, как изложено в:

5'-usGfsuga (Agn) gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 16) и 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO: 10);

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

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

dA, dC, dG и dT представляют собой 2'-дезоксаденозин-3'-фосфат, 2'-дезоксцитидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат и 2'-дезокситимидин-3'-фосфат соответственно;

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

s представляет собой фосфоротиоатную связь; a

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

12. Агент дцРНК по любому из пп.1-11, где агент дцРНК ингибирует экспрессию вируса гепатита В (HBV) в клетке.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая агент дцРНК по любому из пп.1-12 и фармацевтический наполнитель.

14. Способ ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В (HBV) или ингибирования репликации HBV в клетке, включающий приведение клетки в контакт с агентом дцРНК по любому из пп.1-12

или фармацевтической композицией по п.13, что тем самым подавляет экспрессию гена HBV в клетке.

15. Способ по п.14, в котором клетка находится внутри субъекта.

16. Способ по п.15, в котором субъектом является человек.

17. Способ по п.14, где клетка находится *in vitro*.

18. Способ снижения уровня антигена вируса гепатита В (HBV) или снижения вирусной нагрузки HBV у субъекта, инфицированного HBV, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента дцРНК по любому из пп.1-12 или фармацевтической композиции по п.13, что снижает уровень антигена HBV у субъекта.

19. Способ по п.18, где антигеном HBV является HbSAg или HBeAg.

20. Способ по п.18, в котором субъект является HBeAg-положительным.

21. Способ по п.18, в котором субъект является HBeAg-отрицательным.

22. Способ лечения субъекта, страдающего инфекцией вируса гепатита В (HBV), включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента дцРНК по любому из пп.1-12 или фармацевтической композиции по п.13, тем самым осуществляющий лечение субъекта.

23. Способ лечения субъекта, страдающего заболеванием, ассоциированным с вирусом гепатита В (HBV), включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента дцРНК по любому из пп.1-12 или фармацевтической композиции по п.13, тем самым осуществляющий лечение субъекта.

24. Способ по п.23, где заболевание, ассоциированное с HBV, представляет собой хронический гепатит, а субъект является HBeAg-положительным.

25. Способ по п.23, где заболевание, ассоциированное с HBV, представляет собой хронический гепатит, а субъект является HBeAg-отрицательным.

26. Способ по п.23, где заболевание, ассоциированное с HBV, представляет собой инфекцию вируса гепатита D (HDV).

27. Способ по п.23, где заболевание, ассоциированное с HBV, представляет собой дельта-гепатит, острый гепатит В, острый фульминантный гепатит В, хронический гепатит В, фиброз печени, терминальную стадию заболевания печени или гепатоцеллюлярную карциному.

28. Способ по любому из пп.14-27, где агент дцРНК вводят субъекту в дозе от 0,01 до 10 мг/кг, от 0,5 до 50 мг/кг или от 3 до 10 мг/кг.

29. Способ по любому из пп.14-27, где агент дцРНК вводят субъекту в фиксированной дозе от 50 до 200 мг или от 50 до 900 мг.

30. Способ по любому из пп.14-29, где агент дцРНК вводят субъекту подкожно.

31. Способ по любому из пп.14-30, где агент дцРНК вводят субъекту в двух или более дозах.

32. Способ по любому из пп.14-31, где агент дцРНК вводят субъекту один раз в месяц, один раз каждые два месяца или один раз каждые три месяца.

33. Способ по любому из пп.14-32, дополнительно включающий введение субъекту одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов.

34. Способ по п.33, где дополнительный терапевтический агент представляет собой противовирусный агент, ингибитор обратной транскриптазы, иммуностимулятор, терапевтическую вакцину, ингибитор проникновения вируса, олигонуклеотид, ингибирующий секрецию или высвобождение HbsAg, ингибитор капсида или ингибитор ковалентно замкнутой кольцевой ДНК HBV или комбинацию любых из вышеперечисленных.

35. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК), содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO: 10) и антисмысловая цепь содержит 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 16);

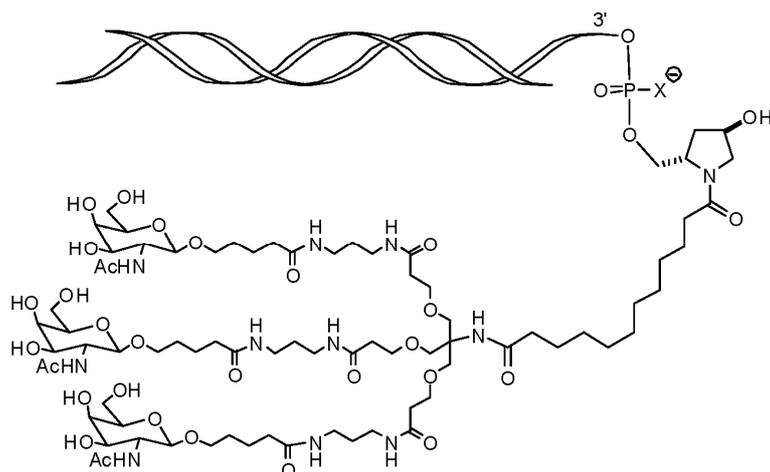
где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат соответственно;

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

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

s представляет собой фосфоротиоатную связь; а

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)амидодеканойл]-4-гидроксипролинол, где L96 конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи, как показано на следующей схеме:



и где X представляет собой O; и

где указанный агент дцРНК ингибирует экспрессию гена вируса гепатита В (HBV) в клетке.

36. Способ лечения субъекта, имеющего инфекцию вируса гепатита В (HBV) или заболевание, связанное с вирусом гепатита В (HBV), включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента дцРНК по п.35, тем самым осуществляющий лечение субъекта.

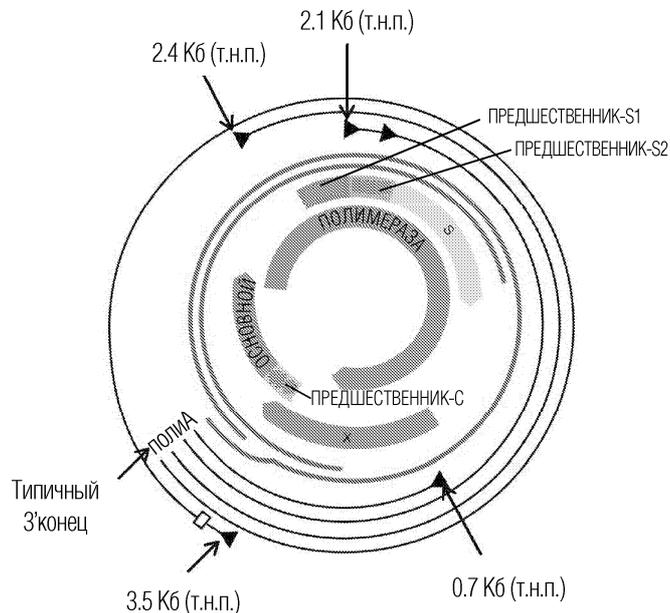
37. Способ по п.36, где заболевание, ассоциированное с HBV, представляет собой инфекцию вируса гепатита D (HDV).

38. Способ по п.36, где заболевание, ассоциированное с HBV, представляет собой дельта-гепатит, острый гепатит В, острый фульминантный гепатит В, хронический гепатит В, фиброз печени, терминальную стадию заболевания печени или гепатоцеллюлярную карциному.

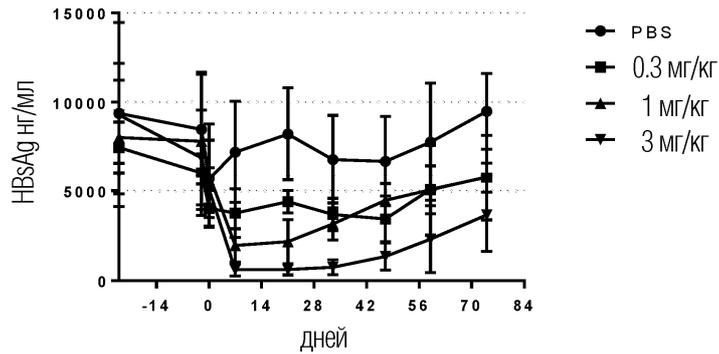
39. Набор для лечения субъекта, имеющего инфекцию вируса гепатита В (HBV) или заболевание, связанное с вирусом гепатита В (HBV), содержащий:

а) агент дцРНК по любому из пп.1-12 и 35 или фармацевтическую композицию по п.13; и

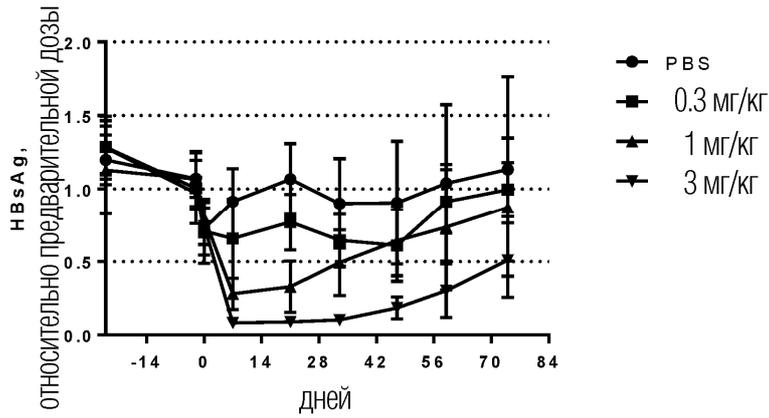
б) инструкции по применению в соответствии со способом по любому из пп.14-34 и 36-38.



Фиг. 1

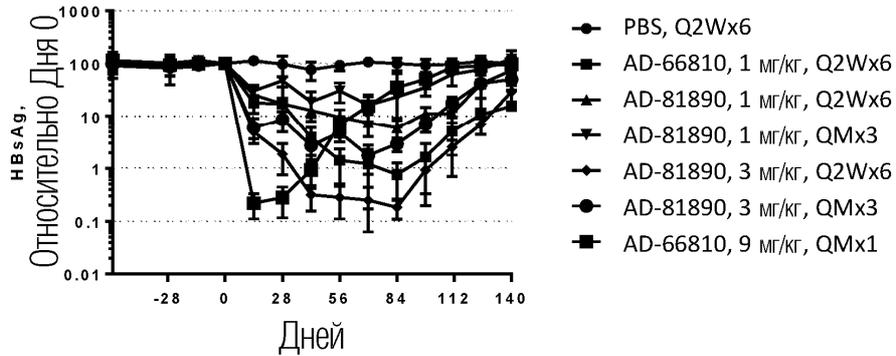


Фиг. 2А

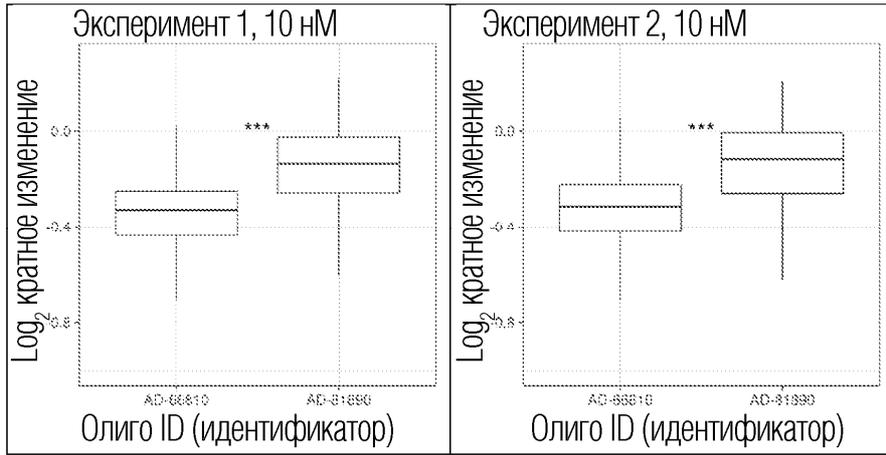


Фиг. 2В

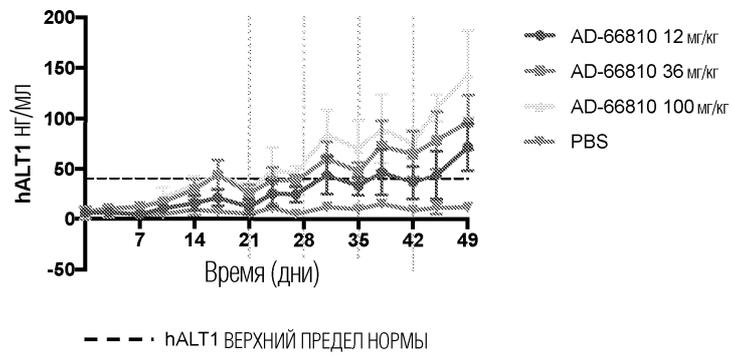
Средние (значения)
по группе



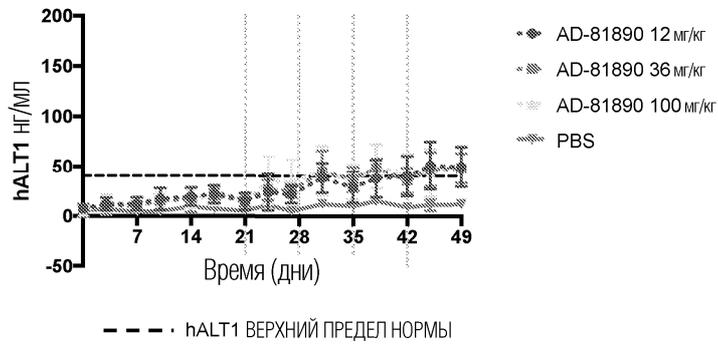
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5А



Фиг. 5В

