

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992473 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.16

(22) Дата подачи заявки
2018.04.18

(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ СУБЪЕКТОВ, ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В (ВГВ)

(31) 62/486,618; 62/553,358; 62/646,978;
62/655,862

(32) 2017.04.18; 2017.09.01; 2018.03.23;
2018.04.11

(33) US

(86) PCT/US2018/028116

(87) WO 2018/195165 2018.10.25

(71) Заявитель:
ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US); ТЕХНИШЕ
УНИВЕРЗИТЕТ МЮНХЕН (DE)

(72) Изобретатель:
Сепп-Лорензино Лаура (US), Протцер
Ульрике, Михлер Томас (DE)

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

(57) Настоящее изобретение относится к способам лечения пациента, имеющего инфекцию вирусом гепатита В (ВГВ), например хроническую инфекцию ВГВ, с использованием комбинации РНКи агента, который направлен на ВГВ, и ВГВ вакцины.

A1

201992473

201992473

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 559526EA/045

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ СУБЪЕКТОВ, ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В (ВГВ)

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США № 62/486618, поданной 18 апреля 2017, временной заявки на патент США № 62/553358, поданной 1 сентября 2017, временной заявки на патент США № 62/646978, поданной 23 марта 2018, и временной заявки на патент США № 62/655862, поданной 11 апреля 2018. Полное содержание каждой из вышеупомянутых временных заявок на патенты включено в настоящее изобретение путем ссылки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который подан электронно в ASCII формате и полностью включен в настоящее изобретение путем ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 12 апреля 2018, называется 121301-07220_SL.txt и имеет размер 429841 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирус гепатита В (ВГВ) представляет собой оболочечный ДНК вирус, который инфицирует печень, что вызывает гепатоцеллюлярный некроз, воспаление, и является основным фактором риска развития цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (НСС). По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире насчитывается 240 миллионов людей, хронически инфицированных ВГВ, в основном в странах с низким и средним уровнем дохода, и что около 650000 человек ежегодно умирают от осложнений от инфекции ВГВ. Хотя имеется эффективная вакцина против гепатита В, и усилия по вакцинации детей при рождении были эффективными для снижения заболеваемости и распространенности инфекции ВГВ, такие программы не оказывают заметного влияния на показатели смертности в течение многих лет (руководящие принципы ВОЗ по профилактике, уходу и лечению людей с хронической инфекцией гепатита В, 2015 по apps.who.int/iris/bitstream/10665/154590/1/9789241549059_eng.pdf?ua=1&ua=1).

Для лечения ВГВ был разработан ряд терапевтических средств, которые эффективно снижают тяжесть заболеваний, связанных с инфекцией ВГВ, но они обычно не приводят к выздоровлению, поскольку они не полностью удаляют все репликативные формы вируса, включая ковалентно замкнутую циклическую ДНК (цкзДНК), которая находится в ядре гепатоцитов и становится матрицей для репликации вируса и транскрипции вирусных РНК. Нуклеотидные и нуклеозидные аналоги, которые обычно считаются золотым стандартом для лечения хронической ВГВ инфекции из-за их безопасности и эффективности, являются эффективными для подавления репликации ВГВ, но они не удаляют цкзДНК, не предотвращают экспрессию вирусных белков, должны постоянно вводиться, и могут приводить к развитию резистентности. Кроме того, лечение нуклеотидными (нуклеозидными) ингибиторами не полностью снижает риск

развития гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), который остается значительным (около 7% через 5–7 лет, несмотря на лечение). Интерфероновые терапии могут приводить к сероконверсии и излечению около 10–15% пациентов, что позволяет прекратить лечение, но данные агенты имеют серьезные побочные эффекты и должны храниться в холодильнике для длительного хранения, что делает их менее желательными для применения в странах, где ВГВ инфекция наиболее распространена.

Лечение хронического ВГВ дополнительно осложняется способностью ВГВ избегать или подавлять иммунный ответ, что приводит к персистенции инфекции. Белки ВГВ обладают иммуноингибирующими свойствами, при этом антиген гепатита В (HBsAg) включает подавляющее большинство белка ВГВ в кровотоке пациентов, инфицированных ВГВ. Кроме того, хотя удаление (посредством сероконверсии) антигена гепатита В (HBeAg) или снижение уровня виремии в сыворотке крови не коррелируют с развитием устойчивого контроля инфекции ВГВ без лечения, удаление сывороточного HBsAg из крови (и сероконверсия) при ВГВ инфекции является общепризнанным прогностическим показателем противовирусного ответа на лечение, который приведет к контролю ВГВ инфекции без лечения. Однако это происходит только у небольшой части пациентов, получающих иммунотерапию. Следовательно, пациенты могут, хотя и редко, иметь достаточно сильный иммунный ответ для подавления или устранения инфекции ВГВ, что приводит, по крайней мере, к функциональному излечению заболевания.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к РНКи агентам и вакцинам против ВГВ для применения в лечении инфекции вирусом гепатита В (ВГВ) и способам лечения пациента, имеющего инфекцию вирусом гепатита В (ВГВ), *например*, хроническую инфекцию ВГВ, которые включают комбинированную терапию или режим лечения, включающий РНКи агент, направленный по меньшей мере на один транскрипт ВГВ, и вакцинотерапию.

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к РНКи агентам и вакцинам против ВГВ для применения в лечении инфекции вирусом гепатита В (ВГВ) и способам лечения пациентов, имеющих инфекцию вирусом гепатита В (ВГВ), *например*, хроническую инфекцию ВГВ. Способы включают режим, который включает введение, *например*, последовательное введение, пациенту, имеющему инфекцию ВГВ, РНКи агента, который направлен по меньшей мере на три транскрипта ВГВ, где РНКи агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь; белковой вакцины, содержащей ВГВ ядерный антиген (HBcAg) и ВГВ поверхностный антиген (HBsAg); и вакцины на основе нуклеиновой кислоты, содержащей экспрессирующую конструкцию, кодирующую HBcAg или HBsAg, где конструкция кодирует белок, который разделяет эпитоп с белковой вакциной, посредством этого осуществляя лечение пациента.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к режиму лечения пациента, имеющего инфекцию вирусом гепатита В (ВГВ), *например*, хроническую инфекцию ВГВ. Режим включает применение РНКи агента, который направлен по меньшей мере на три транскрипта ВГВ, где РНКи агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь;

белковой вакцины, содержащей ВГВ ядерный антиген (HBcAg) и ВГВ поверхностный антиген (HBsAg); и вакцины на основе нуклеиновой кислоты, включающей экспрессирующую конструкцию, кодирующую HBcAg или HBsAg, где конструкция кодирует белок, который разделяет эпитоп с белковой вакциной.

В одном варианте осуществления, HBcAg белок или его иммуногенный фрагмент имеют общий эпитоп с полипептидом ВГВ ядерного антигена (HBcAg) или его иммуногенным фрагментом, присутствующим в белковой вакцине, и/или HBsAg белок или его иммуногенный фрагмент имеют общий эпитоп с полипептидом ВГВ поверхностного антигена (HBsAg) или его иммуногенным фрагментом, присутствующим в белковой вакцине.

В некоторых вариантах осуществления РНКи агент содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления вакцина на основе нуклеиновой кислоты включает экспрессирующую конструкцию, кодирующую HBcAg и HBsAg.

В некоторых вариантах осуществления РНКи агент, направленный на ВГВ, вводят пациенту по меньшей мере два раза.

В некоторых вариантах осуществления РНКи агент, направленный ВГВ, вводимый пациенту, снижает HBsAg в сыворотке пациента по меньшей мере на $0,5 \log_{10}$ МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления, пациент имеет по меньшей мере $0,5 \log_{10}$ МЕ/мл снижение HBsAg в сыворотке перед введением первой дозы белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления, пациент имеет по меньшей мере $1 \log_{10}$ МЕ/мл снижение HBsAg в сыворотке перед введением первой дозы белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет HBsAg $2 \log_{10}$ МЕ/мл или меньше в сыворотке перед введением вакцины.

В некоторых вариантах осуществления РНКи агент вводят пациенту не более чем один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления РНКи агент вводят пациенту не более чем один раз каждые четыре недели.

В некоторых вариантах осуществления РНКи агент вводят пациенту при дозе 0,01 мг/кг–10 мг/кг; или 0,5 мг/кг–50 мг/кг; или 10 мг/кг–30 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, РНКи агент вводят пациенту в дозе, выбранной из 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, и 30 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозу РНКи агента вводят пациенту приблизительно один раз в неделю; приблизительно один раз в две недели; приблизительно один раз в три недели; приблизительно один раз в четыре недели; или дозу РНКи агента вводят пациенту не более чем один раз в неделю; или дозу РНКи агента вводят пациенту не более чем один раз в четыре недели.

В некоторых вариантах осуществления белковая вакцина включает аминокислотную последовательность по меньшей мере одной детерминанты HBsAg и по меньшей мере одной детерминанты HBcAg.

В некоторых вариантах осуществления вакцина на основе нуклеиновой кислоты, содержащая экспрессирующую векторную конструкцию, кодирующую HBcAg или

HBsAg, кодирует аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну детерминанту HBsAg или по меньшей мере одну детерминанту HBcAg.

В некоторых вариантах осуществления, детерминанта HBsAg содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 124–147 SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления детерминанта HBsAg содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 99–168 SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления детерминанта HBcAg содержит последовательность, содержащую аминокислоты 80 SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления последовательность, содержащая аминокислоты 80 SEQ ID NO: 24, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по меньшей мере аминокислотам 70–90 SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления детерминанта HBcAg содержит последовательность, содержащую аминокислоты 138 SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления последовательность, содержащая аминокислоты 80 SEQ ID NO: 14, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по меньшей мере аминокислотам 128–143 SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления, детерминанта HBcAg содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по меньшей мере 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 смежным аминокислотам SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления детерминанта HBcAg содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 1–143 SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления белковая вакцина, вводимая пациенту, содержит дозу 0,1 мкг–1,0 мг HBcAg и дозу 0,1 мкг–1,0 мг HBsAg. В некоторых вариантах осуществления дозу белковой вакцины вводят пациенту приблизительно один раз в неделю; приблизительно один раз в две недели; приблизительно один раз в три недели; приблизительно один раз в четыре недели; или дозу белковой вакцины вводят пациенту не более чем один раз в неделю; или дозу белковой вакцины вводят пациенту не более чем один раз в четыре недели.

В некоторых вариантах осуществления HBcAg белок и HBsAg белок присутствуют в одном составе. В некоторых вариантах осуществления HBcAg белок и HBsAg белок не присутствуют в одном составе. В некоторых вариантах осуществления белковая вакцина содержит адъювант. В некоторых вариантах осуществления адъювант стимулирует уравновешенный Th1/Th2 ответ. В некоторых вариантах осуществления адъювант выбирают из монофосфорилилипида А (MPL), поли (I:C), полиICLC адъюванта, CpG ДНК, полиICLC адъюванта, STING агониста, α -ди-АМФ, α -ди-ГМФ, α -ди-ЦМФ; короткой 5'-трифосфат дцРНК с тупыми концами (3pRNA) Rlg-I лиганда, поли[ди(натрийкарбоксилатомэтилфенокси)фосфазена] (PCEP)), квасцов, виросом, цитокинов, IL-12, AS02, AS03, AS04, MF59, ISCOMATRIX®, IC31® или Rlg-I лиганда. В некоторых вариантах осуществления адъювант выбирают из полиI:C адъюванта, CpG

адьюванта, STING агониста или РСЕР адьюванта.

В некоторых вариантах осуществления белковую вакцину вводят пациенту по меньшей мере два раза. В некоторых вариантах осуществления белковую вакцину вводят пациенту не более чем один раз каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления белковую вакцину вводят пациенту не ранее, чем день, в который последнюю дозу РНКи агента вводят пациенту. В некоторых вариантах осуществления белковую вакцину вводят пациенту в тот же день, как последнюю дозу РНКи агента вводят пациенту. В некоторых вариантах осуществления белковую вакцину вводят пациенту не позднее, чем через месяц после того, как последнюю дозу РНКи агента ввели пациенту. В некоторых вариантах осуществления белковую вакцину вводят пациенту не позднее, чем через два месяца после того, как последнюю дозу РНКи агента ввели пациенту. В некоторых вариантах осуществления белковую вакцину вводят пациенту не позднее, чем через три месяца после того, как последнюю дозу РНКи агента ввели пациенту.

В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению дополнительно включает определение уровня HBsAg в сыворотке после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением белковой вакцины. То есть, уровень HBsAg в сыворотке определяют у пациента после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением белковой вакцины.

В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению дополнительно включают определение уровня HBeAg в сыворотке после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением белковой вакцины. То есть, уровень HBeAg в сыворотке определяют у пациента после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением белковой вакцины.

В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению способы настоящего изобретению дополнительно включают определение уровня HBsAg и уровня HBeAg в сыворотке после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением белковой вакцины. То есть, уровень HBsAg в сыворотке и уровень HBeAg в сыворотке определяют у пациента после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением белковой вакцины.

В некоторых вариантах осуществления вакцина на основе нуклеиновой кислоты включает по меньшей мере одну экспрессирующую векторную конструкцию, кодирующую и HBcAg и HBsAg. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая конструкция способствует экспрессии HBcAg и HBsAg с одного промотора. В других вариантах осуществления экспрессирующая конструкция способствует экспрессии HBcAg и HBsAg с отдельных промоторов.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один промотор выбирают из промотора респираторно-синцитиального вируса (RSV), промотора цитомегаловируса (CMV), РН5 промотора и Н1 промотора. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая конструкция включает вирусный вектор. В некоторых вариантах

осуществления вирусный вектор выбирают из аденовирусного вектора; ретровирусного вектора, лентивирусного вектора, вектора на основе вируса мышинного лейкоза Молони, адено-ассоциированного вирусного вектора; вектора на основе вируса простого герпеса; SV 40 вектора; вектора на основе вируса полиомы; вектора на основе вируса папилломы; вектора на основе пикарновируса; вектора на основе поксвируса, вектора на основе ортопоксвируса, вектора на основе вируса осповакцины, вектора на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), вектора на основе авипоксвируса, вектора на основе вируса оспы канареек, вектора на основе вируса оспы птиц, аденовирусного вектора и вектора на основе вируса Эпштейна–Барр. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой MVA вектор.

В некоторых вариантах осуществления вакцина на основе нуклеиновой кислоты, вводимая пациенту, содержит инфекционную дозу для тканевой культуры ($TCID_{50}$) 10^6 – $10^{10} TCID_{50}$; или 10^6 – $10^9 TCID_{50}$; или 10^6 – $10^8 TCID_{50}$

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе нуклеиновой кислоты вводят пациенту не ранее чем через две недели после того, как ввели конечную дозу белковой вакцины пациенту.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение уровня HBsAg в сыворотке после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением вакцины на основе нуклеиновой кислоты. То есть, уровень HBsAg в сыворотке определяют у пациента после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением вакцины на основе нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вакцину на основе нуклеиновой кислоты вводят пациенту после дополнительного снижения по меньшей мере на $0,5 \log 10$ HBsAg в сыворотке после того, как по меньшей мере одну дозу белковой вакцины вводят пациенту. В некоторых вариантах осуществления режима одну дозу вакцины на основе нуклеиновой кислоты вводят пациенту.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение уровня HBeAg в сыворотке после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением вакцины на основе нуклеиновой кислоты. То есть, уровень HBeAg в сыворотке определяют у пациента после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением вакцины на основе нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вакцину на основе нуклеиновой кислоты вводят пациенту после дополнительного снижения по меньшей мере на $0,5 \log 10$ HBeAg в сыворотке после того, как по меньшей мере одну дозу белковой вакцины вводят пациенту. В некоторых вариантах осуществления режима разовую дозу вакцины на основе нуклеиновой кислоты вводят пациенту.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение уровня HBsAg в сыворотке и уровня HBeAg после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением вакцины на основе нуклеиновой кислоты. То есть, уровень HBsAg в сыворотке и уровень HBeAg в сыворотке определяют

у пациента после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением вакцины на основе нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вакцину на основе нуклеиновой кислоты вводят пациенту после дополнительного снижения по меньшей мере на $0,5 \log_{10}$ HBsAg в сыворотке и HBeAg в сыворотке после того, как по меньшей мере одну дозу белковой вакцины вводят пациенту. В некоторых вариантах осуществления режима разовую дозу вакцины на основе нуклеиновой кислоты вводят пациенту.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение нуклеотидного (нуклеозидного) аналога пациенту по меньшей мере перед введением РНКи, нацеленной на ВГВ. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный (нуклеозидный) аналог вводят на протяжении всего режима. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный (нуклеозидный) аналог выбирают из дизопроксилфумарата тенофовира (TDF), алафенамида тенофовира (TAF), ламивудина, дипивоксила адефовира, энтекавира (ETV), телбивудина, AGX-1009, эмтрицитабина, клевудина, ритонавира, дипивоксила, лобукавира, фамвира, FTC, N-ацетилцистеина (NAC), PC1323, терадигм-ВГВ, тимозина-альфа и ганцикловира, бесифовира (ANA-380/LB-80380) и тенофовир-эксалиад (TLX/CMX157).

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет HBsAg в сыворотке ниже 3000 МЕ/мл перед введением РНКи агента. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет HBsAg в сыворотке ниже 4000 МЕ/мл перед введением РНКи агента. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет HBsAg в сыворотке ниже 5000 МЕ/мл перед введением РНКи агента.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение уровня HBsAg, по меньшей мере, $2 \log_{10}$ по масштабу после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение уровня HBeAg по меньшей мере $1 \log_{10}$ по масштабу после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение уровня HBsAg по меньшей мере $2 \log_{10}$ по масштабу и снижение уровня HBeAg по меньшей мере $1 \log_{10}$ по масштабу после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение уровня HBsAg до 500 МЕ/мл или менее после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение уровня HBsAg до 200 МЕ/мл или менее после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение уровня HBsAg до 100 МЕ/мл или менее после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение уровня HBeAg до 500 МЕ/мл или менее после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение

уровня HBeAg до 200 МЕ/мл или менее после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение уровня HBeAg до 100 МЕ/мл или менее после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение уровня HBsAg и уровня HBeAg до 500 МЕ/мл или менее после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение уровня HBsAg и уровня HBeAg до 200 МЕ/мл или менее после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет снижение уровня HBsAg и уровня HBeAg до 100 МЕ/мл или менее после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

В некоторых вариантах осуществления уровень HBsAg и HBeAg в сыворотке у пациента снижается ниже уровня детекции с использованием клинического анализа в течение по меньшей мере трех месяцев после последней дозы вакцины на основе нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления уровень HBsAg и HBeAg в сыворотке у пациента снижается ниже уровня детекции с использованием клинического анализа в течение по меньшей мере шести месяцев после последней дозы вакцины на основе нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления HBsAg в сыворотке у пациента снижается ниже уровня детекции с использованием клинического анализа в течение по меньшей мере шести месяцев после последней дозы вакцины на основе нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение иммуностимулятора пациенту. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулятор выбирают из группы пегилированного интерферона альфа 2a (ПЭГ-IFN-альфа-2a), интерферона альфа-2b, ПЭГ-IFN-альфа-2b, интерферона лямбда, рекомбинантного человеческого интерлейкина-7, и агониста Toll-подобного рецептора 3, 7, 8 или 9 (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), ингибитора попадания вируса у клетку, мирклюдекса, олигонуклеотида, который ингибирует секрецию или высвобождение HBsAg, REP 9AC, ингибитора сборки капсида, Bay41-4109, NVR-1221, цкзДНК ингибитора, IHVR-25) вирусного капсида, MVA капсида, регулятора иммунной контрольной точки, CTLA-4 ингибитора, ипилимумаба, PD-1 ингибитора, ниволумаба, пембролизумаба, BGB-A317 антитела, PD-L1 ингибитора, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и аффимерного биотерапевтического средства.

В некоторых вариантах осуществления режима, пациент представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления режима, РНКи агент направлен на четыре транскрипта ВГВ. В некоторых вариантах осуществления РНКи агент выбирают из РНКи в приложении А. В некоторых вариантах осуществления РНКи агент выбирают из любого из агентов в любой из таблиц 2-11 в приложении А. В некоторых вариантах осуществления РНКи агент направлен по меньшей мере на 15 непрерывных нуклеотидов

нуклеотидов 206–228, 207–229, 210–232, 212–234, 214–236, 215–237, 216–238, 226–248, 245–267, 250–272, 252–274, 253–275, 254–276, 256–278, 258–280, 263–285, 370–392, 373–395, 375–397, 401–423, 405–427, 410–432, 411–433, 422–444, 424–446, 425–447, 426–448, 731–753, 734–756, 1174–1196, 1250–1272, 1255–1277, 1256–1278, 1545–1567, 1547–1569, 1551–1571, 1577–1597, 1579–1597, 1580–1598, 1806–1825, 1812–1831, 1814–1836, 1829–1851, 1831–1853, 1857–1879, 1864–1886, 2259–2281, 2298–2320 или 2828–2850 SEQ ID NO: 1 (NC_003977.1). В некоторых вариантах осуществления РНКи агент направлен по меньшей мере на 15 непрерывных нуклеотидов нуклеотидов 1579–1597 или 1812–1831 SEQ ID NO: 1 (NC_003977.1). В некоторых вариантах осуществления РНКи агент направлен на нуклеотиды 1579–1597 или 1812–1831 SEQ ID NO: 1 (NC_003977.1).

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 15 непрерывных нуклеотидов UGUGAAGCGAAGUGCACACUU (SEQ ID NO: 25) или AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU (SEQ ID NO: 26). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 19 непрерывных нуклеотидов UGUGAAGCGAAGUGCACACUU (SEQ ID NO: 25) или AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU (SEQ ID NO: 26). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность UGUGAAGCGAAGUGCACACUU (SEQ ID NO: 25) или AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU (SEQ ID NO: 26).

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 15 непрерывных нуклеотидов GUGUGCACUUCGCUUCACA (SEQ ID NO: 27) или CACCAUGCAACUUUUCACCU (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 19 непрерывных нуклеотидов GUGUGCACUUCGCUUCACA (SEQ ID NO: 27) или CACCAUGCAACUUUUCACCU (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность GUGUGCACUUCGCUUCACA (SEQ ID NO: 27) или CACCAUGCAACUUUUCACCU (SEQ ID NO: 28).

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 15 непрерывных нуклеотидов UGUGAAGCGAAGUGCACACUU (SEQ ID NO: 25), и смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 15 непрерывных нуклеотидов GUGUGCACUUCGCUUCACA (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 19 непрерывных нуклеотидов UGUGAAGCGAAGUGCACACUU (SEQ ID NO: 25), и смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 19 непрерывных нуклеотидов GUGUGCACUUCGCUUCACA (SEQ ID NO: 27). В

некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность UGUGAAGCGAAGUGCACACUU (SEQ ID NO: 25), и смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность GUGUGCACUUCGCUUCACA (SEQ ID NO: 27).

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 15 непрерывных нуклеотидов AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU (SEQ ID NO: 26), и смысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 15 непрерывных нуклеотидов CACCAUGCAACUUUUCACCU (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 19 непрерывных нуклеотидов AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU (SEQ ID NO: 26), и смысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 19 непрерывных нуклеотидов CACCAUGCAACUUUUCACCU (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU (SEQ ID NO: 26), и смысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность CACCAUGCAACUUUUCACCU (SEQ ID NO: 28).

В некоторых вариантах осуществления режима по существу все из нуклеотидов указанной смысловой цепи и по существу все из нуклеотидов указанной антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая цепь соединена с лигандом, присоединенным по 3'-концу. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой одно или более GalNAc производных, присоединенных через моновалентный линкер, двухвалентный разветвленный линкер или трехвалентный разветвленный линкер. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбирают из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил модифицированного нуклеотида, 2'-фтор модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксидифицированного нуклеотида, замкнутого нуклеотида, разомкнутого нуклеотида, конформационно запертого нуклеотида, запертого этилнуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, и нуклеотида, содержащего 5'-фосфатный миметик.

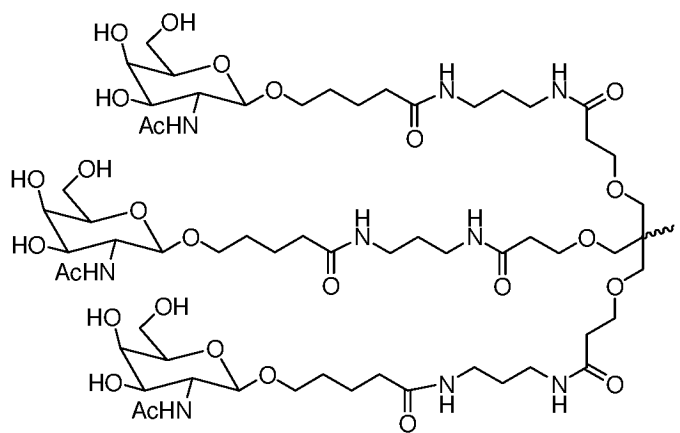
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь РНКи агента

содержит 3' «липкий конец» по меньшей мере из 1 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь РНКи агента содержит 3' «липкий конец» по меньшей мере из 2 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область РНКи агента составляет 15–30 нуклеотидных пар в длину; 17–23 нуклеотидных пар в длину; 17–25 нуклеотидных пар в длину; 23–27 нуклеотидных пар в длину; 19–21 нуклеотидных пар в длину; 21–23 нуклеотидных пар в длину.

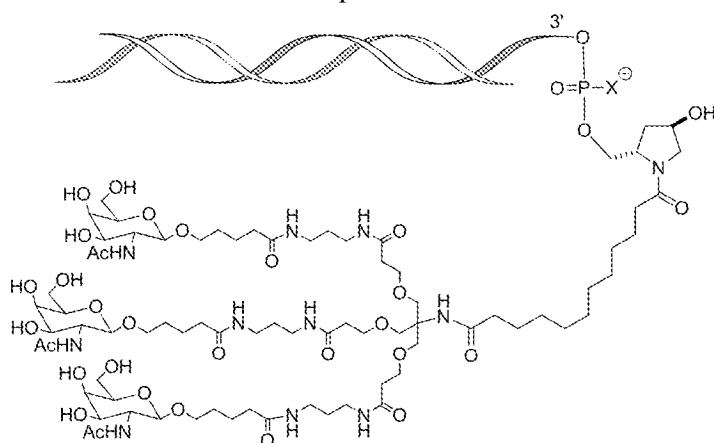
В некоторых вариантах осуществления каждая цепь РНКи агента содержит 15–30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления каждая цепь РНКи агента содержит 19–30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой



и РНКи агент необязательно конъюгирован с лигандом, как показано на следующем схематическом изображении



где X представляет собой O или S.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'–gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca–3' (SEQ ID NO: 29), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'–usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu–3' (SEQ ID NO: 30); или смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'–csascauGfcAfAfCfuuuuucaccu–3' (SEQ ID NO: 31), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'–asGfsgugAfaAfAfaguGfcAfuggugsusu–3' (SEQ ID

NO: 32), где а, с, и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно; as, cs, gs и us представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфоротиоат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат, и 2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат, 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 Gfs представляет собой 2'-фторгуанозин-3'-фосфоротиоат. В некоторых вариантах осуществления РНКи агент представляет собой AD-66810 или AD-66816.

В некоторых вариантах осуществления белковая вакцина содержит эпитоп, присутствующий по меньшей мере в 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 генотипах ВГВ.

В некоторых вариантах осуществления вакцина на основе нуклеиновой кислоты содержит эпитоп, присутствующий по меньшей мере в 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 генотипах ВГВ.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применениям РНКи агентов и вакцин по настоящему изобретению для лечения пациентов, имеющих инфекцию вирусом гепатита В, на основе способов согласно настоящему изобретению. В одном варианте осуществления РНКи агенты и вакцины против ВГВ используют в получении лекарственных средств для лечения пациентов с инфекцией ВГВ.

Настоящее изобретение дополнительно относится к наборам, содержащим РНКи агенты и вакцины согласно настоящему изобретению и инструкции, определяющие режимы лечения, для их применения в лечении пациентов, имеющих инфекцию вирусом гепатита В.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующим подробным описанием и чертежами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 схематически изображает структуру приблизительно 3,2 т.п.н. двухцепочечный геном ВГВ. Репликация генома ВГВ осуществляется через РНК интермедиат и дает 4 перекрывающихся вирусных транскрипта приблизительно 3,5 т.п.н., 2,4 т.п.н., 2,1 т.п.н. и 0,7 т.п.н. (участки терминации показаны стрелками), и стандартный 3' конец, кодирующий семь вирусных белков (pre-S1, pre-S2, S, P, X, pre-C, и C), которые транслируются с трех рамок считывания.

Фигуры 2А–2Е представляют собой графики, показывающие подавление миРНК ВГВ в модели трансгенных мышей. Уровень (2А) HBsAg, (2В) HBeAg и (2С) ВГВ–ДНК в сыворотке HBV1.3–xfs мышей (n=6 на группу) после одной подкожной 3 мг/кг или 9 мг/кг дозы контрольной GalNAc–миРНК (миРНК, которая не направлена на ВГВ), AD–66816 или AD–66810. Уровень (2D) суммарной РНК ВГВ и (2Е) 3,5 т.п.н. транскриптов ВГВ из лизатов печени, определенные КППР в реальном времени и нормализованные к глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH).

Фигура 3 представляет собой схему, показывающую режим дозирования для

эксперимента, анализирующего эффект предобработки of HBV1.3-xfс мышей нуклеозидным ингибитором, энтекавиром, ВГВ–кшРНК, контролем GalNAc–миРНК, AD–66816 или AD–66810 перед введением терапевтической вакцины против ВГВ.

Фигуры 4А–4С представляют собой графики, показывающие уровень (4А) HBsAg, (4В) HBeAg и (4С) ВГВ–ДНК в сыворотке HBV1.3-xfс мышей после обработки, исходя из режима дозирования, представленного на фигуре 3.

Фигуры 5А–5F представляют собой графики, показывающие Т–клеточный иммунный ответ в печени относительно пептидов (5А) HBs(S208), (5В) HBc(C93) и (5С) MVA(B8R) у HBV1.3-xfс мышей после обработки, исходя из режима дозирования, представленного на фигуре 3. Фигуры 5D–5F показывают повторный анализ тех же данных, как на фигурах 5А–5С, проведенный для приспособления к недостаточному исключению мертвых иммунных клеток, и показывает Т–клеточный иммунный ответ в печени относительно пептидов (5D) HBs(S208), (5Е) HBc(C93) и (5F) MVA(B8R).

Фигуры 6А–6С показывают уровень РНК ВГВ и уровни белка в клетках печени у HBV1.3-xfс мышей после обработки, исходя из режима дозирования, представленного на фигуре 3. Фигура 6А показывает суммарную РНК ВГВ. Фигура 6В показывает ВГВ 3,5 т.п.н. транскрипт относительно GAPDH, как определено кПЦР в реальном времени. Фигура 6С показывает количество HBcAg положительных клеток на мм² среза печени, определенное иммуногистохимическим окрашиванием.

Фигура 7 представляет собой схему, показывающую режим дозирования для эксперимента, анализирующего эффект предобработки HBV1.3-xfс мышей контрольной миРНК или AD–66816 перед введением терапевтической вакцины против ВГВ.

Фигуры 8А–8С представляют собой графики, показывающие уровни (8А) HBsAg, (8В) HBeAg и (8С) ВГВ–ДНК в сыворотке HBV1.3-xfс мышей после обработки, исходя из режима дозирования, представленного на фигуре 7.

Фигуры 9А–9D представляют собой графики, показывающие Т–клеточный иммунный ответ в печени относительно пептидов (9А) HBs(S208), (9В) HBc(C93), (9С) HBc(Cpool) и (9D) MVA(B8R) у HBV1.3-xfс мышей после обработки, исходя из режима дозирования представленного на фигуре 7.

Фигуры 10А–10С показывает уровень РНК ВГВ и уровни белка в клетках печени HBV1.3-xfс мышей после обработки, исходя из режима дозирования, представленного на фигуре 7. Фигура 10А показывает суммарную РНК ВГВ. Фигура 10В показывает ВГВ 3,5 т.п.н. транскрипт относительно GAPDH, как определено кПЦР в реальном времени. Фигура 10С показывает количество HBcAg положительных клеток на мм² среза печени, определенное иммуногистохимическим окрашиванием.

Фигуры 11А и 11В представляют собой графики, показывающие уровень (11А) HBsAg и (11В) HBeAg в сыворотке отдельных HBV1.3-xfс мышей через 7 недель после первой дозы вакцины после 6 недельного режима в режиме дозирования, представленном на фигуре 7.

Фигуры 11С и 11D представляют собой графики, показывающие (11С) анти–HBs

гуморальный ответ и (11D) Т-клеточный иммунный ответ в печени против HBs(S208) отдельных HBV1.3-xfs мышей через 7 недель после первой дозы вакцины после 6 недельного режима в режиме дозирования, представленном на фигуре 7.

Фигура 12 представляет собой схему, показывающую режим дозирования для эксперимента, анализирующего эффект предобработки мышей, зараженных AAV вектором, кодирующим ВГВ, контрольной миРНК или AD-66816 перед введением терапевтической вакцины против ВГВ.

Фигуры 13A–13G основаны на режиме дозирования, представленном на фигуре 12. Фигуры 13A и 13B представляют собой графики, показывающие уровень (13A) HBsAg и (13B) HBeAg в сыворотке ВГВ–AAV мышей (вставка 13C представляет собой увеличенную часть поздних временных точек на графике 13B). Фигура 13D показывает уровень ДНК ВГВ в сыворотке на 22 неделю. Фигуры 13D и 13E показывают количество копий на клетку печени (13D) суммарной ДНК ВГВ и (13E) AAV–ДНК на 22 неделю. Фигуры 13F и 13G показывают относительную экспрессию в печени (13F) ВГВ 3,5 РНК относительно GAPDH РНК и (13G) суммарной РНК ВГВ относительно GAPDH РНК.

Фигуры 14A–14C представляют собой графики, показывающие (14A) анти–HBs гуморальный ответ в течение всего эксперимента и (14B) анти–HBe гуморальный ответ на 116 день эксперимента, исходя из режима дозирования, представленного на фигуре 12. Фигура 14C представляет собой увеличенную часть поздних временных точек на графике 14B.

Фигуры 15A и 15B показывают (15A) уровни ALT и (15B) вес тела животных в течение всего эксперимента, исходя из режима дозирования, представленного на фигуре 12.

Формальный список последовательностей представлен в настоящем изобретении, который образует часть настоящего описания.

Приложение А, обеспечивающее примерные целевые последовательности для направленной доставки миРНК и РНКи агентов, представлено в настоящем изобретении и образует часть настоящего описания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к режимам лечения и способам применения РНКи агентов, которые вызывают расщепление, опосредованное индуцированным РНК комплексом сайленсинга (RISC), РНК транскриптов одного или более генов ВГВ (открытые рамки считывания/транскрипты) и вакцин против гепатита В, стимулируя иммунный ответ против одного или более белков ВГВ при лечении инфекции ВГВ. Режимы лечения и способы предпочтительно обеспечивают функциональную кривую в пределах определенного периода времени.

Следующее подробное описание раскрывает, как получить и использовать композиции, содержащие РНКи, для ингибирования экспрессии гена ВГВ, а также композиции, применения и способы лечения пациентов, имеющих заболевания и расстройства, для которых полезно ингибирование или снижение экспрессии гена ВГВ.

I. Определения

Для того чтобы настоящее изобретение было более понятно, впервые определяют определенные термины. Кроме того, следует отметить, что всякий раз, когда приводят значение или диапазон значений параметра, подразумевается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также должны быть частью настоящего изобретения.

Формы единственного числа используют в настоящем изобретении для ссылки на один или более чем один (*m.e.*, по меньшей мере на один) грамматический объект. В качестве примера, “элемент” обозначает один элемент или более одного элемента, например, ряд элементов.

Термин “включая” используют в настоящем изобретении для обозначения и используют взаимозаменяемо с фразой “включая, но не ограничиваясь”.

Термин “или” используют в настоящем изобретении для обозначения и используют взаимозаменяемо с термином “и/или”, если контекст явно не указывает иное.

Термин “приблизительно” используют в настоящем изобретении для обозначения в пределах типичных пределов допустимых значений в данной области техники. например, “приблизительно” можно понимать как находящийся в пределах 2 стандартных отклонений от среднего. В некоторых вариантах осуществления “приблизительно” обозначает $\pm 10\%$. В некоторых вариантах осуществления “приблизительно” обозначает $\pm 5\%$. Когда приблизительно находится перед серией чисел или диапазоном, ясно, что “приблизительно” может изменять каждое из чисел в серии или диапазоне.

Ясно, что термин “по меньшей мере” перед числом или серией чисел включает число, прилегающее к термину “по меньшей мере”, и все последующие числа или целые, которые можно включать логически, как ясно из контекста. например, количество нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым. например, “по меньшей мере, 18 нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты из 21 нуклеотид” обозначает то, что 18, 19, 20 или 21 нуклеотидов имеют указанное свойство. Когда по меньшей мере присутствует перед серией чисел или диапазоном, ясно, что “по меньшей мере” может модифицировать каждое из чисел в серии или диапазоне.

В рамках изобретения “не более чем” или “меньше чем” понимают как величину, прилегающую к фразе и логически меньшим величинам или целым, как логично из контекста, до нуля. например, дуплекс с «липким концом» из “не более чем 2 нуклеотидов” имеет 2, 1, или 0 нуклеотидный «липкий конец». Когда “не более чем” присутствует перед серией чисел или диапазоном, ясно, что “не более чем” может изменять каждое из чисел в серии или диапазоне. В рамках изобретения диапазоны включают и верхний и нижний предел.

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

Различные варианты осуществления настоящего изобретения можно

комбинировать, как определено специалистом в данной области техники.

В рамках изобретения “вирус гепатита В,” используемый взаимозаменяемо с термином “ВГВ”, относится к хорошо известному нецитопатическому гепатотропному ДНК вирусу, принадлежащему к семейству *Hepadnaviridae*.

Геном ВГВ представляет собой частично двухцепочечную, кольцевую ДНК с перекрывающимися рамками считывания (смотри, например, фигуру 1).

Существует четыре транскрипта (которые называют в настоящем изобретении “генами” или “открытыми рамками считывания”), исходя из размера, кодируемые геном ВГВ. Они содержат открытые рамки считывания, называемые С, Х, Р и S. Капсидный белок кодируется геном С (НВсАg). Антиген е гепатита В (НВеАg) получают протеолитическим процессингом пре-капсидного (пре-С) белка. ДНК полимеразы кодируется геном Р. Ген S представляет собой ген, который кодирует поверхностные антигены (НBsАg). НBsАg ген представляет собой одну длинную открытую рамку считывания, которая содержит три "старт" (ATG) кодона в рамке, давая в результате полипептиды трех различных размеров, называемые большой, средний и малый S антигены, пре-S1+пре-S2+S, пре-S2+S, или S. Поверхностные антигены в дополнение к оформлению оболочки ВГВ, также являются частью субвирусных частиц, которые образуются в большом избытке по сравнению с вирионными частицами, и влияют на иммунную толерантность и в секвестировании анти-НBsАg антител, посредством этого позволяя инфекционным частицам избегать обнаружения иммунной системой. Функция неструктурного белка, кодируемого геном Х, полностью не ясна, но он участвует в транскрипционной трансактивации и репликации и связан с развитием рака печени. Примеры белковых последовательностей представлены в присоединенном списке последовательностей (смотри, например, SEQ ID NO:1, 3, 16 и 20).

ВГВ представляет собой один из нескольких ДНК вирусов, которые используют обратную транскриптазу в процессе репликации, который включает несколько стадий, включая проникновение, «раздевание» и транспорт вирусного генома в ядро. Вначале репликация ВГВ генома включает получение РНК интермедиата, который, затем, обратно транскрибируется, давая ДНК вирусный геном.

После инфекции клеток ВГВ, вирусная геномная расслабленная кольцевая ДНК (ркДНК) транспортируется в клеточное ядро и превращается в эписомальную циклическую ковалентно замкнутую DNA (цкзДНК), которая служит в качестве матрицы транскрипции для вирусных мРНК. После транскрипции и ядерного экспорта, цитоплазматическая вирусная прегеномная РНК (пгРНК) собирается с ВГВ полимеразой и капсидными белками, обнаруживая нуклеокапсид, внутри которого катализируемая полимеразой обратная транскрипция дает минус-цепь ДНК, которая, затем, копируется в плюс-цепь ДНК, образуя ркДНК геном потомства. Затем, зрелые нуклеокапсиды или упаковываются с белками вирусной оболочки для выхода в виде вирионных частиц или перемещаются в ядро для увеличения количества цкзДНК путем внутриклеточной амплификации цкзДНК. цкзДНК представляет собой незаменимый компонент цикла

репликации ВГВ и ответственен за сохранность заражения и вирусную жизнестойкость.

Инфекция ВГВ приводит в результате к образованию двух различных частиц: 1) самого инфекционного ВГВ вируса (или частиц Дейна), которые включают вирусный капсид, собранный из HBsAg, и покрытый оболочкой, состоящей из липидной мембраны с ВГВ поверхностными антигенами, и 2) субвирусных частиц (или СВЧ), которые содержат небольшие и средние формы поверхностного антигена HBsAg гепатита В, которые не являются инфекционными. Для каждой полученной вирусной частицы, более 10000 СВЧ высвобождается в кровь. Как таковые, СВЧ (и HBsAg белок, который они несут) представляют собой подавляющее большинство вирусного белка в крови. Клетки, зараженные ВГВ, также секретируют растворимый протеолитический продукт прекапсидного белка, называемый ВГВ е-антиген (HBeAg).

Определено восемь генотипов ВГВ, обозначенных А–Н, и предложены два дополнительных генотипа I и J, причем каждый имеет отличное географическое распространение. Вирус не является цитопатическим, причем вирус-специфический клеточный иммунитет является основной детерминантой исхода воздействия острой инфекции ВГВ с регрессией заболеваний печени с 6 месяцев, или хронической инфекции ВГВ, которая часто связана с прогрессирующим повреждением печени.

Термин “ВГВ” включает любой из генотипов ВГВ (А–J). Полную кодирующую последовательность эталонной последовательности ВГВ генома можно найти, например, в GenBank № доступа. GI:21326584 (SEQ ID NO:1) и GI:3582357 (SEQ ID NO:3). Антисмысловые последовательности представлены в SEQ ID NO: 2 и 4, соответственно. Аминокислотные последовательности для С, Х, Р, и S белков можно найти, например, по номерам доступа NCBI YP_009173857.1 (С белок); YP_009173867.1 и BAA32912.1 (Х белок); YP_009173866.1 и BAA32913.1 (Р белок); и YP_009173869.1, YP_009173870.1, YP_009173871.1 и BAA32914.1 (S белок) (SEQ ID NO: 5–13). Белковые и ДНК последовательности из генотипа D ВГВ, штамм ауw, даны в SEQ ID №: 14–17. Белковые и ДНК последовательности из генотипа А ВГВ, штамм adw, даны в SEQ ID №: 18–21.

Дополнительные примеры последовательностей мРНК ВГВ можно найти в публично доступных базах данных, например, GenBank, UniProt и OMIM. Международное хранилище данных по штаммам вируса гепатита В можно оценить по адресу <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/HepSEQ/main.php>.

Термин “ВГВ”, в рамках изобретения также относится к природным вариантам последовательности ДНК ВГВ генома, *т.е.*, генотипам А–J и их вариантам.

В рамках изобретения “эпитоп”, также называемый “антигенной детерминантой” или “детерминантой”, считают частью белкового антигена, который узнается иммунной системой, специфично антителами, В клетками и/или Т клетками. Эпитопы включают конформационные эпитопы и линейные эпитопы. Белки имеют общий эпитоп, когда они имеют общую аминокислотную последовательность достаточной длины или размера и антигенности для распознавания антителом, В клетками и/или Т клеткой. Т-клеточные эпитопы, представленные молекулами МНС класса I, обычно представляют собой

пептиды из приблизительно 8–11 аминокислот в длину, тогда как молекулы МНС класса II представляют более длинные пептиды из приблизительно 13–17 аминокислот в длину. Конформационные эпитопы обычно являются прерывистыми и охватывают большую аминокислотную последовательность.

В рамках изобретения термин “нуклеотидный (нуклеозидный) аналог” или “ингибитор обратной транскриптазы” представляет собой ингибитор репликации ДНК, который является структурно аналогичным нуклеотиду или нуклеозиду и специфически ингибирует репликацию цкзДНК ВГВ и ингибирует незначительно репликацию ДНК хозяина (например, человека). Данные ингибиторы включают дизопроксилфумарат тенофовира (TDF), алафенамид тенофовира (TAF), ламивудин, дипивоксиладефовир, энтекавир (ETV), телбивудин, AGX-1009, эмтрицитабин, клевудин, ритонавир, дипивоксил, лобукавир, фамвир, FTC, N-ацетилцистеин (NAC), PC1323, терадигм-ВГВ, тимозин-альфа, ганцикловир, бесифовир (ANA-380/LB-80380) и тенофовир-эксалиады (TLX/CMX157). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный (нуклеозидный) аналог представляет собой энтекавир (ETV). Нуклеотидные (нуклеозидные) аналоги имеются в продаже у ряда поставщиков, и их используют в способах, относящихся к настоящему изобретению согласно их показаниям на этикетке (например, стандартное пероральное введение при указанной дозе) или как определено квалифицированным практиком при лечении ВГВ.

В рамках изобретения “целевая последовательность” относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной в процессе транскрипции транскрипта ВГВ, включая мРНК, представляет собой продукт процессинга РНК первичного продукта транскрипции. В одном варианте осуществления, целевая часть последовательности будет, по меньшей мере, достаточно длинной для того, чтобы служить в качестве субстрата для РНКи-направленного расщепления по или вблизи данной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной в процессе транскрипции транскрипта ВГВ. В одном варианте осуществления, целевая последовательность находится в области, кодирующей белок, транскрипта ВГВ.

Целевая последовательность может быть приблизительно 9–36 нуклеотидов в длину, например, приблизительно 15–30 нуклеотидов в длину. например, целевая последовательность может быть приблизительно 15–30 нуклеотидов, 15–29, 15–28, 15–27, 15–26, 15–25, 15–24, 15–23, 15–22, 15–21, 15–20, 15–19, 15–18, 15–17, 18–30, 18–29, 18–28, 18–27, 18–26, 18–25, 18–24, 18–23, 18–22, 18–21, 18–20, 19–30, 19–29, 19–28, 19–27, 19–26, 19–25, 19–24, 19–23, 19–22, 19–21, 19–20, 20–30, 20–29, 20–28, 20–27, 20–26, 20–25, 20–24, 20–23, 20–22, 20–21, 21–30, 21–29, 21–28, 21–27, 21–26, 21–25, 21–24, 21–23 или 21–22 нуклеотидов в длину. Диапазоны и длины, промежуточные вышеупомянутым диапазонам и длинам, также считают частью настоящего изобретения.

В рамках изобретения термин “цепь, содержащая последовательность” относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описана последовательностью, упоминаемой, применяя стандартную нуклеотидную номенклатуру.

Каждый из “G,” “C,” “A,” “T,” и “U” обычно обозначает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания, соответственно. Однако, ясно, что термин “рибонуклеотид” или “нуклеотид” может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как дополнительно описано ниже, или суррогатному замещающему фрагменту. Специалисту хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил можно замещать другими остатками по существу без изменения способности спариваться оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий данный замещающий фрагмент. например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве его основания, может спариваться с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин, или аденин, можно заменять в нуклеотидных последовательностях дцДНК, описанных в настоящем изобретении, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В другом примере, аденин и цитозин в любом месте в олигонуклеотиде можно заменять на гуанин и урацил, соответственно, образуя G–U неоднозначную пару оснований с целевой мРНК. Последовательности, содержащие данные замещающие фрагменты, являются пригодными для составов и способов, описанных в настоящем изобретении.

В рамках изобретения “РНКи агент”, “иРНК агент”, “миРНК агент” и подобные представляет собой двухцепочечную РНК, которая предпочтительно направлена на области в ВГВ геноме, которые являются консервативными для всех серотипов ВГВ и предпочтительно сконструирована для ингибирования всех стадий жизненного цикла ВГВ, например, репликации, сборки, секреции вируса и секреции вирусных антигенов, ингибированием экспрессии более чем одного транскрипта ВГВ. В частности, поскольку транскрипция ВГВ генома приводит в результате к полицистронным перекрывающимся РНК, РНКи агент для применения в настоящем изобретении, направленный на одноцепочечный транскрипт ВГВ, предпочтительно приводит в результате к значительному ингибированию экспрессии большинства или всех транскриптов ВГВ. Все транскрипты ВГВ являются, по меньшей мере, частично перекрывающимися и имеют один сигнал полиаденилирования. Следовательно, все вирусные транскрипты имеют одинаковый 3′–конец и, таким образом, РНКи агент настоящего изобретения, направленный на X ген, будет направлен на все вирусные транскрипты и должен приводить в результате к ингибированию не только экспрессии X гена, но также экспрессии всех других вирусных транскриптов, включая прегеномную РНК (пгРНК). Более того, РНКи агенты настоящего изобретения разработаны для ингибирования ВГВ вирусной репликации направленным воздействием на пгРНК, ВГВ структурные гены, полимеразу и X ген ВГВ. Кроме того, они разработаны для того, чтобы опосредовать «сайленсинг» СВЧ и других вирусных белков, которые участвуют в иммунной толерантности, посредством этого позволяя иммунной системе пациента обнаруживать и реагировать на присутствие вирусных антигенов так, чтобы вызывать иммунный ответ для борьбы и устранения инфекции ВГВ. Не желая быть ограниченными теорией, считают, что комбинация или подкомбинация приведенных выше свойств и специфических сайтов–

мишеней и/или специфических модификаций в данных РНКи агентах придают РНКи агентам настоящего изобретения повышенную эффективность, стабильность, безопасность, активность и продолжительность действия. Данные агенты представлены, например, в РСТ заявках № WO 2016/077321, WO 2012/024170, WO 2017/027350, и WO 2013/003520, полное содержание каждой из которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки. Примеры сайтов–мишеней для РНКи агентов и примеры РНКи агентов представлены в приложении А, поданном вместе с заявкой, которое образует часть настоящего описания. Термин РНКи агенты дополнительно включает кшРНК, например, 8 векторов адено–ассоциированного вируса (AAV) для доставки кшРНК в искусственную ми(кро)РНК под контролем печени–специфичного промотора; необязательно совместно доставляемую ловушку (“TuD”), направленную против кшРНК смысловой цепи, подавляя нецелевую регуляцию генов, обеспечивают в Michler et al., 2016 (EMBO Mol. Med., 8:1082–1098, включенную в настоящее изобретение с помощью ссылки).

Большинство нуклеотидов каждой цепи РНКи агента могут представлять собой рибонуклеотиды, но как описано подробно в настоящем изобретении, каждая или обе цепи могут содержать один или более нуклеотидов, отличных от рибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, как используют в настоящем описании, “РНКи агент” может содержать рибонуклеотиды с химическими модификациями; РНКи агент может включать существенные модификации по нескольким нуклеотидам.

В рамках изобретения термин “модифицированный нуклеотид” относится к нуклеотиду, содержащему, независимо, модифицированный сахарный остаток, модифицированную межнуклеотидную связь и/или модифицированное нуклеиновое основание. Таким образом, термин модифицированный нуклеотид включает замещения, добавления или удаления, например, функциональной группы или атома, из межнуклеозидных связей, сахарных остатков или нуклеиновых оснований. Модификации, пригодные для применения в агентах настоящего изобретения, включают все типы модификаций, описанных в настоящем изобретении или известные в данной области техники. Любые данные модификации, как используют для молекулы типа миРНК, включены “РНКи агентом” для целей настоящего описания и формулы изобретения.

В рамках изобретения “терапевтическая вакцина против ВГВ” и подобные может представлять собой пептидную вакцину, ДНК вакцину, включая векторную вакцину, или клеточную вакцину, которая вызывает иммунный ответ, предпочтительно, ответ, вызванный эффекторными Т–клетками, относительно одного или более белков ВГВ. Предпочтительно, вакцина представляет собой многоэпитопную вакцину, которая является перекрестно–реагирующей с несколькими серотипами ВГВ, предпочтительно всеми серотипами ВГВ. Ряд терапевтических вакцин против ВГВ являются известными в данной области техники и находятся на различных стадиях предклинических и клинических исследований. Белковые вакцины включают вакцины на основе поверхностного антигена (HBsAg) и ядерного антигена (HBcAg) гепатита В (например, Li

et al., 2015, Vaccine. 33:4247–4254, включенная в настоящее изобретение с помощью ссылки). Примеры ДНК вакцины включают HB–110 (Genexine, Kim et al., 2008. Exp Mol Med. 40: 669–676.), pDPSC18 (PowderMed), INO–1800 (Inovio Pharmaceuticals), HB02 VAC–AND (ANRS) и CVI–BГB–002 (CHA Vaccine Institute Co., Ltd.). Примеры белковых вакцин включают Theravax/DV–601 (Dynavax Technologies Corp.), εPA–44 (Chongqing Jiachen Biotechnology Ltd.) и ABX 203 (ABIVAX S.A.). Примеры клеточных вакцин включают HPDCs–Т иммунную терапию (Sun Yat–Sen University). Комбинационные вакцины и продукты также являются известными и включают HepTcell™ (FP–02.2 вакцина (пептид)+IC31® адъювант (комбинация пептид–олигонуклеотидный адъювант) (смотри патентные публикации США № 2013/0330382, 2012/0276138 и 2015/0216967, полное содержание каждой из которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки)); GS–4774 (Gilead, белок слияния S. капсидный X вакцина+Tarmogen иммуностимулятор Т–клеток), pSG2.HBs/MVA.HBs (белковое примирование/стимулирование вирусным вектором, Oxxon Therapeutics), и белковое примирование/стимулирование вектором на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (HBsAg и HBsAg белок+HBcAg и HBsAg в MVA экспрессирующем векторе, Backes et al., 2016, Vaccine. 34:923–32, и WO2017121791, обе из которых включены в настоящее изобретение с помощью ссылки).

В рамках изобретения ясно, что термин “адъювант” представляет собой агент, который стимулирует (например, усиляет, ускоряет или пролонгирует) иммунный ответ на антиген, с которым его вводят для того, чтобы вызвать длительный защитный иммунитет. Существенный иммунный ответ не направлен на сам адъювант. Адъюванты включают, но не ограничиваются, патогенные компоненты, адъюванты в виде частиц и комбинированные адъюванты (смотри, например, www.niaid.nih.gov/research/vaccine-adjuvants-types). Патогенные компоненты (например, монофосфорил липид А (MPL), поли(I:C), полиICLC адъювант, CpG ДНК, ц–ди–АМФ, ц–ди–ГМФ, ц–ди–ЦМФ; короткая 5′–трифосфат дцРНК с тупыми концами (3pRNA), RIG–1 лиганд и эмульсии, такие как поли[ди(натрийкарбоксилатэтилфенокси)фосфазен] (PCPE)), могут способствовать раннему запуску неспецифических или врожденных иммунных реакций на вакцины направленным воздействием на различные рецепторы внутри или на поверхности врожденных иммунных клеток. Врожденная иммунная система влияет на адаптивные иммунные реакции, которые обеспечивают длительную защиту от патогена, на который направлена вакцина. Адъюванты в виде частиц (например, квасцы, виросомы, цитокины, например, IL–12) образуют очень небольшие частицы, которые могут стимулировать иммунную систему и также могут улучшать доставку антигена к иммунным клеткам. Комбинированные адъюванты (например, AS02, AS03 и AS04 (все GSK); MF59 (Novartis); ISCOMATRIX® (CSL Limited); и IC31® (Altimune) вызывают несколько защитных иммунных реакций. Адъюванты, которые обладают умеренным эффектом при отдельном применении, могут вызывать более эффективный иммунный ответ при применении совместно.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, адъюванты для применения в настоящем изобретении стимулируют гуморальный, а также клеточный иммунный ответ. Для этого, сбалансированный Th1/Th2 хелперный Т-клеточный ответ требуется для поддержания нейтрализации гуморальных ответов, а также эффекторных цитотоксических Т-клеточных ответов. Предпочтительно, адъювант относится к сбалансированному Th1/Th2 ответу. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой один или более из полиI:C адъюванта, полиICLC адъюванта, CpG адъюванта, STING агониста (ц-ди-АМФ адъюванта, ц-ди-ГМФ адъюванта или ц-ди-ЦМФ адъюванта), ISCOMATRIX® адъюванта, PCP адъюванта и Rlg-I-лигандного адъюванта. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой полиI:C адъювант, CpG адъювант, STING агонист или PCP адъювант. В некоторых вариантах осуществления адъювант не представляет собой квасцы.

В рамках изобретения “иммуностимулятор” представляет собой агент, который стимулирует иммунный ответ, который можно вводить или не вводить, независимо от антигена. Иммуностимуляторы включают, но не ограничиваются, пегилированный интерферон альфа 2a (ПЭГ-IFN-альфа-2a), интерферон альфа-2b, ПЭГ-IFN-альфа-2b, интерферон лямбда, рекомбинантный человеческий интерлейкин-7 и агонист Toll-подобного рецептора 3, 7, 8 или 9 (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), ингибитор попадания вируса в клетку (например, мирклудекс), олигонуклеотид, который ингибирует секрецию или высвобождение HBsAg (например, REP 9AC), ингибитор сборки капсида (например, Bay41-4109 и NVR-1221), ингибитор цкзДНК (например, IHVR-25). В некоторых вариантах осуществления иммуностимулятор может включать вирусный капсид, необязательно пустой вирусный капсид, например, MVA капсид.

Иммуностимуляторы могут также включать регуляторы иммунной контрольной точки. Регуляторы иммунной контрольной точки могут быть стимулирующими или ингибирующими. В рамках изобретения регуляторы иммунной контрольной точки усиливают иммунный ответ. Регуляторы иммунной контрольной точки включают, но не ограничиваются, CTLA-4 ингибиторы, такие как ипилимумаб, PD-1 ингибиторы, такие как ниволумаб, пебролизумаб, и BGB-A317 антитело. PD-L1 ингибиторы включают атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб, в добавление к аффимерному биотерапевтическому средству.

В рамках изобретения “пациент” представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая примата (такого как человек, примат, отличный от человека, например, обезьяна и шимпанзе), млекопитающего, отличного от примата (например, мышиную модель или другую животную модель, которую можно заразить ВГВ). В одном варианте осуществления, пациент представляет собой человека, такого как человек, подвергаемый лечению или оценке на заболевание, расстройство или состояние, который будет получать пользу из снижения генной экспрессии или репликации ВГВ. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает от хронической инфекции вирусом гепатита В

(ВГВ). В некоторых вариантах осуществления пациент страдает и от хронической инфекции вирусом гепатита В (ВГВ) и от инфекции вирусом гепатита Д (ВГД).

В рамках изобретения термин “лечение” относится к благоприятному или требуемому результату, включая, но не ограничиваясь, облегчение одного или более признаков или симптомов у пациента с инфекцией ВГВ, включая, но не ограничиваясь, наличие ДНК ВГВ в сыворотке или цкзДНК ВГВ в печени, наличие антигена ВГВ в сыворотке или печени, например, HBsAg или HBeAg. Диагностические критерии для инфекции ВГВ являются хорошо известными в данной области техники. “Лечение” может также обозначать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в отсутствии лечения, или пониженный риск развития ГЦР.

В некоторых вариантах осуществления ВГВ–ассоциированное заболевание представляет собой хронический гепатит В (ХГБ). В некоторых вариантах осуществления пациент заражен ВГВ в течение по меньшей мере пяти лет. В некоторых вариантах осуществления пациент заражен ВГВ в течение по меньшей мере десяти лет. В некоторых вариантах осуществления пациент заражен ВГВ при рождении. Пациенты, страдающие от хронического заболевания гепатита В, обладают иммунной толерантностью, имеют активную хроническую инфекцию, сопровождающуюся некровоспалительным заболеванием печени, имеют повышенный оборот гепатоцитов в отсутствии обнаруживаемого некровоспаления или имеют неактивную хроническую инфекцию без каких–либо признаков активного заболевания, и у них также отсутствуют симптомы. Пациенты, страдающие от хронического заболевания гепатитом В, являются HBsAg–положительными и имеют либо высокую вирусную нагрузку ($\geq 10^4$ ДНК копий ВГВ/мл крови), либо низкую вирусную нагрузку ($< 10^3$ ДНК копий ВГВ/мл крови). Пациенты с хроническим активным гепатитом, особенно во время состояния активной репликации, могут иметь симптомы, сходные с симптомами острого гепатита. Персистенция инфекции ВГВ у пациентов с ХГБ представляет собой результат персистенции цкзДНК ВГВ. В некоторых вариантах осуществления пациент с ХГБ является HBeAg–положительным. В других случаях, пациент с ХГБ является HBeAg отрицательным.

В предпочтительных вариантах осуществления лечение инфекции ВГВ приводит в результате к “функциональному излечению” гепатита В. В рамках изобретения термин “функциональное излечение” понимают как выведение из организма циркулирующего HBsAg, и оно предпочтительно сопровождается переходом в состояние, при котором HBsAg антитела становятся недектируемыми, применяя клинически релевантный анализ. например, недектируемые антитела могут включать сигнал, меньше чем 10 мМЕ/мл, как измерено хемилюминесцентным иммуноанализом на микрочастицах (СМИА) или любым другим иммуноанализом, и могут быть названы анти–HBs сероконверсией. Функциональное излечение не требует выведение из организма всех репликативных форм ВГВ (например, цкзДНК из печени). Анти–HBs сероконверсия осуществляется самопроизвольно у приблизительно 0,2–1% хронически зараженных пациентов в год. Однако даже после анти–HBs сероконверсии, персистенцию низкого уровня ВГВ

наблюдают в течение десятков лет, указывающее на то, что осуществляется функциональное, а не полное излечение. Не желая быть связанными механизмом, предполагают, что иммунная система способна держать под контролем ВГВ. Функциональное излечение позволяет прекращать любое лечение инфекции ВГВ. Однако, ясно, что “функциональное излечение” для инфекции ВГВ может быть недостаточным для предотвращения или лечения заболеваний или состояний, которые являются результатом инфекции ВГВ, например, фиброза печени, ГЦР, цирроза.

Термин “снижение” в контексте уровня генной экспрессии ВГВ или репликации ВГВ у пациента или маркера заболевания или симптома, относится к статистически значимому снижению данного уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. При контроле инфекции ВГВ, $\log_{10}$ шкалу обычно используют для описания уровня антигенемии (например, уровень HBsAg в сыворотке) или виремии (уровень ДНК ВГВ в сыворотке). Ясно, что 1 $\log_{10}$ снижение представляет собой 90% снижение (оставшиеся 10%), 2 $\log_{10}$ снижение представляет собой 99% снижение (оставшийся 1%) и т.д. В некоторых вариантах осуществления маркер заболевания снижают ниже уровня детекции.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия маркера заболевания нормализована, *т.е.*, понижена до уровня, как допустимо в пределах диапазона нормы для индивида без данного заболевания, например, уровень маркера заболевания, такого как ALT или AST, снижается до уровня, как допустимо в пределах диапазона нормы для индивида без данного заболевания. Когда уровень, связанный с заболеванием, повышается относительно нормального уровня, изменение рассчитывают, исходя из верхнего уровня нормы (ULN). Когда уровень, связанный с заболеванием, уменьшается относительно нормального уровня, изменение рассчитывают, исходя из нижнего уровня нормы (LLN). Снижение представляет собой процентную разницу в изменении между значением для пациента и нормальным значением. Например, нормальный уровень AST может составлять от 10 до 40 единиц на литр. Если до лечения у пациента уровень AST составляет 200 единиц на литр (*т.е.*, в 5 раз превышает ULN, на 160 единиц на литр выше верхнего уровня нормы), и после обработки пациент имеет уровень AST, равный 120 единиц на литр (*т.е.*, в 3 раза больше ULN, на 80 единиц на литр выше верхнего уровня нормы), повышенная AST будет снижена до нормы на 50% (80/160).

Термин “ингибирование”, в рамках изобретения используют взаимозаменяемо со “снижением”, “сайленсингом”, “понижающим регулированием”, “подавлением” и другими аналогичными терминами, и включает любой уровень ингибирования. Предпочтительно, ингибирование включает статистически значимое или клинически значимое ингибирование.

Предполагается, что фраза “ингибирование экспрессии ВГВ гена” относится к нокдауну любого транскрипта ВГВ (например, 3,5 т.п.н., 2,4 т.п.н., 2,1 т.п.н. или 0,7 т.п.н. транскрипта), кодирующего один или более ВГВ вирусных белков (таких как, например, preS1/2–S, preS, S, P, X, preC и C), а также вариантов или мутантов ВГВ гена.

“Ингибирование экспрессии ВГВ гена” включает любую значительную степень ингибирования ВГВ гена или транскрипта, например, по меньшей мере, частичное подавление экспрессии ВГВ гена S, Р, Х или С, или любой их комбинации, например, S, Р и С. Экспрессию ВГВ гена можно оценить, исходя из уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с ВГВ генной экспрессией, например, уровнем мРНК ВГВ, уровнем белка ВГВ и/или уровнем цкзДНК ВГВ. Данный уровень можно оценить в отдельной клетке или в группе клеток, включая, например, образец, полученный у пациента, например, уровни можно контролировать в сыворотке.

В некоторых вариантах осуществления способов настоящего изобретения, экспрессию ВГВ гена ингибируют, по меньшей мере, на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или ниже уровня детекции анализа. В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование экспрессии ВГВ гена приводит в результате к клинически релевантному ингибированию уровня генной экспрессии, например, значительно ингибированной для обеспечения эффективного иммунного ответа на вакцину против ВГВ белка.

Ингибирование экспрессии ВГВ гена может проявляться снижением количества РНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (данные клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном у пациента), в которых транскрибируется ВГВ ген и которые обрабатывали или обрабатывают (например, контактом клетки или клеток с РНКи агентом настоящего изобретения, или введением РНКи агента настоящего изобретения пациенту, у которого присутствуют или присутствовали данные клетки) так, что ингибируют экспрессию ВГВ гена, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, но которые не обрабатывали или не обрабатывают таким способом (контрольная клетка (клетки)). В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование оценивают способом ПЦР в реальном времени, представленном в примере 2 РСТ заявки № WO 2016/077321 (полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки), причем *in vitro* анализы проводят в соответствующим образом подобранной клеточной линии с дуплексом при концентрации 10 нМ, и выражают уровень мРНК в обработанных клетках в виде процента уровня мРНК в контрольных клетках, применяя следующую формулу:

$$\frac{(\text{RNA in control cells}) - (\text{RNA in treated cells})}{\text{RNA in control cells}} \bullet 100\%$$

Альтернативно, ингибирование экспрессии ВГВ гена можно оценить в пересчете на снижение параметра, который функционально связан с ВГВ генной экспрессией, например, как описано в настоящем изобретении. Сайленсинг гена ВГВ можно определить в любой клетке, экспрессирующей ВГВ, или конститутивно или геномной инженерией, и любым анализом, известным в данной области техники.

Ингибирование экспрессии белка ВГВ может проявляться снижением уровня белка ВГВ, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровень белка, экспрессируемого в образце, полученном у пациента). Как объяснено выше, для оценки

подавления мРНК, ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток можно аналогично выразить в виде процента уровня белка в контрольной клетке или группе клеток, или в сыворотке.

Контрольная клетка или группа клеток, которые можно применять для оценки ингибирования экспрессии ВГВ гена, включает клетку или группу клеток, которые еще не контактировали с РНКи агентом настоящего изобретения. например, контрольную клетку или группу клеток можно получить у индивида (например, пациента, являющегося человеком или животным) перед обработкой пациента РНКи агентом. В альтернативных вариантах осуществления уровень можно сравнивать с подходящим контрольным образцом, например, контрольным образцом известной популяции.

Уровень РНК ВГВ, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, или уровень циркулирующей РНК ВГВ, можно определить, применяя любой способ, известный в данной области техники для оценки экспрессии мРНК, предпочтительно применяя способ ПЦР в реальном времени, представленный в примере 2 РСТ публикации № WO 2016/077321, или примере 1, представленном в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления, уровень экспрессии ВГВ гена (например, суммарную РНК ВГВ, транскрипт ВГВ, например, ВГВ 3,5 т.п.н. транскрипт) в образце определяют обнаружением транскрибированного полинуклеотида или его части, например, РНК ВГВ гена. РНК можно экстрагировать из клеток, применяя способы экстракции РНК, включающие, например, применение экстракции кислым фенолом/гуанидинизотиоцианатом (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy (Qiagen®) или PAXgene (PreAnalytix, Switzerland). Стандартные форматы анализа, применяющие гибридизацию рибонуклеиновых кислот, включают ядерные «ран-он» анализы, ПЦР в реальном времени, анализы с защитой от РНКазы (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035), нозерн-блоттинг, *in situ* гибридизацию и микроматричный анализ. Циркулирующую мРНК ВГВ можно детектировать, применяя способы, описанные в РСТ публикации № WO 2012/177906, полное содержание которой включено в настоящее в настоящее изобретение с помощью ссылки.

В одном варианте осуществления, уровень экспрессии ВГВ гена определяют, применяя зонд на основе нуклеиновой кислоты. Термин “зонд”, в рамках изобретения относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться с конкретным геном ВГВ. Зонды может синтезировать специалист в данной области техники или получить из подходящих биологических препаратов. Зонды можно специально конструировать так, чтобы они были мечеными. Примеры молекул, которые можно применять в качестве зондов, включают, но не ограничиваются, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенную РНК можно применять в анализах с гибридизацией или амплификацией, которые включают, но не ограничиваются, саузерн или нозерн анализы, анализы с полимеразной цепной реакцией (ПЦР) и матрицы с зондами. Один способ для определения уровней мРНК включает контакт изолированной мРНК с молекулой

нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК ВГВ. В одном варианте осуществления, мРНК иммобилизуют на твердой поверхности, и она контактирует с зондом, например, путем прогона выделенной мРНК на агарозном геле и переносом мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В альтернативном варианте осуществления зонд (ы) иммобилизуют на твердой поверхности, и мРНК контактирует с зондом (зондами), например, в матрице генных чипов Affymetrix®. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы обнаружения мРНК для применения в определении уровня мРНК ВГВ.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии ВГВ гена в образце включает способ амплификации нуклеиновой кислоты или обратную транскриптазу (получая кДНК), например мРНК в образце, например, ПЦР в реальном времени (экспериментальный вариант осуществления разработан в Mullis, 1987, патент США № 4683202), лигазную цепную реакцию (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189–193), самоподдерживающуюся репликацию последовательностей (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874–1878), транскрипционную амплификационную систему (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173–1177), Q-Beta репликазу (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), репликацию по типу "катящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033) или любой другой способ амплификации нуклеиновой кислоты, с последующей детекцией амплифицированных молекул, применяя способы, известные специалисту в данной области техники. Данные схемы детекции являются особенно пригодными для детекции молекул нуклеиновой кислоты, если данные молекулы присутствуют в очень небольшом количестве. В конкретных аспектах настоящего изобретения, уровень экспрессии ВГВ гена определяют количественной флуорогенной ПЦР в реальном времени (*m.e.*, TaqMan™ системой), например, применяя способ, представленный в настоящем изобретении.

Уровни экспрессии РНК ВГВ можно отслеживать, применяя блоттинг на мембране (такой как применяемый в гибридизационном анализе, таком как нозерн, саузерн, дот и подобные), или микролунки, пробирки для образцов, гели, шарики или волокна (любую другую твердую подложку, содержащую связанные нуклеиновые кислоты). Смотри патенты США № 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, полное содержание каждой из которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки. Определение уровня экспрессии ВГВ может также включать применение зондов на основе нуклеиновой кислоты в растворе.

В предпочтительных вариантах осуществления уровень РНК экспрессии оценивают, применяя ПЦР в реальном времени (кПЦР). Применение данных способов описано и представлено в примерах, представленных в настоящем изобретении.

Уровень экспрессии белка ВГВ можно определить, применяя любой способ, известный в данной области техники для измерения уровней белка. Данные способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (ТСХ),

гипердиффузную хроматографию, реакции осаждения из жидкости или геля, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одинарную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), твердый иммуноферментный анализ (ELISA), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминесцентные анализы и подобные.

В некоторых вариантах осуществления эффективность способов настоящего изобретения можно отслеживать детектированием или отслеживанием ослабления симптома инфекции ВГВ. Симптомы можно оценить, применяя способ, известный в данной области техники.

В рамках изобретения термин "заболевание, ассоциированное с вирусом гепатита В" или "ВГВ-ассоциированное заболевание," представляет собой заболевание или расстройство, которое вызвано или ассоциировано с инфекцией или репликацией ВГВ. Термин "ВГВ-ассоциированное заболевание" включает заболевание, расстройство или состояние, которое будет улучшаться в результате снижения ВГВ генной экспрессии или репликации. Неограничивающие примеры ВГВ-ассоциированных заболеваний включают, например, инфекцию вирусом гепатита D; гепатит дельта; хронический гепатит В; фиброз печени; терминальную стадию заболевания печени; криоглобулинемию; гепатоцеллюлярную карциному.

Термин "образец", в рамках изобретения включает сбор аналогичных жидкостей, клеток или тканей, выделенных у пациента или полученных из него, а также жидкости, клетки или ткани, находящиеся в пациенте. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку, плазму, иммунные клетки, лимфу, мочу, слюну и подобные. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локализованных областей. например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток из данных органов. В некоторых вариантах осуществления образцы можно получить из печени (например, цельной печени или определенных сегментов печени или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты, резидентные иммунные клетки печени). В предпочтительных вариантах осуществления «образец, полученный у пациента», относится к крови, взятой у пациента, или плазме, сыворотке или полученным у него отобранным пулам клеток (например, популяциям иммунных клеток). В дополнительных вариантах осуществления «образец, полученный у пациента», относится к ткани печени (или ее подкомпонентам), полученной у пациента.

В рамках изобретения ясно, что "кодирующая последовательность" относится к последовательности ДНК, которая кодирует специфическую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК можно обратно транскрибировать с последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления РНКи, например, кшРНК, направлено воздействует на кодирующую последовательность.

Термины "подходящие регуляторные последовательности" и подобные используют

в настоящем изобретении для обозначения нуклеотидных последовательностей, перед (5' некодирующие последовательности), в или после (3' некодирующие последовательности) кодирующей последовательности, и которые влияют на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК, или трансляцию ассоциированной кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны и последовательности распознавания полиаденилирования.

"Промотор", в рамках изобретения относится к последовательности ДНК, способной контролировать экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК. В общем, кодирующая последовательность находится на 3' конце промоторной последовательности. Промоторы можно получить в полном виде из нативного гена или комбинировать из различных элементов, полученных из различных промоторов, обнаруживаемых в природе, или они даже содержат синтетические фрагменты ДНК. Промотор можно выбрать так, чтобы способствовать экспрессии кодирующей последовательности в конкретном типе клеток или на различных стадиях развития, или в ответ на различные условия окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, который является активным в печени, например, специфический для печени промотор. Многие промоторные последовательности являются известными в данной области техники, и выбор подходящей промоторной последовательности для конкурентного контекста находится в пределах способностей специалиста в данной области техники.

Термин "операционно соединенный" относится к ассоциации последовательностей нуклеиновых кислот в одном фрагменте нуклеиновой кислоты так, что функция одной зависит от другой. например, промотор операционно соединен с кодирующей последовательностью, когда он способен влиять на экспрессию данной кодирующей последовательности (*m.e.*, кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора).

Термин "экспрессия", в рамках изобретения относится к транскрипции и стабильному накоплению смысловой (мРНК) или антисмысловой РНК или РНКи агента (например, кшРНК), полученного из фрагмента нуклеиновой кислоты испытуемой технологии. "Сверхэкспрессия" относится к продуцированию генного продукта в трансгенных или рекомбинантных организмах, которая превышает уровень продуцирования в нормальных или нетрансформированных организмах.

"Экспрессионный вектор" или "экспрессирующая конструкция", в рамках изобретения относится к нуклеиновой кислоте, в которой кодирующая последовательность операционно соединена с промоторной последовательностью, обеспечивая экспрессию кодирующей последовательности под контролем промотора. Экспрессионные векторы включают, но не ограничиваются, вирусные векторы или плазмидные векторы. Способы доставки экспрессионных векторов в клетки являются известными в данной области техники.

II. Способы лечения настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к режимам и способам лечения для последовательного применения агента, снижающего экспрессию ВГВ гена, например, РНКи агентов, которые осуществляют расщепление, опосредованное индуцированным РНК комплексом сайленсинга (RISC), одного или более транскриптов ВГВ, и вакцинам против гепатита В, стимулирующим иммунный ответ против одного или более белков ВГВ при лечении инфекции ВГВ. Режимы и способ лечения предпочтительно обеспечивают функциональное излечение ВГВ в течение определенного периода времени.

Режимы и способ лечения, относящиеся к настоящему изобретению, включают упорядоченное введение терапевтических агентов, обеспечивая лечение, и предпочтительно функциональное излечение, инфекции ВГВ. Агенты, применяемые в данных способах, являются известными в данной области техники. Однако агенты отдельно не способны постоянно и продолжительно снижать тяжесть заболевания ВГВ, например, снижая уровень HBsAg до ниже $2 \log_{10}$, предпочтительно $1 \log_{10}$ МЕ/мл или ниже уровня обнаружения, у большинства пациентов. Значительное снижение тяжести заболевания ВГВ, например, снижение уровня HBsAg до ниже $2 \log_{10}$, предпочтительно $1 \log_{10}$ МЕ/мл или ниже уровня обнаружения, будет обеспечивать возможность приостановки введения терапевтических агентов и обеспечивать функциональное излечение ВГВ у значительного количества пациентов. Будучи не связанными механизмом, предполагают, что режимы и способ лечения, относящиеся к настоящему изобретению, включающие введение РНКи агента, направленного на ВГВ, по существу снижают антигены ВГВ и нуклеиновую кислоту на достаточную величины и продолжительность времени у пациента, обеспечивая эффективный иммунный ответ, вызванный введением нескольких доз терапевтической вакцины. Режимы и способы, относящиеся к настоящему изобретению, постоянно обеспечивают значительное снижение тяжести заболевания и функциональное излечение у значительного количестве пациентов, предпочтительно, по меньшей мере, 30%, 40%, 50%, 60% или 70% пациентов.

Модель трансгенных мышей инфекции ВГВ, HBV1.3 xfs применяли для оценки комбинированной терапии, относящейся к настоящему изобретению. Первичные исследования показали эффективность двух различных химически модифицированных GalNAc-РНКи агентов, направленных на ВГВ (AD-66816 и AD-66810), ингибирующих уровень HBsAg и HBeAg белков, и ДНК ВГВ в сыворотке в течение по меньшей мере 21 дней при одной подкожной дозе 3 мг/кг или 9 мг/кг, с аналогичной эффективностью. Значительного нокдауна не наблюдали с РНКи контролем, не направленным против ВГВ (смотри фигуру 2). На основе данных результатов, меньшую дозу 3 мг/кг выбирали для исследований комбинированной терапии.

В первом исследовании комбинированной терапии (смотри фигуру 3), мышей предварительно подвергали одному из шести режимов лечения (n= 6 на группу):

- (1) без предобработки;
- (2) Энтекавир при 1 мкг/мл в воде в течение всего исследования, начиная с первого

дня 0 недели;

(3) 3 мг/кг доза в первый день недель 0, 4, 8 и 12 контрольного РНКи агента.

(4) Разовая доза в первый день недели 0 с экспрессионным вектором, кодирующим кшРНК, направленную на ВГВ (ВГВ–кшРНК) (Michler et al., 2016); или

(5–6) 3 мг/кг дозу в первый день недель 0, 4, 8 и 12 AD–66816 или AD–66810 (в общем, миРНК ВГВ).

В первый день недель 12 и 14, смесь рекомбинантно экспрессируемого в дрожжах HBsAg (15 мкг) и экспрессируемого в *E. coli* HBcAg (15 мкг), дополненные 31,9 мкг синтетического фосфоротиоатного CpGODN 1668 (CpG) и 25 мкг поли[ди(натрийкарбоксилатоэтилфенокси)фосфазена] (PCPE) подкожно вводили всем мышам в качестве первичной белковой вакцинации (Backes, 2016).

В первый день недели 16, смесь вектора на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара, экспрессирующего HBsAg или HBcAg (5×10^7 частиц каждого вируса), подкожно вводили всем мышам в качестве буст вакцинации (Backes, 2016).

Образцы крови получали в первые дни недели 0, 2, 4, 8, 12, 16 и 17 и анализировали на уровни HBsAg, HBeAg и ДНК ВГВ. Результаты, наблюдаемые для уровней HBsAg и HBeAg у мышей в группах 1, 2, и 3 (имитация, энтекавир, контрольный РНКи агент) были аналогичными (фигура 4А и 4В). ВГВ–кшРНК или миРНК ВГВ отдельно вызывали значительное снижение HBsAg, HBeAg и ДНК ВГВ в сыворотке. Схема с трехдозовой прайм–буст вакцинацией давала в результате дополнительное снижение HBsAg во всех группах и снижала уровень HBsAg, по меньшей мере, у некоторых животных в ВГВ–кшРНК и миРНК ВГВ группах ниже уровня обнаружения. Однако вакцинация не снижала HBeAg уровни в любой из групп. Уровни ДНК ВГВ снижались до приблизительно нижнего предела количественного определения только с энтекавиром, поэтому эффект трехдозовой прайм–буст вакцины нельзя было обнаружить (фигура 4С). Все из имитирующей обработки и обработки ВГВ–кшРНК, миРНК ВГВ и контрольной миРНК снижали уровни ДНК ВГВ, и уровень ДНК ВГВ дополнительно снижался прайм–буст вакциной во всех группах. Данные показывают, что РНКи превосходит терапию на основе нуклеотидных (нуклеозидных) аналогов по снижению вирусных антигенов. Кроме того, комбинация РНКи и последующая вакцинация имеют больший эффект на уровни HBsAg и ДНК ВГВ, чем любой из двух агентов в отдельности.

В последний день эксперимента (первый день недели 17), мышей умерщвляли и собирали их печень. Внутривенные CD8+Т–клеточные ответы оценивали на ответ на HBsAg, HBcAg и частицу вируса MVA, применяя способ, представленный в Backes, 2016. Мыши, обработанные ВГВ–кшРНК или миРНК ВГВ, были способны генерировать CD8+иммунный ответ против HBsAg и HBcAg (фигура 5А и 5В). Никакого значимого иммунного ответа против антигенов ВГВ не наблюдали в группах с имитацией, энтекавиром или контрольной миРНК. Однако аналогичный иммунный ответ против вируса MVA наблюдался у всех животных, независимо от предобработки или уровней вирусного антигена (фигура 5С), показывая, что вакцинация работала одинаково хорошо

на всех животных, демонстрируя наличие компетентной иммунной системы. Данные, показанные на фигуре 5А–С, были повторно проанализированы для приспособления к недостаточному исключению мертвых иммунных клеток во время первого анализа. Данные, полученные во втором анализе (показанные на фигуре 5 D–F), снова показывают, что только мыши, предварительно обработанные ВГВ–кшРНК или миРНК ВГВ, были способны генерировать ВГВ–специфические CD8⁺ Т–клеточные ответы после вакцинотерапии, но что MVA–специфичные ответы не были под влиянием предварительной обработки. Снижение дисперсии во втором анализе объясняется более строгим исключением мертвых клеток. Данные демонстрируют, что обработка РНКи, в отличие от современного стандартного лечения нуклеозидным аналогом, может восстанавливать ВГВ–специфический Т–клеточный иммунитет и обеспечивать индукцию ВГВ–специфических CD8 Т–клеточных ответов после вакцинотерапии.

Сыворотку также оценивали на наличие иммунного ответа антител на антигены ВГВ. Хотя вакцина была способна индуцировать Т–клеточный иммунный ответ только у животных, которые получали предварительную обработку миРНК ВГВ или ВГВ–кшРНК, гуморальные ответы на HBsAg и HBcAg были одинаковыми во всех группах, независимо от предобработки в моменты времени, оцененные до недели 17. Гуморальный ответ на HBeAg нельзя было обнаружить. Данные показывают, что высокие нагрузки антигена ВГВ преимущественно ингибируют ВГВ–специфические Т–клеточные, а не В–клеточные, ответы.

Печень также оценивали на наличие транскриптов ВГВ с помощью кПЦР в реальном времени и нормализовали к транскрипту GAPDH печени. У мышей, обработанных ВГВ–кшРНК или миРНК ВГВ, наблюдалось значительное снижение уровней транскрипта ВГВ (фигура 6А и 6В). Не было выявлено существенных различий между имитирующей группой и группой с энтекавиром или контрольной группой с миРНК. Срезы печени анализировали иммуногистохимическим окрашиванием на экспрессию ядерного антигена для оценки антивирусного эффекта в печени (фигура 6С). У животных, которые не были предварительно обработаны до вакцинации, было, в среднем, 83 гепатоцита на мм² с цитоплазматической экспрессией HBc. Данное количество не было значительно изменено у животных, которых предварительно обрабатывали энтекавиром или контрольный миРНК. Однако количество цитоплазматических HBcAg положительных клеток было значительно снижено у животных, предварительно обработанных AAV–кшРНК или миРНК ВГВ. Данные показывают, что комбинаторная терапия с РНКи/вакцинацией подавляет не только антигены в сыворотке, но и экспрессию вирусной антигена в печени.

Продemonстрировав, что подавление экспрессии антигенов ВГВ, применяя кшРНК или миРНК, является эффективным для потенцирования иммунного ответа на режим вакцинации против ВГВ, было разработано исследование, чтобы определить, влияет ли продолжительность подавления антигенов ВГВ на потенцирование иммунного ответа против ВГВ. Применяя мышиную модель ВГВ 1.3xfs, мышей обрабатывали в течение

восьюми, шести или трех недель миРНК ВГВ AD–66816 или контрольной миРНК в течение 8 недель, подкожно вводимых в дозе 3 мг/кг/дозу, с последующим осуществлением режима прайм–буст вакцинации, как указано выше, за исключением того, что в качестве адъюванта применяли 10 мкг к–ди–АМФ, а не РСЕР+CPG (n=6 на 8 и 3 группу, n=6 на 6–недельную группу) (смотри фигуру 7).

Значительное снижение уровней каждого из HBsAg, HBeAg и ДНК ВГВ наблюдали после первого введения AD–66816 (фигуры 8А–8С). Дополнительное значительное снижение HBsAg наблюдали после обработки дозой вакцины, причем самое большое снижение наблюдали в группе 8 недельной предобработки ниже уровня детекции анализа, представляя более чем 5 log10 снижение уровня HBsAg у всех обработанных животных. Иммунизация вызывала только небольшое дополнительное снижение (<0,5 log10) ДНК ВГВ и не вызывала дополнительного снижения уровня HBeAg. Данные показывают, что эффективность вакциноотерапии коррелирует с продолжительностью подавления антигенов перед началом вакцинации. Восстановление ВГВ–специфических CD8 Т–клеточных ответов требует нескольких недель, причем 6 или предпочтительно 8 недельная предобработка приводит в результате к большему HBsAg нокдауну, чем 3 недельная предобработка.

Аналогично, Т–клеточные ответы на HBsAg и HBeAg в печени соответствовали длительности нокдауна антигена ВГВ, причем большая продолжительность нокдауна антигена ВГВ приводит к большим Т–клеточным ответам (фигура 9А–9С). Аналогичные ответы на антигены вируса MVA наблюдались во всех группах, независимо от предобработки (фигура 9D). Гуморальный ответы были одинаковыми во всех группах.

Печень также оценивали на наличие транскриптов ВГВ кПЦР в реальном времени и нормализовали к транскрипту GAPDH в печени. Более длительные периоды предварительной обработки приводили к увеличению уровней нокдауна РНК ВГВ (фигура 10А и 10В).

Срезы печени также анализировали иммуногистохимическим окрашиванием на цитоплазматическую экспрессию HBeAg, оценивая противовирусный эффект обработки в печени (фигура 10С). У животных, предварительно обрабатываемых контрольной миРНК до вакцинации, было, в среднем, 172 гепатоцитов на мм², которые показали цитоплазматическую экспрессию HBe. При большей продолжительности подавления ВГВ до вакцинации в 8–недельной группе предобработки наблюдали постепенное снижение цитоплазматических HBeAg–положительных гепатоцитов в среднем только на 12 цитоплазматических HBeAg–положительных гепатоцитов на мм². Данные показывают, что увеличение ВГВ–специфического CD8⁺ Т–клеточного ответа, наблюдаемого при более длительном подавлении антигена перед вакцинацией, приводило к снижению экспрессии антигена ВГВ в печени. Чтобы оценить продолжительность ответа, образцы крови собирали у мышей (n=6), предварительно обработанных AD–66816 миРНК ВГВ в течение шести недель через 2 и 3 недели после проведения буст вакцинации. У трех из шести мышей уровень HBsAg продолжал снижаться ниже уровня детекции анализа

(фигура 11А и 11В). В частности, у трех животных, которые имели самые высокие уровни HBsAg и HBeAg в начале вакцинации (2, 4 и 5), действительно наблюдалось снижение титров антигенов после вакцинации, но титры антигенов восстанавливались к концу эксперимента. Напротив, у трех животных с самыми низкими титрами антигена в начале вакцинации (1, 3 и 6) наблюдалось дальнейшее снижение HBsAg ниже предела обнаружения. Данные показывают, что функциональное излечение является возможным, применяя режим лечения, относящийся к настоящему изобретению. Данные также свидетельствуют о том, что уровни антигена в начале вакцинации могут влиять на реакцию на вакцинотерапию. Наконец, будучи несвязанными механизмом, данные свидетельствуют о том, что снижение уровня антигена после вакцинотерапии опосредуется, по меньшей мере, частично, CD8⁺T-клетками. Данные показывают, что нокдаун циркулирующих антигенов ВГВ (например, HBsAg, HBeAg), но не ингибирование только репликации ДНК ВГВ, потенцирует иммунный ответ на терапевтическую вакцину против ВГВ, например, на режим прайм-буст вакцинотерапии. То есть, иммунный ответ можно потенцировать предобработкой миРНК, но не нуклеотидными (нуклеозидными) ингибиторами отдельно, поскольку иммунный ответ представляет собой CD8⁺ T-клеточный иммунный ответ.

Величина и продолжительность требуемого нокдауна зависит, например, от уровня тяжести заболевания у пациента. Чем выше уровень циркулирующего антигена, тем больше величина и продолжительность нокдауна антигена, необходимые для потенцирования иммунного ответа. Нокдаун HBsAg в сыворотке должен быть, по меньшей мере, 0,5 log 10 (МЕ/мл), предпочтительно 1 log 10 (МЕ/мл), 1,5 log 10 (МЕ/мл), 2 log 10 (МЕ/мл) или больше относительно уровня у пациента до обработки терапевтической вакциной. В некоторых вариантах осуществления уровень HBsAg в сыворотке крови составляет не более чем 2,5 log 10 (МЕ/мл), 2 log 10 (МЕ/мл), 1,5 log 10 (МЕ/мл) до введения вакцины.

Кроме того, как продемонстрировано в настоящем изобретении, большая продолжительность нокдауна антигена ВГВ приводила к более сильному иммунному ответу. Следовательно, нокдаун HBsAg в сыворотке до значительно более низкого уровня для продолжительности по меньшей мере четыре недели, шесть недель или восемь недель, является предпочтительным перед введением вакцины.

Вторую серию экспериментов разрабатывали для исследования комбинированного режима лечения миРНК/вакцинацией в мышинной модели приобретенной инфекции ВГВ, применяя систему адено-ассоциированной вирусной инфекции. Для данных исследований, C57/Bl6 мышам дикого типа (9 недельным) вводили внутривенно 2×10^{10} геномных эквивалентов серотипа 8 адено-ассоциированного вируса (AAV8), несущего 1,2-кратно удлиненный ВГВ геном генотипа D (AAV-BGB1.2) (смотри, например, Yang, et al. (2014) Cell and Mol Immunol 11:71). Начиная с 4 недель после AAV-трансдукции (в день -28), животных обрабатывали тремя дозами или контрольной миРНК или миРНК ВГВ (ВГВ AD-66816 или AD-66810) в дни 0, 29 и 57, и затем половину животных в

каждой группе подвергали режиму вакцинации, состоящему из первичной белковой вакцинации HBsAg, HbcAg и 10 мкг к-ди-АМФ в дни 57 и 70, и усиливали MVA-HBs и MVA-HBc в день 84. Режим лечения показан на фигуре 12.

После AAV-BGB1.2 трансдукции, уровни HBsAg и HBeAg повышались до уровней, сравнимых с уровнями, наблюдаемыми для трансгенных мышей с ВГВ (HBVxfs) (смотри, например, фигуры 13А и 13В). Мыши, обработанные миРНК ВГВ, показывали среднее снижение уровней HBsAg приблизительно $2 \log_{10}$ по масштабу и уровней HBeAg более чем $1 \log_{10}$, так что уровни HBsAg и HBeAg снижались до менее чем около 500 МЕ/мл, тогда как контрольная миРНК не оказывала влияния на уровни антигенов. Животные, обработанные одной из миРНК ВГВ, которые не подвергались режиму вакцинации, показали медленно восстанавливающиеся уровни антигенов после последнего применения миРНК. Антигенемия возвращалась к исходному уровню через 18 недель. Комбинированная терапия миРНК ВГВ и вакциной приводила к длительному ответу со снижением HBsAg и HBeAg ниже предела обнаружения на протяжении всего эксперимента. Снижение уровня HBsAg и HBeAg наблюдали до введения MVA усиливающей дозы, что позволяет предположить, что белковая вакцинация может быть достаточной, чтобы повлиять на излечение. Как сывороточные, так и печеночные ДНК и РНК ВГВ, были значительно снижены после комбинированной терапии миРНК ВГВ и режимом вакцинации (фигуры 13D–13H). Это свидетельствует о том, что РНКи-опосредованная супрессия может сильно снижать экспрессию антигена, но то, что введение вакцины продлевает продолжительность ответа.

Введение вакцины отдельно на животных, которые получали контрольную миРНК, обеспечивает временное снижение уровней антигенов, которые восстанавливаются к концу эксперимента. Напротив, у всех животных, которые получали миРНК ВГВ и вакцинацию, уровни HBsAg и HBeAg снижались ниже предела обнаружения после начала вакцинации. Уровни антигенов оставались в основном необнаруживаемыми вообще в измеренные конечные моменты времени по меньшей мере 22 недели после последнего применения миРНК (фигуры 13А и 13В). Длительная потеря антигенемии у животных, предварительно обработанных миРНК ВГВ, в противоположность восстановлению антигенов у животных, предварительно обработанных контрольной миРНК, дополнительно демонстрирует, что иммунный контроль достигался только у животных, у которых были снижены титры антигенов перед вакцинацией.

Одновременно с потерей антигенемии, у животных, обработанных ВГВ миРНК плюс вакцина, развивались высокие титры анти-HBs-антител, что приводило к анти-HBs и анти-HBe-сероконверсии у всех вакцинированных животных (фигура 14). У животных, предварительно обработанных миРНК, развивались 10 кратные или более высокие постоянные титры анти-HBs, и они были способны полностью и постоянно удалять HBsAg и HBeAg из сыворотки. Интересно, что у 3/12 мышей, вакцинированных после обработки миРНК ВГВ, отмечалось временное снижение уровней анти-HBe между 15 и 22 неделями, что приводило к низкому уровню рецидива HBeAg (фигура 13С), который

снова контролировался. Хотя анти-HBs антитела можно также измерять у животных, которые получали контрольную миРНК плюс вакцину, уровни были ниже. Кроме того, только животные, которые получали миРНК ВГВ плюс вакцина, вырабатывали анти-HBe антитела. Взятые вместе, функциональное излечение не было достигнуто только одной схемой обработки миРНК или одной схемой вакцинотерапии. Однако потеря антигенемии, а также развитие анти-HBs и анти-HBe антител демонстрирует, что комбинация миРНК ВГВ плюс вакцина может достигать функционального излечения.

На протяжении всего эксперимента контролировали АЛТ и массу тела животных. Потеря антигенемии закончилась небольшим увеличением активности АЛТ, наблюдаемым в группах, получавших ВГВ миРНК в сочетании с режимом вакцинации (фигура 15А). В данных группах наблюдалось значительное, но умеренное увеличение (оба $p > 0,05$ или меньше при повторном измерении двухфакторным дисперсионным анализом; сравнение только временных точек после начала вакцинации) по сравнению со всеми другими группами лечения, которые не получали комбинацию миРНК ВГВ-вакцинация. Будучи не связанными механизмом, предполагают, что CD8⁺ Т-клетки, индуцированные комбинированной схемой ВГВ-миРНК-вакцинации, убивают ВГВ-экспрессирующие гепатоциты, приводя к повышению АЛТ.

Массу тела животных измеряли на протяжении всего эксперимента для оценки переносимости лечения. В течение всего эксперимента наблюдалось постоянное увеличение, независимо от обработки миРНК. Животные, которые были вакцинированы, показали небольшое и кратковременное снижение (приблизительно 5%) массы тела после вакцинации, но она восстанавливалась до нормального уровня в течение девяти дней, и впоследствии они набирали вес, сопоставимый с контрольными группами (фигура 15В). Взятые вместе, данные по АЛТ активности и массе тела показывают, что все исследованные способы лечения, включая только миРНК, только вакцинацию, а также комбинированный режим миРНК/вакцинации, являются хорошо переносимыми.

Количество и интервалы времени введения доз миРНК для снижения уровня HBsAg в сыворотке зависят от, например, конкретного применяемого агента. Из-за продолжительности и эффективности примерных GalNAc миРНК, применяемых в способах, описанных и предоставленных в настоящем изобретении, например, в приложении А и в публикации РСТ № WO 2016/077321 (полное содержание которых включено в настоящее описание с помощью ссылки), разовая доза миРНК может быть достаточной для обеспечения уровня и продолжительности нокдауна, необходимого перед введением терапевтической вакцины. Как показано на фигуре 4, разовая доза вектора AAV, кодирующего кшРНК, была достаточной для обеспечения долговременного нокдауна антигенов ВГВ и ДНК ВГВ. Специалист в данной области техники способен отслеживать статус заболевания ВГВ, например, измерением уровня HBsAgs в крови, определяя интервалы времени и уровни миРНК и вакцины, подходящие для конкретного пациента.

Ряд терапевтических вакцин против ВГВ являются известными в данной области

техники и обсуждается в настоящем изобретении. В предпочтительных вариантах осуществления протокол прайм–буст вакцинации, такой как протокол, который используют в настоящем изобретении, является предпочтительным. Однако, способ нокдауна антигенов ВГВ, относящийся к настоящему изобретению, можно применять в комбинации с другими терапевтическими вакцинами против ВГВ, известными в данной области техники, включая вакцины, для которых обнаружено, что они являются недостаточными при их отдельном введении. Вакцинации включают, по меньшей мере, две дозы антигена в виде белка или нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вакцинация включает три дозы белковой вакцины. В предпочтительных вариантах осуществления способы включают введение гетерогенных вакцин, *т.е.*, по меньшей мере, одной дозы белковой вакцины по меньшей мере одной дозы вакцины на основе нуклеиновой кислоты. Примерные варианты осуществления вакцин и режимов дозирования представлены, например, в публикации РСТ № WO 2017/121791, полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Способы, относящиеся к настоящему изобретению, включают применение вакцины на основе нуклеиновой кислоты, включающие экспрессирующую векторную конструкцию, кодирующую НВсAg или НВsAg, где конструкция кодирует белок, который разделяет эпитоп с белковой вакциной. Следовательно, ясно, что ни вакцина на основе нуклеиновой кислоты, ни белковая вакцина, не требуется для обеспечения белка полной длины. Вакцина на основе нуклеиновой кислоты и белковая вакцина требуются для обеспечения, по меньшей мере, одного общего эпитопа, который присутствует в НВсAg или НВsAg, и не требуют обеспечения белка полной длины. Как отмечалось выше, эпитопы могут быть относительно короткими молекулами МНС класса I, которые обычно представляют собой пептиды из приблизительно 8–11 аминокислот в длину, тогда как молекулы МНС класса II представляют собой более длинные пептиды из 13–17 аминокислот в длину, причем конформационные эпитопы являются более длинными. Однако ясно, что применение белковых антигенов и кодирующих последовательностей для белковых антигенов, которые кодируют несколько эпитопов, является предпочтительным. Кроме того, ясно, что антигены, присутствующие в белковой вакцине и кодируемые вакциной на основе нуклеиновой кислоты, могут быть или не быть идентичными. Также ясно, что антигены следует выбирать по их иммуногенности. Данные антигены являются хорошо известными в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления порядок введения белковой вакцины и вакцины на основе нуклеиновой кислоты обращают по сравнению с порядком, представленным в способах, относящихся к настоящему изобретению. То есть, вакцину на основе нуклеиновой кислоты вводят первой, и белковую вакцину вводят второй. В некоторых вариантах осуществления вводят суммарно три дозы вакцины, две дозы вакцины на основе нуклеиновой кислоты, с последующей единичной дозой белковой вакцины. В альтернативных вариантах осуществления за единичной дозой вакцины на основе нуклеиновой кислоты следуют две дозы белковой вакцины. В других вариантах

осуществления вводят одну дозу каждой вакцины.

В предпочтительных вариантах осуществления способ прайм-буст вакцинации включает применение адъюванта с белковыми антигенами. Подходящие адъюванты для применения в способах способствуют клеточному ответу на антигены. Адъюванты предпочтительно обеспечивают сбалансированный Th1/Th2 ответ.

Способы миРНК+вакцина, относящиеся к настоящему изобретению, можно применять в комбинации с введением нуклеотидных (нуклеозидных) ингибиторов, которые являются стандартом для лечения ВГВ. В некоторых вариантах осуществления пациентов обрабатывают нуклеотидными (нуклеозидными) ингибиторами перед обработкой миРНК+вакцина. В некоторых вариантах осуществления пациентов обрабатывают в течение всего режима лечения миРНК+вакцина нуклеотидными (нуклеозидными) ингибиторами. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный (нуклеозидный) ингибитор дозируют для снижения уже имеющегося воспаления, связанного с инфекцией ВГВ, перед введением терапевтического агента на основе нуклеиновой кислоты, направленного на ВГВ (например, миРНК, кшРНК, антисмысловой олигонуклеотид).

В некоторых вариантах осуществления пациентов можно обрабатывать предварительно или одновременно другими агентами, применяемыми для лечения ВГВ. Данные агенты включают, но не ограничиваются, иммуностимулятор (например, пегилированный интерферон альфа 2а (ПЭГ-IFN- α 2а), интерферон альфа-2b, рекомбинантный человеческий интерлейкин-7 и агонист Toll-подобного рецептора 7 (TLR7)), ингибитор попадания вируса в клетку (например, миклюдекс), олигонуклеотид, который ингибирует секрецию или высвобождение HbsAg (например, REP 9AC), ингибитор сборки капсида (например, Bay41-4109 и NVR-1221), цкзДНК ингибитор (например, INVR-25), RIG-I лиганд, или регулятор иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулятор представляет собой RIG-I лиганд или регулятор иммунной контрольной точки. Функциональное излечение включает длительный период, по меньшей мере, 3 месяца, предпочтительно 6 месяцев, HBsAg ниже 50 МЕ/мл, или обнаруживаемый гуморальный ответ на HBsAg. В предпочтительных вариантах осуществления функциональное излечение включает и длительный период, по меньшей мере, 3 месяца, предпочтительно 6 месяцев, HBsAg ниже 50 МЕ/мл и обнаруживаемый гуморальный ответ на HBsAg.

А. РНКи агенты для применения в способах настоящего изобретения

Настоящее изобретение включает применение РНКи, которые ингибируют экспрессию, по меньшей мере, одного транскрипта ВГВ, и предпочтительно трех или четырех транскриптов ВГВ (открытые рамки считывания, иногда называют в настоящем изобретении генами). Из-за весьма плотной структуры генома ВГВ, можно сконструировать единичные РНКи, которые будут ингибировать экспрессию трех или четырех транскриптов ВГВ (смотри фигуру 1). Для простоты, текст в настоящем изобретении относится к “одному транскрипту ВГВ” или “транскрипту ВГВ.” Ясно, что

предпочтительные варианты осуществления включают ингибирование более чем одного транскрипта ВГВ (или открытой рамки считывания), предпочтительно, по меньшей мере, трех транскриптов ВГВ (или открытых рамок считывания). Кроме того, ясно, что есть восемь генотипов ВГВ, и два предложенных дополнительных генотипа, которые могут дополнительно включать мутации в опубликованных последовательностях. Следовательно, определенные РНКи агенты могут ингибировать различное количество генов, исходя из конкретного генотипа и пациента, зараженного ВГВ.

В некоторых вариантах осуществления РНКи агент включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии или снижения уровня транскрипта ВГВ в клетке у пациента с инфекцией ВГВ. дцРНК включает антисмысловую цепь, содержащую область комплементарности, которая является комплементарной, по меньшей мере, части мРНК, образуемой при экспрессии транскрипта ВГВ. Область комплементарности составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше в длину (например, приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, или 18 нуклеотидов или меньше в длину). При контакте с клеткой, экспрессирующей ген ВГВ, РНКи избирательно ингибирует экспрессию, по меньшей мере, одного, предпочтительно трех или четырех генов ВГВ. В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование экспрессии определяют способом кПЦР в соответствующей клеточной линии, как показано в примерах. Для оценки активности *in vitro*, процент ингибирования определяют, применяя способы, представленные в примере 2 публикации РСТ № WO 2016/077321 при единичной дозе при конечной концентрации дуплекса 10 нМ. Для исследований *in vivo*, уровень после обработки можно сравнить, например, с соответствующим историческим контролем или контрольным образцом объединенной популяции, определяя уровень снижения, например, когда базовое значение недоступно для пациента. Соответствующий контроль должен быть тщательно выбран специалистом в данной области.

дцРНК содержит две цепи РНК, которые являются комплементарными и гибридизуются, образуя дуплексную структуру в условиях, в которых будут применять дцРНК. Одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) включает в себя область комплементарности, которая является по существу комплементарной и, как правило, полностью комплементарной целевой последовательности. Целевую последовательность можно получить из последовательности мРНК, образованной в процессе экспрессии гена ВГВ. Поскольку известно несколько генотипов ВГВ, РНКи агенты предпочтительно конструируют для ингибирования экспрессии генов ВГВ максимально возможного количества генотипов. Ясно, что миРНК, которая полностью комплементарна одному или более генотипам ВГВ, не будет полностью комплементарной всем генотипам. Другая цепь (смысловая цепь) включает область, которая является комплементарной антисмысловой цепи, так что две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при смешении в подходящих условиях. Как описано в другом месте в настоящем изобретении и известно в данной области техники, комплементарные последовательности дцРНК могут также

содержаться в виде самокомплементарных областей одной молекула нуклеиновой кислоты, в отличие от того, чтобы находится в отдельных олигонуклеотидах.

Обычно, дуплексная структура имеет 15 и 30 пар оснований в длину, например, 15–29, 15–28, 15–27, 15–26, 15–25, 15–24, 15–23, 15–22, 15–21, 15–20, 15–19, 15–18, 15–17, 18–30, 18–29, 18–28, 18–27, 18–26, 18–25, 18–24, 18–23, 18–22, 18–21, 18–20, 19–30, 19–29, 19–28, 19–27, 19–26, 19–25, 19–24, 19–23, 19–22, 19–21, 19–20, 20–30, 20–29, 20–28, 20–27, 20–26, 20–25, 20–24, 20–23, 20–22, 20–21, 21–30, 21–29, 21–28, 21–27, 21–26, 21–25, 21–24, 21–23 или 21–22 пар оснований в длину. Диапазоны и длины, промежуточные вышеупомянутым диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Аналогично, область комплементарности к целевой последовательности составляет 15 и 30 нуклеотидов в длину, например, 15–29, 15–28, 15–27, 15–26, 15–25, 15–24, 15–23, 15–22, 15–21, 15–20, 15–19, 15–18, 15–17, 18–30, 18–29, 18–28, 18–27, 18–26, 18–25, 18–24, 18–23, 18–22, 18–21, 18–20, 19–30, 19–29, 19–28, 19–27, 19–26, 19–25, 19–24, 19–23, 19–22, 19–21, 19–20, 20–30, 20–29, 20–28, 20–27, 20–26, 20–25, 20–24, 20–23, 20–22, 20–21, 21–30, 21–29, 21–28, 21–27, 21–26, 21–25, 21–24, 21–23 или 21–22 нуклеотидов в длину. Диапазоны и длины, промежуточные вышеупомянутым диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК имеет 15–20 нуклеотидов в длину или приблизительно 25–30 нуклеотидов в длину. В общем, дцРНК является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. например, хорошо известно в данной области техники, что дцРНК, длиннее чем приблизительно 21–23 нуклеотидов в длину, могут служить в качестве субстратов для Dicer. Как также ясно специалисту в данной области техники, область РНК, направленная на расщепление, будет чаще всего частью более длинной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. Где это уместно, “часть” мРНК мишени представляет собой непрерывную последовательность мРНК мишени достаточной длины для того, чтобы быть субстратом для РНКи-направленного расщепления (*m.e.*, расщепления посредством RISC пути).

Специалисту в данной области техники также ясно, что дуплексная область представляет собой первичную функциональную часть дцРНК, например, дуплексную область из приблизительно 9–36 пар оснований, например, приблизительно 10–36, 11–36, 12–36, 13–36, 14–36, 15–36, 9–35, 10–35, 11–35, 12–35, 13–35, 14–35, 15–35, 9–34, 10–34, 11–34, 12–34, 13–34, 14–34, 15–34, 9–33, 10–33, 11–33, 12–33, 13–33, 14–33, 15–33, 9–32, 10–32, 11–32, 12–32, 13–32, 14–32, 15–32, 9–31, 10–31, 11–31, 12–31, 13–32, 14–31, 15–31, 15–30, 15–29, 15–28, 15–27, 15–26, 15–25, 15–24, 15–23, 15–22, 15–21, 15–20, 15–19, 15–18, 15–17, 18–30, 18–29, 18–28, 18–27, 18–26, 18–25, 18–24, 18–23, 18–22, 18–21, 18–20, 19–30, 19–29, 19–28, 19–27, 19–26, 19–25, 19–24, 19–23, 19–22, 19–21, 19–20, 20–30, 20–29, 20–28, 20–27, 20–26, 20–25, 20–24, 20–23, 20–22, 20–21, 21–30, 21–29, 21–28, 21–27, 21–26, 21–25, 21–24, 21–23 или 21–22 пар оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления, в той степени, в которой она превращается в функциональный дуплекс, например, из 15–

30 пар оснований, который направлен на требуемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющих дуплексную область более чем из 30 пар оснований, представляет собой дцРНК. Таким образом, специалисту в данной области техники ясно, что в одном варианте осуществления, миРНК предоставляется дцРНК. В другом варианте осуществления дцРНК не является природной миРНК. В другом варианте осуществления РНКи агент, пригодный для направленного воздействия на генную экспрессию ВГВ, не генерируется в клетке-мишени расщеплением более длинной дцРНК.

Дуплексная область может быть любой длины, которая обеспечивает специфическое разрушение требуемой РНК мишени посредством RISC пути и может находиться в диапазоне от приблизительно 9 до 36 пар оснований в длину, например, приблизительно 15–30 пар оснований в длину, например, приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований в длину, такую как приблизительно 15–30, 15–29, 15–28, 15–27, 15–26, 15–25, 15–24, 15–23, 15–22, 15–21, 15–20, 15–19, 15–18, 15–17, 18–30, 18–29, 18–28, 18–27, 18–26, 18–25, 18–24, 18–23, 18–22, 18–21, 18–20, 19–30, 19–29, 19–28, 19–27, 19–26, 19–25, 19–24, 19–23, 19–22, 19–21, 19–20, 20–30, 20–29, 20–28, 20–27, 20–26, 20–25, 20–24, 20–23, 20–22, 20–21, 21–30, 21–29, 21–28, 21–27, 21–26, 21–25, 21–24, 21–23 или 21–22 пар оснований в длину. Диапазоны и длины, промежуточные вышеупомянутым диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной более длинной молекулы РНК, или они могут быть различными молекулами РНК. В тех случаях, когда две цепи являются частью одной более длинной молекулы, и, следовательно, соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, соединяющую цепь РНК называют «петлей шпильки». Петля шпильки может содержать, по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может содержать, по меньшей мере, 2, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 5, по меньшей мере, 6, по меньшей мере, 7, по меньшей мере, 8, по меньшей мере, 9, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 20, по меньшей мере, 23 или более неспаренных нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК агент настоящего изобретения содержит тетрапетлю. В рамках изобретения "тетрапетля" в контексте дцРНК относится к петле (одноцепочечная область), состоящей из четырех нуклеотидов, которые образуют стабильную вторичную структуру, которая делает вклад в стабильность соседних гибридованных по Уотсону–Крику нуклеотидов. Не будучи связанными теорией, тетрапетля может стабилизировать соседнюю уотсон–криковскую пару оснований за счет стэкинг взаимодействий. Кроме того, взаимодействия между четырьмя нуклеотидами в тетрапетле включают, но не ограничиваются, спаривание оснований не по Уотсону–Крику, стэкинг взаимодействия, водородные связи и контактные взаимодействия (Cheong

et al., Nature 1990 Aug 16;346(6285):680–2; Neus и Pardi, Science 1991 Jul 12;253(5016): 191–4). Тетрапетля обеспечивает увеличение температуры плавления (T_m) смежного дуплекса, которая является большей, чем ожидаемая из последовательности с простой модельной петлей, состоящей из четырех случайных оснований. например, тетрапетля может обеспечивать температуру плавления, по меньшей мере, 55°C в 10 mM NaHPO₄ в шпильке, содержащей дуплекс, по меньшей мере, 2 пары оснований в длину. Тетрапетля может содержать рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и их комбинации. Примеры РНК тетрапетлей включают UNCG семейство тетрапетлей (например, UUCG), GNRA семейство тетрапетлей (например, GAAA) и CUUG тетрапетлю. (Woese et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Nov;87(21):8467–71 ; Antao et al., Nucleic Acids Res. 1991 Nov 1;19(21):5901–5). Примеры ДНК тетрапетлей включают d(GNNA) семейство тетрапетлей (например, d(GTTA), d(GNRA)) семейство тетрапетлей, d(GNAB) семейство тетрапетлей, d(CNNG) семейство тетрапетлей, d(TNCG) семейство тетрапетлей (например, d(TTCG)). (Nakano et al. Biochemistry, 41 (48), 14281 – 14292, 2002; Shinji et al. Nippon Kagakkai Koen Yokoshu т. 78; № 2; стр. 731 (2000).)

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, дцНК, содержащие тетрапетлю и модифицированный нуклеотид, предполагаются, как описано, например, в патентной заявке США № 2011/0288147, полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки. В некоторых вариантах осуществления дцНК настоящего изобретения содержит первую цепь и вторую цепь, где первая цепь и вторая цепь образуют дуплексную область из 19–25 нуклеотидов в длину, где первая цепь содержит 3' область, которая выступает за границы дуплексной области первая цепь–вторая цепь и содержит тетрапетлю, и дцНК содержит разрыв между 3' концом первой цепи и 5' концом второй цепи.

Необязательно, разрыв расположен в прогнозируемом сайте расщепления Dicer двухцепочечной нуклеиновой кислоты (дцНК), содержащей тетрапетлю. Предполагается, что, как и в случае с любым из дуплексных олигонуклеотидов настоящего изобретения, дуплексы, содержащие тетрапетлю настоящего изобретения, могут содержать любой диапазон модификаций, описанных в настоящем изобретении или иначе известных в данной области техники, включая, например, 2'-О-метил, 2'-фтор, обращенное основание, GalNAc молекулы и т.д. Обычно каждый нуклеотид в обеих цепях дцНК, содержащей тетрапетлю, является химически модифицированным, если дцНК, содержащую тетрапетлю, предполагается доставлять без применения липидных наночастиц или другого способа доставки, который защищает дцНК от разрушения в процессе доставки. Однако в некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов не модифицируют.

Когда две по существу комплементарные цепи дцРНК содержатся в отдельных молекулах РНК, данные молекулы не требуют, но могут быть соединены ковалентно. Когда две цепи соединены ковалентно способом, отличным от непрерывной цепи нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи,

образующих дуплексную структуру, соединяющую структуру называют “линкером. Цепи РНК могут содержать одинаковое или различное количество нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований представляет собой количество нуклеотидов в более короткой цепи дцРНК минус любые «липкие концы», которые присутствуют в дуплексе. В добавление к дуплексной структуре, РНКи может содержать один или более нуклеотидных «липких концов».

дцРНК, как описано в настоящем изобретении, может дополнительно содержать один или более одноцепочечных нуклеотидных «липких концов», например, из 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. дцРНК, содержащие, по меньшей мере один нуклеотидный «липкий конец», могут обладать неожиданно лучшими ингибирующими свойствами по сравнению с их аналогами с тупыми концами. Нуклеотидный «липкий конец» может содержать или состоять из нуклеотидного/нуклеозидного аналога, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. «Липкий конец» (концы) могут быть в смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Более того, нуклеотид (нуклеотиды) «липкого конца» могут присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах любой из антисмысловой или смысловой цепи дцРНК. В некоторых вариантах осуществления более длинные, удлиненные «липкие концы» являются возможными.

дцРНК можно получить стандартными способами, известными в данной области техники. РНКи соединения настоящего изобретения можно получить, применяя двухстадийный способ. Сначала, отдельные цепи двухцепочечной молекулы РНК получают отдельно. Затем, цепи отжигают. Отдельные цепи молекулы мРНК можно получить, применяя жидкофазный или твердофазный органический синтез или оба. В некоторых вариантах осуществления РНКи соединения получают из экспрессионного вектора, доставленного в клетку.

В первом аспекте, дцРНК настоящего изобретения содержит по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловую цепь выбирают из группы последовательностей, представленных в любой из таблиц в приложении А, и соответствующую антисмысловую цепь смысловой цепи выбирают из группы последовательностей любой из таблиц в приложении А.

В некоторых вариантах осуществления смысловую цепь выбирают из группы последовательностей, представленных в любой из таблиц в приложении А, и соответствующую антисмысловую цепь смысловой цепи выбирают из группы последовательностей любой из таблиц в приложении А. В данном аспекте, одна из двух последовательностей является комплементарной другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей является по существу комплементарной последовательности мРНК, получаемой в процессе экспрессии ВГВ гена. Как таковая, в данном аспекте, дцРНК будет содержать два олигонуклеотида, где первый олигонуклеотид описан в качестве смысловой цепи в любой из таблиц в приложении А, и второй олигонуклеотид описан как соответствующая антисмысловая цепь смысловой

цепи в любой из таблиц в приложении А. В одном варианте осуществления, по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в различных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления, по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в одном олигонуклеотиде.

Ясно, что, хотя некоторые из последовательностей в таблицах в приложении А описаны как модифицированные или конъюгированные последовательности, РНК РНКи настоящего изобретения, например, дцРНК настоящего изобретения, может содержать любую из последовательностей, предусмотренных в таблицах в приложении А, которая является немодифицированной, неконъюгированной или модифицированной или конъюгированной отлично от того, как описано в настоящем изобретении. Дополнительные сайты-мишени представлены, например, в РСТ публикациях № WO 2016/077321, WO 2012/024170, WO 2017/027350, и WO 2013/003520; и в Michler, 2016, полное содержание которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Специалисту хорошо известно, что дцРНК, содержащие дуплексную структуру из приблизительно 20–23 пар оснований, например, 21 пары оснований, привлекают внимание как особенно эффективные в стимуляции РНК интерференции (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877–6888). Однако другие обнаружили, что более короткие или более длинные РНК дуплексные структуры также могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) RNA 14:1714–1719; Kim et al. (2005) Nat Biotech 23:222–226). В вариантах осуществления описанных выше, в силу природы олигонуклеотидных последовательностей, представленных в любой из таблиц в приложении А, дцРНК, описанные в настоящем изобретении, могут включать, по меньшей мере, одну цепь с длиной минимум 21 нуклеотида. Можно с достаточной вероятностью ожидать, что более короткие дуплексы, содержащие одну из последовательностей любой из таблиц в приложении А минус только несколько нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть аналогично эффективными по сравнению с дцРНК, описанными выше. Следовательно, дцРНК, содержащие последовательность по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более непрерывных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей любой из таблиц в приложении А и отличающихся их способностью ингибировать экспрессию ВГВ гена не более чем на 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от дцРНК, содержащей полную последовательность.

РНКи, как описано в настоящем изобретении, может содержать один или более ошибочных спариваний оснований с целевой последовательностью, или с одной или более ВГВ целевыми последовательностями, например, из-за вариаций в последовательности среди ВГВ генотипов. В одном варианте осуществления, РНКи, как описано в настоящем изобретении, содержит не более чем 3 ошибочных спаривания оснований. Если антисмысловая цепь РНКи содержит ошибочные спаривания оснований к целевой последовательности, предпочтительно, чтобы положение ошибочного спаривания оснований не находилось в центре области комплементарности. Если антисмысловая цепь РНКи содержит ошибочные спаривания оснований к целевой последовательности,

предпочтительно, чтобы ошибочное спаривание оснований ограничивалось в пределах последних 5 нуклеотидов от любого из 5'– или 3'–конца области комплементарности. например, для 23 нуклеотидного РНКи агента, цепь, которая является комплементарной области ВГВ гена, обычно не содержит любое ошибочное спаривание оснований в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем изобретении, или способы, известные в данной области техники, можно применять для определения, является ли РНКи, содержащая ошибочное спаривание оснований к целевой последовательности, эффективной для ингибирования экспрессии ВГВ гена. Рассмотрение эффективности РНКи с ошибочным спариванием оснований по ингибированию экспрессии ВГВ гена является важным, особенно если известно, что конкретная область комплементарности в ВГВ гене содержит полиморфную вариацию последовательности в различных генотипах и популяции.

i. Модифицированные РНКи для применения в способах настоящего изобретения

В некоторых вариантах осуществления РНК РНКи для применения в настоящем изобретении, например, дцРНК, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации или конъюгаты, известные в данной области техники и описанные в настоящем изобретении, например, при получении из экспрессионного вектора. В других вариантах осуществления РНК РНКи настоящего изобретения, например, дцРНК, является химически модифицированной для увеличения стабильности или других полезных характеристик. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, по существу все из нуклеотидов РНКи настоящего изобретения являются модифицированными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, все из нуклеотидов РНКи настоящего изобретения являются модифицированными. РНКи настоящего изобретения, в которых “по существу все из нуклеотидов являются модифицированными”, в значительной части, но не полностью модифицированы и могут содержать не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированных нуклеотидов.

Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем изобретении, можно получить или модифицировать способами, хорошо известными в данной области техники, такими как способы, описанные в “Current protocols in nucleic acid chemistry,” Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, которая включена в настоящее изобретение с помощью ссылки. Модификации включают, например, концевые модификации, например, 5'–концевые модификации (фосфорилирование, конъюгат, обращенные связи) или 3'–концевые модификации (конъюгат, ДНК нуклеотиды, обращенные связи и *т.д.*); модификации оснований, например, замещение стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые спариваются с расширенным репертуаром партнеров, удаление основания (нуклеотиды, лишённые основания), или конъюгированные основания; модификации сахарного остатка (например, по 2'–положению или 4'–положению) или замена сахарного остатка; или модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных

связей. Конкретные примеры РНКи соединений, пригодных в вариантах осуществления описанных в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются, РНК, содержащие модифицированные остовы или неприродные межнуклеозидные связи. РНК, содержащие модифицированные остовы, включают, среди прочих, РНК, которые не содержат атом фосфора в осто́ве. Для целей настоящего описания, и как иногда ссылаются в данной области техники, модифицированные РНК, которые не содержат атома фосфора в их межнуклеозидном осто́ве, можно также считать олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированные РНКи будут содержать атом фосфора в их межнуклеозидном осто́ве.

Модифицированные РНК остовы включают, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоклфосфотриэфиры, метил и другие алкилфосфаты, включая 3'-алкиленфосфаты и хиральные фосфаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидаты и аминоклфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боронофосфаты, содержащие нормальные 3'-5' связи, их 2'-5'-соединенные аналоги, и те, что имеют обращенную полярность, где соседние пары нуклеозидных звеньев соединены 3'-5' к 5'-3' или 2'-5' к 5'-2'. Различные соли, смешанные соли и свободные кислые формы также являются включенными.

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

Модифицированные РНК остовы, которые не содержат в себе атом фосфора, включают остовы, которые образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеотидными связями, смешанными гетероатомами и алкильными или циклоалкильными межнуклеотидными связями, или одной или более короткоцепочечными гетероароматическими или гетероциклическими межнуклеотидными связями. Они включают те, что содержат морфолиновые связи (образованные частично сахарной частью нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкен-содержащие остовы; сульфаматные остовы; метиленимино и метиленигидрази́но остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, содержащие смешанные N, O, S и CH₂ компонентные части.

Репрезентативные патенты США, которые описывают получение

олигонуклеозидов выше, включают, но не ограничиваются, патенты США № 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437; и 5677439, полное содержание каждого из которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

В других вариантах осуществления подходящие РНК миметики предполагаются для применения в РНКи, в которых и сахар и межнуклеотидная связь, *т.е.*, остов, нуклеотидного звеньев заменен на новые группы. Основания сохраняют для гибридизации с подходящим соединением–мишенью, являющимся нуклеиновой кислотой. Одно данное олигомерное соединение, миметик РНК, который, как показано, обладает превосходными гибридизационными свойствами, называют пептидонуклеиновой кислотой (ПНК). В РНК соединениях, сахарный остов РНК заменен на амид–содержащий остов, в частности аминоэтилглициновый остов. Нуклеиновые основания сохраняют, и они соединены непосредственно или опосредовано с аза атомами азота амидной части остова. Репрезентативные патенты США, которые описывают получение ПНК соединений, включают, но не ограничиваются, патенты США № 5539082; 5714331; и 5719262, полное содержание каждого из которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки. Дополнительные ПНК соединения, пригодные для применения в РНКи настоящего изобретения, описаны, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497–1500.

Некоторые варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфоротиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами, 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(метиимино) или MMI остов], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [где нативный фосфодиэфирный остов представлен как $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$] вышеуказанного патента США № 5489677, и амидные остовы вышеуказанного патента США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, описанные в настоящем изобретении, имеют структуры морфолинового остова вышеуказанного патента США № 5034506.

Модифицированные РНК могут также содержать один или более замещенных сахарных фрагментов. РНКи, например, дцРНК, описанные в настоящем изобретении, могут включать одну из следующих модификаций по 2'-положению: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными C_1 – C_{10} алкилом или C_2 – C_{10} алкенилом и алкинилом. Примеры подходящих модификаций включают $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ и $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, где n и m равны от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления дцРНК содержит одну из следующих модификаций по 2' положению: C_1 – C_{10} низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный

сил, РНК расщепляющую группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств РНКи, или группу для улучшения фармакодинамических свойств РНКи, и другие заместители, имеющие аналогичные свойства. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, также известную как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) *т.е.*, алкоксиалкокси группу. Другим примером модификации является 2'-диметиламинооксиэтокси, *т.е.*, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂ группа, также известная как 2'-DMAOE, как описано в примерах в настоящем изобретении ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная в данной области техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), *т.е.*, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Аналогичные модификации можно также получить по другим положениям в РНК РНКи, в частности по 3' положению сахара в 3' концевом нуклеотиде или в 2'-5' соединенных дцРНК и по 5' положению 5' концевого нуклеотида. РНКи могут также содержать миметики сахара, такие как циклобутильные фрагменты вместо пентофуранозильного сахара. Репрезентативные патенты США, которые описывают получение данных модифицированных сахарных структур, включают, но не ограничиваются, патенты США № 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; и 5700920, некоторые из которых принадлежат на правах долевой собственности с настоящей заявкой. Полное содержание каждого из перечисленных выше включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

РНК РНКи может также содержать модификации или замены нуклеиновых оснований (часто называемых в данной области техники просто "основанием"). В рамках изобретения "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания включают пуриновые основания, аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые основания, тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 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-галогенурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, в частности 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин и 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные нуклеиновые основания включают те, что описаны в патенте США № 3687808, те, что описаны в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; те, что описаны в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering*, стр. 858-859, Kroschwitz, J. L. ed.

John Wiley & Sons, 1990, те, что описаны Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и те, что описаны Sanghvi, Y S., Chapter 15, *dsRNA Research and Applications*, стр. 289–302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из нуклеиновых оснований являются особенно пригодными для увеличения связывающего сродства олигомерных соединений, описанных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и 0-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Показано, что 5-метилцитозиновые замещения увеличивают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6–1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, стр. 276–278) и представляют собой примеры замещения оснований, даже более конкретно при комбинировании с 2'-О-метоксиэтильными сахарными модификациями.

Репрезентативные патенты США, которые описывают получение некоторых из указанных выше модифицированных нуклеиновых оснований, а также другие модифицированные нуклеиновые основания, включают, но не ограничиваются, указанные выше патенты США № 3687808 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672; и 7495088, полное содержание каждого из которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

РНК РНКи можно также модифицировать так, чтобы она содержала одну или более конформационно запертых нуклеиновых кислот (LNA). Конформационно запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированный рибозный остаток, в котором рибозный остаток содержит дополнительный мостик, соединяющий 2' и 4' атомы углерода. Данная структура эффективно "блокирует" рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Показано, что добавление конформационно запертых нуклеиновых кислот к миРНК увеличивает стабильность миРНК в сыворотке и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439–447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833–843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185–3193).

В некоторых вариантах осуществления РНКи настоящего изобретения содержат один или более мономеров, которые представляют собой UNA (разомкнутую нуклеиновую кислоту) нуклеотиды. UNA представляет собой разомкнутую ациклическую нуклеиновую кислоту, где любая из связей сахара удалена, образуя разомкнутый "сахарный" остаток. В одном примере, UNA также включает мономер с удаленными связями между C1'–C4' (*т.е.* ковалентной связью углерод–кислород–углерод между C1' и C4' углеродами). В другом примере, удалена C2'–C3' связь (*т.е.* ковалентная связь углерод–углерод между C2' и C3' углеродами) сахара (смотри *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133–134 (2008) и Fluiter et al., *Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039, включенные в настоящее изобретение с помощью ссылки).

РНК РНКи можно также модифицировать так, чтобы она содержала один или более бициклических сахарных остатков. “Бициклический сахар” представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное мостиковым соединением двух атомов. “Бициклический нуклеозид” (“BNA”) представляет собой нуклеозид, содержащий сахарный остаток, содержащий мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, посредством этого 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 изобретения может содержать одну или более конформационно запертых нуклеиновых кислот (LNA). Конформационно запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированный рибозный остаток, в котором рибозный остаток содержит дополнительный мостик, соединяющий 2' и 4' углероды. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклический сахарный остаток, содержащий 4'-CH₂-O-2' мостик. Данная структура эффективно “запирает” рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Показано, что добавление конформационно запертых нуклеиновых кислот к миРНК увеличивает стабильность миРНК в сыворотке и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439–447; Mook, OR. Et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833–843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185–3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах настоящего изобретения включают, без ограничения, нуклеозиды, содержащие мостик между 4' и 2' рибозильными кольцевыми атомами. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотидные агенты настоящего изобретения содержат один или более бициклических нуклеозидов, содержащих 4'-2' мостик. Примеры данных 4'-2' мостиковых бициклических нуклеозидов включают, но не ограничиваются, 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также называемый “запертый этил” или “cEt”) и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и его аналоги; смотри, например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; смотри, например, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и его аналоги; смотри, например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (смотри, например, US20040171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C1–C12 алкил или защитную группу (смотри, например, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (смотри, например, Chattopadhyaya et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118–134); и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и его аналоги; смотри, например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из приведенных выше включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Дополнительные репрезентативные патенты США и патентные публикации США, которые описывают получение нуклеотидов конформационно запертых нуклеиновых кислот, включают, но не ограничиваются, следующие: патенты США № 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133; 7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; US

20080039618; и US 20090012281, полное содержание каждого из которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Можно получить любой из приведенных выше бициклических нуклеозидов, содержащий одну или более стереохимических конфигураций сахара, включая, например, α -L-рибофуранозу и β -D-рибофуранозу (смотри WO 99/14226).

РНК РНКи можно также модифицировать так, чтобы она содержала один или более запертых этилнуклеотидов. В рамках изобретения "запертый этилнуклеотид" или "cEt" представляет собой конформационно запертую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный остаток, содержащий 4'-CH(CH₃)-O-2' мостик. В одном варианте осуществления, запертый этилнуклеотид имеет S конформацию, называемую в настоящем изобретении "S-cEt."

РНКи настоящего изобретения могут также включать один или более "конформационно ограниченных нуклеотидов" ("CRN"). CRN представляют собой нуклеотидные аналоги с линкером, соединяющим C2' и C4' углероды рибозы или C3 и C5' углероды рибозы. CRN замыкают рибозное кольцо в стабильной конформации и увеличивают гибридизационное сродство к мРНК. Линкер имеет достаточную длину для размещения кислорода в оптимальном положении для стабильности и сродства, приводящем в результате к меньшей складчатости рибозного кольца.

Репрезентативные публикации, которые описывают получение некоторых из CRN, упоминаемых выше, включают, но не ограничиваются, US 20130190383 и WO 2013036868, полное содержание каждого из которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Hyp-C6-NHAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Hyp-C6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Hyp-NHAc), тимидин-2'-O-дезокситимидин (эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Hyp-C6-амино), 2-докозаноил-уридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT(idT) и другие. Описание данной модификации можно найти в WO 2011005861.

Другие модификации нуклеотидов РНКи настоящего изобретения включают 5' фосфатный или 5' фосфатный миметик, например, 5'-концевой фосфат или фосфатный миметик по антисмысловой цепи РНКи агента. Подходящие фосфатные миметики описаны, например, в US20120157511, полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

В некоторых вариантах осуществления РНКи агент для применения в способах настоящего изобретения представляет собой агент, выбранный из группы агентов, перечисленных в любой из таблиц в приложении А. Данные агенты могут дополнительно содержать лиганд.

ii. РНКи, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК РНКи настоящего изобретения включает химическое присоединение к РНК одного или более лигандов, фрагментов или конъюгатов, которые

увеличивают активность, клеточное распределение или поглощение клетками РНКи. Данные фрагменты включают, но не ограничиваются, липидные фрагменты, такие как холестериновый фрагмент (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553–6556), холевую кислоту (Manoharan et al., *Bior. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053–1060), тиоэфир, например, берил–S–тримитиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306–309; Manoharan et al., *Bior. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765–2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533–538), алифатическую цепь, например, додекандиольный или ундецильный остатки (Saison–Behmoaras et al., *EMBO J*, 1991, 10:1111–1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327–330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49–54), фосфолипид, например, ди–гексадецил–гас–глицерин или триэтиламмоний 1,2–ди–О–гексадецил–гас–глицеро–3–фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651–3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777–3783), полиамин или полиэтиленгликольную цепь (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969–973), или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651–3654), пальмитильный фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229–237) или октадециламиноновый или гексиламинокарбонилосихолестериновый фрагмент (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923–937).

В одном варианте осуществления, лиганд изменяет распределение, направленную доставку или время жизни РНКи агента, в который его вводят. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает увеличенное сродство к выбранной мишени, например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, клеточному или органному компартменту, ткани, органу или части тела, например, по сравнению с вариантами, не содержащими данный лиганд. Предпочтительные лиганды не участвуют в спаривании оснований в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать природное вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин, N–ацетилгалактозамин или гиалуроновую кислоту); или липид. Лиганд может также представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическую полиаминокислоту. Примеры полиаминокислот включают полилизин (PLL), поли L–акспарагиновую кислоту, поли L–глутаминовую кислоту, безводный сополимер стирола и малеинового ангидрида, поли(L–лактид–со–гликолидный) сополимер, сополимер дивинильного эфира и малеинового ангидрида, N–(2–гидроксипропил)метакриламидный сополимер (НМРА), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2–этилакриловую кислоту), N–изопропилакриламидные полимеры или полифосфазины. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид–полиамин, пептидомиметиковый полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа–спиральный пептид.

Лиганды могут также включать группы, осуществляющие направленную доставку, например, агенты, осуществляющие направленную доставку в клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается со специфическим типом клеток, таким как клетка почек. Группа, осуществляющая направленную доставку, может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, сурфактантный белок А, муциновый углевод, многовалентную лактозу, одновалентную или многовалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, многовалентную маннозу, многовалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, трансферрин, бифосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, витамин А, биотин или RGD-пептид или RGD-пептидный миметик. В некоторых вариантах осуществления лиганды включают одновалентную или многовалентную галактозу. В некоторых вариантах осуществления лиганды включают холестерин.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), кросс-линкеры (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафин, сапфин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилосигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил) литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил) холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин) и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat пептид), алкилирующие агенты, фосфат, амино, меркапто, ПЭГ (например, ПЭГ-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиомеченные маркеры, ферменты, гептены (например, биотин), агенты, улучшающие транспорт/поглощение (например, аспирин, витамин Е, фолевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, акридин-имидазольные конъюгаты, Eu³⁺ комплексы тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы, обладающие специфическим сродством к колиганду, или антитела, например, антитело, которое связывается со специфическим типом клеток, таким как гепатоциты. Лиганды могут также включать гормоны и рецепторы гормонов. Они могут также включать непептидные молекулы, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, многовалентную лактозу, моновалентную или многовалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, многовалентную маннозу или многовалентную фукозу. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор p38 MAP киназы или активатор NF-κB.

Лиганд может представлять собой вещество, например, лекарственное средство,

которое может улучшать поглощение РНКи агента клеток, например, нарушением клеточного цитоскелета, например, нарушением клеточных микротрубочек, микрофиламентов или промежуточных филаментов. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, джаплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, присоединенный к РНКи, как описано в настоящем изобретении, действует в качестве фармакокинетического модулятора (РК модулятор). РК модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, агенты, связывающиеся с белками, РЕГ, витамины *и т.д.* Примеры РК модуляторов включают, но не ограничиваются, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, свинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат ряд фосфоротиоатных связей, связываются с белками сыворотки, таким образом короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие несколько фосфоротиоатных связей в остове, также подходят для настоящего изобретения в качестве лигандов (например, в качестве РК модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связываются с сывороточными компонентами (например, белками сыворотки), также являются пригодными для применения в качестве РК модулирующих лигандов в вариантах осуществления описанных в настоящем изобретении.

Конъюгированные с лигандом олигонуклеотиды настоящего изобретения можно получить применением олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную группу, такую как группа, полученная в результате присоединения соединяющей молекулы в олигонуклеотид (описано ниже). Данный реакционноспособный олигонуклеотид может реагировать непосредственно с имеющимися в продаже лигандами, лигандами, которые синтезируют несущими любую из ряда защитных групп, или лигандами, которые содержат присоединенный к ним соединяющий фрагмент.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах настоящего изобретения, может удобно и стандартно получать хорошо известным способом твердофазного синтеза. Оборудование для данного синтеза продает несколько поставщиков, включая, например, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Любой другой способ получения, известный в данной области техники, можно дополнительно или альтернативно применять. Также известно применение аналогичных способов получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

В конъюгированных с лигандом олигонуклеотидах и лиганде–молекуле, несущих сиквенс–специфические присоединенные нуклеозиды настоящего изобретения, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды можно собирать на подходящем ДНК синтезаторе, применяя стандартные нуклеотидные или нуклеозидные предшественники, или нуклеотидные или нуклеозидные конъюгатные предшественники, которые уже несут

присоединяющую группу, предшественники лиганда–нуклеотида или нуклеозида–конъюгата, которые уже несут молекулу лиганда, или ненуклеозидные несущие лиганд структурные блоки.

При применении нуклеотид–конъюгатных предшественников, которые уже несут соединяющую группу, получение сиквенс–специфических присоединенных нуклеозидов обычно завершено, и затем молекула лиганда реагирует с соединяющей группой, образуя конъюгированный с лигандом олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды или присоединенные нуклеозиды настоящего изобретения получают автоматическим синтезатором, применяя фосфорамидиты, полученные из лиганд–нуклеозидных конъюгатов в добавление к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые имеются в продаже и стандартно используют в синтезе олигонуклеотидов.

1. Липидные конъюгаты

В одном варианте осуществления, лиганд или конъюгат представляет собой липид или молекулу на основе липида. Данный липид или молекула на основе липида предпочтительно связывается с белком сыворотки, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд обеспечивает распределение конъюгата в ткани–мишени, например, ткани–мишени, отличной от почек, тела. например, ткань–мишень может представлять собой печень, включая паренхимальные клетки печени. Другие молекулы, которые связываются с HSA, можно также применять в качестве лигандов. например, можно применять напроксен или аспирин. Липид или лиганд на основе липида может (а) увеличивать устойчивость к разрушению конъюгата, (b) улучшать направленную доставку или транспорт в клетку–мишень или клеточную мембрану, или (с) можно применять для регулирования связывания с белком сыворотки, например, HSA.

Лиганд на основе липида можно применять для ингибирования, например, контроля связывания конъюгата с тканью–мишенью. например, липид или лиганд на основе липида, который связывается с HSA более сильно, будет менее вероятно направляться в почки и, следовательно, менее вероятно, что он будет выводиться из тела. Липид или лиганд на основе липида, который связывается с HSA менее сильно, можно применять для направленной доставки конъюгата в почку.

В предпочтительном варианте осуществления, лиганд на основе липида связывается с HSA. Предпочтительно, он связывается с HSA с достаточным сродством так, чтобы конъюгат предпочтительно распределялся в ткани, отличной от почек. Однако, предпочтительно, чтобы сродство не было столь сильным, чтобы связывание HSA–лиганд нельзя было обратить.

В другом предпочтительном варианте осуществления, лиганд на основе липида связывается с HSA слабо или вообще не связывается, так что конъюгат будет предпочтительно распределяться в почке. Другие фрагменты, которые осуществляют направленную доставку в клетки почек, можно также применять вместо или в добавление

к лиганду на основе липида.

В другом аспекте, лиганд представляет собой фрагмент, например, витамин, который поглощается клеткой–мишенью, например, пролиферирующей клеткой. Они являются особенно пригодными для лечения заболеваний, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или незлокачественного типа, например, раковых клеток. Примеры витаминов включают витамин А, Е, и К. Другие примеры витаминов включают В витамин, например, фолевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые клетками–мишенями, такими как клетки печени. Также включенными являются HSA и липопротеин низкой плотности (LDL).

2. Агенты, способствующие проникновению в клетку

В другом аспекте, лиганд представляет собой агент, способствующий проникновению в клетку, предпочтительно спиральный агент, способствующий проникновению в клетку. Предпочтительно, агент является амфипатическим. Пример агента представляет собой пептид, такой как tat или antennopodia. Если агент представляет собой пептид, его можно модифицировать, включая пептидилмиметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи, и применение D–аминокислот. Спиральный агент предпочтительно представляет собой альфа–спиральный агент, который предпочтительно имеет липофильную и липофобную фазу.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем изобретении олигопептидомиметиком) представляет собой молекулу, способную складываться в определенную трехмерную структуру, аналогичную природному пептиду. Присоединение пептида и пептидомиметиков к РНКи агентам может влиять на фармакокинетическое распределение РНКи, такое как улучшение клеточного узнавания и поглощения. Пептидный или пептидомиметиковый фрагмент может быть приблизительно 5–50 аминокислот в длину, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину.

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид, способствующий проникновению в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий в основном из Tyr, Trp или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой дендримерный пептид, замкнутый пептид или сшитый пептид. В другой альтернативе, пептидный фрагмент может содержать гидрофобную последовательность для транслокации через мембрану (MTS). Пример гидрофобного MTS–содержащего пептида представляет собой RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 33). RFGF аналог (например, аминокислотную последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 34), содержащий гидрофобный MTS, может также представлять собой фрагмент, осуществляющий направленную доставку. Пептидный фрагмент может представлять собой пептид для “доставки”, который может нести большие полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белок, через клеточные мембраны. например,

обнаружено, что последовательности из Tat белка ВИЧ (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 35) и белок *Drosophila Antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 36) способны функционировать как пептиды для доставки. Пептид или пептидомиметик можно кодировать случайной последовательностью ДНК, такой как пептид, обнаруженный в фаг-дисплейной библиотеке, или комбинаторной библиотеке один шарик–одно соединение (OBOC) (Lam et al., Nature, 354:82–84, 1991). Примеры пептида или пептидомиметика, присоединенных к дцРНК агенту через включенный мономерное звено для целей направления в клетку, представляют собой пептид аргинин–глицин–аспарагиновая кислота (RGD), или RGD миметик. Пептидный фрагмент может быть в диапазоне длины от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут содержать структурную модификацию, такую как модификация для повышения стабильности или непосредственно конформационных свойств. Можно применять любую из конформационных модификаций, описанных ниже.

RGD пептид для применения в композициях и способах настоящего изобретения может быть линейным или циклическим, и его можно модифицировать, например, гликозилировать или метилировать, облегчая направленную доставку в конкретную ткань (ткани). RGD–содержащие пептиды и пептидомиметики могут содержать D–аминокислоты, а также синтетические RGD миметики. В добавление к RGD, можно применять другие фрагменты, которые нацелены на интегриновый лиганд. Предпочтительные конъюгаты данного лиганда нацелены на PECAM–1 или VEGF.

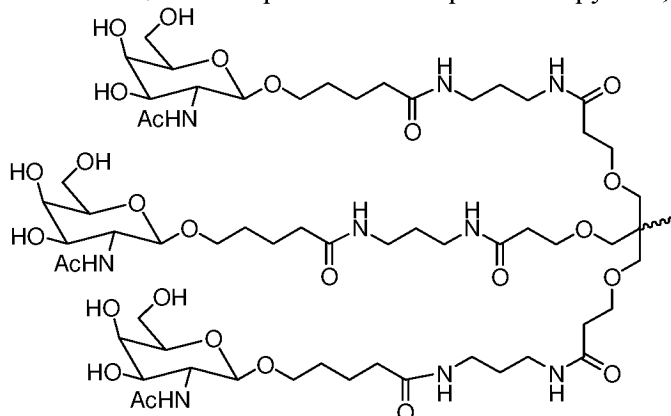
“Пептид, способствующий проникновению в клетку” способен проникать через клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибковая клетка, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептид, способствующий проникновению в микробную клетку может представлять собой, например, α –спиральный линейный пептид (например, LL–37 или церопин P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α –дефензин, β –дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две основные аминокислоты (например, PR–39 или индолицидин). Пептид, способствующий проникновению в клетку, может также содержать сигнал ядерной локализации (NLS). например, пептид, способствующий проникновению в клетку, может представлять собой двусоставной амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена слияния пептида HIV–1 gp41 и NLS SV40 большого T антигена (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717–2724, 2003).

3. Углеводные конъюгаты

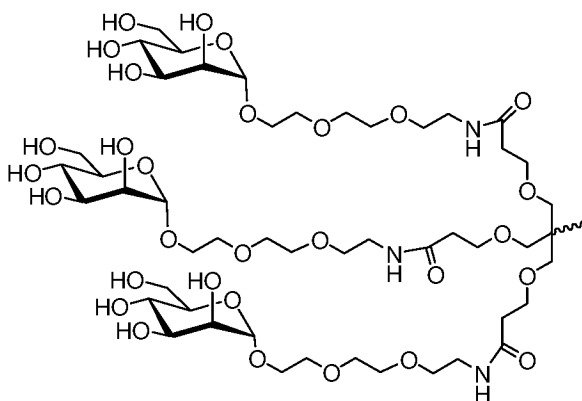
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов настоящего изобретения, РНК и олигонуклеотид дополнительно содержит углевод. Конъюгированные с углеводом РНК являются полезными для *in vivo* доставки нуклеиновых кислот, а также композиций, пригодных для *in vivo* терапевтического применения, как описано в настоящем изобретении. В рамках изобретения “углевод” относится к соединению, которое или представляет собой углевод *per se*, полученный из одного или более моносахаридных звеньев, содержащих, по меньшей мере, 6 атомов углерода (которые

могут быть линейными, разветвленными или циклическими), причем атом кислорода, азота или серы соединен с каждым атомом углерода; или соединение, содержащее в качестве его части углеводный фрагмент, состоящий из одного или более моносахаридных звеньев, причем каждый содержит по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), причем атом кислорода, азота или серы соединен с каждым атомом углерода. Репрезентативные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев), и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные смолы. Конкретные моносахариды включают C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8) сахара; ди- и трисахариды включают сахара, содержащие два или три моносахаридных звена (например, C5, C6, C7 или C8).

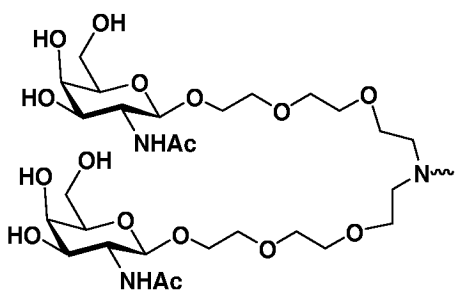
В одном варианте осуществления, углеводный конъюгат для применения в композициях и способах настоящего изобретения представляет собой моносахарид. В другом варианте осуществления, углеводный конъюгат для применения в композициях и способах настоящего изобретения выбирают из группы, состоящей из:



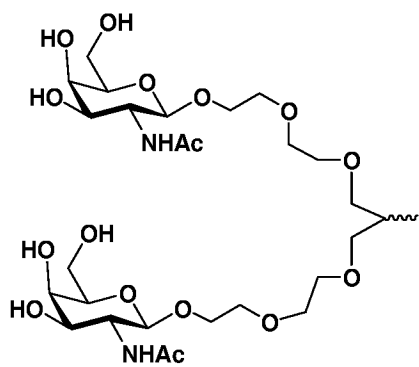
формулы II,



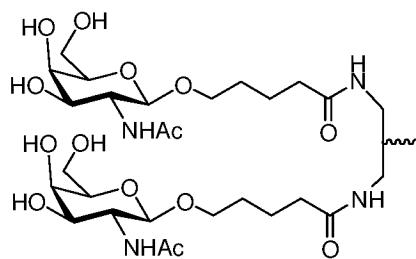
формула III,



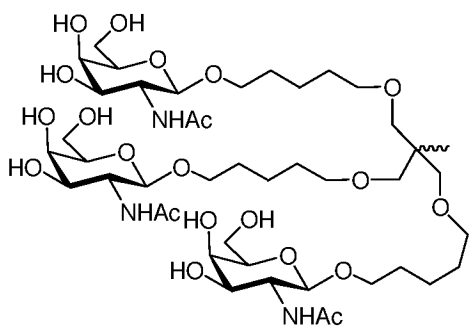
формула IV,



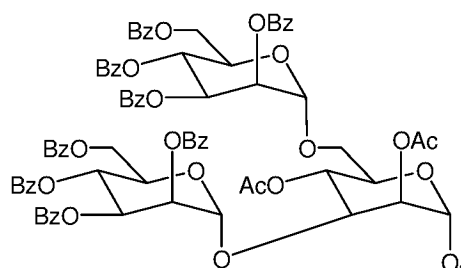
формула V,



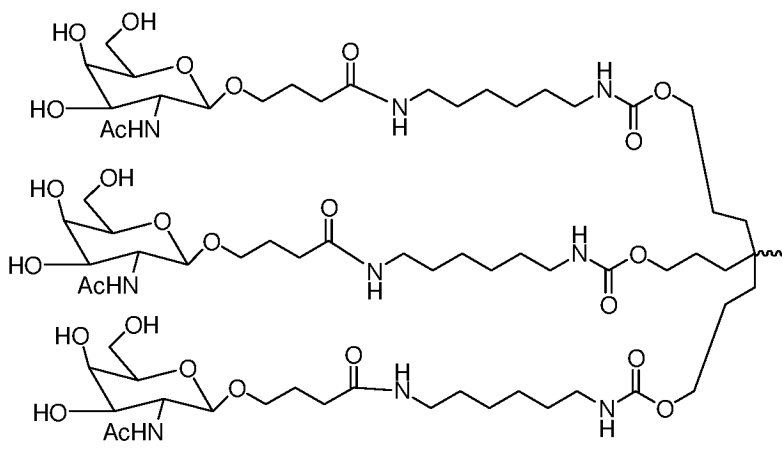
формула VI,



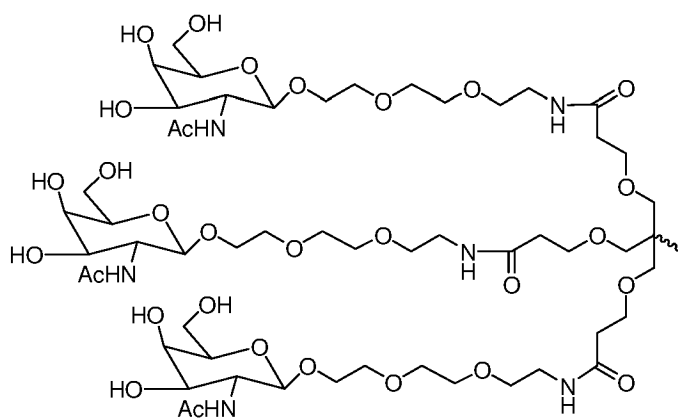
формула VII,



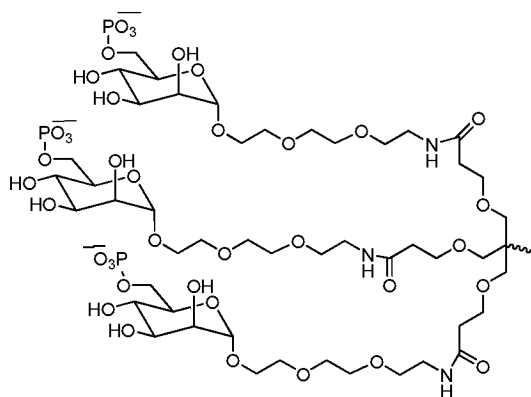
формула VIII,



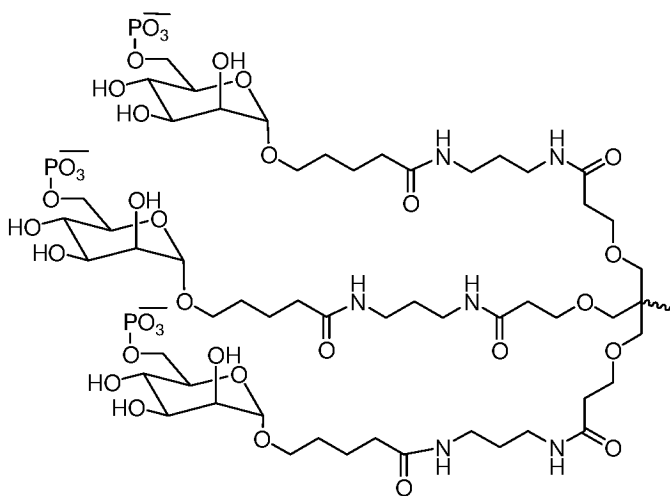
формула IX,



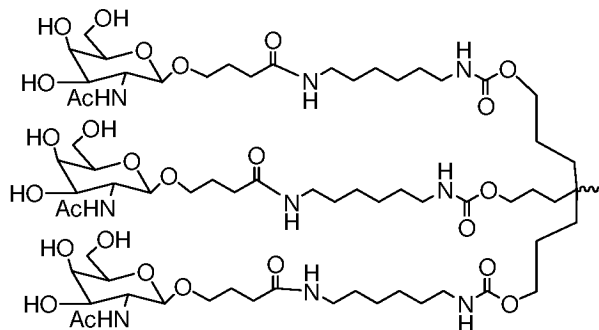
формула X,



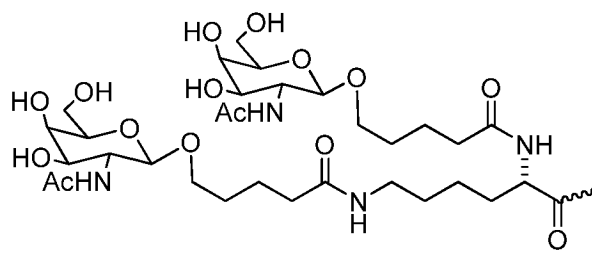
формула XI,



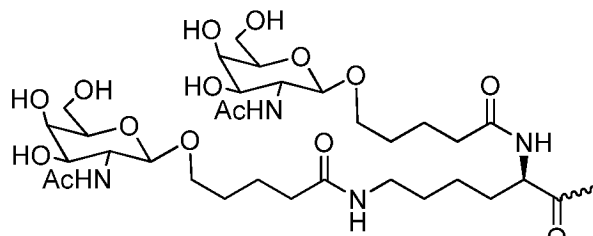
Формула XII,



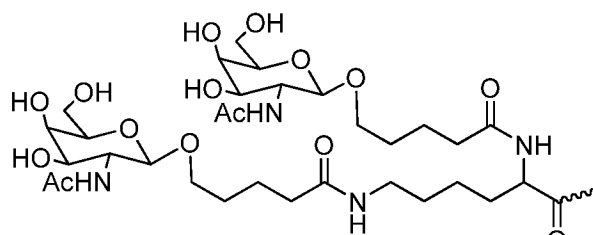
Формула XIII,



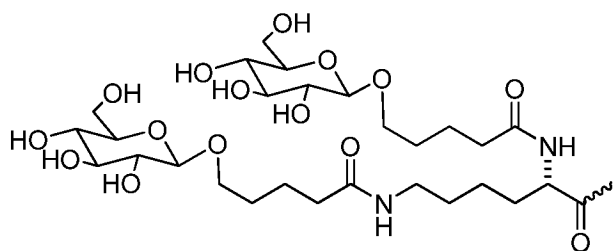
Формула XIV,



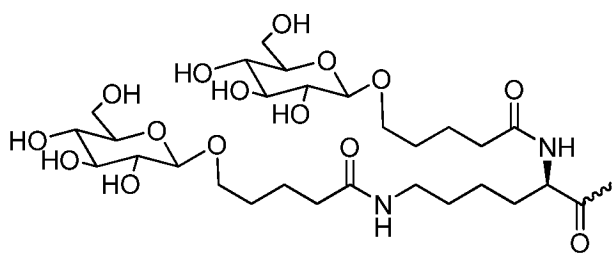
Формула XV,



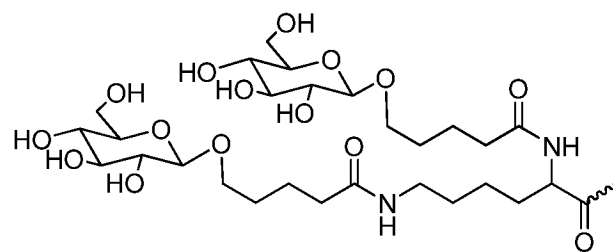
Формула XVI,



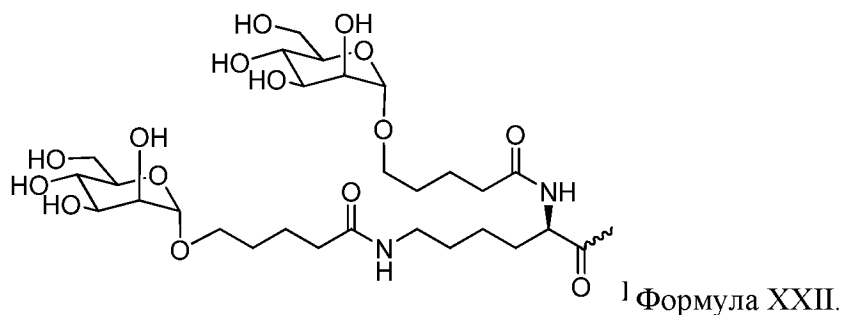
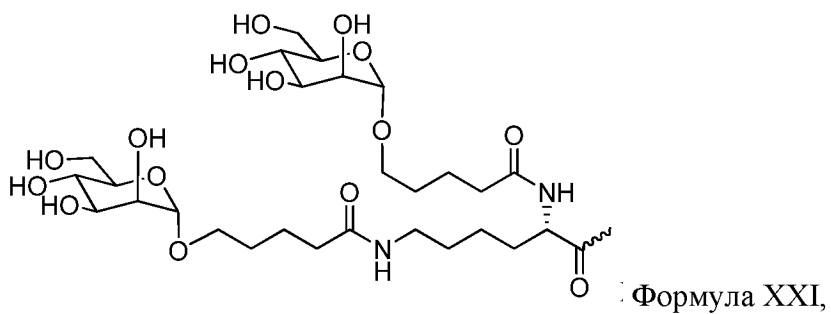
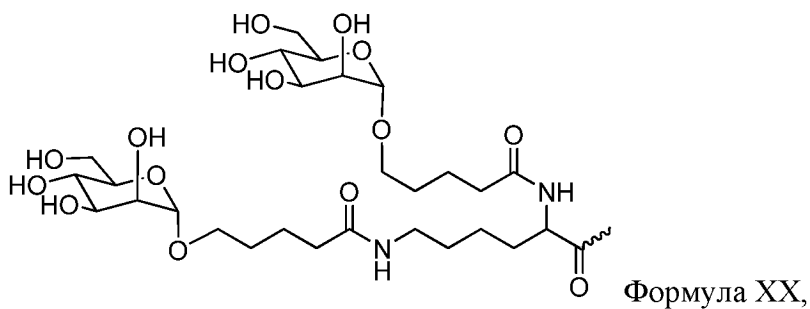
Формула XVII,



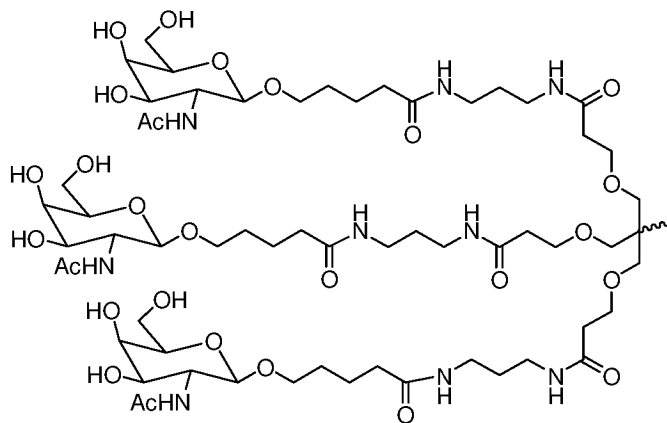
I Формула XVIII,



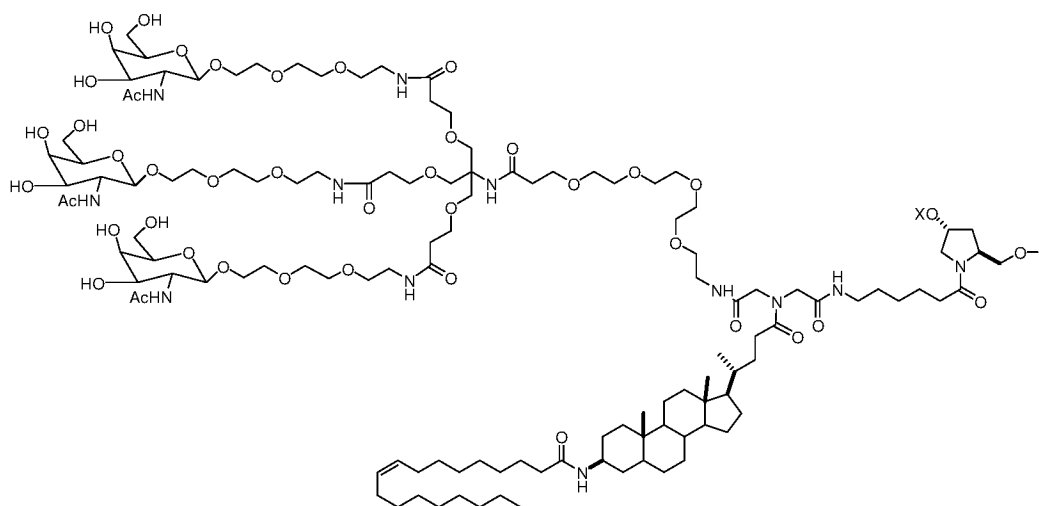
Формула XIX,



В одном варианте осуществления, моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как



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



(Формула XXIII), где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, GalNAc или GalNAc производное присоединено к РНКи агенту настоящего изобретения через моновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или GalNAc производное присоединено к РНКи агенту настоящего изобретения через двухвалентный линкер. В еще других вариантах осуществления настоящего изобретения, GalNAc или GalNAc производное присоединено к РНКи агенту настоящего изобретения через трехвалентный линкер.

В одном варианте осуществления, двухцепочечные РНКи агенты настоящего изобретения содержат одно GalNAc или GalNAc производное, присоединенное к РНКи агенту. В другом варианте осуществления, двухцепочечные РНКи агенты настоящего изобретения содержат несколько (например, 2, 3, 4, 5, или 6) GalNAc или GalNAc производных, причем каждый независимо присоединен к нескольким нуклеотидам двухцепочечного РНКи агента через несколько моновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления например, когда две цепи РНКи агента настоящего изобретения являются частью одной большей молекулы, соединенные непрерывающейся цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих петлю шпильки, содержащую несколько неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо содержать GalNAc или GalNAc производное, присоединенное через моновалентный линкер. Петлю шпильки можно также получить удлинённым «липким концом» в одной цепи дуплекса.

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат дополнительно содержит один или более дополнительных лигандов, как описано выше, таких как, но не ограничиваясь, РК модулятор или пептид, способствующий проникновению в клетку.

Дополнительные углеводные конъюгаты, пригодные для применения в настоящем изобретении, включают конъюгаты, описанные в WO 2014179620 и WO 2014179627, полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

4. Линкеры

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанные в настоящем изобретении, можно присоединять к РНК-и олигонуклеотиду через различные линкеры, которые могут быть отщепляемыми или неотщепляемыми.

Термин "линкер" или "линкерная группа" обозначает органическую молекулу, которая соединяет две части соединения, например, ковалентно соединяет две части соединения. Линкеры обычно включают простую связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, или цепь атомов, такую как, но не ограничиваясь, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкинилариалалкил, алкинилариалалкенил, алкинилариалалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкинилариал, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, где один или более метиленов можно прерывать или обрывать O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), замещенным или незамещенным арилом, замещенным или незамещенным гетероарилом, замещенным или незамещенным гетероциклилом; где R₈ представляет собой водород, ацил, алифатический фрагмент или замещенный алифатический фрагмент. В одном варианте осуществления, линкер состоит из приблизительно 1–24 атомов, 2–24, 3–24, 4–24, 5–24, 6–24, 6–18, 7–18, 8–18 атомов, 7–17, 8–17, 6–16, 7–16 или 8–16 атомов.

Отщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая в значительной степени стабильна вне клетки, но которая после проникновения в клетку отщепляется, высвобождая две части, которые соединял вместе линкер. В предпочтительном варианте осуществления, отщепляемая линкерная группа отщепляется, по меньшей мере, приблизительно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или более, или по меньшей мере приблизительно в 100 раз быстрее в клетке-мишени или при первых исходных условиях (которые можно, например, выбрать так, чтобы они имитировали или представляли внутриклеточные условия), чем в крови пациента, или при вторых исходных условиях (которые можно, например, выбрать так, чтобы они имитировали или представляли условия, обнаруживаемые в крови или сыворотке).

Отщепляемые линкерные группы подвержены расщеплению агентами, например,

pH, окислительно–восстановительным потенциалом или наличием разрушающих молекул. Обычно расщепляющие агенты расщепления более распространены или обнаруживаются при более высоких уровнях или активностях внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры данных расщепляющих агентов включают: окислительно–восстановительные агенты, которые выбирают для конкретных субстратов или которые не имеют субстратной специфичности, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстанавливающие агенты, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать редокс отщепляемую линкерную группу восстановлением; эстеразы; эндосомы или агенты, которые могут создавать кислую среду, например, те, которые приводят к pH пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать отщепляемую кислотой линкерную группу, действуя как обычная кислота, пептидазы (которые могут быть специфичными для субстрата) и фосфатазы.

Отщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть подвержена pH. pH сыворотки человека составляет 7,4, тогда как средняя внутриклеточная pH является слегка меньшей в диапазоне приблизительно 7,1–7,3. Эндосомы имеют более кислый pH в диапазоне 5,5–6,0, и лизосомы имеют даже более кислый pH в районе 5,0. Некоторые линкеры будут содержать отщепляемую линкерную группу, которая отщепляется при предпочтительном pH, посредством этого высвобождая катионный липид от лиганда внутри клетки, или в требуемом компартменте клетки.

Линкер может включать отщепляемую линкерную группу, которая отщепляется конкретным ферментом. Тип отщепляемой линкерной группы, введенной в линкер, может зависеть от клетки, в которую осуществляют направленную доставку. например, лиганд, осуществляющий направленную доставку в печень, можно присоединять к катионному липиду через линкер, который содержит эфирную группу. Клетки печени являются богатыми эстеразами и, следовательно, линкер будет отщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты эстеразами. Другие типы клеток, богатые эстеразами, включают клетки легких, коры почки и семенника.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно применять, когда типы клеток–мишеней богаты пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

В общем, пригодность отщепляемой линкерной группы, являющейся кандидатом, можно оценить путем проверки способности отщепляющего агента (или условий) расщеплять линкерную группу, являющуюся кандидатом. Также будет желательно проверить отщепляемую линкерную группу, являющуюся кандидатом, на способность противостоять расщеплению в крови или при контакте с другими тканями, не являющимися мишенями. Таким образом, можно определить относительную восприимчивость к расщеплению между первым и вторым условиями, где первое выбрано, чтобы показать расщепление в клетке–мишени, а второе выбрано, чтобы показать расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке. Оценки можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре

клеток, в культуре органов или тканей или в интактных животных. Может быть полезным провести первоначальные оценки в бесклеточных или культуральных условиях и подтвердить дальнейшими оценками на интактных животных. В предпочтительном варианте осуществления, пригодные 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 сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

а. редокс отщепляемые линкерные группы

В одном варианте осуществления, отщепляемая линкерная группа представляет собой редокс отщепляемую линкерную группу, которая отщепляется при восстановлении или окислении. Пример восстановительно отщепляемой линкерной группы представляет собой дисульфидную линкерную группу ($-S-S-$). Для определения того, является ли отщепляемая линкерная группа, являющаяся кандидатом, пригодной “восстановительно отщепляемой линкерной группой” или, например, пригодной для применения с конкретным РНКи фрагментом и конкретным агентом, осуществляющим направленную доставку, можно посмотреть способы, описанные в настоящем изобретении. например, кандидат можно оценить инкубацией с дитиотрейтолом (DTT) или другим восстанавливающим агентом, применяя реагенты, известные в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, которая будет наблюдаться в клетке, например, в клетке-мишени. Кандидаты также можно оценить в условиях, выбранных для имитации условий крови или сыворотки. В одном случае, соединения, являющиеся кандидатами, расщепляются не более чем на 10% в крови. В других вариантах осуществления пригодные соединения, являющиеся кандидатами, расщепляются, по меньшей мере, приблизительно 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, являющихся кандидатами, можно определить, применяя стандартные анализы кинетики фермента в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и по сравнению с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

б. Фосфатные отщепляемые линкерные группы

В другом варианте осуществления, отщепляемый линкер включает фосфатную отщепляемую линкерную группу. Фосфатную отщепляемую линкерную группу отщепляют агентами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Пример агента, который расщепляет фосфатные группы в клетках, представляет собой ферменты, такие как фосфатазы в клетках. Примеры фосфатных линкерных групп представляют собой $-O-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(SR_k)-O-$, $-S-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(OR_k)-S-$, $-S-P(O)(OR_k)-S-$, $-O-P(S)(OR_k)-S-$, $-S-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(R_k)-O-$, $-O-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-O-$, $-S-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-S-$, $-O-P(S)(R_k)-S-$.

Предпочтительные варианты осуществления представляют собой $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$, $-O-P(S)(H)-S-$. Предпочтительный вариант осуществления представляет собой $-O-P(O)(OH)-O-$. Данные кандидаты можно оценить, применяя способы, аналогичные способам, описанным выше.

с. Отщепляемые кислотой линкерные группы

В другом варианте осуществления, отщепляемый линкер включает отщепляемую кислотой линкерную группу. Отщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая отщепляется в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления отщепляемые кислотой линкерные группы отщепляются в кислом окружении при pH приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже), или агентами, такими как ферменты, которые действуют как обычная кислота. В клетке, специфические органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать условия для отщепления отщепляемых кислотой линкерных групп. Примеры отщепляемых кислотой линкерных групп включают, но не ограничиваются, гидразоны, эфиры и эфиры аминокислот. Отщепляемые кислотой группы могут иметь общую формулу $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)-$. Предпочтительный вариант осуществления представляет собой, когда углерод, присоединенный к кислороду эфира (алкокси группа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Данные кандидаты можно оценить, применяя способы, аналогичные способам, описанным выше.

d. Эфирные линкерные группы

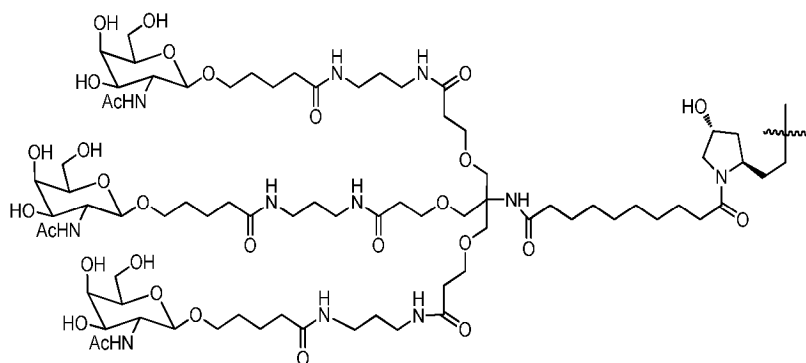
В другом варианте осуществления, отщепляемый линкер включает эфирную отщепляемую линкерную группу. Эфирная отщепляемая линкерная группа отщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы в клетках. Примеры эфирных отщепляемых линкерных групп включают, но не ограничиваются, эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Эфирные отщепляемые линкерные группы имеют общую формулу $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Данные кандидаты можно оценить, применяя способы, аналогичные способам, описанным выше.

e. Пептидные отщепляющиеся группы

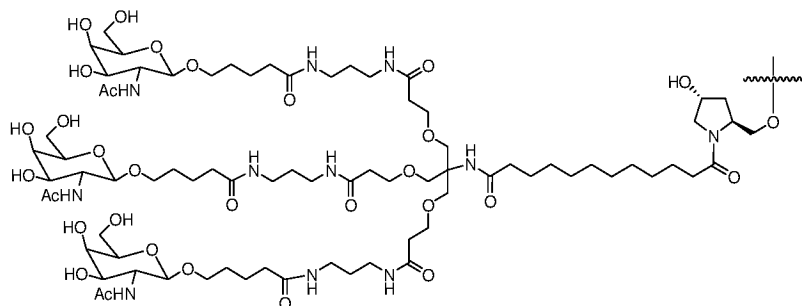
В еще другом варианте осуществления, отщепляемый линкер включает пептидную отщепляемую линкерную группу. Пептидная отщепляемая линкерная группа отщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Пептидные отщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами, давая олигопептиды (например, дипептиды, трипептиды и т.д.) и полипептиды. Пептидные отщепляемые группы не содержат амидной группы ($-C(O)NH-$). Амидная группа может образовываться между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой специфический тип амидной связи,

образованной между аминокислотами, давая пептиды и белки. Пептидные отщепляемые группы обычно ограничены пептидной связью (*m.e.*, амидной связью), образованной между аминокислотами, давая пептиды и белки, и не включает все амидные функциональные группы. Пептидные отщепляемые линкерные группы имеют общую формулу – $\text{NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-}$, где RA и RB представляют собой группы R двух соседних аминокислот. Данные кандидаты можно оценить, применяя способы, аналогичные способам, описанным выше.

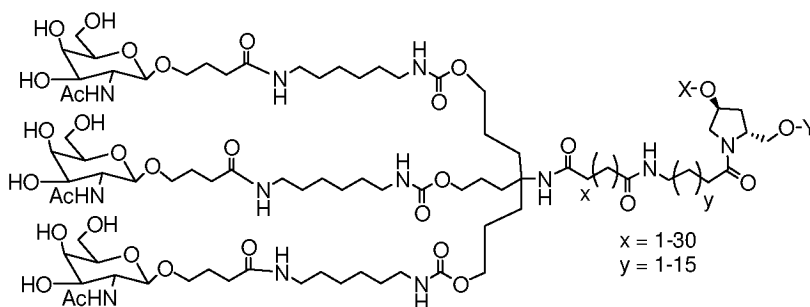
В одном варианте осуществления, РНКи настоящего изобретения конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры РНКи–углеводных конъюгатов с линкерами композиций и способов настоящего изобретения включают, но не ограничиваются,



(Формула XXIV),



(Формула XXV),



(Формула XXVI),

[illegible][illegible]

$x = 1-30$
 $y = 1-15$
 $z = 1-20$

(Формула XXX) и

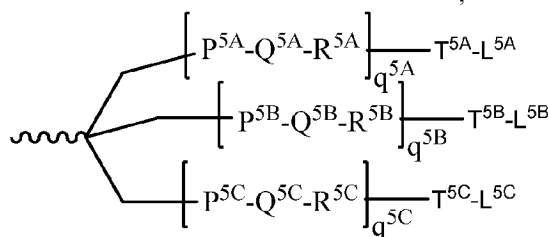
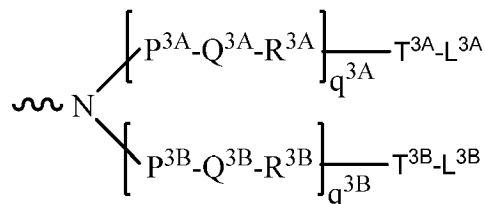
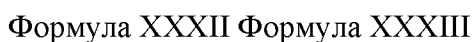


(Формула XXXI),

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

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов настоящего изобретения, лиганд представляет собой один или более “GalNAc” (N-ацетилгалактозамин) производных, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления, дцРНК настоящего изобретения конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных любой из формул (XXXII)–(XXXV):



Формула XXXIV Формула XXXV

где:

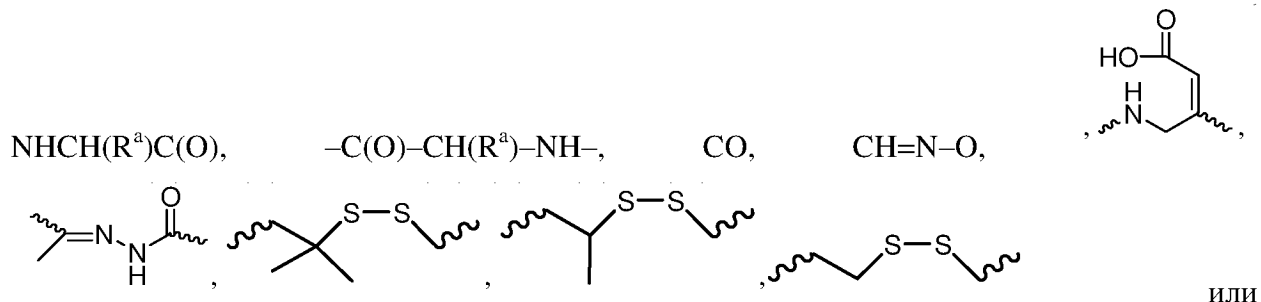
q2A, q2B, q3A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B и q5C представляют собой независимо для каждого появления 0–20, и где повторяющееся звено может быть одинаковым или отличным;

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

$Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C}$ независимо для каждого появления

является отсутствующим, представляет собой алкилен, замещенный алкилен, где один или более метиленов можно прерывать или заканчивать одним или более из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

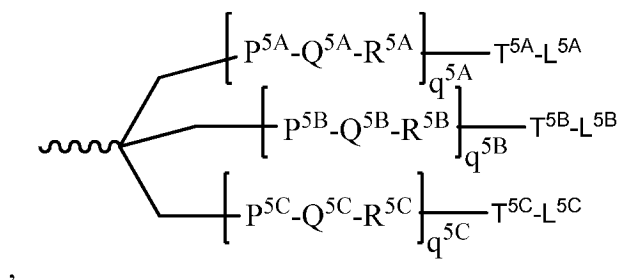
Каждый R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C} независимо для каждого появления является отсутствующим, представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH,



гетероцикл;

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

Формула XXXV



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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих GalNAc производных, включают, но не ограничиваются, структуры, перечисленные выше как формулы II, VII, XI, X и XIII.

Репрезентативные патенты США, которые описывают получение РНК конъюгатов, включают, но не ограничиваются, патенты США № 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241 5391723; 5416203 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928 и 5688941;

6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; 8106022, полное содержание каждого из которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Необязательно для каждого положения в указанном соединении быть однородно модифицированным, и в действительности более одной из приведенных выше модификаций можно вводить в одно соединение или даже в один нуклеозид в РНКи. Настоящее изобретение также включает РНКи соединения, которые представляют собой химерные соединения.

“Химерные” РНКи соединения или “химеры” в контексте настоящего изобретения представляют собой РНКи соединения, предпочтительно дцРНК, которые содержат два или более химически отличных области, причем каждая получена, по меньшей мере, из одного мономерного блока, *т.е.*, нуклеотида в случае дцРНК соединения. Данные РНКи обычно содержат, по меньшей мере, одну область, где РНК модифицирована таким образом, чтобы придать РНКи повышенную устойчивость к деградации нуклеазами, улучшенное клеточное поглощение или повышенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительный участок РНКи может служить субстратом для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы H представляют собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет РНК цепь РНК:ДНК дуплекса. Активация РНКазы H, следовательно, приводит в результате к расщеплению РНК мишени, посредством этого значительно увеличивая эффективность ингибирования РНКи генной экспрессии. Следовательно, сопоставимые результаты часто можно получить с более короткими РНКи, когда используют химерные дцРНК, по сравнению с фосфоротиоатными дезокси-дцРНК, гибридизующимися с той же целевой областью. Расщепление мишени РНК можно обычно обнаруживать гель-электрофорезом и, при необходимости, способами, связанными с гибридизацией нуклеиновых кислот, известными в данной области техники.

В некоторых случаях, РНК РНКи можно модифицировать группой, отличной от лиганда. Ряд молекул, отличных от лигандов, конъюгируют с РНКи для того, чтобы увеличить активность, клеточное распределение или поглощение клетками РНКи, и способы получения данных конъюгатов есть в специальной литературе. Данные молекулы, отличные от лигандов, включают липидные молекулы, такие как холестерин (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54–61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевую кислоту (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), тиоэфир, например, гексил-S-тритилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, додекандиольный или ундецильный остатки (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-гас-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-O-гексадецил-гас-глицеро-3-H-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), полиамин или полиэтиленгликольную

цепь (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитильный фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) или откадещильный или гексиламинокарбонилноксистеринный фрагмент (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Репрезентативные патенты США, которые описывают получение данных РНК конъюгатов, перечислены выше. Стандартные протоколы получения конъюгатов включают получение РНК, несущих аминокислоты в одном или более положениях последовательности. Затем, аминокислота реагирует с молекулой, которую будут конъюгировать, применяя подходящие конденсирующие или активирующие агенты. Реакцию конъюгирования можно проводить или с РНК, все еще привязанной к твердой подложке, или после отщепления RNA, в жидкой фазе. Очистка РНК конъюгата ВЭЖХ обычно дает чистый конъюгат.

iii. Доставка РНКи настоящего изобретения

Доставку РНКи настоящего изобретения в клетку, например, клетку в пациенте, таком как пациент, являющийся человеком, зараженным ВГВ, можно осуществлять рядом различных путей. Доставку можно также осуществлять непосредственно введением композиции, содержащей РНКи, например, дцРНК, пациенту. Альтернативно, *in vivo* доставку можно осуществлять непосредственно введением одного или более векторов, которые кодируют и направляют экспрессию РНКи. Данные альтернативы обсуждаются дополнительно ниже.

В общем, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) можно приспособлять для применения с РНКи настоящего изобретения (смотри, например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139–144 и WO9402595, которая включена в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте). Для доставки *in vivo*, факторы, которые надо принимать во внимание для того, чтобы доставлять молекулу РНКи, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предотвращение неспецифических эффектов, и накопление доставляемой молекулы в ткани-мишени. Для введения РНКи систематически для лечения заболевания, РНК можно модифицировать или альтернативно доставлять, применяя систему доставки лекарственного средства; оба способа действуют, предотвращая быстрое разрушение дцРНК эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель могут также обеспечить направленную доставку РНКи композиции в ткань-мишень и избегание нежелательных побочных эффектов. РНКи молекулы можно модифицировать химическим конъюгированием с липофильными группами, такими как холестерин, улучшая поглощение клетками и предотвращая разрушение. В альтернативном варианте осуществления, РНКи можно доставлять, применяя системы доставки лекарственного средства, такие как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки облегчают связывание РНКи молекулы (отрицательно заряженной) и также усиливают взаимодействие с отрицательно заряженной клеточной

мембраной, обеспечивая эффективное поглощение РНКи клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры можно соединять с РНКи, или образовывать везикулы или мицеллы (смотри, например, Kim SH., et al (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107–116), которые заключают в оболочку РНКи. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает разрушение РНКи при введении систематически. Способы получения и введения катионных–РНКи комплексов находятся в пределах способностей специалиста в данной области техники (смотри, например, Sorensen, DR., et al (2003) *J. Mol. Biol* 327:761–766; Verma, UN., et al (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291–1300; Arnold, AS et al (2007) *J. Hypertens.* 25:197–205, которые включены в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственного средства, пригодных для системной доставки РНКи, включают DOTAP (Sorensen, DR., et al (2003), выше; Verma, UN., et al (2003), *выше*), олигофектамин, "твердые липидные частицы нуклеиновых кислот" (Zimmermann, TS., et al (2006) *Nature* 441:111–114), кардиолипид (Chien, PY., et al (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321–328; Pal, A., et al (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087–1091), полиэтиленмин (Bonnet ME., et al (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), Arg–Gly–Asp (RGD) пептиды (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472–487) и полиамидоамины (Tomalia, DA., et al (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61–67; Yoo, H., et al (1999) *Pharm. Res.* 16:1799–1804). В некоторых вариантах осуществления РНКи образует дуплекс с циклодекстрином для системного введения. Способ введения и фармацевтические композиции РНКи и циклодекстрины можно найти в патенте США № 7427605, который включен в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления РНКи агенты можно вводить с амфипатическими пептидами, облегчая pH–зависимый выход из эндосом (смотри, например, Bartz et al., 2011. *Biochem. J.* 435:475–87, включенная в настоящее изобретение с помощью ссылки)

1. Вектор, кодирующий РНКи, для применения в настоящем изобретении

РНКи, направленную на ВГВ ген, можно экспрессировать транскрипционными элементами, встроенными в ДНК или РНК векторы (смотри, например, Couture, A, et al., *TIG.* (1996), 12:5–10; Skillern, A., et al., WO 00/22113, WO 00/22114, и патент США № 6,054,299). Примеры экспрессионных векторов для экспрессии кшРНК, направленной на ВГВ, приведены в Michler et al., 2016, которая обсуждает 8 адено–ассоциированных вирусных (AAV) векторов для доставки, включающие (i) встраивание кшРНК в искусственную ми(кро)РНК под контролем печени–специфичного промотора; (ii) совместную экспрессию с Argonaute–2, ограничивающим скорость клеточным фактором, чье насыщение избытком РНКи иницирующих факторов может быть токсичным; или (iii) совместную доставку ловушки ("TuD"), направленной на кшРНК смысловую цепь, сдерживая нецелевую генную регуляцию. Плазмиды, экспрессирующие кшРНК shHBV4–7, которые применяли в исследованиях на клеточной культуре, клонировали прямым включением соответствующих кшРНК–кодирующих олигонуклеотидов в самокомплементарную AAV векторную плазмиду, ранее сообщаемую Grimm et al, 2006

(Nature 441: 537–541), содержащую H1 промотор с последующими двумя BbsI сайтами для встраивания олигонуклеотидов, а также RSV промотор. Данные конструкторы можно также применять для экспрессии антигенов вакцины, если они имеют подходящий размер для экспрессионного вектора.

Экспрессия может быть кратковременной (порядка дней или недель) или длительной (от недель до месяцев или дольше), в зависимости от конкретной применяемой конструкции и типа ткани–мишени или клетки. Эти трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансген также можно сконструировать так, чтобы позволить ему наследоваться как внехромосомная плазида (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292).

Отдельная цепь или цепи РНК можно транскрибировать с промотора в экспрессионном векторе. Когда две отдельные цепи предполагается экспрессировать для генерирования, например, дцРНК, два отдельных экспрессионных вектора можно вводить совместно (например, трансфекцией или заражением) в клетку–мишень. Альтернативно, каждую отдельную цепь дцРНК можно транскрибировать промоторами, оба из которых находятся в одной экспрессионной плазмиде. В одном варианте осуществления, дцРНК экспрессируют в виде обращенных повторяющихся полинуклеотидов, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью так, что дцРНК имеет структуру петли и стебля.

РНК экспрессионные векторы обычно представляют собой ДНК плазмиды или вирусные векторы. Экспрессионные векторы, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно векторы, совместимые с клетками позвоночных, можно применять для получения рекомбинантных конструкторов для экспрессии РНК, как описано в настоящем изобретении. Экспрессионные векторы для эукариотических клеток являются хорошо известными в данной области техники и являются доступными из ряда коммерческих источников. Обычно, обеспечивают данные векторы, содержащие стандартные сайты рестрикции для вставки требуемых фрагментов нуклеиновых кислот. Доставка РНК–экспрессирующих векторов может быть системной, такой как подкожным, внутривенным или внутримышечным введением. Данные векторы можно также применять для экспрессии вирусных антигенов из вакцин на основе нуклеиновых кислоты.

Вирусные векторные системы, которые можно применять со способами и композициями, описанными в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, включая, но не ограничиваясь, лентивирусные векторы, векторы на основе вируса мышинного лейкоза Молони и т.д.; (c) адено–ассоциированные вирусные векторы; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) SV 40 векторы; (f) векторы вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикарновируса; (i) векторы на основе поксвируса, такого как ортопоксвирус, например, векторы на основе вируса осповакцины, включая векторы на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара, или авипокс,

например, оспа канареек или оспа птиц; и (j) хелпер–зависимый или «выпотрошенный» аденовирус. Вирусы с дефектами репликации могут также быть предпочтительными. Различные векторы будут или не будут встраиваться в геном клетки. Конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции, при необходимости. Альтернативно, конструкцию можно вводить в векторы, способные к эписомальной репликации, например EPV и EBV векторы. Конструкты для рекомбинантной экспрессии РНКи или антигена ВГВ будут обычно требовать регуляторных элементов, например, промоторов, энхансеров, и т.д., обеспечивающих экспрессию РНКи в клетках–мишенях. Другие аспекты для рассмотрения векторов и конструктов дополнительно описаны ниже.

Данные конструкты и векторы можно также применять для экспрессии антигенов вакцины, если они имеют подходящие размеры для экспрессионного вектора. Данные ограничения являются понятными специалисту в данной области техники.

В. Терапевтические ВГВ вакцины для применения в способах настоящего изобретения

Терапевтические ВГВ вакцины для применения в режимах и способах настоящего изобретения могут представлять собой пептидную вакцину, ДНК вакцину, включая векторную вакцину или клеточную вакцину, которая вызывает иммунный ответ, предпочтительно ответ, вызванный эффекторными Т–клетками, против одного или более белков ВГВ. Предпочтительно, вакцина представляет собой мультиэпитопную вакцину, которая является кроссреактивной с несколькими ВГВ серотипами, предпочтительно всеми ВГВ серотипами.

Терапевтическую вакцину разрабатывают для активации иммунной системы пациента для узнавания и борьбы или устранения уже имеющейся инфекции патогеном. Это явно отличается от профилактической вакцинации, которая разработана для стимулирования быстрой нейтрализации, опосредованной антителами, инвазивного патогена. Контроль и устранение персистирующих вирусов, таких как вирусы гепатита, герпеса или папилломы, требуют мульти–специфических и полифункциональных эффекторных Т–клеточных ответов. Данные Т–клеточные ответы идеально направлены против постоянно экспрессируемых вирусных антигенов, чтобы контролировать патоген. Терапевтические вакцины находятся на стадии разработки для ряда хронических инфекций. Инфекция вирусом гепатита В представляет собой кандидат для лечения вакцинотерапией, поскольку самопроизвольное, иммуноопосредованное восстановление хронического гепатита В и элиминацию вируса наблюдают в очень редких случаях.

Надежные Т–клеточные ответы, по–видимому, необходимы для достижения излечения ВГВ. В то время как ВГВ–специфичные CD4+ и CD8+ Т–клеточные ответы легко выявляются у пациентов с прекращающейся инфекцией ВГВ, ВГВ–специфические Т–клетки дефицитны и функционально нарушены при хроническом гепатите В, скорее всего, из–за высоких количеств циркулирующих вирусных HBeAg и HBsAg. Т–клетки устраняют ВГВ–инфицированные клетки благодаря своей цитотоксической активности, но также контролируют ВГВ–генную экспрессию и репликацию нецитолитическим

способом.

Для преодоления иммунной толерантности при хроническом гепатите В различные подходы исследуются в предклинических моделях, применяя ДНК или пептидные вакцины, или векторные или клеточные вакцины, стимулирующие ответ эффекторных Т-клеток. Разрабатываются кандидаты на мультиэпитопные терапевтические вакцины, которые покрывают существенно различающиеся ВГВ генотипы и наиболее частые типы HLA. Хотя было продемонстрировано правильное представление пептида, иммуногенность была ограничена, и подход не был переведен в клинику. Неполный список приведен в таблице ниже. Таблица терапевтических вакцин против ВГВ

<u>Назва ние вакци ны</u>	<u>белки/ кодирующ ие последоват ельности</u>	<u>Тип вакцины /композиция</u>	<u>Доступн ые результаты</u>	<u>спонсор</u>	<u>Стади я разраб отки</u>	<u>Ссыл ка на клини чески е испыт ания №</u>	<u>ссылк и (полно е содерж ание котор ых включ ено в настоя щее изобре тение с помощ ью ссылк и)</u>
<u>HB- 110</u>	<u>HBsAg, HBcAg, человеческ ий PL-12</u>	<u>3 плазмидная ДНК вакцина</u>	<u>Исследов ание завершен о,</u>	<u>Genexine</u>	<u>фаза I</u>	<u>NCT0 18134 87</u>	<u>Kim et al., 2008. Exp</u>

			<u>результат</u> <u>ы не</u> <u>сообщал</u> <u>ись</u>			<u>NCT0</u> <u>16415</u> <u>36</u> <u>NCT0</u> <u>05139</u> <u>68</u>	<u>Mol</u> <u>Med.</u> <u>40:</u> <u>669–</u> <u>676</u>
<u>HB–</u> <u>100</u>	<u>pGX10 S</u> <u>+pGX10</u> <u>S1/S2/X</u> <u>+pGX10</u> <u>core</u> <u>+pGX10</u> <u>Pol</u> <u>+pGX10</u> <u>hIL–</u> <u>12N222L</u>	<u>5 Плазмидная</u> <u>ДНК вакцина</u> <u>– 4</u> <u>антигены+че</u> <u>ловеческий</u> <u>IL–12</u>					<u>Yang et</u> <u>al.,</u> <u>2006.</u> <u>Gene</u> <u>Therap</u> <u>y.</u> <u>13:111</u> <u>0–1117</u>
<u>ppdpS</u> <u>C18</u>		<u>ДНК</u> <u>вакцина,</u> <u>дополненная</u> <u>эпидермальн</u> <u>ой доставкой,</u> <u>опосредованн</u> <u>ой частицами</u>	<u>Исследов</u> <u>ание</u> <u>завершен</u> <u>о,</u> <u>результат</u> <u>ы не</u> <u>сообщал</u> <u>ись</u>	<u>PowderM</u> <u>ed</u>	<u>фаза I</u>	<u>NCT0</u> <u>02775</u> <u>76</u>	
<u>INO–</u> <u>1800</u>	<u>HbsAg,</u> <u>HBcAg</u>	<u>ДНК</u> <u>плазмида</u>	<u>рекрутин</u> <u>г</u>	<u>Inovio</u> <u>Pharmace</u>	<u>фаза I</u>	<u>NCT0</u> <u>24313</u>	

				<u>uticals</u>		<u>12</u>	
<u>HB02</u> <u>VAC-</u> <u>ADN</u>	<u>HB preS/S</u>	<u>pCMV-S2.S</u> <u>ДНК</u> <u>вакцина;</u> <u>CMV</u> <u>промотор;</u> <u>плазмидный</u> <u>вектор</u>	<u>Хорошо</u> <u>переноси</u> <u>тся;</u> <u>нет</u> <u>изменени</u> <u>й</u> <u>в</u> <u>частоте</u> <u>рецидиво</u> <u>в</u> <u>у</u> <u>обработка</u> <u>нных</u> <u>пациенто</u> <u>в с ВГВ</u> <u>или</u> <u>снижени</u> <u>я</u> <u>возраста</u> <u>ние</u> <u>уровня</u> <u>вирусеми</u> <u>и</u>	<u>ANRS</u>	<u>Phase</u> <u>I/II</u>	<u>NCT0</u> <u>05366</u> <u>27</u>	<u>Mancin</u> <u>i</u> <u>-</u> <u>Bourgi</u> <u>ne</u> <u>et</u> <u>al.,</u> <u>2006.</u> <u>Вакцин</u> <u>a</u> <u>24:448</u> <u>2-4489</u>
<u>CVI-</u> <u>ВГВ-</u> <u>002</u>	<u>HbsAg</u>	<u>DNA+ L-</u> <u>rampro</u>	<u>Рекрутин</u> <u>г</u>	<u>CHA</u> <u>Vaccine</u> <u>Institute</u> <u>Co., Ltd.</u>	<u>фаза</u> <u>I/II</u>	<u>NCT0</u> <u>26936</u> <u>52</u>	
<u>Therav</u> <u>ax</u> <u>(DV-</u>	<u>HBsAg.</u> <u>HBcAg</u>	<u>белок+адъюв</u> <u>ант</u>	<u>Хорошо</u> <u>переноси</u> <u>тся;</u>	<u>Dynavax</u> <u>Technolo</u> <u>gies Corp.</u>	<u>фаза Ib</u>	<u>NCT0</u> <u>10232</u> <u>30</u>	

<u>601)</u>			<u>противовирусный</u> <u>ответ,</u> <u>наблюдае</u> <u>мый на</u> <u>всех</u> <u>пациента</u> <u>х</u>				
<u>НерТс</u> <u>ell™</u>		<u>пептид</u> с <u>добавлением</u> <u>адъюванта</u> <u>IC31®</u>	<u>Рекрутин</u> <u>г</u>	<u>Altimmun</u> <u>e, Inc.</u>	<u>фаза I</u>	<u>NCT0</u> <u>24968</u> <u>97</u>	<u>US</u> <u>201303</u> <u>30382</u> <u>US</u> <u>201202</u> <u>76138</u> <u>US</u> <u>201502</u> <u>16967</u>
<u>HBsA</u> <u>g/HBc</u> <u>Ag</u>	<u>HBsAg</u> <u>HBcAg</u>	<u>Белок</u>			<u>исслед</u> <u>ование</u>		<u>Li et</u> <u>al.,</u> <u>2015,</u> <u>Vaccin</u> <u>e.</u> <u>33:424</u> <u>7-4254</u>
<u>GS-</u>	<u>Белок</u> <u>слияния</u>	<u>белок+тамоге</u> <u>н, Т-</u>	<u>Исследов</u> <u>ания</u>	<u>Gilead</u>	<u>фаза II</u>	<u>NCT0</u> <u>19437</u>	<u>Gaggar</u> <u>et al.,</u>

<u>4774</u>	<u>HBsAg,</u> <u>HBcAg,</u> <u>HBxAg</u>	<u>клеточный</u> <u>стимулятор</u>	<u>фазы II</u> <u>группы</u> <u>без</u> <u>лечения</u> <u>продолж</u> <u>аются;</u> <u>нет</u> <u>существо</u> <u>нного</u> <u>снижени</u> <u>я вируса</u> <u>у</u> <u>пациенто</u> <u>в,</u> <u>подвергн</u> <u>утых</u> <u>лечению</u>			<u>99</u> <u>NCT0</u> <u>17795</u> <u>05</u> <u>NCT0</u> <u>21742</u> <u>76</u>	<u>2014.</u> <u>Vaccin</u> <u>e.</u> <u>32:492</u> <u>5–</u> <u>4931.</u>
<u>εРА–</u> <u>44</u>		<u>мультипепти</u> <u>дная вакцина</u>	<u>некотора</u> <u>я</u> <u>сероконв</u> <u>ерсия</u> <u>наблюда</u> <u>лась во</u> <u>всех</u> <u>группах,</u> <u>нет</u> <u>статисти</u> <u>ческого</u> <u>анализа</u>	<u>Chongqin</u> <u>g Jaichen</u> <u>Biotechno</u> <u>logy, Ltd.</u>	<u>Фаза II</u>	<u>NCT0</u> <u>08697</u> <u>78</u> <u>NCT0</u> <u>28621</u> <u>06</u>	
<u>ABX</u>	<u>HBsAg,</u>	<u>HBsAg,</u>	<u>продолж</u>	<u>ABIVAX</u>	<u>фаза</u>	<u>NCT0</u> <u>22499</u>	

<u>203</u>	<u>HBcAg</u>	<u>HBcAg</u>	<u>ается</u>	<u>S.A.</u>	<u>II/III</u>	<u>88</u>	
<u>pSG2.</u> <u>HBs/</u> <u>MVA.</u> <u>HBs</u>		<u>белок прайм–</u> <u>вирусный</u> <u>вектор буст</u>	<u>Хорошо</u> <u>переноси</u> <u>тся, но не</u> <u>контроли</u> <u>рует</u> <u>инфекци</u> <u>ю ВГВ</u>	<u>Oxxon</u> <u>Therapeut</u> <u>ics</u>	<u>фаза</u> <u>IIa</u>	<u>ISRCT</u> <u>N</u> <u>67270</u> <u>384</u>	<u>Cavena</u> <u>ugh et</u> <u>al.,</u> <u>2011.</u> <u>PLoS</u> <u>ONE 6:</u> <u>e14626.</u>
	<u>HBsAg.</u> <u>HBcAg</u>	<u>Белок прайм–</u> <u>вирусный</u> <u>вектор буст с</u> <u>адьювантом</u>			<u>исслед</u> <u>ование</u>		<u>Backes,</u> <u>2016,</u> <u>Vaccin</u> <u>e;</u> <u>WO201</u> <u>712179</u> <u>1</u>

Существующие профилактические вакцины используют для восстановления ВГВ–специфического иммунитета у хронически инфицированных пациентов, но они не могут обеспечить функциональное излечение. Данные вакцины на основе субвирусных частиц были способны снижать репликацию ВГВ в животных моделях хронической гепаднавиральной инфекции, но не были успешными на пациентах с хроническим гепатитом В. Иммуногенный комплекс антиген–антитело (HBsAg–HBIG), кандидат на терапевтическую вакцину, с квасцами в качестве адьюванта впервые показал многообещающие результаты в двойном слепом плацебо–контролируемом клиническом исследовании фазы IIb, но результаты клинического испытания фазы III, включающего 450 пациентов, были разочаровывающими. Скорее всего, это связано с тем, что вакцины на основе субвирусных частиц с адьювантами на основе квасцов разработаны в качестве профилактических вакцин и преимущественно индуцируют антитела, а не цитотоксические Т–клеточные ответы, которые потребуются для терапевтической эффективности.

Альтернативно, ДНК вакцины, кодирующие ВГВ оболочечные белки, разрабатывают для стимулирования ВГВ–специфических Т–клеток, но они также имеют ограниченный успех. Поскольку ДНК вакцины практически не вызывают гуморальный

ответ, им не удалось достичь сероконверсии HBeAg или HBsAg. Альтернативная ДНК прайм, поксвирус–буст вакцинация, включающая область preS/S ВГВ, кодирующую ВГВ оболочечные белки, показала многообещающие результаты на шимпанзе, но также потерпела неудачу в клиническом исследовании фазы IIa, не вызывая устойчивых Т–клеточных ответов и не снижая виремию у хронических носителей ВГВ. Возможно, она не может вызвать помощь Т–клеток или достаточно широкие, многоспецифичные иммунные ответы.

Любые вакцины, известные в данной области техники, можно применять в способах и режимах, относящихся к настоящему изобретению. Предпочтительные варианты осуществления включают прайм–буст схему вакцинации белковыми антигенами, вводимыми дважды, и вакцину на основе нуклеиновой кислоты, вводимую один раз, как представлено в примерах и представлено в публикации РСТ № WO 2017/121791 (полное содержание которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки). Как обсуждалось выше, последовательность белкового антигена в вакцине и аминокислотная последовательность, кодируемая вакциной на основе нуклеиновой кислоты, не должны быть идентичными. Они просто должны иметь, по меньшей мере один общий эпитоп, предпочтительно несколько эпитопов, так что последовательное введение вакцин имеет требуемый прайм–буст эффект. Кроме того, как обсуждалось в настоящем изобретении, в предпочтительных вариантах осуществления режим лечения, относящийся к настоящему изобретению, будет обеспечивать режим лечения, эффективный для нескольких, если не для всех, серотипов ВГВ. Следовательно, ясно, что антиген, полученный у пациента, может не содержать последовательности антигенов, идентичные антигенам, экспрессируемым ВГВ вирусом, который заражает пациента.

В данной области техники известно, что некоторые части антигенов ВГВ представляют собой основные мишени антител, генерируемых в процессе первичного иммунного ответа на инфекцию ВГВ, известные как детерминанты. например, HBsAg включает "a" детерминанту–эпитоп, который расположен по аминокислотам 124–147 в основной гидрофильной области (MHR, аминокислоты 100–169) 226 аминокислотного гена S (SEQ ID NO: 8 или 22). Данная "a" детерминанта представляет собой одну из основных мишеней анти–HBs антитела в процессе первичного иммунного ответа при остром гепатите В. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный фрагмент HBsAg содержит, по сравнению с белком полной длины, по меньшей мере, аминокислоты 99–168, соответствующие положениям аминокислот небольшого оболочечного белка (SEQ ID NO: 23) (смотри, например, Lada et al., J. Virol.(2006) 80:2968–2975, полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки).

Аналогично, детерминанты обнаружены в HBcAg (смотри, например, Salfeld et al., J. Virol. (1989) 63:798–808, полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки). Капсидный белок полной длины имеет 183 аминокислот в длину и состоит из домена сборки (аминокислоты 1–149) и домена, связывающего нуклеиновую кислоту (аминокислоты 150–183). Три отличных главных детерминанты

охарактеризованы. Одна конформационная детерминанта, ответственная за антигенность HBc в собранном ядре (HBc), и линейная детерминанта, связанная с HBe (HBe1), были обе сопоставлены с перекрывающейся гидрофильной последовательностью в районе аминокислоты 80; вторая HBe-детерминанту (HBe2) была отнесена к месту вблизи аминокислоты 138, но было обнаружено, что для ее антигенности требуется внутримолекулярное участие расширенной последовательности между аминокислотами 10 и 140. Обычно, такой иммуногенный фрагмент содержит, по сравнению с полноразмерным капсидным белком, по меньшей мере, аминокислоты с 18 по 143, соответствующие положениям последовательности, указанным в SEQ ID NO: 24. Аналогичные последовательности можно идентифицировать в SEQ ID NO: 10.

В предпочтительных вариантах осуществления вакцины включают аминокислотную последовательность или кодируют аминокислотную последовательность, которая содержит по меньшей мере одну детерминанту HBsAg или HBcAg. Конкретно, в некоторых вариантах осуществления вакцина, направленная на HBsAg, содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность аминокислот 127–147 HBsAg, например, содержит по меньшей мере аминокислоты 99–168 аминокислотной последовательности небольшого оболочечного белка (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления вакцина направлена на гидрофильную последовательность по меньшей мере в районе аминокислоты 80 HBcAg или аминокислотную последовательность по меньшей мере в районе аминокислоты 138, например, по меньшей мере, части из 40 аминокислот, по меньшей мере, части из 50 аминокислот, по меньшей мере, части из 60 аминокислот, по меньшей мере, части из 70 аминокислот, по меньшей мере, части из 80 аминокислот, по меньшей мере, части из 90 аминокислот, или по меньшей мере части из 100 аминокислот SEQ ID NO: 43, включающие аминокислоту 80 или аминокислоту 138, или их кодирующую последовательность. В предпочтительных вариантах осуществления антигенная аминокислотная последовательность антигена, направленного на HBcAg, включает по меньшей мере 20 аминокислот, N-концевых и C-концевых к аминокислоте 80 или 138 SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления вакцина, направленная на HBcAg, включает по меньшей мере аминокислотную последовательность аминокислот 10–140 или 18–143 HBsAg.

В некоторых вариантах осуществления вакцина может содержать всю аминокислотную последовательность или кодировать всю аминокислотную последовательность одной или более из SEQ ID NO: 22, 23 или 24.

Ясно, что существует несколько серотипов ВГВ с различными последовательностями нуклеиновых кислот, которые кодируют различные аминокислотные последовательности. Следовательно, ясно, что аминокислотная последовательность белковой вакцины или аминокислотная последовательность, кодируемая вакциной на основе нуклеиновой кислоты, может не быть на 100% идентичной последовательностям, представленным в SEQ ID NOs. В некоторых вариантах

осуществления настоящего изобретения, аминокислотная последовательность белковой вакцины или аминокислотная последовательность, кодируемая вакциной на основе нуклеиновой кислоты, является, по меньшей мере, на 90% идентичной, по меньшей мере, на 91% идентичной, по меньшей мере, на 92% идентичной, по меньшей мере, на 93% идентичной, по меньшей мере, на 94% идентичной, по меньшей мере, на 95% идентичной, по меньшей мере, на 96% идентичной, по меньшей мере, на 97% идентичной, или по меньшей мере на 98% идентичной части SEQ ID NO: 22, 23 или 24. Дополнительные примеры HBsAg и HBcAg аминокислотных последовательностей представлены в списке последовательностей. Способы выравнивания для обнаружения подходящих последовательностей, соответствующих HBsAg и HBcAg детерминантам в последовательностях, указанных выше, являются известными в данной области техники.

Вакцина предпочтительно содержит MVA вирусы в диапазоне концентраций 10^4 – 10^9 инфекционных доз для тканевой культуры (TCID)₅₀/мл, предпочтительно в диапазоне концентраций 10^5 – 5×10^8 TCID₅₀/мл, более предпочтительно в диапазоне концентраций 10^6 – 10^8 TCID₅₀/мл и самое предпочтительное в диапазоне концентраций 10^7 – 10^8 TCID₅₀/мл.

Предпочтительная доза вакцины для людей включает 10^6 – 10^9 TCID₅₀, самое предпочтительное дозу 10^6 TCID₅₀ или 10^7 TCID₅₀ или 10^8 TCID₅₀.

Предпочтительные способы согласно настоящему изобретению включают введение и белковой вакцины и вакцины на основе нуклеиновой кислоты. Однако другие способы включают введение только белковых антигенов. Менее предпочтительные варианты осуществления включают введение только нуклеиновых кислот, кодирующих антигены.

i. Адьюванты

Как используют в настоящем изобретении “адьювант” понимают как агент, который стимулирует (например, усиливает, ускоряет или продлевает) иммунный ответ на антиген, с которым его вводят для того, чтобы вызвать долгосрочный защитный иммунитет. Существенный иммунный ответ не направлен на сам адьювант. Адьюванты включают, но не ограничиваются, компоненты патогена, адьюванты в виде частиц и комбинированные адьюванты (смотри, например, www.niaid.nih.gov/research/vaccine-adjuvants-types). Компоненты патогенов (например, монофосфориллипид А (MPL), поли(I:C), CpG ДНК, эмульсии, такие как поли[ди(натрийкарбоксилатэтилфеноксифосфазен)] (РСЕР)) могут способствовать запуску раннего неспецифического или врожденного иммунных ответов на вакцины направленным воздействием на различные рецепторы внутри или на поверхности клеток врожденной иммунной системы. Данная врожденная иммунная система воздействует на адаптивные иммунные ответы, которые обеспечивают длительную защиту от патогена, на который направлена вакцина. Адьюванты в виде частиц (например, квасцы, виросомы, цитокины, например, IL-12) образуют очень небольшие частицы, которые могут стимулировать иммунную систему и также могут улучшать доставку антигена к

иммунным клеткам. Комбинированные адъюванты (например, AS02, AS03 и AS04 (GSK); MF59 (Novartis); и IC31® (Altimmune) вызывают множество защитных иммунных ответов. Адъюванты, которые обладают умеренным эффектом при применении отдельно, могут вызывать мощный иммунный ответ при применении совместно. В некоторых вариантах осуществления предпочтительные адъюванты включают к-ди-АМФ, к-ди-ГМФ, к-ди-ЦМФ, полиICLC, CpG, ISCOMATRIX®, AS02, AS03, AS04 или RIG-I лиганд, такой как 5' 3P-РНК. В некоторых вариантах осуществления вирусный капсид с или без нуклеиновой кислоты, экспрессирующей антиген ВГВ, можно применять в качестве адъюванта. например, вакцину, которая предпочтительно стимулирует Т-клетки, такую как MVA только или ДНК прайм, MVA буст или аденовирусный вектор прайм-MVA буст, можно применять в способах настоящего изобретения.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, адъюванты для применения в настоящем изобретении стимулируют гуморальный и клеточный иммунный ответ, как обсуждалось выше. В некоторых вариантах осуществления адъюванты обеспечивают сбалансированный Th1/Th2 ответ.

ii. Неадъювантные иммуностимуляторы и дополнительные агенты

Способы согласно настоящему изобретению могут дополнительно включать введение дополнительных агентов, применяемых в лечении ВГВ или стимулировании иммунного ответа. Данные агенты могут включать иммуностимулятор (например, пегилированный интерферон альфа 2а (ПЭГ-IFN- α 2а), интерферон альфа-2b, рекомбинантный человеческий интерлейкин-7, и агонист Toll-подобного рецептора 3, 7, 8 или 9 (TLR3, TLR7, TLR8, или TLR9)), ингибитор попадания вируса в клетку (например, мирклюдекс), олигонуклеотид, который ингибирует секрецию или высвобождение HBsAg (например, REP 9AC), ингибитор сборки капсида (например, Bay41-4109 и NVR-1221), цкзДНК ингибитор (например, IHVR-25), RIG-I-лиганд, STING агонист, иммунная терапия на основе антител против ВГВ (моно-, би-, или триспецифическое антитело против ВГВ) или регулятор иммунной контрольной точки. Данные агенты являются известными в данной области техники.

С. Нуклеотидные и нуклеозидные аналоги для применения в способах настоящего изобретения

Нуклеотидные и нуклеозидные аналоги считают стандартом для лечения инфекции ВГВ, поскольку они обычно считаются безопасными и недорогими. Однако нуклеотидные и нуклеозидные аналоги не могут излечить инфекцию ВГВ, могут вызывать развитие устойчивости, и должны приниматься неопределенный срок. Нуклеотидные аналоги и нуклеозидные аналоги включают, но не ограничиваются, дизопроксилфумарат тенофовира (TDF), алафенамид тенофовира, ламивудин, дипивоксиладефовир, энтекавир (ETV), телбивудин, AGX-1009, эмтрицитабин, клевудин, ритонавир, дипивоксил, лобукавир, фамвир, FTC, N-Ацетилцистеин (NAC), PC1323, терадигм-ВГВ, тимозин-альфа, ганцикловир, бесифовир (ANA-380/LB-80380) и тенофовир-эксалидекс (TXL/CMX157). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный (нуклеозидный)

аналог представляет собой энтекавир (ETV) или тенофовир или их производное. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный (нуклеозидный) аналог не представляет собой ламивудин. Нуклеотидные (нуклеозидные) аналоги имеются в продаже в ряда источников, и их используют в способах, относящихся к настоящему изобретению согласно их указаниям на этикетке (например, обычно вводят перорально при конкретной дозе) или как определено практикующим врачом для лечения ВГВ.

III. Антисмысловые олигонуклеотиды, направленные на ВГВ

Настоящее изобретение включает применение РНКи, которые способствуют расщеплению, по меньшей мере, одного транскрипта ВГВ, и предпочтительно трех или четырех транскриптов ВГВ. Антисмысловые олигонуклеотиды можно аналогично применять для стимулирования расщепления, по меньшей мере, одного транскрипта ВГВ, предпочтительно трех или четырех транскриптов ВГВ, в способах настоящего изобретения, приведенных в настоящем изобретении. Примеры антисмысловых олигонуклеотидов, направленных на ВГВ, представлены, например, в патентных заявках США № 2013/0035366, 2012/0207709 и 2004/0127446, содержание каждой из которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте.

Специалисту в данной области техники ясно, что конъюгаты, линкеры и составы для доставки миРНК, как представлено выше, можно применять для формулирования и доставки терапевтических агентов на основе антисмысловых олигонуклеотидов пациентам.

IV. Фармацевтические композиции настоящего изобретения

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые содержат РНКи или вакцины для применения в настоящем изобретении. Ясно, что одобренные терапевтические агенты формулируют и вводят путем, указанным в их инструкциях на упаковке.

В некоторых вариантах осуществления обеспечивают фармацевтические композиции, содержащие РНКи или вакцину, как описано в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие РНКи или вакцину, являются пригодными для лечения пациентов с инфекцией ВГВ. Данные фармацевтические композиции формулируют, исходя из способа доставки, например, для системного введения парентеральной доставкой, например, подкожной (SC), внутримышечной (IM) или внутривенной (IV) доставкой.

Фармацевтические РНКи композиции для применения в настоящем изобретении можно вводить в дозах, достаточных для снижения уровня, по меньшей мере, одного транскрипта ВГВ. В общем, подходящая доза РНКи настоящего изобретения будет в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграмм на килограмм веса тела реципиента в день, обычно в диапазоне от приблизительно 1 до 50 мг на килограмм веса тела в день. Обычно, подходящая доза РНКи настоящего изобретения будет в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5,0 мг/кг, предпочтительно приблизительно 0,3 мг/кг и приблизительно 3,0 мг/кг. Режим с

повторением доз может включать введение терапевтического количества РНКи на регулярной основе, такой как каждую вторую неделю или один раз в год. В некоторых вариантах осуществления РНКи вводят от приблизительно одного раза в месяц до приблизительно одного раза в квартал (*m.e.*, приблизительно один раз каждые три месяца). В предпочтительных вариантах осуществления РНКи агент вводят подкожно.

Состав и дозировка вакцины будет зависеть от свойств вводимой вакцины. В стратегии с белковой прайм–экспрессионный вектор буст вакцинацией, белковые прайм вакцины вводят с интервалом приблизительно 2, 3 или 4 недели, причем буст вакцины с экспрессионным вектором вводят приблизительно через 2, 3 или 4 недели после второй дозы белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления есть приблизительно две недели между первой и второй дозами белковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления есть приблизительно две недели между второй дозой белковой вакцины и буст вакцины с ДНК экспрессионным вектором. В некоторых вариантах осуществления прайм и буст вакцины вводят путями, независимо выбранными из внутримышечного, внутрикожного или подкожного.

Фармацевтические вакцины на основе нуклеиновой кислоты для применения в настоящем изобретении можно вводить в дозах, достаточных для стимуляции иммунного ответа, в качестве прайм агента или буст агента. Количество вакцины на основе нуклеиновой кислоты, которое будут вводить, будет зависеть, например, от дозы вакцины. Поскольку режимы, относящиеся к настоящему изобретению, могут включать применение существующих вакцин на основе нуклеиновой кислоты, знание относительно соответствующих дозировок, основанных на терапевтической эффективности и безопасности, должно основываться на конкретном применяемом агенте.

Фармацевтические белковые вакцины для применения в настоящем изобретении можно вводить в дозах, достаточных для стимуляции иммунного ответа, в виде прайм или буст агента. Количество белковой вакцины, которое будут вводить, будет зависеть, например, от применяемого адъюванта. Белковые вакцины можно дозировать, например, при приблизительно 5–100 мг/кг/доза, приблизительно 10–50 мг/кг/доза или приблизительно 20–40 мг/кг/доза. Поскольку режимы, относящиеся к настоящему изобретению, могут включать применение существующих белковых вакцин, знание относительно соответствующих дозировок, основанных на терапевтической эффективности и безопасности, должно основываться на конкретном применяемом агенте.

После первоначального режима лечения, лечение можно осуществлять на менее частой основе. В предпочтительных вариантах осуществления режимы и способы лечения, относящиеся к настоящему изобретению, приводят в результате к функциональному излечению, позволяя приостановить лечение после завершения режима или после того, как диагностические критерии не будут указывать на функциональное излечение, например, пониженный уровень HBsAg предпочтительно ниже уровня обнаружения способов, относящихся к настоящему изобретению, и обнаруживаемый иммунный ответ на HBsAg.

Специалисту в данной области техники ясно, что некоторые факторы могут влиять на дозировку и временные интервалы, требуемые для эффективного лечения пациента, включая, но не ограничиваясь, тяжесть заболевания или расстройства, предшествующее лечение, общее состояние здоровья или возраст пациента, и другие присутствующие заболевания. Более того, лечение пациента терапевтически эффективным количеством композиции может включать однократное лечение или серию лечений. Оценки эффективных дозировок и периодов полувыведения *in vivo* для отдельного терапевтического агента, применяемого в способах и режимах настоящего изобретения, можно осуществлять, применяя обычные методологии или на основе тестирования *in vivo*, применяя соответствующую животную модель, как описано в другом месте в настоящем документе и известно в данной области техники.

РНКи составы, содержащие мембранные молекулярные ансамбли

РНКи для применения в композициях и способах настоящего изобретения можно формулировать для доставки в мембранном молекулярном ансамбле, например, липосоме или мицелле. В рамках изобретения термин “липосома” относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных, по меньшей мере, в виде одного бислоя, например, одного бислоя или нескольких бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и внутреннюю водную часть. Водная часть содержит РНКи композицию. Липофильный материал изолирует водную внутреннюю часть от водного внешнего пространства, которое обычно не содержит РНКи композицию, хотя в некоторых примерах, оно может содержать ее. Липосомы являются пригодными для переноса и доставки активных ингредиентов к месту действия. Поскольку липосомная мембрана структурно аналогична биологическим мембранам, когда липосомы наносят на ткань, липосомный бислой сливается с бислоем клеточных мембран. По мере того, как происходит слияние липосомы и клетки, внутреннее водное содержимое, которое содержит РНКи, доставляется в клетку, где РНКи может специфически связываться с РНК мишенью и может опосредовать РНКи. В некоторых случаях липосомы также осуществляют специфическую доставку, например, направляют РНКи к определенным типам клеток.

Липосому, содержащую РНКи агент, можно получить различными способами. В одном примере, липидный компонент липосомы растворяют в детергенте, так что образуются мицеллы с липидным компонентом. например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может иметь высокую критическую концентрацию мицеллообразования и может быть неионным. Примеры детергентов включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Затем, препарат РНКи агента добавляют к мицеллам, которые содержат липидный компонент. Катионные группы в липиде взаимодействуют с РНКи агентом и конденсируются вокруг РНКи агента с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например, диализом, чтобы получить липосомный

препарат РНКи агента.

При необходимости, соединение, являющееся носителем, которое способствует конденсации, можно добавлять в процессе реакции конденсации, например, контролируемым добавлением. Например, соединение, являющееся носителем, может представлять собой полимер, отличный от нуклеиновой кислоты (например, спермин или спермидин). рН можно также регулировать, способствуя конденсации.

Способы получения стабильных полинуклеотидных системы доставки, которые вводят комплекс полинуклеотид/катионные липид в качестве структурных компонентов системы доставки, дополнительно описаны, например, в WO 9637194, полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки. Образование липосом может также включать один или более аспектов примерных способов, описанных в Felgner, P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413–7417, 1987; патенте США № 4897355; патенте США № 5171678; Bangham, et al. *M. Mol. Biol.* 23:238, 1965; Olson, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 557:9, 1979; Szoka, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194, 1978; Mayhew, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984; Kim, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 728:339, 1983; и Fukunaga, et al. *Endocrinol.* 115:757, 1984. Общепринятые способы получения липидных агрегатов подходящего размера для применения в качестве систем доставки включают обработку ультразвуком и заморозку–оттаивание плюс экструзия (смотри, например, Mayer, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986). Микрофлюидизацию можно применять, когда требуются устойчиво маленькие (50–200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984). Данные способы легко приспособить для упаковки препаратов РНКи агента в липосомы.

Липосомы делятся на два широких класса. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот с образованием стабильного комплекса. Комплекс положительно заряженной нуклеиновой кислоты/липосомы связывается с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализуется в эндосому. Из-за кислого рН внутри эндосомы, липосомы разрываются, высвобождая их содержимое в цитоплазму клетки (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980–985).

Липосомы, которые чувствительны к рН или являются отрицательно–заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты, а не образуют с ними комплексы. Поскольку и нуклеиновая кислота, и липид являются одинаково заряженными, происходит отталкивание, а не комплексообразование. Тем не менее, некоторое количество нуклеиновой кислоты захватывается внутри водного пространства данных липосом. Чувствительные к рН липосомы используют для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей ген тимидинкиназы, в клеточные монослои в культуре. Экспрессия экзогенного гена обнаружена в клетках–мишенях (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269–274).

Один основной тип липосомных композиции включает фосфолипиды, отличные от природного фосфатидилхолина. Нейтральные липосомные композиции, например, можно

получить из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анионные липосомные композиции обычно получают из димиристоилфосфатидилглицерина, в то время как анионные фузогенные липосомы получают главным образом из диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомной композиции получают из фосфатидилхолина (ФХ), такого как, например, соевый ФХ и яичный ФХ. Другой тип получают из смесей фосфолипида или фосфатидилхолина или холестерина.

Примеры других способов введения липосом в клетки *in vitro* и *in vivo* включают патенты США № 5283185 и 5171678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994; Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11307, 1993; Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992; Gershon, Biochem. 32:7143, 1993; и Strauss EMBO J. 11:417, 1992.

Неионные липосомные системы также исследовали для определения их применимости для доставки лекарственных средств на кожу, в частности, в системах, содержащих неионные поверхностно-активные вещества и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие NovasomeTM I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и NovasomeTM II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), применяли для доставки циклоспорина-А в дерму кожи мыши. Результаты показали, что данные неионные липосомные системы были эффективны в облегчении отложения циклоспорина А в разных слоях кожи (Hu et al. S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4(6) 466).

Липосомы также включают “стерически стабилизированные” липосомы, термин, который, в рамках изобретения относится к липосомам, содержащим один или более специализированных липидов, которые, при введении в липосомы, приводят к увеличенному времени циркуляции относительно липосом, не содержащих данные специализированные липиды. Примеры стерически стабилизированных липосом представляют собой липосомы, в которых часть образующей везикулы липидной части липосомы (А) содержит один или более гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид G_{M1}, или (В) дериватизируют одним или более гидрофильными полимерами, такими как полиэтиленгликольный (ПЭГ) фрагмент. Не желая быть связанными любой конкретной теорией, в данной области техники считают, что, по меньшей мере, для стерически стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или ПЭГ-дериватизированные липиды, увеличенное время циркуляции данных стерически стабилизированных липосом является результатом уменьшенного поглощения клетками ретикуло-эндотелиальной системы (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Различные липосомы, содержащие один или более гликолипидов, являются известными в данной области техники. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) сообщают о способности моносиалоганглиозид G_{M1}, галактоцереброзидсульфата и фосфатидилинозита увеличивать время жизни липосом в крови. Данные результаты

были изложены Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 6949). Патент США № 4837028 и WO 88/04924, оба Allen et al., описывают липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид G_{M1} или эфир галактоцереброзидсульфата. Патент США № 5543152 описывает липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхлоин описаны в WO 9713499 (Lim et al.).

Катионные липосомы обладают преимуществом, заключающимся в способности сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и неспособны сливаться также эффективно с плазматической мембраной, захватываются макрофагами *in vivo*, и их можно применять для доставки РНКи агентов в макрофаги.

Дополнительные преимущества липосомы включают следующее: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразлагаемыми; липосомы могут включать в себя широкий спектр растворимых в воде и липидах лекарственных препаратов; липосомы могут защитить инкапсулированные РНКи агенты в их внутренних отделах от метаболизма и деградации (Rosoff, в "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, том 1, стр. 245). Важными соображениями при получении липосомных составов являются поверхностный заряд липидов, размер пузырьков и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N, N, N-триметиламмонийхлорид (DOTMA) можно применять для получения небольших липосом, которые взаимодействуют самопроизвольно с нуклеиновой кислотой, образуя комплекс липид-нуклеиновая кислота, который способен сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток тканевых культур, приводя в результате к доставке РНКи агента (смотри, например, Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 и патент США № 4897355 относительно описания DOTMA и его применения с ДНК).

DOTMA аналог, 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP) можно применять в комбинации с фосфолипидом, получая ДНК-комплексующие везикулы. Липофектин™ (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) представляет собой эффективный агент для доставки высокоанионных нуклеиновых кислот в живые клетки тканевых культур, которые содержат положительно заряженные DOTMA липосомы, которые взаимодействуют самопроизвольно с отрицательно заряженными полинуклеотидами, образуя комплексы. Когда используют достаточное количество положительно заряженных липосом, чистый заряд на полученных комплексах также является положительным. Полученные таким образом положительно заряженные комплексы самопроизвольно прикрепляются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры ткани. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис (олеилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан («DOTAP») (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) отличается от DOTMA тем, что олеоильные фрагменты соединены сложноэфирной

связью, а не простой эфирной связью.

Другие сообщаемые катионные липидные соединения включают соединения, которые конъюгированы с рядом молекул, включая, например, карбоксиспермин, который конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает соединения, такие как 5-карбоксиспермилглицин диоктаолеоиламид (“DOGS”) (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламин 5-карбоксиспермиламид (“DPPEs”) (смотри, например, патент США № 5171678).

Другие катионные липидные конъюгаты включают дериватизацию липида холестерином (“DC-Chol”), который формулируют в виде липосомы в комбинации с DOPE (смотри, Gao, X. and Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Сообщается, что липополилизин, полученный конденсацией полилизина с DOPE, является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Для определенных клеточных линий, сообщается, что данные липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, проявляют низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем содержащие DOTMA композиции. Другие коммерческие катионные липидные продукты включают DMRIE и DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) и липофектамин (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Другие катионные липиды, пригодные для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомные составы особенно подходят для местного введения. Липосомы обладают несколькими преимуществами перед другими составами. Данные преимущества включают уменьшение побочных эффектов, связанных с высокой системной абсорбцией вводимого лекарственного средства, повышенное накопление введенного лекарственного средства в требуемой мишени и способность вводить РНКи агент в кожу. В некоторых осуществлениях, липосомы используют для доставки РНКи агента к эпидермальным клеткам, а также для усиления проникновения РНКи агента в кожные ткани, например, в кожу. например, липосомы можно применять местно. Местная доставка лекарственных средств, сформулированных в виде липосомы, в кожу задокументирована (смотри, например, Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, т. 2, 405–410 и du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259–265; Mannino, R. J. и Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682–690, 1988; Itani, T. et al. *Gene* 56:267–276, 1987; Nicolau, C. et al. *Meth. Enz.* 149:157–176, 1987; Straubinger, R. M. и Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512–527, 1983; Wang, C. Y. и Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851–7855, 1987).

Липосомы, которые содержат РНКи, можно получить сильно деформируемыми. Данная деформируемость может позволить липосомам проникать через поры, которые являются меньшими среднего радиуса липосомы. например, трансферсомы являются разновидностью деформируемых липосом. Трансферсомы можно получить добавлением активаторов поверхностного края, обычно поверхностно-активных веществ, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы, которые содержат РНКи агент, можно доставлять, например, подкожной инъекцией, чтобы доставить агент РНКи к

кератиноцитам в коже. Чтобы пересечь интактную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны проходить через серию мелких пор, каждая диаметром менее 50 нм, под воздействием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, благодаря липидным свойствам, данные трансферосомы могут быть самооптимизируемыми (адаптивными к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися, и могут часто достигать своих целей без фрагментации и часто самозагружающимися.

Другие составы в соответствии с настоящим изобретением описаны в WO 2008042973.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как эмульсии (включая микроэмульсии) и липосомах. Наиболее распространенным способом классификации и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как природных, так и синтетических, является применение гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ). Природа гидрофильной группы (также известной как «головка») относится к наиболее полезному способу классификации различных поверхностно-активных веществ, применяемых в составах (Rieger, in “*Pharmaceutical Dosage Forms*”, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, стр. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не является ионизированной, его классифицируют как неионное поверхностно-активное вещество. Неионные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах и применимы в широком диапазоне значений pH. В общем, их величина HLB находится в диапазоне от 2 до приблизительно 18, в зависимости от их структуры. Неионные поверхностно-активные вещества включают неионные эфиры, такие как эфиры этиленгликоля, эфиры пропиленгликоля, глицериловые эфиры, полиглицериловые эфиры, сорбитановые эфиры, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные эфиры. Неионогенные алканоламиды и простые эфиры, такие как этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блочные полимеры, также включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее популярными представителями класса неионных поверхностно-активных веществ.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, такие как мыла, ациллактилаты, ациламиды аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и мыла.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как катионное. Катионные поверхностно-активные вещества включают

соли четвертичного аммония и этоксилированные амины. Четвертичные аммонийные соли являются наиболее часто применяемыми представителями данного класса.

Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью нести либо положительный, либо отрицательный заряд, то поверхностно-активное вещество классифицируют как амфотерное. Амфотерные поверхностно-активные вещества включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламидами, N-алкилбетаины и фосфатиды.

Применение поверхностно-активных веществ в лекарственных продуктах, составах и в эмульсиях рассмотрено (Rieger, в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

РНКи для применения в способах настоящего изобретения можно также обеспечивать в виде мицеллярных составов. «Мицеллы» определяют в настоящем изобретении как особый тип молекулярной сборки, в которой амфипатические молекулы расположены в виде сферической структуры, так что все гидрофобные части молекулы направлены внутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Обратное расположение существует, если среда является гидрофобной.

Липидные частицы

РНКи, например, дцРНК настоящего изобретения можно полностью инкапсулировать в липидном составе, например, LNP, или других частицах нуклеиновая кислота-липид. Экспрессионные векторы или РНК, содержащие кодирующие последовательности вирусных антигенов под контролем подходящего промотора, можно формулировать в виде липидных частиц для доставки.

В рамках изобретения термин "LNP" относится к стабильным частицам нуклеиновая кислота-липид. LNP обычно содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который препятствует агрегации частиц (например, ПЭГ-липидный конъюгат). LNP являются особенно пригодными для системного применения, поскольку они показывают продленное время жизни в кровотоке после внутривенной (внутривенной) инъекции и накопление в периферийных зонах (например, зонах, физически отделенных от места введения). LNP включают "pSPLP", которые включают комплекс инкапсулированный конденсирующий агент-нуклеиновая кислота, как представлено в WO 0003683. Частицы настоящего изобретения обычно имеют средний диаметр от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, более обычно от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, более обычно от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм, самое обычное от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, и являются по существу нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда они присутствуют в частицах нуклеиновая кислота-липид настоящего изобретения, являются устойчивыми в водных растворах к разрушению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способы их получения описаны, например, в патентах США № 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; и 6815432; US20100324120 и WO 9640964.

В некоторых вариантах осуществления отношение липида к лекарственному

средству (массовое соотношение) (например, отношение липида к дцРНК) будет в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 50:1, от приблизительно 1:1 до приблизительно 25:1, от приблизительно 3:1 до приблизительно 15:1, от приблизительно 4:1 до приблизительно 10:1, от приблизительно 5:1 до приблизительно 9:1, или от приблизительно 6:1 до приблизительно 9:1. Промежуточные диапазоны вышеупомянутых диапазонов также считают частью настоящего изобретения.

Катионные липид может представлять собой, например, N, N-диолеил-N, N-диметиламмонийхлорид (DODAC), N, N-дистеарил-N, N-диметиламмоний бромид (DDAB), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N, N, N-триметиламмонийхлорид (DOTAP), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N, N, N-триметиламмонийхлорид (DOTMA), N, N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N, N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N, N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-Дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (Dlin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеоил-3-диметиламинопропан (DLinDaP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеоил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMA), хлоридная соль 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), хлоридную соль 1,2-дилинолеоил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPz) или 3-(N, N-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N, N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N, N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 1,2-дилиноленилокси-N, N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или их аналоги, (3aR,5s,6aS)-N, N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-откадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил 4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанидиол)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать от приблизительно 20 моль % до приблизительно 50 моль % или приблизительно 40 моль % суммарных липидов, присутствующих в частице. В других вариантах осуществления соединение, 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан, можно применять для получения липид-миРНК наночастиц.

В некоторых вариантах осуществления липид-миРНК частица содержит 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана: 10% DSPC: 40% холестерина: 10% ПЭГ-C-DOMG (молярный процент) с размером частиц $63,0 \pm 20$ нм и соотношением миРНК/липид 0,027.

Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, включая, но не ограничиваясь, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC),

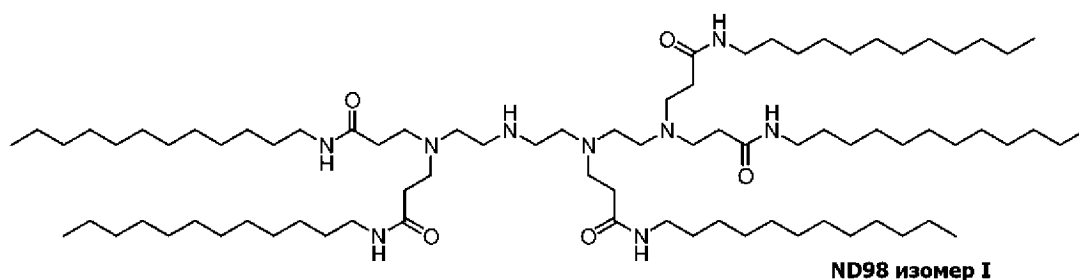
диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфозтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-O-монометил PE, 16-O-диметил PE, 18-1-транс PE, 1-стеароил-2-олеоил-фосфатидилэтаноламин (SOPE), холестерин или их смесь. Некатионный липид может составлять от приблизительно 5 моль % до приблизительно 90 моль %, приблизительно 10 моль % или приблизительно 58 моль %, если содержится холестерин, суммарных липидов, присутствующих в частице.

Конъюгированный липид, который может подавлять агрегацию частиц, может представлять собой, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ)-липид, включая, без ограничения, ПЭГ-диацилглицерин (DAG), ПЭГ-диалкилоксипропил (DAA), ПЭГ-фосфолипид, ПЭГ-церамид (Cer) или их смесь. ПЭГ-DAA конъюгат может представлять собой, например, ПЭГ-дилаурилоксипропил (C₁₂), ПЭГ-димиристоксипропил (C₁₄), ПЭГ-дирпальмитилоксипропил (C₁₆) или ПЭГ-дистеарилоксипропил (C₁₈). Конъюгированный липид, который препятствует агрегации частиц, может составлять от 0 моль % до приблизительно 20 моль % или приблизительно 2 моль % суммарных липидов, присутствующих в частице.

В некоторых вариантах осуществления частица нуклеиновая кислота-липид дополнительно содержит холестерин при, например, от приблизительно 10 моль % до приблизительно 60 моль % или приблизительно 48 моль % суммарных липидов, присутствующих в частице.

В одном варианте осуществления, липидоид ND98·4HCl (MW 1487) (смотри US20090023673, который включен в настоящее изобретение с помощью ссылки), холестерин (Sigma-Aldrich) и ПЭГ-церамид C16 (Avanti Polar Lipids) можно применять для получения наночастиц липид-дцРНК (*m.e.*, LNP01 частиц). Стоковые растворы каждого в этаноле получают следующим способом: ND98, 133 мг/мл; холестерин, 25 мг/мл, ПЭГ-церамид C16, 100 мг/мл. Затем, ND98, холестерин и ПЭГ-церамид C16 стоковые растворы можно смешивать, например, при молярном соотношении 42:48:10. Объединенный липидный раствор можно смешивать с водной дцРНК (например, в ацетате натрия pH 5) так, чтобы конечная концентрация этанола составляла приблизительно 35–45%, и конечная концентрация ацетата натрия составляла приблизительно 100–300 мМ. Липид-дцРНК наночастицы обычно образуются самопроизвольно после смешения. В зависимости от требуемого распределения частиц по размерам, полученную смесь наночастиц можно экструдировать через поликарбонатную мембрану (например, с отсечкой 100 нм), применяя, например, термобарабанный экструдер, такой как Lipex экструдер (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях, стадию экструзии можно пропустить. Удаление этанола и одновременную замену буфера можно осуществить, например, путем диализа или фильтрации в тангенциальном потоке. Буфер

можно заменять, например, фосфатно–солевым буфером (PBS) при pH приблизительно 7, например, pH приблизительно 6,9, pH приблизительно 7,0, pH приблизительно 7,1, pH приблизительно 7,2, pH приблизительно 7,3 или pH приблизительно 7,4.



Формула 1

LNP01 составы описаны, например, в WO 2008042973, который включен в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Дополнительные примеры липид–дцРНК составов описаны в таблице 1.

Таблица 1

	Ионизированный/катионный липид	катионный липид/некатионный липид/холестерин/ПЭГ–липидный конъюгат соотношение липид:миРНК
SNAL P-1	1,2–Дилиноленилокси–N, N–диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/ПЭГ–сDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:миРНК~7:1
2–XTC	2,2–Дилинолеил–4–диметиламиноэтил–[1,3]–диоксолан (XTC)	XTC/DPPC/холестерин/ПЭГ–сDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:миРНК~7:1
LNP05	2,2–Дилинолеил–4–диметиламиноэтил–[1,3]–диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/ПЭГ–DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:миРНК~6:1
LNP06	2,2–Дилинолеил–4–диметиламиноэтил–[1,3]–диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/ПЭГ–DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:миРНК~11:1
LNP07	2,2–Дилинолеил–4–диметиламиноэтил–[1,3]–диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/ПЭГ–DMG 60/7,5/31/1,5, липид:миРНК~6:1
LNP08	2,2–Дилинолеил–4–диметиламиноэтил–[1,3]–диоксолан	XTC/DSPC/холестерин/ПЭГ–DMG 60/7,5/31/1,5,

	(ХТС)	липид:миРНК~11:1
LNP09	2,2-Дилинолеил-4- диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/ПЭГ-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N, N-диметил-2,2- ди((9Z,12Z)-октадека-9,12- диенил)тетрагидро-3aH- циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)	ALN100/DSPC/холестерин/ПЭГ-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта- 6,9,28,31-тетраен-19-ил 4- (диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/холестерин/ПЭГ-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2- гидроксидодецил)амино)этил)(2- гидроксидодецил)амино)этил)пипера зин-1-ил)этилазанидиил)дидодекан- 2-ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/холестерин/ПЭГ-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК 10:1
LNP13	ХТС	ХТС/DSPC/холестерин/ПЭГ-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/холестерин/ПЭГ-DMG 40/15/40/5 липид:миРНК: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/холестерин/ПЭГ- DSG/GalNAc-ПЭГ-DSG 50/10/35/4,5/0,5 липид:миРНК: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/холестерин/ПЭГ-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/холестерин/ПЭГ-DSG 50/10/38,5/1,5

		липид:миPHK: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/холестерин/ПЭГ–DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHK: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/холестерин/ПЭГ–DMG 50/10/35/5 липид:миPHK: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/холестерин/ПЭГ–DPG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHK: 10:1
LNP21	C12–200	C12–200/DSPC/холестерин/ПЭГ–DSG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHK: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/холестерин/ПЭГ–DSG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHK: 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин

ПЭГ–DMG: ПЭГ–дидимиристоилглицерин (C14–ПЭГ или ПЭГ–C14) (ПЭГ со средним молекулярным весом 2000)

ПЭГ–DSG: ПЭГ–дистирилглицерин (C18–ПЭГ или ПЭГ–C18) (ПЭГ со средним молекулярным весом 2000)

ПЭГ–сDMA: ПЭГ–карбамоил–1,2–димиристилоксипропиламин (ПЭГ со средним молекулярным весом 2000)

Составы, содержащие SNALP (1,2–дилиноленилокси–N, N–диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации № WO 2009/127060, поданной 15 апреля 2009, которая включена в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Составы, содержащие XTC, составы описаны в РСТ публикации № WO 2010/088537, полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Составы, содержащие MC3, описаны, например, в публикации США № 2010/0324120, полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Составы, содержащие ALNY–100, описаны в РСТ публикации № WO 2010/054406, полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Составы, содержащие C12–200, описаны в РСТ публикации № WO 2010/129709,

полное содержание которой включено в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, гелевые капсулы, сашэ, таблетки или минитаблетки. Загустители, ароматизаторы, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие добавки или связующие могут быть желательны. В некоторых вариантах осуществления пероральные составы являются составами, в которых дцРНК, описанные в изобретении, вводят в сочетании с одним или более усилителем проникновения, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты или их соли.

Подходящие желчные кислоты/соли включают ченодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсodeзоксиченодезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, таурodeзоксихолевую кислоту, натрия тауро-24,25-дигидрофузидат и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додecil-азациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации усилителей проникновения, например, жирные кислоты/соли в комбинации с желчными кислотами/солями. Один пример комбинации представляет собой натриевую соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные усилители проникновения включают полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. ДцРНК, описанные в настоящем изобретении, можно доставлять перорально в гранулированной форме, включая высушенные распылением частицы, или в виде комплекса, образуя микро или наночастицы. Комплексообразующие дцРНК агенты включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксетаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (ПЭГ) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-дериватизированные полиимины, поллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие агенты включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинметилэтилен P(TDAE), полиаминостирол (например, p-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D, L-молочная кислота), поли(DL-молочная-со-гликолевая

кислота (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (ПЭГ). Пероральные составы для дцРНК и их получение описаны подробно в патентах США № 6887906 и 6747014 и US 20030027780, каждый из которых включен в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения включают, но не ограничиваются, растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Данные композиции можно получить из множества компонентов, которые включают, но не ограничиваются, предварительно отформованные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Особенно предпочтительными являются составы, которые направлено воздействуют на печень при лечении заболеваний печени, таких как рак печени.

Фармацевтические составы настоящего изобретения, которые можно удобно предоставлять в стандартной лекарственной форме, можно получить в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в фармацевтической области техники. Данные способы включают стадию смешения активных ингредиентов с фармацевтическим носителем (ями) или эксципиентом (ами). В общем, составы получают равномерным и тщательным смешением активных ингредиентов с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями или с обоими, а затем, при необходимости, приданием продукту формы.

V. Применение способов настоящего изобретения

Настоящее изобретение описывает различные способы и режимы лечения. Ясно, что способы можно обеспечивать как применение РНКи агентов и вакцин, относящихся к настоящему изобретению. То есть, настоящее изобретение относится к

а) РНКи агенту, который направлено воздействует, по меньшей мере, на три транскрипта ВГВ, где РНКи агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь;

б) белковой вакцине, содержащей ВГВ ядерный антиген (НВсAg) и ВГВ поверхностный антиген (НВsAg); и

с) вакцине на основе нуклеиновой кислоты, содержащей экспрессирующую векторную конструкцию, кодирующую НВсAg или НВsAg, где конструкция кодирует белок, который разделяет эпитоп с белковой вакциной; посредством этого осуществляя лечение пациента

для применения в способах лечения пациента, имеющего инфекцию гепатита В.

Применения включают все из вариантов и примеров РНКи агентов, белковых вакцин и вакцин на основе нуклеиновой кислоты, относящихся к настоящему изобретению.

VI. Наборы для осуществления на практике способов настоящего изобретения

Настоящее изобретение описывает способы, режимы лечения и применение агентов для лечения пациента, имеющего инфекцию гепатита В. Ясно, что агенты для осуществления на практике способов настоящего изобретения можно получить, исходя из описания, относящегося к настоящему изобретению. Данный набор будет содержать

а) РНКи агент, который направлено воздействует, по меньшей мере, на три

транскрипта ВГВ, где РНКи агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь;

б) белковую вакцину, содержащую ВГВ ядерный антиген (НВсAg) и ВГВ поверхностный антиген (НВsAg);

с) вакцину на основе нуклеиновой кислоты, содержащую экспрессирующую векторную конструкцию, кодирующую НВсAg или НВsAg, где конструкция кодирует белок, который разделяет эпитоп с белковой вакциной; посредством этого осуществляя лечение; и

д) инструкции для применения в способах лечения пациента, имеющего инфекцию гепатита В.

Применения включают все варианты и примеры РНКи агентов, белковых вакцин и вакцин на основе нуклеиновой кислоты, относящихся к настоящему изобретению. Компоненты набора можно предоставлять вместе, например, в коробке. В некоторых вариантах осуществления компоненты настоящего изобретения можно обеспечивать отдельно, например, из-за различных требований хранения, но обеспечивать для применения вместе, например, исходя из инструкций на упаковке для применения.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Полное содержание всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в настоящей заявке, а также фигуры, приложение А и список последовательностей, включены в настоящее исследование с помощью ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. материалы и способы

Примеры РНКи

Примеры сайтов-мишеней РНКи и немодифицированных и модифицированных последовательностей миРНК представлены в таблицах в приложении А.

Химически модифицированные миРНК ВГВ дуплексы, применяемые в экспериментах ниже, имеют следующие последовательности:

Немодифицированные последовательности:

<u>ИН</u> <u>дуплек</u> <u>са</u>	<u>Смысловая</u> <u>последовательность</u> <u>Немодифицированная (5'–</u> <u>3')</u>	<u>SEQ</u> <u>ID:</u>	<u>Антисмысловая</u> <u>последовательность</u> <u>немодифицированная (5'–3')</u>	<u>SEQ</u> <u>ID:</u>
<u>AD–</u> <u>66810</u>	<u>GUGUGCACUUCGCUUCAC</u> <u>A</u>	<u>27</u>	<u>UGUGAAGCGAAGUGCACAC</u> <u>UU</u>	<u>25</u>

<u>ИН</u> <u>дуплек</u> <u>са</u>	<u>Смысловая</u> <u>последовательность</u> <u>Немодифицированная (5'–3')</u>	<u>SEQ</u> <u>ID:</u>	<u>Антисмысловая</u> <u>последовательность</u> <u>немодифицированная (5'–3')</u>	<u>SEQ</u> <u>ID:</u>
<u>AD–</u> <u>66816</u>	<u>CACCAUGCAACUUUUUA</u> <u>CCU</u>	<u>28</u>	<u>AGGUGAAAAAGUUGCAUG</u> <u>GUGUU</u>	<u>26</u>

Модифицированные последовательности:

<u>ИН</u> <u>дуплек</u> <u>са</u>	<u>Смысловая</u> <u>последовательность</u> <u>модифицированная (5'–3')</u>	<u>SEQ</u> <u>ID:</u>	<u>Антисмысловая</u> <u>последовательность</u> <u>модифицированная (5'–3')</u>	<u>SEQ</u> <u>ID:</u>
<u>AD–</u> <u>66810</u>	<u>gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca</u> <u>L96</u>	<u>37</u>	<u>usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacs</u> <u>usu</u>	<u>30</u>
<u>AD–</u> <u>66816</u>	<u>csasccauGfcAfAfCfuuuuucac</u> <u>cuL96</u>	<u>38</u>	<u>asGfsgugAfaAfAfaguuGfcAfugg</u> <u>ugsusu</u>	<u>32</u>

Сокращения для нуклеотидных мономеров в модифицированных последовательностях нуклеиновых кислот представлены в таблице 1 приложения А.

Сайт–мишень AD–66810 представляет собой GTGTGCACTTCGCTTCACA (SEQ ID NO: 39), который представляет собой нуклеотиды 1579–1597 NC_003977.1 (SEQ ID NO: 1).

Сайт–мишень AD–66816 представляет собой CACCATGCAACTTTTTTCACCT (SEQ ID NO: 40), который представляет собой нуклеотиды 1812–1832 of NC_003977.1 (SEQ ID NO: 1).

Оценка в клеточной культуре miPHK ВГВ

hNTCP–экспрессирующие HepG2 клетки заражали (100 множественность заражения (MOI)) ВГВ частиц/клетка (подтип ауw)) в двух экземплярах. На 4 день после заражения, клетки трипсинизировали и пересевали в многолуночные планшеты и

трансфецировали контрольной или миРНК ВГВ AD–66810 (имеющей химические модификации, показанные в таблице выше и смысловую и антисмысловую последовательности, как показано в SEQ ID №: 37 и 30, соответственно) или AD–66816 (имеющей химические модификации, показанные в таблице выше и смысловую и антисмысловую последовательности, как показано в SEQ ID №: 38 и 32, соответственно), причем каждую доставляли при 100 нМ, 10 нМ, или 1 нМ, применяя Lipofectamine® RNAiMax. Надосадочную жидкость собирали через 3, 6, 10, 13 и 17 дней после пересевания, и уровни HBeAg и HBsAg определяли относительно контроля без трансфекции. HBsAg и HBeAg уровни определяли, применяя хемилюминесцентный иммуноанализ на микрочастицах (CMIA), измеренный в анализаторе для иммуноанализа Abbott Architect (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

Мыши, введение миРНК и вакцинации

ВГВ–трансгенные мыши (штамм HBV1.3xfs (ВГВ генотип D, подтип ауw)) были получены в результате селекции в домашних условиях при определенных условиях в отсутствии патогенов в соответствии с установленными руководящими принципами.

Для введения миРНК, мышам подкожно вводили 3 мг/кг или 9 мг/кг дозу контрольной миРНК или миРНК ВГВ (модифицированная AD–66810 или модифицированная AD–66816); или внутривенно вводили инъекцией в хвостовую вену 1×10^{11} AAV частиц для экспрессии ВГВ–кшРНК, как показано на фигурах и в примерах ниже.

Для белковой вакцинации, мышей иммунизировали подкожно рекомбинантной дрожжевой HBsAg и Escherichia coli HBcAg (APP Latvijas Biomedicinas, Riga, Latvia), смешанными с 31,91 мкг синтетического фосфоротиоатного CpG ОДН 1668 и 25 мкг поли[ди(натрийкарбоксилатэтилфеноксифосфазена)] (PCPE) в 50 мкл ФБР.

Рекомбинантную MVA генерировали гомологичной рекомбинацией и селекцией спектра хозяев, как описано ранее (Staib et al., 2003. Biotechniques. 34:694–700). Полные HBcAg (генотип D, подтип ауw) и HBsAg открытые рамки считывания (генотип A, подтип ауw или адw) клонировали в MVA трансферных плаزمиды рПΔHR–PH5 или рПΔHR–P7.5, посредством этого помещая ВГВ белки под контроль ранних/поздних специфических для вируса вакцины промоторов PH5 (HBcAg ауw /HBsAg ауw/HBsAg адw) или P7.5 (HBsAg ауw). После конструирования каждого вируса, проверяли генную экспрессию, последовательность вставленной ДНК и вирусную чистоту. Для получения препаратов вакцины, MVA стандартно размножали в CEF, очищали ультрацентрифугированием через сахарозу, перерастворяли в 1 mM Tris–HCl pH 9,0 и титровали, следуя стандартному способу (Staib et al., 2004. Methods Mol Biol. 269:77–100). Для MVA вакцинации, мышей вакцинировали интраперитонеально 1×10^8 инфекционными единицами соответствующей рекомбинантой MVA в 500 мкл ФСБ.

Конкретные режимы дозирования представлены в примерах ниже и на фигурах 3, 7 и 12.

Серологический анализ

Уровни HBsAg и HBeAg в сыворотке определяли при 1:33 разбавлениях; и анти-HBs уровни определяли при 1:100 разбавлении, применяя хемилюминесцентный иммуноанализ на микрочастицах (СМИА), измеряемый на анализаторе для иммуноанализа Abbott Architect (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Количественное определение титров ВГВ в сыворотке полимеразной цепной реакцией в реальном времени и определение уровней ДНК ВГВ в сыворотке проводили, как описано в Untergasser et al., 2006 (Hepatology. 43:539–47). Количество ДНК ВГВ нормализовали к уровню ДНК перед обработкой.

Уровни анти-HBc антитела определяли при разбавлении 1:20, применяя Enzgnost анти-HBc моноклональный тест на ВЕРИИ платформе (Both Siemens Healthcare, Eschborn, Germany). Если образец измеряли вне линейного диапазона, большее или меньшее разбавление применяли, при необходимости.

Количественное определение титров ВГВ в сыворотке полимеразной цепной реакцией в реальном времени и определение уровней ДНК ВГВ в сыворотке проводили, как описано в Untergasser et al., 2006 (Hepatology. 43:539–47). Количество ДНК ВГВ нормализовали к уровню ДНК перед обработкой.

АЛТ активность измеряли в день отбора крови при 1:4 разбавлении в фосфатно-буферном соляном растворе (ФБР), применяя Reflotron GPT/ALT тест (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Анализ со стимуляцией лимфоцитов

Печень-ассоциированные лимфоциты (LAL) выделяли, как описано в Stross et al., 2012 (Hepatology 56:873–83) и стимулировали H2-kb- или H-2Db-ограниченными пептидами (смотри Backes, 2016) в течение 12 часов в присутствии 1 мг/мл брэфелдина А (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Клетки окрашивали живыми/мертвыми моноазидобромидом этидия (Invitrogen®, Karlsruhe, Germany) и блокировали анти-CD16/CD32-Fc-Block (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Поверхностные маркеры окрашивали РВ-конъюгированными анти-CD8-альфа и РЕ-конъюгированными анти-CD4 (eBiosciences, Eching, Germany). Окрашивание внутриклеточных цитокинов (ICS) проводили FITC анти-IFN-гамма (XMGI,2), PE-Cy7 анти-TNF-альфа и APC анти-IL-2 (eBiosciences, Eching, Germany), применяя набор Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) согласно рекомендациям разработчика. Те же данные анализировали дважды, во второй раз с более строгим исключением мертвых клеток.

Иммуногистохимическое окрашивание для HBc-экспрессирующих гепатоцитов

Печени собирали, фиксировали в 4% параформальдегиде и погружали в парафин. Печень разрезали (2 мкм), срезы окрашивали кроличьим анти-HBcAg в качестве первичных антител (Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA; #RP 017; 1:50 разбавление; извлечение при 100°C в течение 30 минут с EDTA) и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Выдерживание в буфере Вентана и окрашивание проводили на NEXES роботе для иммуногистохимии (Ventana Instruments), применяя IVIEW DAB набор для детекции (Ventana Instruments) или на Bond MAX (Leica

Biosystems). Для анализа, срезы сканировали, применяя SCN 400 слайдовый сканер, и положительные клетки считали, применяя интегрированное программное обеспечение Tissue AI (оба Leica Biosystems).

Транскрипты ВГВ из лизата печени

Для анализа РНК ВГВ из лизата печени, РНК экстрагировали из 30 мг ткани печени мининабором RNeasy (Qiagen), и кДНК синтезировали набором Superscript III (Thermo Fisher Scientific). Транскрипты ВГВ амплифицировали с праймерами для только 3,5 т.п.н. транскриптов (прямой праймер 5'– GAGTGTGGATTCGCACTCC–3' (SEQ ID NO: 41); обратный праймер 5'– GAGGCGAGGGAGTTCTTCT–3' (SEQ ID NO: 42)), или с праймерами, связывающимися с обычным 3' концом всех транскриптов ВГВ (прямой праймер 5'– TCACCAGCACCATGCAAC–3' (SEQ ID NO: 43); обратный праймер 5'– AAGCCACCCAAGGCACAG–3' (SEQ ID NO: 44)) (денатурирование: 95°C 5 мин; амплификация: 95°C 3 с, 60°C 30 с (40 циклов)) (Yan et al., 2012). Результаты нормализовали к экспрессии мышинной GAPDH (прямой праймер 5'– ACCAACTGCTTAGCCC–3' (SEQ ID NO: 45); обратный праймер 5'– CCACGACGGACACATT–3' (SEQ ID NO: 46)) (денатурирование: 95°C 5 мин; амплификация: 95°C 15 с, 60°C 10 с, 72°C 25 с (45 циклов)). Все ПЦР реакции проводили на LightCycler 480 (Roche Diagnostics).

AAV–ВГВ мышинная модель

Для AAV мышинной модели, C57/Bl6 мышам дикого типа (9 недельным; 6 животных на группу обработки) вводили внутривенно 2×10^{10} геномных эквивалентов (geq) адено-ассоциированного вируса серотипа 8 (AAV8), несущего 1,2-кратно удлиненный ВГВ геном генотипа D (AAV–HBV1.2) (день –28) (смотри, например, Yang, et al. (2014) Cell and Mol Immunol 11:71). Начиная с 4 недель после AAV-трансдукции (день 0), животных обрабатывали 3 инъекциями (3 мг/кг живого веса, n=12 на группу) или контрольной миРНК или миРНК ВГВ (AD–66816 или AD–66810) (дни 0, 29 и 57). Каждую группу обработки миРНК разделяли на две группы (n=6 на группу), которую не будут обрабатывать или которую будут обрабатывать вакциной, состоящей из рекомбинантного HBsAg, HBcAg (15 мкг каждый) и 10 мкг к-ди-АМФ, вводимой в 57 и 70 день и усиленной MVA–HBs и MVA–HBc (5×10^7 geq каждая) в 84 день. Схема, показывающая режим лечения, представлена на фигуре 12.

Пример 2 – оценка миРНК ВГВ в HepG2–NTCP клеточной линии и эксперименты по подбору доз на HBVxfs мышах

Анти–ВГВ миРНК оценивали на эффективный нокдаун антигенов ВГВ и ДНК в *in vitro* инфекционной модели, применяя ВГВ-зараженные HepG2–NTCP клетки, обработанные 1 нМ, 10 нМ или 100 нМ одной из модифицированной AD–66810 или модифицированной AD–66816 миРНК ВГВ, или контрольной миРНК, как представлено выше. Надосадочные жидкости собирали через 3, 6, 10, 13 и 17 дней после обработки миРНК и анализировали на уровни HBcAg и HBsAg по сравнению с контролем без трансфекции. Было показано, что обе миРНК ВГВ эффективно подавляют экспрессию и

HBeAg и HBsAg с наибольшими уровнями нокдауна, наблюдаемыми в 13 и 17 день. Значительного нокдауна не наблюдали с контрольной миРНК. Данные показывают, что AD-66810 или AD-66816 миРНК ВГВ являются эффективными для подавления экспрессии антигенов ВГВ долгосрочным способом в *in vitro* системе инфекции ВГВ.

Затем, ВГВ и контрольную миРНК тестировали в HBVxfs трансгенной модели хронического гепатита В. HBVxfs мыши содержали интегрированный ВГВ геном, который экспрессируется под контролем печенъ-специфичного промотора. При приблизительно 10 недельном возрасте, мышам вводили 3 или 9 мг/кг дозу одной из AD-66810 или AD-66816 миРНК ВГВ или контрольной миРНК (n=6 на группу). Образцы крови собирали через 6, 13, и 21 дней после обработки миРНК, и получали сыворотку. Уровни HBeAg, HBsAg и ДНК ВГВ в сыворотке (фигуры 2A–2C) определяли, как представлено выше. Кроме того, РНК выделяли из печени и уровни суммарной РНК ВГВ и ВГВ 3,5 т.п.н. транскрипта определяли, применяя способ Yan, 2012 и нормализовали к экспрессии GAPDH (фигуры 2D и 2E).

Было показано, что обе миРНК ВГВ при обеих дозах эффективно подавляют экспрессию HBsAg и HBeAg и снижают уровни ДНК ВГВ в сыворотке по сравнению с контрольными уровнями (смотри фигуры 2A–2C). Затем, суммарная РНК ВГВ печени относительно ДНК GAPDH и 3,5 т.п.н. РНК ВГВ относительно уровня РНК GAPDH значительно снижались обеими дозами миРНК ВГВ по сравнению с контрольными уровнями (фигуры 2D и 2E). На основе данных результатов, 3 мг/кг дозу выбирали для применения в последующих экспериментах.

Пример 3 – сравнение снижения антигенной загрузки миРНК с нуклеотидными (нуклеозидными) аналогами перед введением терапевтической вакцины в модели трансгенных мышей с ВГВ

Продemonстрировав, что миРНК, направленная на ВГВ, может эффективно подавлять экспрессию HBsAg и HBeAg и снижать уровни ДНК ВГВ в сыворотке в HBVxfs мышинной модели, исследовали эффект обработки мышей нуклеозидным аналогом энтекавир или миРНК ВГВ перед введением терапевтической вакцины, применяя прайм-буст режим. Схема обработки показана на фигуре 3.

Мышей предварительно обрабатывали одним из шести режимов обработки перед вакцинацией, применяя прайм-буст режим (n=6 на группу):

- (1) без предобработки;
- (2) Энтекавир при 1 мкг/мл в воде в течение всего исследования, начиная с первого дня недели 0 (расчетная доза из приблизительно 4 мг/день, исходя из расчетов, представленных в Lütgehetmann et al., 2011, *Gastroenterology*, 140:2074–83);
- (3) 3 мг/кг доза в первый день недель 0, 4, 8 и 12 контрольного РНКи агента.
- (4) Разовая доза в первый день недели 0 с экспрессионным вектором, кодирующим кшРНК, направленную на ВГВ (ВГВ-кшРНК) (Michler et al., 2016); или
- (5–6) 3 мг/кг доза в первый день недель 0, 4, 8 и 12 модифицированной AD-66816 или модифицированной AD-86610 (генетически миРНК ВГВ).

В первый день недель 12 и 14, смесь рекомбинантно экспрессируемого дрожжевой HBsAg (15 мкг) и экспрессируемого *E. coli* HBcAg (15 мкг), дополненную 31,9 мкг синтетического фосфоротиоатного CpG ОДН 1668 (CpG) и 25 мкг поли[ди(натрийкарбоксилатэтилфеноксифосфазена)] (PCPE), подкожно вводили всем мышам в качестве белковой прайм вакцинации (Backes, 2016).

В первый день недели 16, смесь модифицированного вируса вакцины Ankara, экспрессирующего HBsAg или HBcAg (5×10^7 частиц каждого вируса), подкожно вводили всем мышам в качестве буст вакцинации (Backes, 2016).

Образцы крови получали в первые дни недели 0, 2, 4, 8, 12, 16 и 17, и полученные из них образцы сыворотки анализировали на уровни HBsAg, HBeAg и ДНК ВГВ. Результаты показаны на фигуре 4.

Уровни HBsAg и HBeAg у мышей в группах 1, 2 и 3 (имитация, энтекавир, контрольный РНКи агент) были аналогичными. ВГВ–кшРНК или миРНК ВГВ (AD–66816 или AD–86610) отдельно вызывали значительное снижение HBsAg, HBeAg и ДНК ВГВ в сыворотке (фигуры 4А–4С). Три дозы прайм–буст схемы вакцинации приводили в результате к дополнительному снижению HBsAg во всех группах, и пониженному уровню HBsAg, по меньшей мере, у некоторых животных в ВГВ–кшРНК и миРНК ВГВ группах ниже уровня обнаружения. Однако обработка вакциной не снижала уровни HBeAg в любой из групп. Будучи не связанными механизмом, предполагают, что снижение HBsAg, но не HBeAg, является результатом иммунного ответа, вызванного вакциной на s антиген, но не e антиген, который получают протеолитическим процессингом С белка (смотри фигуру 5, обсуждаемую ниже).

Уровни ДНК ВГВ снижались до приблизительно нижнего предела количественного определения только с энтекавиром, поэтому эффекты трехдозовой прайм–буст вакцины нельзя было обнаружить (фигура 4С). Все из имитируемой обработки и обработки ВГВ–кшРНК, миРНК ВГВ и контрольной миРНК снижали уровни ДНК ВГВ, и уровень ДНК ВГВ дополнительно снижался прайм–буст вакциной во всех группах. Неясно, почему имитируемая обработка и контрольная миРНК снижали уровни ДНК ВГВ в данном эксперименте. Снижение ДНК ВГВ не наблюдали в ответ на обработку контрольной миРНК в других экспериментах (смотри, например, фигуры 2С и 8С). Данные показывают, что РНКи превосходит терапию нуклеотидным (нуклеозидным) аналогом по снижению вирусных антигенов. Кроме того, РНКи и последующая вакцинация обладают комбинированным эффектом на уровни HBsAg и ДНК ВГВ больше, чем любой из данных агентов в отдельности.

В последний день эксперимента (первый день недели 17), мышей умерщвляли, и собирали их печени. Лимфоциты, ассоциированные с печенью, выделяли из печени, и после стимуляции пептидом CD8⁺ Т–клеточные ответы измеряли путем окрашивания внутриклеточных цитокинов. В частности, внутрипеченочные CD8⁺ Т–клеточные ответы оценивали на ответ на HBsAg, HBcAg и частицу вируса MVA, применяя способ, представленный в Backes, 2016. Данные анализировали дважды, применяя два разных

порога для исключения мертвых иммунных клеток, поскольку определяли, что исключение мертвых иммунных клеток в первом анализе, представленном на фигурах 5А–5С, были недостаточным. Второй анализ показан на фигурах 5D–5F. Второй анализ подтвердил выводы первого анализа.

Мыши, предварительно обработанные ВГВ–кшРНК или миРНК ВГВ перед вакцинацией, были способны генерировать CD8⁺ Т клеточный иммунный ответ на HBsAg и HBcAg (фигуры 5А, 5В, 5D и 5Е), указывая на то, что цитотоксические Т–клетки способны выводить инфекцию ВГВ, стимулировались, когда уровни антигенов ВГВ подавлялись перед вакцинацией. Значительного CD8⁺ Т–клеточного иммунного ответа на антигены ВГВ не наблюдали в имитируемой, энтекавирной или контрольной миРНК группах. Значительный и аналогичный CD8⁺ Т–клеточный иммунный ответ на вируса MVA у всех животных, независимо от предобработки или вирусных уровней антигенов, продемонстрировал, что вакцинация работала одинаково хорошо на всех животных и не подвержена воздействию уровней антигенов ВГВ, посредством этого демонстрируя присутствие компетентной иммунной системы (фигуры 5С и 5F). Никаких существенных различий в выработке антител не наблюдалось между животными, подвергнутыми имитационной обработке, и любой другой группой, что указывает на то, что высокие уровни антигенов ВГВ могут индуцировать Т–клеточную толерантность.

Данные показывают, что обработка РНКи, в противоположность современному стандарту лечения нуклеозидным аналогом, может восстанавливать ВГВ–специфический Т–клеточный иммунитет в печени и обеспечивать стимулирование ВГВ–специфических CD8⁺ Т клеточных ответов после вакцинотерапии. Сильный CD8⁺ эффекторный Т–клеточный ответ связан с выведением вируса из организма и функциональным излечением (смотри, например, Thimme et al., 2003. J. Virol. 77:68–76, и Backes et al., 2016. Vaccine. 34:923–932).

РНК также выделяли из печени, и уровни суммарной РНК ВГВ и ВГВ 3,5 т.п.н. транскрипта обнаруживали, применяя способ Yan, 2012 и нормализовали к экспрессии GAPDH. Обработка мышей миРНК ВГВ или ВГВ–кшРНК перед введением вакцины приводила в результате к значительному снижению суммарной РНК ВГВ и ВГВ 3,5 т.п.н. транскрипта по сравнению с контролем с имитационной обработкой (фигуры 6А и 6В). Значительного изменения суммарной РНК ВГВ и ВГВ 3,5 т.п.н. транскрипта не наблюдали у мышей, обработанных энтекавиром или контрольной миРНК перед вакцинацией по сравнению с контролем с имитационной обработкой. Данные показывают, что и миРНК ВГВ и кшРНК, в противоположность контрольной группе и группе с энтекавиром, с успехом приводили к снижению уровней транскрипта ВГВ.

Кроме того, экспрессию антигенов ВГВ в печени анализировали иммуногистохимическим окрашиванием на HBc срезов печени и подсчетом HBc положительных клеток на мм² (фигура 6С). Только группы с животными, предварительно обработанными ВГВ миРНК или кшРНК, но не энтекавиром или контрольной миРНК, показали сниженную HBc экспрессию после вакцинации.

Во всем эксперименте, отслеживали вес тела и уровни АЛТ. Значительных различий не наблюдали в любой из групп обработки по сравнению с контролем с имитационной обработкой.

Пример 4 – оценка эффекта продолжительности нокдауна антигена ВГВ на ответ на иммунизацию в ВГВ модели трансгенных мышей

Продemonстрировав, что подавление экспрессии антигенов ВГВ, применяя кшРНК или миРНК, является эффективным для потенцирования иммунного ответа на режим вакцинации против ВГВ, исследование планировали для определения того, имела ли продолжительность подавления антигенов ВГВ эффект на потенцирование ВГВ иммунного ответа. Схема обработки показана на фигуре 7.

Применяя HBV1.3xfs мышиную модель, мышей обрабатывали в течение восьми, шести или трех недель миРНК ВГВ AD-66816 (модифицированная) или контрольной миРНК в течение 8 недель, вводимых подкожно при 3 мг/кг/доза. За введением миРНК следовало введение прайм-буст вакцины, как представлено выше, за исключением того, что к-ди-АМФ применяли в качестве адъюванта с введением белка, а не РСЕР+CPG (n=6 на группу). Следовательно, мыши в 8 недельной группе (n=6) получали три дозы миРНК, причем третью дозу вводили в первый день введения вакцины. Мыши в 6 недельной группе (n=12) получали две дозы миРНК, причем вторую дозу вводили за две недели перед первым днем введения вакцины. Наконец, мыши в 3 недельной группе (n=6) получали одну дозу миРНК, причем дозу вводили за три недели до первого дня введения вакцины.

Образцы крови собирали в первый день –8 недели, –6 недели, –4 недели, –2 недели, 0 недели, 2 недели, 4 недели и 6 недель, перед (отрицательные числа) и после первой дозы вакцины в первый день недели 0. Сыворотку получали, и уровни HBsAg, HBeAg и ДНК ВГВ оценивали, как описано выше.

Значительное снижение каждого из HBsAg, HBeAg и ДНК ВГВ наблюдали после первого введения AD-66816 (фигуры 8А–8С). Дополнительное значительное снижение HBsAg наблюдали после обработки буст вакциной, причем наибольшее снижение наблюдали в группе с 8 недельной предобработкой ниже уровня детекции анализа, представляя более чем 5 log₁₀ снижение уровня HBsAg для всех обработанных животных. Иммунизация вызывала только небольшое дополнительное снижение (<0,5 log₁₀) ДНК ВГВ, которая значительно снижалась обработкой миРНК. Дополнительное снижение уровней HBeAg не наблюдали в ответ на режим вакцинации.

Данные показывают, что эффективность вакцинотерапии коррелирует с продолжительностью подавления антигенов перед началом вакцинации. Восстановление ВГВ-специфических CD8⁺ Т клеточных ответов требует нескольких недель, с 6 или предпочтительно 8 недельной предобработкой, а не 3 недельной предобработкой.

В последний день эксперимента, в первый день недели 6 после начала иммунизации, мышей умерщвляли и собирали их печени для шести мышей для каждой группы. Ассоциированные с печенью лимфоциты выделяли, и анализ со стимуляцией

лимфоцитов проводили, как представлено выше. Конкретно, внутрипеченочные CD8⁺ Т-клеточные ответы оценивали на ответ на HBsAg, HBcAg и частицы вируса MVA, применяя способ, предоставленный в Backes, 2016. Т-клеточные ответы на HBsAg и HBcAg в печени соотносились с длительностью нокдауна антигенов ВГВ, причем тенденция более высоких уровней иммунного ответа наблюдается при большей продолжительности действия антигена ВГВ, что приводит к большей Т-клеточной реакции (смотри фигуры 9А–9С). Аналогичные ответы на антигены вируса MVA наблюдали во всех группах, независимо от предобработки, показывая, что вакцинация работала одинаково хорошо на всех животных и не находилась под влиянием уровней антигена ВГВ, демонстрирующих наличие компетентной иммунной системы (фигура 9D). Не наблюдалось существенных различий в выработке антител между животными, получавшими контрольную миРНК, и любой из других групп. Это демонстрирует, что восстановление ВГВ-специфических CD8⁺ Т-клеточных ответов происходит не сразу, причем более сильные ответы наблюдают после вакцинотерапии, если животные имели пониженные титры антигенов ВГВ в течение по меньшей мере 6 или 8 недель по сравнению только с 3 неделями. Это также подтверждает предыдущий вывод о том, что, в противоположность Т-клеточным ответам, В-клеточный иммунитет, по-видимому, не подвержен значительному влиянию титров антигенов ВГВ.

РНК также выделяли из печени, и уровни суммарной РНК ВГВ и ВГВ 3,5 т.п.н. транскрипта детектировали, применяя способ Яна 2012, и нормализовали к экспрессии GAPDH. Обработка мышей миРНК ВГВ AD-66816 перед введением вакцины приводила к значительному снижению суммарной РНК ВГВ и ВГВ 3,5 т.п.н. транскрипта в лизатах печени по сравнению с контролем, обработанным контрольной миРНК (фигуры 10А и 10В). Кроме того, экспрессию антигенов ВГВ в печени анализировался иммуногистохимическим окрашиванием и подсчетом HBc положительных клеток на мм² (фигура 10С). Коррелируя наблюдаемое увеличение ВГВ-специфических CD8-ответов с увеличенной продолжительностью предварительной обработки миРНК, в печени наблюдали сниженные количества клеток, экспрессирующих HBc. Данные результаты демонстрируют, что клеточные ответы CD8⁺ Т действительно предотвращали экспрессию антигенов в печени.

Чтобы оценить продолжительность ответа, образцы крови собирали у мышей, предварительно обработанных AD-66816 миРНК ВГВ, применяя шестинедельный режим обработки через 2 и 3 недели после проведения буст вакцинации (фигуры 11А–11D). У трех из шести мышей уровень HBsAgс продолжал снижаться ниже уровня обнаружения анализа (фигура 11А). В ходе эксперимента аналогичного снижения уровней HBcAg не наблюдали (Фигура 11В). Данные показывают, что максимальный эффект от комбинированной терапии миРНК и вакцинации, относящейся к настоящему изобретению, наступает через 1 неделю после вакцинации MVA, которая была выбрана в качестве момента окончания для наилучшей оценки CD8⁺ Т клеточных ответов. Анти-HBs гуморальный ответ (фигура 11С) и Т-клеточный иммунный ответ в печени на HBs

(S208) (фигура 11D) на 7-й неделе после первой дозы вакцины после 6-недельного режима в режиме дозирования. Гуморальный ответ варьировался среди животных.

Данные показывают, что функциональное излечение является возможным, применяя режимы лечения, относящиеся к настоящему изобретению. Кроме того, данные предполагают, что меньшая нагрузка HBsAg и HBeAg может приводить в результате к большим уровням иммунного клиренса антигенов ВГВ и потенцировать иммунный ответ, по меньшей мере, в течение короткой продолжительности эксперимента.

Во всем эксперименте, отслеживали вес тела и уровни АЛТ. Значительных различий не наблюдали в любой из групп обработки по сравнению с контролем с имитационной обработкой.

Пример 5 – оценка эффекта продолжительности нокдауна антигенов ВГВ на реакцию на иммунизацию в AAV–ВГВ мышинной модели

Продемонстрировав эффективность комбинированного режима обработки миРНК–вакцина в модели трансгенных мышей, мышиную модель AAV–ВГВ инфекции применяли для исследования эффективности режима лечения в модели с приобретенной инфекцией (смотри, например, Yang, et al. (2014) Cell Mol Immunol 11:71). Данная мышинная модель показывает сохраняемую ВГВ вирусность после заражения рекомбинантным адено–ассоциированным вирусом (AAV), несущим реплицируемый ВГВ геном.

Есть ряд различий между моделями ВГВ–трансгенных и AAV–ВГВ мышей. Трансгенные ВГВ мыши могут экспрессировать антиген ВГВ по существу с рождения, тогда как модель AAV–ВГВ позволяет вводить геном ВГВ на более позднем этапе жизни мышей. Это может повлиять на иммунную толерантность. Кроме того, трансгенные мыши ВГВ переносят трансген в каждую клетку организма, обеспечивая возможность «протекающей» внепеченочной экспрессии. Хотя серотип AAV8 может инфицировать клетки вне печени, он имеет сильный печеночный тропизм. Более того, невозможно удалить инфекцию ВГВ у трансгенной мыши. Когда трансгенная ВГВ–экспрессирующая клетка печени погибает, она заменяется новой ВГВ–экспрессирующей клеткой. В модели инфекции, если инфицированные клетки погибают, новые делящиеся клетки не инфицируются во время деления клеток.

Девятинедельных мышей C57/B16 заражали AAV–ВГВ (–28 день). Затем, мышей обрабатывали одной из контрольных миРНК или одной из двух миРНК ВГВ, модифицированной AD–66816 или модифицированной AD–66810, в дозе 3 мг/кг, вводимой подкожно в дни 0, 29 и 57 (т.е. 0 неделя, 4 неделя, 8 неделя) (n=12 на группу). Каждая группа обработки миРНК была разделена на две группы (n=6 на группу). Одну группу обрабатывали по протоколу вакцинации ВГВ (белковый прайм в дни 57 и 70, и MVA буст в день 84, то есть недели 8, 10 и 12, соответственно), и одну группу не обрабатывали. Схема, показывающая режим дозирования, представлена на фигуре 12. На протяжении всего эксперимента мышей контролировали на наличие HBsAg в сыворотке, HBeAg, анти–HBs антител, массу тела и АЛТ. Также периодически тестировали уровни

анти-НВс-антител.

Фигуры 13А и 13В показывают увеличение уровней HBsAg и HBeAg, сопоставимое с уровнями, наблюдаемыми у трансгенных мышей в течение двух недель после трансдукции вирусом AAV-ВГВ. Мыши, обработанные только контрольной миРНК, реплицировали ВГВ в течение более 8 месяцев при уровнях, сравнимых с хронически инфицированными людьми (уровень HBsAg около 2000 МЕ/мл, виремия ВГВ 10^6 – 10^7 МЕ/мл). ВГВ миРНК AD-66816 и AD-66810 снижали HBsAg на 2 и 2,5 $\log_{10}$, соответственно, а HBeAg на $\geq 1 \log_{10}$. Эффект сохранялся, по меньшей мере, через 4 недели после прекращения обработки миРНК до того, как антигенемия медленно восстанавливалась до исходных уровней через 18 недель (фигуры 13А и 13В).

Внутрипеченочные уровни ДНК ВГВ (фигура 13D) и ДНК AAV (фигура 13E) на 22 неделе определяли кПЦР, как описано выше. Относительную экспрессию в печени ВГВ 3,5 РНК относительно GAPDH РНК (фигура 13F) и суммарной РНК ВГВ относительно GAPDH РНК (фигура 13G) определяли ПЦР в реальном времени. Мыши, обрабатываемые комбинированным протоколом миРНК-вакцина, демонстрировали значительное снижение количества суммарной ДНК ВГВ и ДНК AAV по сравнению с контролем без обработки или обработкой миРНК или вакциной отдельно на 22 неделе (фигуры 13D и 13E). Примечательно, что в результате комбинированной обработки уровни суммарной ДНК ВГВ снижались до менее чем одной копии на клетку (фигура 13D). Мыши, обработанные комбинированным протоколом миРНК-вакцина, также демонстрировали значительное снижение уровня экспрессии 3,5 т.п.н. РНК ВГВ относительно экспрессии РНК GAPDH по сравнению со всеми другими режимами обработки (фигура 13F). Значительное снижение суммарной РНК ВГВ относительно экспрессии РНК GAPDH наблюдалась по сравнению с обработкой только вакциной или миРНК (фигура 13G). Данные свидетельствуют о том, что короткий курс введения только миРНК или терапевтической вакцины против ВГВ является недостаточным для длительного подавления инфекции ВГВ. Иммуноопосредованный контроль ВГВ после миРНК нокдауна экспрессии ВГВ является длительным. Через 22 недели после последней дозы миРНК эффект миРНК уменьшался, как это наблюдалось в группах, которые получали только ВГВ миРНК без вакцинации. Мыши, обрабатываемые протоколом миРНК-вакцина, сохраняли подавление ДНК и РНК ВГВ в течение длительного времени после окончания введения миРНК.

Иммунные ответы не наблюдали для данных полностью иммунокомпетентных мышей при обработке только миРНК, но обработка вакциной приводила в результате к анти-НВс сероконверсии для всех вакцинированных животных (фигуры 14А и 14В). Однако животные, предварительно обработанные миРНК, обнаруживали в 10 раз большие и более постоянные титры анти-НВс и были способны полностью и постоянно удалять сывороточные HBsAg и HBeAg. Напротив, анти-НВс сероконверсия наблюдалась только на животных, предварительно обработанных миРНК ВГВ. Интересно, что трое из 12 мышей, вакцинированных после обработки миРНК ВГВ, показали временный рецидив

HBeAg между неделями 15 и 22 в сочетании с пониженными уровнями анти-HBe (фигура 13С). Будучи не связанными механизмом, предполагают, что рецидив HBeAg контролировался иммунологической памятью, вызванной вакциной. Взятые вместе, подавление экспрессии антигенов миРНК ВГВ в комбинации с гетерологической прайм-буст вакциной являются достаточными для подавления иммунной толерантности к антигенам ВГВ. Последовательная терапия достигала долгосрочного функционального излечения в мышинной модели персистирующей инфекции ВГВ без значительного повреждения печени.

Фигуры 14А и 14В показывают, что животные, обработанные режимом миРНК ВГВ плюс вакцина, обнаруживали высокие титры анти-HBs антитела и анти-HBe антитела. Уровень анти-HBs антитела продолжал увеличиваться после последней дозы вакцины. Хотя анти-HBs антитела можно также измерить на животных, которые получали режим контрольной миРНК плюс вакцина, уровни были значительно меньшими. Кроме того, только животные, которые получали режим миРНК ВГВ плюс вакцина, обнаруживали анти-HBe антитела и достигали сероконверсии анти-HBe. Комбинированная терапия, применяя миРНК и вакцину, по-видимому, является хорошо переносимой. Все мыши одинаково набирали вес и наблюдалось только незначительное повышение АЛТ (<2-кратный верхний предел нормы) (фигуры 15А и 15В). Потеря антигенемии совпала с небольшим увеличением активности АЛТ, наблюдаемым в группах, получавших ВГВ миРНК в сочетании с режимом вакцинации (фигура 15А). В этих группах наблюдалось значительное, но умеренное увеличение (оба $p > 0,05$ или меньше при повторном измерении двухфакторным дисперсионным анализом; сравнивая только временные точки после начала вакцинации) по сравнению со всеми другими группами обработки, которые не получали комбинированный режим миРНК ВГВ-вакцина. В течение всего эксперимента наблюдалось устойчивое увеличение массы тела у всех животных, независимо от обработки миРНК. Животные, которые были вакцинированы, показали небольшое и кратковременное снижение (приблизительно 5%) массы тела после вакцинации, но восстанавливались до нормальных уровней в течение девяти дней и впоследствии набирали вес, сопоставимый с контрольными группами (фигура 15В).

Будучи не связанными механизмом, данные, относящиеся к настоящему изобретению, дают веские основания предполагать, что высокий уровень экспрессии антигенов ВГВ, обычно определяемых как циркулирующие HBsAg и HBeAg, предотвращает ВГВ-специфические CD8⁺ Т клеточные ответы, что имеет далеко идущие последствия для будущей иммунотерапии хронического гепатита В. Применяя две разные мышинных модели хронического гепатита В, предполагается, что ВГВ-специфическую иммуномодуляцию можно обратить подавлением экспрессии белков ВГВ в гепатоцитах, применяя терапию на основе РНКи. Данное снижение антигенов ВГВ РНКи, в отличие от нуклеозидных (нуклеотидных) аналогов, обеспечивающих стандартную медицинскую помощь, позволяет индуцировать сильные ВГВ-специфичные CD8⁺ Т-клеточные ответы

вакцинотерапией, которые необходимы для контроля инфекции ВГВ.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица 1. Сокращения нуклеотидных мономеров, применяемых в представлении последовательностей нуклеиновых кислот. Ясно, что, если не указано иначе, данные мономеры, при присутствии в олигонуклеотиде, соединены между собой 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Сокращение	Нуклеотид(нуклеотиды)
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'-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
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
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

Сокращение	Нуклеотид(нуклеотиды)
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфотиоат
s	Фосфотиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)амидододеканоил)]-4-гидроксипролинол Нур-(GalNAc-алкил)3
(dT)	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
Y34	2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (2'-OMe фураноза без нуклеинового основания)
Y44	2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-5-фосфат
(Agn)	Аденозингликоль нуклеиновая кислота (GNA)
(Tgn)	Тимидингликоль нуклеиновая кислота (GNA) S-изомер
(Cgn)	Цитидингликоль нуклеиновая кислота (GNA)
P	Фосфат
V	винилфосфат

Таблица 2. Примеры немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи ВГВ дцРНК (данные по активности доступны в WO2016/077321, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO	Название антисмыслового олигонуклеотида	Антисмысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:	Положение в NC_003977.1
AD-61522	A-123463	AGUUAUUAU GGAUGAUG UGGUA	47	A-123464	UACCACAUCA UCCAUAUAAC UGA	263	731_753
AD-61547	A-123487	GGAUGUGU CUGCGGCG UUUUA	48	A-123488	UAAAACGCCG CAGACACAUC CAG	264	373_395
AD-63938	A-127896	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	49	A-127897	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	265	250_272

AD- 63939	A- 127909	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	50	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	266	250_272
AD- 63940	A- 127917	ACUCGUGG UGGACUUC TCUCA	51	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	267	250_272
AD- 63941	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	52	A-127925	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	268	250_272
AD- 63942	A- 127933	UCGUGGUG GACUUCUC UCA	53	A-127934	UGAGAGAAGU CCACCACGAG U	269	252_274
AD- 63943	A- 127944	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	54	A-127942	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	270	250_272
AD- 63945	A- 127910	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	55	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	271	250_272
AD- 63946	A- 127918	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	56	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	272	250_272
AD- 63947	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	57	A-127926	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	273	250_272
AD- 63948	A- 127935	GUGGUGGA CUUCUCUC A	58	A-127936	UGAGAGAAGU CCACCACGA	274	254_276
AD- 63949	A- 127944	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	59	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	275	250_272
AD- 63950	A- 127900	UCGUGGUG GACUUCUC UCAUU	60	A-127901	UGAGAGAAGU CCACCACGAU U	276	252_274
AD-	A-	ACUCGUGG	61	A-127906	UGAGAGAAGU	277	250_272

63951	127911	UGGACUUC UCUCA			CCACCACGAG UCU		
AD- 63952	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	62	A-127919	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	278	250_272
AD- 63953	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	63	A-127927	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	279	250_272
AD- 63955	A- 127945	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	64	A-127940	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	280	250_272
AD- 63956	A- 127902	UCGUGGUG GACUUCUC UCA	65	A-127903	UGAGAGAAGU CCACCACGAU U	281	252_274
AD- 63957	A- 127912	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	66	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	282	250_272
AD- 63958	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	67	A-127920	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	283	250_272
AD- 63959	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	68	A-127928	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	284	250_272
AD- 63960	A- 126619	UAUUUCCU AGGGUACA A	69	A-127938	UGAGAGAAGU CCACCACGA	285	254_276
AD- 63961	A- 127945	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	70	A-127942	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	286	250_272
AD- 63962	A- 127902	UCGUGGUG GACUUCUC UCA	71	A-127904	UGAGAGAAGU CCACCACGAU U	287	252_274
AD- 63963	A- 127913	ACUCGUGG UGGACUUC	72	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG	288	250_272

		UCUCA			UCU		
AD- 63964	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	73	A-127921	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	289	250_272
AD- 63965	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	74	A-127929	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	290	250_272
AD- 63966	A- 127939	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	75	A-127940	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	291	250_272
AD- 63967	A- 127945	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	76	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	292	250_272
AD- 63968	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	77	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	293	250_272
AD- 63968	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	78	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	294	250_272
AD- 63968	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	79	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	295	250_272
AD- 63969	A- 127914	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	80	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	296	250_272
AD- 63970	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	81	A-127922	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	297	250_272
AD- 63971	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	82	A-127930	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	298	250_272
AD- 63972	A- 127941	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	83	A-127942	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	299	250_272

AD- 63973	A- 127946	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	84	A-127947	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	300	250_272
AD- 63975	A- 127915	ACUCGUGG UGGACUUC TCUCA	85	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	301	250_272
AD- 63976	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	86	A-127923	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	302	250_272
AD- 63977	A- 127917	ACUCGUGG UGGACUUC TCUCA	87	A-127931	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	303	250_272
AD- 63978	A- 127943	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	88	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	304	250_272
	A- 127908	AD-63979	89	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	305	250_272
AD- 63980	A- 127916	ACUCGUGG UGGACUUC TCUCA	90	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	306	250_272
AD- 63981	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	91	A-127924	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	307	250_272
AD- 63982	A- 127917	ACUCGUGG UGGACUUC TCUCA	92	A-127932	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	308	250_272
AD- 63983	A- 127944	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	93	A-127940	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	309	250_272
AD- 63985	A- 127961	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	94	A-127956	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	310	254_276
AD-	A-	GUGGUGGA	95	A-127956	AAAUUGAGAG	311	254_276

63986	127969	CUUCUCUC AAUUU			AAGUCCACCA CGA		
AD- 63987	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	96	A-127977	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	312	254_276
AD- 63988	A- 127986	UGGACUUC UCUCAAUU U	97	A-127987	AAAUUGAGAG AAGUCCACC	313	258_280
AD- 63989	A- 127996	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	98	A-127992	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	314	254_276
AD- 63990	A- 127950	GGUGGACU UCUCUCA UUUUU	99	A-127951	AAAUUGAGAG AAGUCCACCU U	315	256_278
AD- 63991	A- 127962	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	100	A-127956	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	316	254_276
AD- 63992	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	101	A-127970	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	317	254_276
AD- 63993	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	102	A-127978	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	318	254_276
AD- 63994	A- 127984	GGUGGACU UCUCUCA UUU	103	A-127988	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA C	319	256_278
AD- 63995	A- 127996	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	104	A-127993	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	320	254_276
AD- 63996	A- 127952	GGUGGACU UCUCUCA UUU	105	A-127953	AAAUUGAGAG AAGUCCACCU U	321	256_278
AD- 63997	A- 127963	GUGGUGGA CUUCUCUC	106	A-127956	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA	322	254_276

		AAUUU			CGA		
AD- 63999	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	107	A-127979	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	323	254_276
AD- 64000	A- 127986	UGGACUUC UCUCAAUU U	108	A-127989	AAAUUGAGAG AAGUCCACC	324	258_280
AD- 64001	A- 127996	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	109	A-127994	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	325	254_276
AD- 64002	A- 127952	GGUGGACU UCUCUCA UUU	110	A-127954	AAAUUGAGAG AAGUCCACCU U	326	256_278
AD- 64003	A- 127964	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	111	A-127956	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	327	254_276
AD- 64004	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	112	A-127972	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	328	254_276
AD- 64005	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	113	A-127980	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	329	254_276
AD- 64006	A- 127990	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	114	A-127991	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	330	254_276
AD- 64007	A- 127996	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	115	A-127995	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	331	254_276
AD- 64008	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	116	A-127956	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	332	254_276
AD- 64008	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	117	A-127956	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	333	254_276

AD- 64009	A- 127965	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	118	A-127956	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	334	254_276
AD- 64010	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	119	A-127973	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	335	254_276
AD- 64011	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	120	A-127981	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	336	254_276
AD- 64012	A- 127990	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	121	A-127992	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	337	254_276
AD- 64013	A- 127997	GUGGUGGA CTTCUCUCA AUUU	122	A-127998	AAAUUGAGAG AAGTCCACCA CGA	338	254_276
AD- 64014	A- 127957	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	123	A-127958	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	339	254_276
AD- 64015	A- 127966	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	124	A-127956	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	340	254_276
AD- 64016	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	125	A-127974	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	341	254_276
AD- 64017	A- 127968	GUGGUGGA CUTCUCUCA AUUU	126	A-127982	AAAUUGAGAG AAGTCCACCA CGA	342	254_276
AD- 64018	A- 127990	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	127	A-127993	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	343	254_276
AD- 64019	A- 127959	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	128	A-127956	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	344	254_276
AD-	A-	GUGGUGGA	129	A-127956	AAAUUGAGAG	345	254_276

64020	127967	CUUCUCUC AAUUU			AAGUCCACCA CGA		
AD- 64021	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	130	A-127975	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	346	254_276
AD- 64022	A- 127968	GUGGUGGA CUTCUCUCA AUUU	131	A-127983	AAAUUGAGAG AAGTCCACCA CGA	347	254_276
AD- 64023	A- 127990	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	132	A-127994	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	348	254_276
AD- 64024	A- 127960	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	133	A-127956	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	349	254_276
AD- 64025	A- 127968	GUGGUGGA CUTCUCUCA AUUU	134	A-127956	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	350	254_276
AD- 64026	A- 127955	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	135	A-127976	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	351	254_276
AD- 64027	A- 127984	GGUGGACU UCUCUCAA UUU	136	A-127985	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA C	352	256_278
AD- 64028	A- 127990	GUGGUGGA CUUCUCUC AAUUU	137	A-127995	AAAUUGAGAG AAGUCCACCA CGA	353	254_276
AD- 64272	A- 128001	GUGCACUU CGCUUCAC CUCUG	138	A-128002	CAGAGGUGAA GCGAAGUGCA CAC	354	1577_15 99
AD- 64274	A- 128363	GUUGACAA AAAUCCUC ACAAU	139	A-128364	AUUGUGAGGA UUUUUGUCA CAA	355	215_237
AD- 64275	A- 128377	UGUUGACA AAAAUCCU	140	A-128378	UUGUGAGGAU UUUUGUCAAC	356	214_236

		CACAA			AAG		
AD- 64276	A- 128393	GGUGGACU UCUCUCAA UUUUA	141	A-128394	UAAAAUUGAG AGAAGUCCAC CAC	357	256_278
AD- 64277	A- 128407	UCUUUUGG AGUGUGGA UUCGA	142	A-128408	UCGAAUCCAC ACUCCAAAAG ACA	358	2259_22 81
AD- 64277	A- 128407	UCUUUUGG AGUGUGGA UUCGA	143	A-128408	UCGAAUCCAC ACUCCAAAAG ACA	359	2259_22 81
AD- 64278	A- 128423	ACUGUUCA AGCCUCCA AGCUA	144	A-128424	UAGCUUGGAG GCUUGAACAA GAC	360	1857_18 79
AD- 64279	A- 128435	UCUGCCGA UCCAUACU GCGGA	145	A-128436	UCCGCAGUAU GGAUCGGCAG AGG	361	1255_12 77
AD- 64280	A- 128379	AUGUGUCU GCGGCGUU UUAUA	146	A-128380	UAUAAAACGC CGCAGACACA UCC	362	375_397
AD- 64281	A- 128395	CCCCGUCU GUGCCUUC UCAUA	147	A-128396	UAUGAGAAGG CACAGACGGG GAG	363	1545_15 67
AD- 64282	A- 128409	GCCUAAUC AUCUCUUG UUCAU	148	A-128410	AUGAACAAGA GAUGAUUAGC GAG	364	1831_18 53
AD- 64283	A- 128425	UCUAGACU CGUGGUGG ACUUC	149	A-128426	GAAGUCCACC ACGAGUCUAG ACU	365	245_267
AD- 64284	A- 128437	CUGCCGAU CCAUACUG CGGAA	150	A-128438	UUCCGCAGUA UGGAUCGGCA GAG	366	1256_12 78
AD- 64285	A- 128365	UUUUUCUU GUUGACAA AAAUA	151	A-128366	UAUUUUUGUC AACAAGAAAA ACC	367	207_229

AD- 64286	A- 128381	AUCUUCUU GUUGGUUC UUCUA	152	A-128382	UAGAAGAACC AACAAGAAGA UGA	368	426_448
AD- 64289	A- 128367	GUUUUUCU UGUUGACA AAAAU	153	A-128368	AUUUUUGUCA ACAAGAAAAA CCC	369	206_228
AD- 64290	A- 128383	CUGCCUAA UCAUCUCU UGUUA	154	A-128384	UAACAAGAGA UGAUUAGGCA GAG	370	1829_18 51
AD- 64291	A- 128399	UCCUCACA AUACCACA GAGUA	155	A-128400	UACUCUGUGG UAUUGUGAGG AUU	371	226_248
AD- 64292	A- 128413	CUUGUUGA CAAAAUC CUCAA	156	A-128414	UUGAGGAUUU UUGUCAACAA GAA	372	212_234
AD- 64293	A- 128439	GCAACUUU UUCACCUC UGCCU	157	A-128440	AGGCAGAGGU GAAAAAGUUG CAU	373	1814_18 36
AD- 64294	A- 128369	GGGAACAA GAGCUACA GCAUA	158	A-128370	UAUGCUGUAG CUCUUGUUCC CAA	374	2828_28 50
AD- 64295	A- 128385	CGUGGUGG ACUUCUCU CAAUU	159	A-128386	AAUUGAGAGA AGUCCACCAG CAG	375	253_275
AD- 64297	A- 128415	CUGCUGCU AUGCCUCA UCUUA	160	A-128416	UAAGAUGAGG CAUAGCAGCA GGA	376	411_433
AD- 64298	A- 128427	GUUGGAUG UGUCUGCG GCGUU	161	A-128428	AACGCCGCAG ACACAUCCAA CGA	377	370_392
AD- 64299	A- 128441	UUCAUCCU GCUGCUAU GCCUA	162	A-128442	UAGGCAUAGC AGCAGGAUGA AGA	378	405_427
AD-	A-	UUCUUGUU	163	A-128372	UAGGAUUUUU	379	210_232

64300	128371	GACAAAAA UCCUA			GUCAACAAGA AAA		
AD- 64302	A- 128417	UAUAUGGA UGAUGUGG UAUUA	164	A-128418	UAAUACCACA UCAUCCAUAU AAC	380	734_756
AD- 64303	A- 128429	UUCAUCCU GCUGCUAU GCCUC	165	A-128430	GAGGCAUAGC AGCAGGAUGA AGA	381	405_427
AD- 64304	A- 128443	GUGCACUU CGCUUCAC CUCUA	166	A-128444	UAGAGGUGAA GCGAAGUGCA CAC	382	1577_15 99
AD- 64305	A- 128373	UUGACAAA AAUCCUCA CAAUA	167	A-128374	UAUUGUGAGG AUUUUUGUCA ACA	383	216_238
AD- 64307	A- 128403	AAGCCUCC AAGCUGUG CCUUA	168	A-128404	UAAGGCACAG CUUGGAGGCU UGA	384	1864_18 86
AD- 64308	A- 128419	CCUCUUCA UCCUGCUG CUAUA	169	A-128420	UAUAGCAGCA GGAUGAAGAG GAA	385	401_423
AD- 64309	A- 128431	CCUGCUGC UAUGCCUC AUCUU	170	A-128432	AAGAUGAGGC AUAGCAGCAG GAU	386	410_432
AD- 64310	A- 128375	CAUCUUCU UGUUGGUU CUUCU	171	A-128376	AGAAGAACCA ACAAGAAGAU GAG	387	425_447
AD- 64311	A- 128391	CCGUCUGU GCCUUCUC AUCUA	172	A-128392	UAGAUGAGAA GGCACAGACG GGG	388	1547_15 69
AD- 64312	A- 128405	CCUCAUCU UCUUGUUG GUUCU	173	A-128406	AGAACCAACA AGAAGAUGAG GCA	389	422_444
AD- 64313	A- 128421	CCACCAAA UGCCCCUA	174	A-128422	UAAGAUAGGG GCAUUUGGUG	390	2298_23 20

		UCUUA			GUC		
AD- 64314	A- 128433	GCUCCUCU GCCGAUCC AUACU	175	A-128434	AGUAUGGAUC GGCAGAGGAG CCA	391	1250_12 72
AD- 64315	A- 128363	GUUGACAA AAAUCCUC ACAAU	176	A-128445	AUUGUGAGGA UUUUUGUCAA CAA	392	215_237
AD- 64316	A- 128377	UGUUGACA AAAAUCCU CACAA	177	A-128453	UUGUGAGGAU UUUUGUCAAC AAG	393	214_236
AD- 64317	A- 128393	GGUGGACU UCUCUCAA UUUUA	178	A-128461	UAAAAUUGAG AGAAGUCCAC CAC	394	256_278
AD- 64318	A- 128407	UCUUUUGG AGUGUGGA UUCGA	179	A-128469	UCGAAUCCAC ACUCCAAAAG ACA	395	2259_22 81
AD- 64318	A- 128407	UCUUUUGG AGUGUGGA UUCGA	180	A-128469	UCGAAUCCAC ACUCCAAAAG ACA	396	2259_22 81
AD- 64319	A- 128423	ACUGUUCA AGCCUCCA AGCUA	181	A-128477	UAGCUUGGAG GCUUGAACAA GAC	397	1857_18 79
AD- 64320	A- 128435	UCUGCCGA UCCAUAUCU GCGGA	182	A-128483	UCCGCAGUAU GGAUCGGCAG AGG	398	1255_12 77
AD- 64321	A- 123463	AGUUAUAU GGAUGAUG UGGUA	183	A-128446	UACCACAUCA UCCAUAUAAC UGA	399	731_753
AD- 64322	A- 128379	AUGUGUCU GCGGCGUU UUAUA	184	A-128454	UAUAAAACGC CGCAGACACA UCC	400	375_397
AD- 64323	A- 128395	CCCCGUCU GUGCCUUC UCAUA	185	A-128462	UAUGAGAAGG CACAGACGGG GAG	401	1545_15 67

AD- 64324	A- 128409	GCCUAAUC AUCUCUUG UUCAU	186	A-128470	AUGAACAAGA GAUGAUUAGC GAG	402	1831_18 53
AD- 64325	A- 128425	UCUAGACU CGUGGUGG ACUUC	187	A-128478	GAAGUCCACC ACGAGUCUAG ACU	403	245_267
AD- 64326	A- 128437	CUGCCGAU CCAUACUG CGGAA	188	A-128484	UUCCGCAGUA UGGAUCGGCA GAG	404	1256_12 78
AD- 64328	A- 128381	AUCUUCUU GUUGGUUC UUCUA	189	A-128455	UAGAAGAACC AACAAGAAGA UGA	405	426_448
AD- 64330	A- 128411	UUCUCUCA AUUUUCUA GGGGA	190	A-128471	UCCCCUAGAA AAUUGAGAGA AGU	406	263_285
AD- 64331	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	191	A-127907	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	407	250_272
AD- 64332	A- 128001	GUGCACUU CGCUUCAC CUCUG	192	A-128485	CAGAGGUGAA GCGAAGUGCA CAC	408	1577_15 99
AD- 64333	A- 128367	GUUUUUCU UGUUGACA AAAAU	193	A-128448	AUUUUUGUCA ACAAGAAAAA CCC	409	206_228
AD- 64334	A- 128383	CUGCCUAA UCAUCUCU UGUUA	194	A-128456	UAACAAGAGA UGAUUAGGCA GAG	410	1829_18 51
AD- 64335	A- 128399	UCCUCACA AUACCACA GAGUA	195	A-128464	UACUCUGUGG UAUUGUGAGG AUU	411	226_248
AD- 64336	A- 128413	CUUGUUGA CAAAAUC CUCAA	196	A-128472	UUGAGGAUUU UUGUCAACAA GAA	412	212_234
AD-	A-	GUGGUGGA	197	A-127958	AAAUUGAGAG	413	254_276

64337	127955	CUUCUCUC AAUUU			AAGUCCACCA CGA		
AD- 64338	A- 128439	GCAACUUU UUCACCUC UGCCU	198	A-128486	AGGCAGAGGU GAAAAAGUUG CAU	414	1814_18 36
AD- 64339	A- 128369	GGGAACAA GAGCUACA GCAUA	199	A-128449	UAUGCUGUAG CUCUUGUUCC CAA	415	2828_28 50
AD- 64341	A- 128401	UCAUCUUC UUGUUGGU UCUUA	200	A-128465	UAAGAACCAA CAAGAAGAUG AGG	416	424_446
AD- 64342	A- 128415	CUGCUGCU AUGCCUCA UCUUA	201	A-128473	UAAGAUGAGG CAUAGCAGCA GGA	417	411_433
AD- 64343	A- 128427	GUUGGAUG UGUCUGCG GCGUU	202	A-128479	AACGCCGCAG ACACAUCCAA CGA	418	370_392
AD- 64344	A- 128441	UUCAUCCU GCUGCUAU GCCUA	203	A-128487	UAGGCAUAGC AGCAGGAUGA AGA	419	405_427
AD- 64345	A- 128371	UUCUUGUU GACAAAAA UCCUA	204	A-128450	UAGGAUUUUU GUCAACAAGA AAA	420	210_232
AD- 64347	A- 123487	GGAUGUGU CUGCGGCG UUUUA	205	A-128466	UAAAACGCCG CAGACACAUC CAG	421	373_395
AD- 64348	A- 128417	UAUAUGGA UGAUGUGG UAUUA	206	A-128474	UAAUACCACA UCAUCCAUAU AAC	422	734_756
AD- 64349	A- 128429	UUCAUCCU GCUGCUAU GCCUC	207	A-128480	GAGGCAUAGC AGCAGGAUGA AGA	423	405_427
AD- 64350	A- 128443	GUGCACUU CGCUUCAC	208	A-128488	UAGAGGUGAA GCGAAGUGCA	424	1577_15 99

		CUCUA			CAC		
AD- 64351	A- 128373	UUGACAAA AAUCCUCA CAAUA	209	A-128451	UAUUGUGAGG AUUUUUGUCA ACA	425	216_238
AD- 64352	A- 128389	CCAAGUGU UUGCUGAC GCAAA	210	A-128459	UUUGCGUCAG CAAACACUUG GCA	426	1174_11 96
AD- 64352	A- 128389	CCAAGUGU UUGCUGAC GCAAA	211	A-128459	UUUGCGUCAG CAAACACUUG GCA	427	1174_11 96
AD- 64353	A- 128403	AAGCCUCC AAGCUGUG CCUUA	212	A-128467	UAAGGCACAG CUUGGAGGCU UGA	428	1864_18 86
AD- 64354	A- 128419	CCUCUUCA UCCUGCUG CUAUA	213	A-128475	UAUAGCAGCA GGAUGAAGAG GAA	429	401_423
AD- 64355	A- 128431	CCUGCUGC UAUGCCUC AUCUU	214	A-128481	AAGAUGAGGC AUAGCAGCAG GAU	430	410_432
AD- 64356	A- 128375	CAUCUUCU UGUUGGUU CUUCU	215	A-128452	AGAAGAACCA ACAAGAAGAU GAG	431	425_447
AD- 64357	A- 128391	CCGUCUGU GCCUUCUC AUCUA	216	A-128460	UAGAUGAGAA GGCACAGACG GGG	432	1547_15 69
AD- 64358	A- 128405	CCUCAUCU UCUUGUUG GUUCU	217	A-128468	AGAACCAACA AGAAGAUGAG GCA	433	422_444
AD- 64359	A- 128421	CCACCAAA UGCCCCUA UCUUA	218	A-128476	UAAGAUAGGG GCAUUUGGUG GUC	434	2298_23 20
AD- 64360	A- 128433	GCUCCUCU GCCGAUCC AUACU	219	A-128482	AGUAUGGAUC GGCAGAGGAG CCA	435	1250_12 72

AD- 64700	A- 129379	ACUCGUGG UGTACUUC UCUCA	220	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	436	250_272
AD- 64701	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	221	A-129387	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	437	250_272
AD- 64702	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	222	A-129395	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	438	250_272
AD- 64703	A- 129376	ACUCGUGG UGGACUUC ACUCA	223	A-129385	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	439	250_272
AD- 64704	A- 129381	ACUCGUGG TGTACUUCA CUCA	224	A-129389	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	440	250_272
AD- 64705	A- 129380	ACUCGUGG UGTACUUC ACUCA	225	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	441	250_272
AD- 64706	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	226	A-129388	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	442	250_272
AD- 64707	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	227	A-129396	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	443	250_272
AD- 64708	A- 129382	ACUCGUGG TGGACUUCT CUCA	228	A-129385	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	444	250_272
AD- 64709	A- 129373	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	229	A-129391	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	445	250_272
AD- 64710	A- 129373	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	230	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	446	250_272
AD-	A-	ACUCGUGG	231	A-127906	UGAGAGAAGU	447	250_272

64711	129381	TGTACUUCA CUCA			CCACCACGAG UCU		
AD- 64712	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	232	A-129389	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	448	250_272
AD- 64713	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	233	A-129397	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	449	250_272
AD- 64714	A- 129384	ACUCGUGG TGGACUUC ACUCA	234	A-129385	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	450	250_272
AD- 64715	A- 129376	ACUCGUGG UGGACUUC ACUCA	235	A-129391	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	451	250_272
AD- 64716	A- 129374	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	236	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	452	250_272
AD- 64717	A- 129382	ACUCGUGG TGGACUUCT CUCA	237	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	453	250_272
AD- 64718	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	238	A-129390	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	454	250_272
AD- 64719	A- 127917	ACUCGUGG UGGACUUC TCUCA	239	A-129385	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	455	250_272
AD- 64720	A- 129381	ACUCGUGG TGTACUUCA CUCA	240	A-129385	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	456	250_272
AD- 64721	A- 129382	ACUCGUGG TGGACUUCT CUCA	241	A-129391	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	457	250_272
AD- 64722	A- 129375	ACUCGUGG UGGACUUC	242	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG	458	250_272

		CUCA			UCU		
AD- 64723	A- 129383	ACUCGUGG UGGACUUC TCUCA	243	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	459	250_272
AD- 64725	A- 127917	ACUCGUGG UGGACUUC TCUCA	244	A-129398	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	460	250_272
AD- 64726	A- 129373	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	245	A-129389	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	461	250_272
AD- 64727	A- 129384	ACUCGUGG TGGACUUC ACUCA	246	A-129391	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	462	250_272
AD- 64728	A- 129376	ACUCGUGG UGGACUUC ACUCA	247	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	463	250_272
AD- 64729	A- 129384	ACUCGUGG TGGACUUC ACUCA	248	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	464	250_272
AD- 64730	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	249	A-129392	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	465	250_272
AD- 64731	A- 129399	ACUCGUGG UGGACUUC TCUCA	250	A-129385	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	466	250_272
AD- 64732	A- 129376	ACUCGUGG UGGACUUC ACUCA	251	A-129389	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	467	250_272
AD- 64733	A- 129381	ACUCGUGG TGTACUUCA CUCA	252	A-129391	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	468	250_272
AD- 64734	A- 129377	ACUCGUGG UGGACUUC CCUCA	253	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	469	250_272

AD- 64735	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	254	A-129385	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	470	250_272
AD- 64736	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	255	A-129393	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	471	250_272
AD- 64737	A- 129399	ACUCGUGG UGGACUUC TCUCA	256	A-129398	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	472	250_272
AD- 64738	A- 129382	ACUCGUGG TGGACUUCT CUCA	257	A-129389	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	473	250_272
AD- 64739	A- 129378	ACUCGUGG UGGACUUC GCUCA	258	A-127906	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	474	250_272
AD- 64740	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	259	A-129386	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	475	250_272
AD- 64741	A- 127905	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	260	A-129394	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	476	250_272
AD- 64742	A- 129373	ACUCGUGG UGGACUUC UCUCA	261	A-129385	UGAGAGAAGT CCACCACGAG UCU	477	250_272
AD- 64743	A- 129384	ACUCGUGG TGGACUUC ACUCA	262	A-129389	UGAGAGAAGU CCACCACGAG UCU	478	250_272

Таблица 3. Примеры модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи ВГВ дцРНК (данные по активности доступны в WO2016/077321, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

Назва ние дуплек са	Назва ние смысл ового олиго	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:	Название антисмыс лового олигонук леотида	Антисмысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
------------------------------	---	--	------------------	---	---	------------------

	нукле отида					
AD– 61522	A– 12346 3	AfsgsUfuAfuAfuGfGf AfuGfaUfgUfgGfuAfL 96	479	A–123464	usAfscCfaCfaUfcA fuccAfuAfuAfaCfu sgsa	694
AD– 61547	A– 12348 7	GfsgsAfuGfuGfuCfUf GfcGfgCfgUfuUfuAfL 96	480	A–123488	usAfsaAfaCfgCfcG fcagAfcAfcAfuCfc sasg	695
AD– 63938	A– 12789 6	Y44ACUCGUGGUG GACUUCUCUCA	481	A–127897	UGAGAGAAGUC CACCACGAGUC U	696
AD– 63939	A– 12790 9	ascsucGfuGfgUfGfGfa CfuucUfcucaL96	482	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccacfcAfcGfaGf uscsu	697
AD– 63940	A– 12791 7	ascsucguggugdGacuuc (Tgn)cucaL96	483	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccacfcAfcGfaGf uscsu	698
AD– 63941	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	484	A–127925	usGfsaGfagaAfguc caCfcAfcgaGfuses u	699
AD– 63942	A– 12793 3	uscsGfuGfgUfGfGfaC fuUfcUfcUfcAfL96	485	A–127934	usGfsaGfaGfaAfg UfccacfcAfcGfasg su	700
AD– 63943	A– 12794 4	ascsucGfuGfgUfGfGfa CfuucucucaL96	486	A–127942	usGfsAfgaGfaAfg UfccacfcAfcGfagu scsu	701
AD– 63945	A– 12791 0	ascsucguGfgUfGfGfa CfuucUfcucaL96	487	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccacfcAfcGfaGf uscsu	702
AD– 63946	A– 12791 8	ascsucguGfgUfGfGfac uuCfucucaL96	488	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccacfcAfcGfaGf uscsu	703
AD– 63947	A– 12790	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL	489	A–127926	usGfsaGfagaagUfc caCfcAfcgaGfuses	704

	5	96			u	
AD– 63948	A– 12793 5	gsusGfgUfGfGfaCfuU fcUfcUfcAfL96	490	A–127936	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcsgsa	705
AD– 63949	A– 12794 4	ascsucGfuGfgUfGfGfa CfuucucucaL96	491	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	706
AD– 63950	A– 12790 0	Y44UfcGfuGfgUfgGfa CfuUfcUfcUfcAfusuY 44	492	A–127901	usGfsasGfaGfaAfg UfcCfaCfcAfcGfau su	707
AD– 63951	A– 12791 1	ascsucguGfgUfGfGfa CfuucucucaL96	493	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	708
AD– 63952	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	494	A–127919	usGfsaGfaGfaagUf ccaCfcAfcGfaGfus csu	709
AD– 63953	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	495	A–127927	usGfsagagaAfgUfc caCfcAfcgaguscsu	710
AD– 63955	A– 12794 5	ascsucgugguGfGfacuu cucucaL96	496	A–127940	usGfsAfgAfgAfaG fuccaCfCfaCfGfAfg uscsu	711
AD– 63956	A– 12790 2	Y44uscsGfuGfgUfgGf aCfuUfcUfcUfcAfY44	497	A–127903	usGfsaGfaGfaAfg UfcCfaCfcAfcGfas usu	712
AD– 63957	A– 12791 2	ascsucguGfgUfGfGfac uucucucaL96	498	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	713
AD– 63958	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	499	A–127920	usGfsagaGfaAfgUf ccaCfcAfcgaGfusc su	714
AD– 63959	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	500	A–127928	usGfsaGfagaAfguc caCfcAfcgaguscsu	715

AD– 63960	A– 12661 9	usasUfuUfCfCfuAfgG fgUfaCfaAfL96	501	A–127938	PusGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcsgsa	716
AD– 63961	A– 12794 5	ascsucgugguGfGfacuu cucucaL96	502	A–127942	usGfsAfgaGfaAfg UfccaCfcAfcGfagu scsu	717
AD– 63962	A– 12790 2	Y44uscsGfuGfgUfgGf aCfuUfcUfcUfcAfY44	503	A–127904	PusGfsaGfaGfaAfg UfcCfaCfcAfcGfas usu	718
AD– 63963	A– 12791 3	ascsucguggUfgGfacuu cucucaL96	504	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	719
AD– 63964	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	505	A–127921	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcgagus csu	720
AD– 63965	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	506	A–127929	usGfsagaGfaaGfuc caCfcAfcgaguscsu	721
AD– 63966	A– 12793 9	ascsUfcGfugguGfGfa CfuuCfuCfucaL96	507	A–127940	usGfsAfgAfgAfaG fuccaCfCfaCfGafg uscsu	722
AD– 63967	A– 12794 5	ascsucgugguGfGfacuu cucucaL96	508	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	723
AD– 63968	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	509	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	724
AD– 63968	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	510	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	725
AD– 63968	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	511	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	726
AD–	A–	ascsucguggugGfacuuc	512	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg	727

63969	12791 4	ucucaL96			UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	
AD– 63970	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	513	A–127922	usGfsagaGfaagUfc caCfcAfcgaGfuses u	728
AD– 63971	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	514	A–127930	usGfsagaGfaagucc aCfcAfcgaguscsu	729
AD– 63972	A– 12794 1	ascsUfcGfuGfgUfGfGfa CfuUfcUfcUfcAfL96	515	A–127942	usGfsAfgaGfaAfg UfccaCfcAfcGfagu scsu	730
AD– 63973	A– 12794 6	ascsucguggudGdGacu ucucucaL96	516	A–127947	usdGsaGfaGfaAfg dTccadCcAfcGfag uscsu	731
AD– 63975	A– 12791 5	ascsucguggUfgGfacuu c(Tgn)cucaL96	517	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	732
AD– 63976	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	518	A–127923	usGfsagaGfaAfgUf ccaCfcAfcgaguscsu	733
AD– 63977	A– 12791 7	ascsucguggudGacuuc (Tgn)cucaL96	519	A–127931	usdGsagagaagucca dCcagaguscsu	734
AD– 63978	A– 12794 3	ascsUfcGfuGfgUfGfGfa CfuUfcUfcUfcAfL96	520	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	735
AD– 63979	A– 12790 8	ascsucGfuGfgUfGfGfa CfuucUfcucAfL96	521	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	736
AD– 63980	A– 12791 6	ascsucguggugGfacuuc(Tgn)cucaL96	522	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	737
AD– 63981	A– 12790	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL	523	A–127924	usGfsaGfagaAfgUf ccaCfcAfcgaGfusc	738

	5	96			su	
AD- 63982	A- 12791 7	ascsucguggugdGacuuc (Tgn)cucaL96	524	A-127932	PusdGsagagaagucc adCcacgaguscsu	739
AD- 63983	A- 12794 4	ascsucGfuGfguGfGfa CfuucucucaL96	525	A-127940	usGfsAfgAfgAfaG fuccaCfCfaCfgAfg uscsu	740
AD- 63985	A- 12796 1	gsusggugGfaCfUfUfc UfcucAfauuuL96	526	A-127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	741
AD- 63986	A- 12796 9	gsusggugGfaCfUfUfcu cuCfaauuuL96	527	A-127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	742
AD- 63987	A- 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	528	A-127977	asAfsaUfugagaGfa agUfcCfaccAfcsgs a	743
AD- 63988	A- 12798 6	usgsGfaCfUfUfcUfcUf cAfaUfuUfL96	529	A-127987	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfascsc	744
AD- 63989	A- 12799 6	gsusgguggacUfUfcucu cauuuL96	530	A-127992	asAfsAfUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcac sgsa	745
AD- 63990	A- 12795 0	Y44GfgUfgGfaCfuUfc UfcUfcAfaUfuUfusuY 44	531	A-127951	asAfsasUfuGfaGfa GfaAfgUfcCfaCfcu su	746
AD- 63991	A- 12796 2	gsusggugGfaCfUfUfc UfcucauuuL96	532	A-127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	747
AD- 63992	A- 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	533	A-127970	asAfsaUfuGfagaGf aagUfcCfaCfcAfc gsa	748
AD- 63993	A- 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	534	A-127978	asAfsauugaGfaGfa agUfcCfaccacsgsa	749

AD– 63994	A– 12798 4	gsgUfgGfaCfUfUfcUf cUfcAfaUfuUfL96	535	A–127988	PasAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcsa sc	750
AD– 63995	A– 12799 6	gsusgguggacUfUfcucu caauuuL96	536	A–127993	asAfsAfuGfaGfa GfaagUfCfcaCfcac sgsa	751
AD– 63996	A– 12795 2	Y44gsgsUfgGfaCfuUf cUfcUfcAfaUfuUfY44	537	A–127953	asAfsaUfuGfaGfa GfaAfgUfcCfaCfcs usu	752
AD– 63997	A– 12796 3	gsusggugGfaCfUfUfcu cucaauuuL96	538	A–127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	753
AD– 63999	A– 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	539	A–127979	asAfsaUfugaGfaga agUfcCfaccacsgsa	754
AD– 64000	A– 12798 6	usgsGfaCfUfUfcUfcUf cAfaUfuUfL96	540	A–127989	PasAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfascsc	755
AD– 64001	A– 12799 6	gsusgguggacUfUfcucu caauuuL96	541	A–127994	asAfsAfuGfaGfa GfaagUfCfcaCfcac sgsa	756
AD– 64002	A– 12795 2	Y44gsgsUfgGfaCfuUf cUfcUfcAfaUfuUfY44	542	A–127954	PasAfsaUfuGfaGfa GfaAfgUfcCfaCfcs usu	757
AD– 64003	A– 12796 4	gsusgguggaCfuUfcucu caauuuL96	543	A–127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	758
AD– 64004	A– 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	544	A–127972	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaccacs gsa	759
AD– 64005	A– 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	545	A–127980	asAfsauuGfagAfga agUfcCfaccacsgsa	760
AD–	A–	gsusGfgugGfaCfUfUfc	546	A–127991	asAfsaUfuGfaGfa	761

64006	12799 0	UfcUfcAfaUfuL96			GfaagUfcCfaCfcac sgsa	
AD– 64007	A– 12799 6	gsusgguggacuUfcucuc caauuuL96	547	A–127995	asAfsAfUfugaGfa GfaagUfcCfaCfcac sgsa	762
AD– 64008	A– 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	548	A–127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	763
AD– 64008	A– 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	549	A–127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	764
AD– 64009	A– 12796 5	gsusgguggacuUfcucuc aauuuL96	550	A–127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	765
AD– 64010	A– 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	551	A–127973	asAfsauuGfagaGfa agUfcCfaccAfcs gsa	766
AD– 64011	A– 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	552	A–127981	asAfsauuGfagagaa gUfcCfaccacsgsa	767
AD– 64012	A– 12799 0	gsusGfgugGfaCfUfUfc UfcUfcAfaUfuL96	553	A–127992	asAfsAfUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcac sgsa	768
AD– 64013	A– 12799 7	gsusgguggacdTdTcucu caauuuL96	554	A–127998	asdAsAfuugaGfaG faagdTdCcaCfcacs gsa	769
AD– 64014	A– 12795 7	Y44GfsusGfgUfgGfaC fUfUfcUfcUfcAfaUfu UfL96	555	A–127958	PasAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	770
AD– 64015	A– 12796 6	gsusgguggaCfuUfcucu c(Agn)auuuL96	556	A–127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	771
AD– 64016	A– 12795	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL	557	A–127974	asAfsauuGfaGfaGf aagUfcCfaccacsgsa	772

	5	96				
AD– 64017	A– 12796 8	gsusgguggacudTcucuc (Agn)auuuL96	558	A–127982	asdAsauugagagaag dTccaccacsgsa	773
AD– 64018	A– 12799 0	gsusGfgugGfaCfUfUfc UfcUfcAfaUfuL96	559	A–127993	asAfsAfuGfaGfa GfaagUfCfcaCfcac sgsa	774
AD– 64019	A– 12795 9	gsusggUfgGfaCfUfUfc UfcucAfaUfuL96	560	A–127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	775
AD– 64020	A– 12796 7	gsusgguggacuUfcucuc(Agn)auuuL96	561	A–127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	776
AD– 64021	A– 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	562	A–127975	asAfsaUfugaGfaGf aagUfcCfaccAfcsg sa	777
AD– 64022	A– 12796 8	gsusgguggacudTcucuc (Agn)auuuL96	563	A–127983	PasdAsauugagagaa gdTccaccacsgsa	778
AD– 64023	A– 12799 0	gsusGfgugGfaCfUfUfc UfcUfcAfaUfuL96	564	A–127994	asAfsAfUfuGfaGfa GfaagUfCfcaCfcac sgsa	779
AD– 64024	A– 12796 0	gsusggUfgGfaCfUfUfc UfcucAfaUuuL96	565	A–127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	780
AD– 64025	A– 12796 8	gsusgguggacudTcucuc (Agn)auuuL96	566	A–127956	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	781
AD– 64026	A– 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	567	A–127976	asAfsaUfugaGfaga agUfcCfaccAfcsgs a	782
AD– 64027	A– 12798 4	gsgUfgGfaCfUfUfcUf cUfcAfaUfuUfL96	568	A–127985	asAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcsa sc	783

AD– 64028	A– 12799 0	gsusGfgugGfaCfUfUfc UfcUfcAfaUfuL96	569	A–127995	asAfsAfUfugaGfa GfaagUfCfcaCfcac sgsa	784
AD– 64272	A– 12800 1	GfsusGfcAfcUfuCfGf CfuUfcAfcCfuCfuGfL 96	570	A–128002	csAfsGfGfuGfa AfgcgAfaGfuGfcA fcsasc	785
AD– 64274	A– 12836 3	GfsusUfgAfcAfaAfAf AfuCfcUfcAfcAfaUfL 96	571	A–128364	asUfsuGfuGfaGfg AfuuuUfuGfuCfaA fcsasa	786
AD– 64275	A– 12837 7	UfsgsUfuGfaCfaAfAf AfaUfcCfuCfaCfaAfL 96	572	A–128378	usUfsgUfgAfgGfa UfuuuUfgUfcAfaC fasasg	787
AD– 64276	A– 12839 3	GfsgsUfgGfaCfuUfCf UfcUfcAfaUfuUfuAfL 96	573	A–128394	usAfsaAfaUfuGfa GfagaAfgUfcCfaCf csasc	788
AD– 64277	A– 12840 7	UfscsUfuUfuGfgAfGf UfgUfgGfaUfuCfgAfL 96	574	A–128408	usCfsgAfaUfcCfaC facuCfcAfaAfaGfa scsa	789
AD– 64277	A– 12840 7	UfscsUfuUfuGfgAfGf UfgUfgGfaUfuCfgAfL 96	575	A–128408	usCfsgAfaUfcCfaC facuCfcAfaAfaGfa scsa	790
AD– 64278	A– 12842 3	AfscsUfgUfuCfaAfGf CfcUfcCfaAfgCfuAfL 96	576	A–128424	usAfsGcfUfgGfa GfgcuUfgAfaCfaA fgsasc	791
AD– 64279	A– 12843 5	UfscsUfgCfcGfaUfCf CfaUfaCfuGfcGfgAfL 96	577	A–128436	usCfscGfcAfgUfa UfggaUfcGfgCfaG fasgsg	792
AD– 64280	A– 12837 9	AfsusGfuGfuCfuGfCf GfgCfgUfuUfuAfuAfL 96	578	A–128380	usAfsuAfaAfaCfg CfcgcAfgAfcAfcA fuscsc	793
AD– 64281	A– 12839 5	CfscsCfcGfuCfuGfUf GfcCfuUfcUfcAfuAfL 96	579	A–128396	usAfsuGfaGfaAfg GfcacAfgAfcGfgG fgsasg	794
AD–	A–	GfscsCfuAfaUfcAfUf	580	A–128410	asUfsgAfaCfaAfg	795

64282	12840 9	CfuCfuUfgUfuCfaUfL 96			AfgauGfaUfuAfgC fgsasg	
AD– 64283	A– 12842 5	UfscsUfaGfaCfuCfGf UfgGfuGfgAfcUfuCfL 96	581	A–128426	gsAfsaGfuCfcAfcC facgAfgUfcUfaGfa scsu	796
AD– 64284	A– 12843 7	CfsusGfcCfGafuCfCf AfuAfcUfgCfGfaAfL 96	582	A–128438	usUfscCfGcfaGfu AfuggAfuCfGfca fgsasg	797
AD– 64285	A– 12836 5	UfsusUfuUfcUfuGfUf UfgAfcAfaAfaAfuAfL 96	583	A–128366	usAfsuUfuUfuGfu CfaacAfaGfaAfaAf ascsc	798
AD– 64286	A– 12838 1	AfsusCfuUfcUfuGfUf UfgGfuUfcUfuCfuAfL 96	584	A–128382	usAfsGfaGfaAfc CfaacAfaGfaAfgAf usgsa	799
AD– 64289	A– 12836 7	GfsusUfuUfuCfuUfGf UfuGfaCfaAfaAfaUfL 96	585	A–128368	asUfsuUfuUfgUfc AfacaAfgAfaAfaA fcscsc	800
AD– 64290	A– 12838 3	CfsusGfcCfuAfaUfCf AfuCfuCfuUfgUfuAfL 96	586	A–128384	usAfsaCfaAfgAfg AfugaUfuAfgGfcA fgsasg	801
AD– 64291	A– 12839 9	UfscsCfuCfaCfaAfUf AfcCfaCfaGfaGfuAfL 96	587	A–128400	usAfsCfuUfgUfg GfuauUfgUfgAfgG fasusu	802
AD– 64292	A– 12841 3	CfsusUfgUfuGfaCfAf AfaAfaUfcCfuCfaAfL 96	588	A–128414	usUfsgAfgGfaUfu UfuugUfcAfaCfaA fgsasa	803
AD– 64293	A– 12843 9	GfscsAfaCfuUfuUfUf CfaCfcUfcUfgCfcUfL 96	589	A–128440	asGfsgCfaGfaGfg UfgaaAfaAfgUfuG fcsasu	804
AD– 64294	A– 12836 9	GfsgsGfaAfcAfaGfAf GfcUfaCfaGfcAfuAfL 96	590	A–128370	usAfsuGfcUfgUfa GfcucUfuGfuUfcC fcsasa	805
AD– 64295	A– 12838	CfsgsUfgGfuGfgAfcCf UfuCfuCfuCfaAfuUfL	591	A–128386	asAfsuUfgAfgAfg AfaguCfcAfcCfaGf	806

	5	96			csasg	
AD– 64297	A– 12841 5	CfsusGfcUfgCfuAfUf GfcCfuCfaUfcUfuAfL 96	592	A–128416	usAfsaGfaUfgAfg GfcAuAfgCfaGfcA fgsgsa	807
AD– 64298	A– 12842 7	GfsusUfgGfaUfgUfGf UfcUfgCfgGfcGfuUfL 96	593	A–128428	asAfscGfcCfgCfaG facaCfaUfcCfaAfcs gsa	808
AD– 64299	A– 12844 1	UfsusCfaUfcCfuGfCf UfgCfuAfuGfcCfuAfL 96	594	A–128442	usAfsgGfcAfuAfg CfagcAfgGfaUfgA fasgsa	809
AD– 64300	A– 12837 1	UfsusCfuUfgUfuGfAf CfaAfaAfaUfcCfuAfL 96	595	A–128372	usAfsgGfaUfuUfu UfgucAfaCfaAfgA fasasa	810
AD– 64302	A– 12841 7	UfsasUfaUfgGfaUfGf AfuGfuGfgUfaUfuAfL 96	596	A–128418	usAfsaUfaCfcAfcA fucaUfcCfaUfaUfa sasc	811
AD– 64303	A– 12842 9	UfsusCfaUfcCfuGfCf UfgCfuAfuGfcCfuCfL 96	597	A–128430	gsAfsgGfcAfuAfg CfagcAfgGfaUfgA fasgsa	812
AD– 64304	A– 12844 3	GfsusGfcAfcUfuCfGf CfuUfcAfcCfuCfuAfL 96	598	A–128444	usAfsgAfgGfuGfa AfgcgAfaGfuGfcA fcsasc	813
AD– 64305	A– 12837 3	UfsusGfaCfaAfaAfAf UfcCfuCfaCfaAfuAfL 96	599	A–128374	usAfsuUfgUfgAfg GfauuUfuUfgUfcA fascsa	814
AD– 64307	A– 12840 3	AfsasGfcCfuCfcAfAf GfcUfgUfgCfcUfuAfL 96	600	A–128404	usAfsaGfgCfaCfaG fcuuGfgAfgGfcUfu sgsa	815
AD– 64308	A– 12841 9	CfscsUfcUfuCfaUfCf CfuGfcUfgCfuAfuAfL 96	601	A–128420	usAfsuAfgCfaGfc AfggaUfgAfaGfaG fgsasa	816
AD– 64309	A– 12843 1	CfscsUfgCfuGfcUfAf UfgCfcUfcAfuCfuUfL 96	602	A–128432	asAfsgAfuGfaGfg CfauaGfcAfgCfaGf gsasu	817

AD– 64310	A– 12837 5	CfsasUfcUfuCfuUfGf UfuGfgUfuCfuUfcUfL 96	603	A–128376	asGfsaAfgAfaCfcA facaAfgAfaGfaUfg sasg	818
AD– 64311	A– 12839 1	CfscsGfuCfuGfuGfCf CfuUfcUfcAfuCfuAfL 96	604	A–128392	usAfsgAfuGfaGfa AfggcAfcAfgAfcG fgsgsg	819
AD– 64312	A– 12840 5	CfscsUfcAfuCfuUfCf UfuGfuUfgGfuUfcUfL 96	605	A–128406	asGfsaAfcCfaAfcA fagaAfgAfuGfaGfg scsa	820
AD– 64313	A– 12842 1	CfscsAfcCfaAfaUfGf CfcCfcUfaUfcUfuAfL 96	606	A–128422	usAfsaGfaUfaGfg GfgcaUfuUfgGfuG fgsusc	821
AD– 64314	A– 12843 3	GfscsUfcCfuCfuGfCf CfgAfuCfcAfuAfcUfL 96	607	A–128434	asGfsuAfuGfgAfu CfggcAfgAfgGfaG fcscsa	822
AD– 64315	A– 12836 3	GfsusUfgAfcAfaAfAf AfuCfcUfcAfcAfaUfL 96	608	A–128445	PasUfsuGfuGfaGfg AfuuuUfuGfuCfaA fcsasa	823
AD– 64316	A– 12837 7	UfsgsUfuGfaCfaAfAf AfaUfcCfuCfaCfaAfL 96	609	A–128453	PusUfsgUfgAfgGf aUfuuuUfgUfcAfa Cfasasg	824
AD– 64317	A– 12839 3	GfsgsUfgGfaCfuUfCf UfcUfcAfaUfuUfuAfL 96	610	A–128461	PusAfsaAfaUfuGfa GfagaAfgUfcCfaCf csasc	825
AD– 64318	A– 12840 7	UfscsUfuUfuGfgAfGf UfgUfgGfaUfuCfgAfL 96	611	A–128469	PusCfsgAfaUfcCfa CfacuCfcAfaAfaGf ascsa	826
AD– 64319	A– 12842 3	AfscsUfgUfuCfaAfGf CfcUfcCfaAfgCfuAfL 96	612	A–128477	PusAfsgCfuUfgGfa GfgcuUfgAfaCfaA fgsasc	827
AD– 64320	A– 12843 5	UfscsUfgCfcGfaUfCf CfaUfaCfuGfcGfgAfL 96	613	A–128483	PusCfscGfcAfgUfa UfggaUfcGfgCfaG fasgsg	828
AD–	A–	AfsgsUfuAfuAfuGfGf	614	A–128446	PusAfscCfaCfaUfc	829

64321	12346 3	AfuGfaUfgUfgGfuAfL 96			AfuccAfuAfuAfaC fusgsa	
AD– 64322	A– 12837 9	AfsusGfuGfuCfuGfCf GfgCfgUfuUfuAfuAfL 96	615	A–128454	PusAfsuAfaAfaCfg CfcgcAfgAfcAfcA fuscsc	830
AD– 64323	A– 12839 5	CfsesCfcGfuCfuGfUf GfcCfuUfcUfcAfuAfL 96	616	A–128462	PusAfsuGfaGfaAfg GfcacAfgAfcGfgG fgsasg	831
AD– 64324	A– 12840 9	GfsesCfuAfaUfcAfUf CfuCfuUfgUfuCfaUfL 96	617	A–128470	PasUfsgAfaCfaAfg AfgauGfaUfuAfgC fgsasg	832
AD– 64325	A– 12842 5	UfsesUfaGfaCfuCfGf UfgGfuGfgAfcUfuCfL 96	618	A–128478	PgsAfsaGfuCfcAfc CfacgAfgUfcUfaG fascsu	833
AD– 64326	A– 12843 7	CfsusGfcCfGafuCfCf AfuAfcUfgCfGfaAfL 96	619	A–128484	PusUfscCfGcfaGfu AfuggAfuCfGfGfcA fgsasg	834
AD– 64328	A– 12838 1	AfsusCfuUfcUfuGfUf UfgGfuUfcUfuCfuAfL 96	620	A–128455	PusAfsgAfaGfaAfc CfaacAfaGfaAfgAf usgsa	835
AD– 64330	A– 12841 1	UfsusCfuCfuCfaAfUf UfuUfcUfaGfgGfgAfL 96	621	A–128471	PusCfscCfcUfaGfa AfaauUfgAfgAfgA fasgsu	836
AD– 64331	A– 12790 5	AfsesUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	622	A–127907	PusGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	837
AD– 64332	A– 12800 1	GfsusGfcAfcUfuCfGf CfuUfcAfcCfuCfuGfL 96	623	A–128485	PcsAfsgAfgGfuGfa AfgcgAfaGfuGfcA fcsasc	838
AD– 64333	A– 12836 7	GfsusUfuUfuCfuUfGf UfuGfaCfaAfaAfaUfL 96	624	A–128448	PasUfsuUfuUfgUfc AfacaAfgAfaAfaA fcsesc	839
AD– 64334	A– 12838	CfsusGfcCfuAfaUfCf AfuCfuCfuUfgUfuAfL	625	A–128456	PusAfsaCfaAfgAfg AfugaUfuAfgGfcA	840

	3	96			fgsasg	
AD– 64335	A– 12839 9	UfscsCfuCfaCfaAfUf AfcCfaCfaGfaGfuAfL 96	626	A–128464	PusAfsCufcUfgUfg GfuauUfgUfgAfgG fasusu	841
AD– 64336	A– 12841 3	CfsusUfgUfuGfaCfAf AfaAfaUfcCfuCfaAfL 96	627	A–128472	PusUfsgAfgGfaUf uUfuugUfcAfaCfa Afgsasa	842
AD– 64337	A– 12795 5	GfsusGfgUfgGfaCfUf UfcUfcUfcAfaUfuUfL 96	628	A–127958	PasAfsaUfuGfaGfa GfaagUfcCfaCfcAf csgsa	843
AD– 64338	A– 12843 9	GfscsAfaCfuUfuUfUf CfaCfcUfcUfgCfcUfL 96	629	A–128486	PasGfsgCfaGfaGfg UfgaaAfaAfgUfuG fcsasu	844
AD– 64339	A– 12836 9	GfsgsGfaAfcAfaGfAf GfcUfaCfaGfcAfuAfL 96	630	A–128449	PusAfsuGfcUfgUfa GfcucUfuGfuUfcC fcsasa	845
AD– 64341	A– 12840 1	UfscsAfuCfuUfcUfUf GfuUfgGfuUfcUfuAfL 96	631	A–128465	PusAfsaGfaAfcCfa AfcaaGfaAfgAfuG fasgsg	846
AD– 64342	A– 12841 5	CfsusGfcUfgCfuAfUf GfcCfuCfaUfcUfuAfL 96	632	A–128473	PusAfsaGfaUfgAfg GfcAuAfgCfaGfcA fgsgsa	847
AD– 64343	A– 12842 7	GfsusUfgGfaUfgUfGf UfcUfgCfgGfcGfuUfL 96	633	A–128479	PasAfsCgfcCfGcCfa GfacaCfaUfcCfaAf csgsa	848
AD– 64344	A– 12844 1	UfsusCfaUfcCfuGfCf UfgCfuAfuGfcCfuAfL 96	634	A–128487	PusAfsGfcAfuAf gCfagcAfgGfaUfg Afasgsa	849
AD– 64345	A– 12837 1	UfsusCfuUfgUfuGfAf CfaAfaAfaUfcCfuAfL 96	635	A–128450	PusAfsGfaUfuUf uUfgucAfaCfaAfg Afasasa	850
AD– 64347	A– 12348 7	GfsgsAfuGfuGfuCfUf GfcGfgCfgUfuUfuAfL 96	636	A–128466	PusAfsaAfaCfGcCfc GfcagAfcAfcAfuC fcsasg	851

AD– 64348	A– 12841 7	UfsasUfaUfgGfaUfGf AfuGfuGfgUfaUfuAfL 96	637	A–128474	PusAfsaUfaCfcAfc AfucaUfcCfaUfaUf asasc	852
AD– 64349	A– 12842 9	UfsusCfaUfcCfuGfCf UfgCfuAfuGfcCfuCfL 96	638	A–128480	PgsAfsgGfcAfuAf gCfagcAfgGfaUfg Afasgsa	853
AD– 64350	A– 12844 3	GfsusGfcAfcUfuCfGf CfuUfcAfcCfuCfuAfL 96	639	A–128488	PusAfsgAfgGfuGf aAfgcgAfaGfuGfc Afcasasc	854
AD– 64351	A– 12837 3	UfsusGfaCfaAfaAfAf UfcCfuCfaCfaAfuAfL 96	640	A–128451	PusAfsuUfgUfgAf gGfauuUfuUfgUfc Afascsa	855
AD– 64352	A– 12838 9	CfscsAfaGfuGfuUfUf GfcUfgAfcGfcAfaAfL 96	641	A–128459	PusUfsuGfcGfuCfa GfcaaAfcAfcUfuG fgscsa	856
AD– 64352	A– 12838 9	CfscsAfaGfuGfuUfUf GfcUfgAfcGfcAfaAfL 96	642	A–128459	PusUfsuGfcGfuCfa GfcaaAfcAfcUfuG fgscsa	857
AD– 64353	A– 12840 3	AfsasGfcCfuCfcAfAf GfcUfgUfgCfcUfuAfL 96	643	A–128467	PusAfsaGfgCfaCfa GfcuuGfgAfgGfcU fusgsa	858
AD– 64354	A– 12841 9	CfscsUfcUfuCfaUfCf CfuGfcUfgCfuAfuAfL 96	644	A–128475	PusAfsuAfgCfaGfc AfggaUfgAfaGfaG fgsasa	859
AD– 64355	A– 12843 1	CfscsUfgCfuGfcUfAf UfgCfcUfcAfuCfuUfL 96	645	A–128481	PasAfsgAfuGfaGfg CfauaGfcAfgCfaGf gsasu	860
AD– 64356	A– 12837 5	CfsasUfcUfuCfuUfGf UfuGfgUfuCfuUfcUfL 96	646	A–128452	PasGfsaAfgAfaCfc AfacaAfgAfaGfaU fgsasg	861
AD– 64357	A– 12839 1	CfscsGfuCfuGfuGfCf CfuUfcUfcAfuCfuAfL 96	647	A–128460	PusAfsgAfuGfaGfa AfggcAfcAfgAfcG fgsgsg	862
AD–	A–	CfscsUfcAfuCfuUfCf	648	A–128468	PasGfsaAfcCfaAfc	863

64358	12840 5	UfuGfuUfgGfuUfcUfL 96			AfagaAfgAfuGfaG fgscsa	
AD– 64359	A– 12842 1	CfscsAfcCfaAfaUfGf CfcCfcUfaUfcUfuAfL 96	649	A–128476	PusAfsaGfaUfaGfg GfgcaUfuUfgGfuG fgsusc	864
AD– 64360	A– 12843 3	GfscsUfcCfuCfuGfCf CfgAfuCfcAfuAfcUfL 96	650	A–128482	PasGfsuAfuGfgAf uCfggcAfgAfgGfa Gfscsa	865
AD– 64700	A– 12937 9	ascsucguggugdTacuu(Cgn)ucucaL96	651	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	866
AD– 64701	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	652	A–129387	PusgsagagaagdTcc adCcacgaguscsu	867
AD– 64702	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	653	A–129395	usGsagadGaagucca Ccacgaguscsu	868
AD– 64703	A– 12937 6	ascsucguggugdGacuuc dAcucaL96	654	A–129385	usdGsagagaagdTcc adCcacgaguscsu	869
AD– 64704	A– 12938 1	ascsucguggdTgdTacuu cdAcucaL96	655	A–129389	usdGsagadGaagucc adCcacgaguscsu	870
AD– 64705	A– 12938 0	ascsucguggugdTacuuc dAcucaL96	656	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	871
AD– 64706	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	657	A–129388	usdGsadGagaagucc adCcacgaguscsu	872
AD– 64707	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	658	A–129396	usgsagadGaagdTcc adCcacgaguscsu	873
AD– 64708	A– 12938	ascsucguggdTgdGacuuc (Tgn)cucaL96	659	A–129385	usdGsagagaagdTcc adCcacgaguscsu	874

	2					
AD- 64709	A- 12937 3	ascsucguggugdGacuu(Cgn)ucucaL96	660	A-129391	usdGsagadGaagdT ccadCcacgaguscsu	875
AD- 64710	A- 12937 3	ascsucguggugdGacuu(Cgn)ucucaL96	661	A-127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	876
AD- 64711	A- 12938 1	ascsucguggdTgdTacu cdAcucaL96	662	A-127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	877
AD- 64712	A- 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	663	A-129389	usdGsagadGaagu ccadCcacgaguscsu	878
AD- 64713	A- 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	664	A-129397	PusgsagadGaagdTc cadCcacgaguscsu	879
AD- 64714	A- 12938 4	ascsucguggdTgdGacu cdAcucaL96	665	A-129385	usdGsagagaagdTcc adCcacgaguscsu	880
AD- 64715	A- 12937 6	ascsucguggugdGacuuc dAcucaL96	666	A-129391	usdGsagadGaagdT ccadCcacgaguscsu	881
AD- 64716	A- 12937 4	ascsucguggugdGacuuc u(Cgn)ucaL96	667	A-127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	882
AD- 64717	A- 12938 2	ascsucguggdTgdGacu c(Tgn)cucaL96	668	A-127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	883
AD- 64718	A- 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	669	A-129390	usdGsagagadAgucc adCcacgaguscsu	884
AD- 64719	A- 12791 7	ascsucguggugdGacuuc (Tgn)cucaL96	670	A-129385	usdGsagagaagdTcc adCcacgaguscsu	885

AD- 64720	A- 12938 1	ascsucguggdTgdTacu cdAcucaL96	671	A-129385	usdGsagagaagdTcc adCcacgaguscsu	886
AD- 64721	A- 12938 2	ascsucguggdTgdGacu c(Tgn)cucaL96	672	A-129391	usdGsagadGaagdT ccadCcacgaguscsu	887
AD- 64722	A- 12937 5	ascsucguggugdGacuuc Y34cucaL96	673	A-127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	888
AD- 64723	A- 12938 3	ascsucguggugdGdAcu uc(Tgn)cucaL96	674	A-127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	889
AD- 64725	A- 12791 7	ascsucguggugdGacuuc (Tgn)cucaL96	675	A-129398	PusdGsagagaagdTc cadCcacgaguscsu	890
AD- 64726	A- 12937 3	ascsucguggugdGacuu(Cgn)ucucaL96	676	A-129389	usdGsagadGaagucc adCcacgaguscsu	891
AD- 64727	A- 12938 4	ascsucguggdTgdGacu cdAcucaL96	677	A-129391	usdGsagadGaagdT ccadCcacgaguscsu	892
AD- 64728	A- 12937 6	ascsucguggugdGacuuc dAcucaL96	678	A-127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	893
AD- 64729	A- 12938 4	ascsucguggdTgdGacu cdAcucaL96	679	A-127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscsu	894
AD- 64730	A- 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	680	A-129392	usGsagagaagdTcca dCcacgaguscsu	895
AD- 64731	A- 12939 9	Y34ascsucguggugdGa cuuc(Tgn)cucaL96	681	A-129385	usdGsagagaagdTcc adCcacgaguscsu	896
AD-	A-	ascsucguggugdGacuuc	682	A-129389	usdGsagadGaagucc	897

64732	12937 6	dAcucaL96			adCcacgaguscusu	
AD– 64733	A– 12938 1	ascsucguggdTgdTacuuc dAcucaL96	683	A–129391	usdGsagadGaagdT ccadCcacgaguscusu	898
AD– 64734	A– 12937 7	ascsucguggugdGacuuc dCcucal96	684	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscusu	899
AD– 64735	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	685	A–129385	usdGsagagaagdTcc adCcacgaguscusu	900
AD– 64736	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	686	A–129393	usdGsagagaagdTcc aCcacgaguscusu	901
AD– 64737	A– 12939 9	Y34ascsucguggugdGa cuuc(Tgn)cucal96	687	A–129398	PusdGsagagaagdTc cadCcacgaguscusu	902
AD– 64738	A– 12938 2	ascsucguggdTgdGacuuc (Tgn)cucal96	688	A–129389	usdGsagadGaaguucc adCcacgaguscusu	903
AD– 64739	A– 12937 8	ascsucguggugdGacuuc dGcucal96	689	A–127906	usGfsaGfaGfaAfg UfccaCfcAfcGfaGf uscusu	904
AD– 64740	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	690	A–129386	usgsagagaagdTcca dCcacgaguscusu	905
AD– 64741	A– 12790 5	AfscsUfcGfuGfgUfGf GfaCfuUfcUfcUfcAfL 96	691	A–129394	usGsagagaagdTcca Ccacgaguscusu	906
AD– 64742	A– 12937 3	ascsucguggugdGacuuc(Cgn)ucucal96	692	A–129385	usdGsagagaagdTcc adCcacgaguscusu	907
AD– 64743	A– 12938	ascsucguggdTgdGacuuc dAcucaL96	693	A–129389	usdGsagadGaaguucc adCcacgaguscusu	908

	4					
--	---	--	--	--	--	--

Таблица 4. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи дцРНК ВГВ (данные по активности доступны в WO2016/077321, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

ИН дуплекса	Смысловая последовательность (5'–3')	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность (5'–3')	SEQ ID NO:
AD–65369	UCGUGGUGGACUUCUCUC A	909	UGAGAGAAGUCCACCACG AUU	938
AD–65381	UCGUGGUGGACUUCUCUC A	910	UGAGAGAAGUCCACCACG AUU	939
AD–63962	UCGUGGUGGACUUCUCUC A	911	UGAGAGAAGUCCACCACG AUU	940
AD–63938	ACUCGUGGUGGACUUCUC UCA	912	UGAGAGAAGUCCACCACG AGUCU	941
AD–65561	UCGUGGUGGACUUCUCUC A	913	UGAGAGAAGUCCACCACG AUU	942
AD–65566	UCGUGGUGGACUUCUCUC A	914	UGAGAGAAGUCCACCACG AUU	943
AD–63944	UCGUGGUGGACUUCUCUC AUU	915	UGAGAGAAGUCCACCACG AUU	944
AD–63968	ACUCGUGGUGGACUUCUC UCA	916	UGAGAGAAGUCCACCACG AGUCU	945
AD–65406	UCGUGGUGGACUUCUCUC A	917	UGAGAGAAGUCCACCACG AUU	946
AD–65396	ACUCGUGGUGGACUUCUC UCA	918	UGAGAGAAGUCCACCACG AGUUU	947
AD–65427	GUGCACUUCGCUUCACCU CUA	919	UAGAGGUGAAGCGAAGUG CACUU	948
AD–65573	GUGCACUUCGCUUCACCU CUA	920	UAGAGGUGAAGCGAAGUG CACAC	949
AD–65432	GCACUUCGCUUCACCUCU A	921	UAGAGGUGAAGCGAAGUG CAC	950
AD–64332	GUGCACUUCGCUUCACCU CUG	922	CAGAGGUGAAGCGAAGUG CACAC	951

AD– 64322	AUGUGUCUGCGGCGUUUU AUA	923	UAUAAAACGCCGCAGACA CAUCC	952
AD– 64272	GUGCACUUCGCUUCACCU CUG	924	CAGAGGUGAAGCGAAGUG CACAC	953
AD– 65583	GCACUUCGCUUCACCUCU A	925	UAGAGGUGAAGCGAAGUG CUU	954
AD– 63994	GGUGGACUUCUCUCAAUU U	926	AAAUUGAGAGAAGUCCAC CAC	955
AD– 65370	CGUGGUGGACUUCUCUCA AUU	927	AAUUGAGAGAAGUCCACC AGCAG	956
AD– 65265	GUGGUGGACUUCUCUCA UUU	928	AAAUUGAGAGAAGUCCAC CACGA	957
AD– 65407	CGUGGUGGACUUCUCUCA AUU	929	AAUUGAGAGAAGUCCACC AGCAG	958
AD– 64027	GGUGGACUUCUCUCAAUU U	930	AAAUUGAGAGAAGUCCAC CAC	959
AD– 65266	GUGGUGGACUUCUCUCA UUU	931	AAAUUGAGAGAAGUCCAC CACGA	960
AD– 65389	UGGUGGUUCTUCUCUAAU U	932	AAUUGAGAGAAGUCCACC AUU	961
AD– 64008	GUGGUGGACUUCUCUCA UUU	933	AAAUUGAGAGAAGUCCAC CACGA	962
AD– 65377	CGUGGUGGUUCTUCUCUAA AUU	934	AAUUGAGAGAAGUCCACC AGCUU	963
AD– 65409	GGUGGACUUCUCUCAAUU UUA	935	UAAAAUUGAGAGAAGUCC ACCAC	964
AD– 65403	GGUGGACUUCUCUCAAUU UUA	936	UAAAAUUGAGAGAAGUCC ACCAC	965
AD– 65385	UGGACUACTCUCAAAUUU A	937	UAAAAUUGAGAGAAGUCC AUU	966

Таблица 5. Примеры модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи дцРНК ВГВ (данные по активности доступны в WO2016/077321, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

ИН дуплек	Смысловая последовательность (5'–3')	SEQ ID	Антисмысловая последовательность (5'–3')	SEQ ID
--------------	---	-----------	---	-----------

ca		NO:		NO:
AD- 65369	uscsGuGfgUfGfGfacuuCfUfcucaL 96	967	PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfc gasusu	996
AD- 65381	uscsGuGfgUfGfGfacuucucucaL96	968	PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfc gasusu	997
AD- 63962	Y44uscsGfuGfgUfgGfaCfuUfcUf cUfcAfY44	969	PusGfsaGfaGfaAfgUfcCfaCfc AfcGfasusu	998
AD- 63938	Y44ACUCGUGGUGGACUUCU CUCA	970	UGAGAGAAGUCCACCACG AGUCU	999
AD- 65561	uscsGuGfgUfGfGfacuuCfUfcucaL 96	971	UfsGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfc gasusu	1000
AD- 65566	uscsGuGfgUfGfGfacuucucucaL96	972	UfsGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfc gasusu	1001
AD- 63944	Y44ucGuGGuGGAcuucucucAus uY44	973	UfGfagAfgAfAfGUfccaCfCAf cgAusu	1002
AD- 63968	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfc UfcUfcAfL96	974	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfc GfaGfuscu	1003
AD- 65406	uscsGuGfgUfGfGfacuuCfUfcucaL 96	975	usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcg asusu	1004
AD- 65396	ascsucGuGfgUfGfGfacuucucucaL 96	976	usGfsagaGfaaguccaCfcAfcgag ususu	1005
AD- 65427	gsusgcacUfuCfGfCfuacaccucuaL 96	977	PusAfsagGfugaagcgAfaGfugc acsusu	1006
AD- 65573	gsusgcacUfuCfGfCfuucaCfCfucu aL96	978	UfsAfsagGfuGfAfagcgAfaGf ugcacsasc	1007
AD- 65432	gscsacUfucGfCfuucacCfucuaL96	979	PusAfsagGfuGfAfagcgAfaGf ugesasc	1008
AD- 64332	GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfc CfuCfuGfL96	980	PcsAfsGfGfuGfaAfgcgAfaG fuGfcAfcscasc	1009
AD- 64322	AfsusGfuGfuCfuGfCfGfgCfGfUfu UfuAfuAfL96	981	PusAfsuAfaAfaCfGfCfcgAfgA fcAfcAfuscsc	1010
AD- 64272	GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfc CfuCfuGfL96	982	csAfsGfGfuGfaAfgcgAfaGf uGfcAfcscasc	1011
AD-	gscsacuucgdCuucac(Cgn)ucuaL9	983	usdAsgagdGugaagcgdaagugcs	1012

65583	6		usu	
AD– 63994	gsgsUfgGfaCfUfUfcUfcAfaU fuUfL96	984	PasAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCf aCfcsasc	1013
AD– 65370	csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaau uL96	985	asAfsuugAfgAfGfaaguCfcAfcc agcsasg	1014
AD– 65265	gsusggugGfaCfUfUfcUfcucauuu L96	986	asAfsaUfugagaGfaagUfcCfacc Afcsgsa	1015
AD– 65407	csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaau uL96	987	asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfcc agcsasg	1016
AD– 64027	gsgsUfgGfaCfUfUfcUfcAfaU fuUfL96	988	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfa Cfcsasc	1017
AD– 65266	gsusggugGfaCfUfUfcucuCfaauuu L96	989	asAfsaUfugagaGfaagUfcCfacc Afcsgsa	1018
AD– 65389	usgsgudGgucdTucucuaaaauL96	990	asdAsuugagagdAagudCcaccasu su	1019
AD– 64008	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfc AfaUfuUfL96	991	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfa CfcAfcsgsa	1020
AD– 65377	csgsuggudGgucdTucucuaaaauL96	992	asdAsuugagagdAagudCcaccagc susu	1021
AD– 65409	gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuu aL96	993	PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfc caccsasc	1022
AD– 65403	gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuu aL96	994	usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfcc accsasc	1023
AD– 65385	usgsgacuacdTcucaaaauuaL96	995	usdAsaaaugadGagadAguccasu su	1024

Таблица 6. Примеры немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи дцРНК ВГВ (данные по активности доступны в WO2016/077321, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

ИН дупле кса	ИН смысл ового	немодифицирован ная смысловая последовательнос ть (5'–3')	SEQ ID NO:	ИН антисм ыслово го	Немодифицированная антисмысловая последовательность (5'–3')	SEQ ID NO:
AD– 65381	A– 130366	UCGUGGUGGAC UUCUCUCA	1025	A– 131904	UGAGAGAAGUCCAC CACGAUU	1036

AD- 66019	A- 130366	UCGUGGUGGAC UUCUCUCA	1026	A- 131904	UGAGAGAAGUCCAC CACGAUU	1037
AD- 65375	A- 130366	UCGUGGUGGAC UUCUCUCA	1027	A- 130364	UGAGAGAAGUCCAC CACGAUU	1038
AD- 65427	A- 130441	GUGCACUUCGCU UCACCUCUA	1028	A- 131905	UAGAGGUGAAGCGA AGUGCACUU	1039
AD- 66110	A- 130441	GUGCACUUCGCU UCACCUCUA	1029	A- 131905	UAGAGGUGAAGCGA AGUGCACUU	1040
AD- 65421	A- 130441	GUGCACUUCGCU UCACCUCUA	1030	A- 130442	UAGAGGUGAAGCGA AGUGCACUU	1041
AD- 65407	A- 130371	CGUGGUGGACU UCUCUCAAUU	1031	A- 130372	AAUUGAGAGAAGUC CACCAGCAG	1042
AD- 65377	A- 130384	CGUGGUGGUCTU CUCUAAAUAU	1032	A- 130748	AAUUGAGAGAAGUC CACCAGCUU	1043
AD- 65409	A- 130388	GGUGGACUUCUC UCAAUUUUA	1033	A- 131906	UAAAAUUGAGAGAA GUCCACCAC	1044
AD- 66111	A- 130388	GGUGGACUUCUC UCAAUUUUA	1034	A- 131906	UAAAAUUGAGAGAA GUCCACCAC	1045
AD- 65403	A- 130388	GGUGGACUUCUC UCAAUUUUA	1035	A- 130389	UAAAAUUGAGAGAA GUCCACCAC	1046

Таблица 7. Примеры модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи дцРНК ВГВ (данные по активности доступны в WO2016/077321, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

ИН дупле кса	ИН смысл ового	Смысловая последовательнос ть (5'–3')	SEQ ID NO:	ИН антисмы слового	Антисмысловая Последовательность (5'–3')	SEQ ID NO:
AD- 65381	A- 130366	uscsguGfgUfGfGfac uucucucaL96	1047	A-131904	<u>P</u> usGfsagaGfaAfGfucaCfcAfcgasusu	1058
AD- 66019	A- 130366	uscsguGfgUfGfGfac uucucucaL96	1048	A-131904	<u>VP</u> usGfsagaGfaAfGfuc caCfcAfcgasusu	1059
AD- 65375	A- 130366	uscsguGfgUfGfGfac uucucucaL96	1049	A-130364	usGfsagaGfaAfGfucaCfcAfcgasusu	1060
AD- 65427	A- 130441	gsusgcacUfuCfGfCf uucaccucuaL96	1050	A-131905	<u>P</u> usAfsgagGfugaagcgA faGfugacacsusu	1061

AD-66110	A-130441	gsusgcacUfuCfGfCf uucaccucuaL96	1051	A-131905	<u>VP</u> usAfsgagGfugaagcg AfaGfugcacsusu	1062
AD-65421	A-130441	gsusgcacUfuCfGfCf uucaccucuaL96	1052	A-130442	usAfsgagGfugaagcgAfa Gfugcacsusu	1063
AD-65407	A-130371	csgsugguGfgAfCfUf ucucUfCfaauuL96	1053	A-130372	asAfsuugAfgAfgAfagu CfcAfccagesasg	1064
AD-65377	A-130384	csgsuggudGgucdTuc ucuaaaauL96	1054	A-130748	asdAsuugagagdAagudC caccagesusu	1065
AD-65409	A-130388	gsgsuggaCfuUfCfUf cucaAfUfuuuuL96	1055	A-131906	<u>P</u> usAfsaaaUfuGfAfgag aAfgUfccaccsasc	1066
AD-66111	A-130388	gsgsuggaCfuUfCfUf cucaAfUfuuuuL96	1056	A-131906	<u>VP</u> usAfsaaaUfuGfAfga gaAfgUfccaccsasc	1067
AD-65403	A-130388	gsgsuggaCfuUfCfUf cucaAfUfuuuuL96	1057	A-130389	usAfsaaaUfuGfAfgaga AfgUfccaccsasc	1068

Таблица 8. Примеры немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи дцРНК ВГВ (данные по активности доступны в WO2016/077321, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

ИН дупле кса	Название смыслового олигонукле отида	Смысловая последователь ность (5'–3')	SEQ ID NO:	Название антисмысло вого олигонукле отида	Антисмысловая Последователь ность (5'–3')	SEQ ID NO:
AD-65776	A-131859	UGUGCACUU CGCUUCACC UCU	1069	A-131860	AGAGGUGAAG CGAAGUGCAC ACG	1115
AD-65782	A-131877	UGCACUUCG CUUCACCUC UGA	1070	A-131878	UCAGAGGUGA AGCGAAGUGC ACA	1116
AD-65792	A-131865	GUGUGCACU UCGCUUCAC CUA	1071	A-131866	UAGGUGAAGC GAAGUGCACA CGG	1117
AD-65781	A-131861	CGUGUGCAC UUCGCUUCA CCU	1072	A-131862	AGGUGAAGCG AAGUGCACAC GGU	1118
AD-	A-128443	GUGCACUUC	1073	A-128444	UAGAGGUGAA	1119

64304		GCUUCACCU CUA			GCGAAGUGCA CAC	
AD- 65771	A-131857	CCGUGUGCA CUUCGCUUC ACA	1074	A-131858	UGUGAAGCGA AGUGCACACG GUC	1120
AD- 65758	A-131867	CACUUCGCU UCACCUCUG CAA	1075	A-131868	UUGCAGAGGU GAAGCGAAGU GCA	1121
AD- 65777	A-131875	ACUUCGCUU CACCUCUGC ACA	1076	A-131876	UGUGCAGAGG UGAAGCGAAG UGC	1122
AD- 61567	A-123525	GGCUGUAGG CAUAAAUUG GUA	1077	A-123526	UACCAAUUUA UGCCUACAGC CUC	1123
AD- 65772	A-131873	UUCGCUUCA CCUCUGCAC GUA	1078	A-131874	UACGUGCAGA GGUGAAGCGA AGU	1124
AD- 65767	A-131871	UCGCUUCAC CUCUGCACG UCA	1079	A-131872	UGACGUGCAG AGGUGAAGCG AAG	1125
AD- 65763	A-131869	CUUCGCUUC ACCUCUGCA CGU	1080	A-131870	ACGUGCAGAG GUGAAGCGAA GUG	1126
AD- 64281	A-128395	CCCCGUCUG UGCCUUCUC AUA	1081	A-128396	UAUGAGAAGG CACAGACGGG GAG	1127
AD- 64311	A-128391	CCGUCUGUG CCUUCUCAU CUA	1082	A-128392	UAGAUGAGAA GGCACAGACG GGG	1128
AD- 65790	A-131837	CCAGCACCA UGCAACUUU UUA	1083	A-131838	UAAAAAGUUG CAUGGUGCUG GUG	1129
AD- 65761	A-131841	CACCAGCAC CAUGCAACU	1084	A-131842	AAAAGUUGCA UGGUGCUGGU	1130

		UUU			GCG	
AD- 65786	A-131849	CACCAUGCA ACUUUUUCA CCU	1085	A-131850	AGGUGAAAAA GUUGCAUGGU GCU	1131
AD- 65785	A-131835	CAAUGUCAA CGACCGACC UUA	1086	A-131836	UAAGGUCGGU CGUUGACAUU GCA	1132
AD- 65787	A-131863	CGCUUCACC UCUGCACGU CGA	1087	A-131864	UCGACGUGCA GAGGUGAAGC GAA	1133
AD- 65770	A-131845	ACCUUGAGG CAUACUUCA AAG	1088	A-131846	CUUUGAAGUA UGCCUCAAGG UCG	1134
AD- 65766	A-131843	CCGACCUUG AGGCAUACU UCA	1089	A-131844	UGAAGUAUGC CUCAAGGUCG GUC	1135
AD- 61555	A-123521	GACCUUGAG GCAUACUUC AAA	1090	A-123522	UUUGAAGUAU GCCUCAAGGU CGG	1136
AD- 65762	A-131855	ACCGACCUU GAGGCAUAC UUA	1091	A-131856	UAAGUAUGCC UCAAGGUCGG UCG	1137
AD- 65755	A-131827	UCGCAUGGA GACCACCGU GAA	1092	A-131828	UUCACGGUGG UCUCCAUGCG ACG	1138
AD- 65788	A-131811	UUACAUAA AGGACUCUU GGA	1093	A-131812	UCCAAGAGUC CUCUUAUGUA AGA	1139
AD- 65768	A-131803	UCUUACAUA AGAGGACUC UUA	1094	A-131804	UAAGAGUCCU CUUAUGUAAG ACC	1140
AD- 61561	A-123523	ACUUCAAAG ACUGUUUGU UUA	1095	A-123524	UAAACAAACA GUCUUUGAAG UAU	1141

AD- 65764	A-131801	UACUUCAAA GACUGUUUG UUU	1096	A-131802	AAACAAACAG UCUUUGAAGU AUG	1142
AD- 65753	A-131799	AUACUUCAA AGACUGUUU GUU	1097	A-131800	AACAAACAGU CUUUGAAGUA UGC	1143
AD- 65765	A-131817	UUGUUUAAA GACUGGGAG GAA	1098	A-131818	UUCCUCCCAG UCUUUAAACA AAC	1144
AD- 65769	A-131819	GCAUACUUC AAAGACUGU UUA	1099	A-131820	UAAACAGUCU UUGAAGUAUG CCU	1145
AD- 65759	A-131815	CAAAGACUG UUUGUUUAA AGA	1100	A-131816	UCUUUAAACA AACAGUCUUU GAA	1146
AD- 65774	A-131831	AGACUGUUU GUUUAAGA CUA	1101	A-131832	UAGUCUUUAA ACAAACAGUC UUU	1147
AD- 65778	A-131807	GUUUGUUUA AAGACUGGG AGA	1102	A-131808	UCUCCCAGUC UUUAAACAAA CAG	1148
AD- 65773	A-131805	GGGGGAGGA GAUUAGAUU AAA	1103	A-131806	UUUAAUCUAA UCUCCUCCCC CAA	1149
AD- 65789	A-131825	GGGGAGGAG AUUAGAUUA AAG	1104	A-131826	CUUUAUCUA AUCUCCUCCC CCA	1150
AD- 65783	A-131809	GUUGGGGGA GGAGAUUAG AUU	1105	A-131810	AAUCUAAUCU CCUCCCCCAA CUC	1151
AD- 65754	A-131813	UUGGGGGAG GAGAUUAGA UUA	1106	A-131814	UAAUCUAAUC UCCUCCCCCA ACU	1152
AD-	A-131821	GGGAGGAGA	1107	A-131822	UCUUUAAUCU	1153

65779		UUAGAUUAA AGA			AAUCUCCUCC CCC	
AD- 65791	A-131851	UUAGAUUAA AGGUCUUUG UAA	1108	A-131852	UUACAAAGAC CUUUAAUCUA AUC	1154
AD- 65760	A-131829	UAGAUUAAA GGUCUUUGU ACU	1109	A-131830	AGUACAAAGA CCUUUAAUCU AAU	1155
AD- 65784	A-131823	AUUAGAUUA AAGGUCUUU GUA	1110	A-131824	UACAAAGACC UUUAAUCUAA UCU	1156
AD- 65757	A-131853	GAGGAGAUU AGAUUAAAG GUA	1111	A-131854	UACCUUUAAU CUAAUCUCCU CCC	1157
AD- 65775	A-131847	GGACUCUUG GACUCUCUG CAA	1112	A-131848	UUGCAGAGAG UCCAAGAGUC CUC	1158
AD- 65780	A-131833	ACUCUUGGA CUCUCUGCA AUA	1113	A-131834	UAUUGCAGAG AGUCCAAGAG UCC	1159
AD- 65756	A-131839	AGAUUAAAG GUCUUUGUA CUA	1114	A-131840	UAGUACAAAG ACCUUUAUUC UAA	1160

Таблица 9. Примеры немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи дцРНК ВГВ (данные по активности доступны в WO2016/077321, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

ИН дупле кса	Название смыслового олигонукле отида	Смысловая последователь ность (5'–3')	SEQ ID NO:	Название антисмысло вого олигонукле отида	Антисмысловая последовательн ость (5'–3')	SEQ ID NO:
AD- 65776	A-131859	UfsgsUfgCfaCf uUfCfGfcUfuCf aCfcUfcUfL96	1161	A-131860	asGfsaGfgUfgAfa GfcgaAfgUfgCfa Cfascsg	1207
AD-	A-131877	UfsgsCfaCfuUfc	1162	A-131878	usCfsaGfaGfgUfg	1208

65782		GfCfUfuCfaCfc UfcUfgAfL96			AfagcGfaAfgUfg Cfascsa	
AD- 65792	A-131865	GfsusGfuGfcAf cUfUfCfGcfUf cAfcCfuAfL96	1163	A-131866	usAfsGfuGfaAf gCfGaaGfuGfcAf cAfcsgsg	1209
AD- 65781	A-131861	CfsgsUfgUfgCf aCfUfUfcGfcUf uCfaCfcUfL96	1164	A-131862	asGfsgUfgAfaGfc GfaagUfgCfaCfa Cfsgsgsu	1210
AD- 64304	A-128443	GfsusGfcAfcUf uCfGfCfuUfcAf cCfuCfuAfL96	1165	A-128444	usAfsGafGfuGf aAfgcgAfaGfuGf cAfcasac	1211
AD- 65771	A-131857	CfscsGfuGfuGf cAfCfUfuCfGcf uUfcAfcAfL96	1166	A-131858	usGfsuGfaAfgCf gAfaguGfcAfcAf cGfsgusc	1212
AD- 65758	A-131867	CfsasCfuUfcGfc UfUfCfaCfcUfc UfgCfaAfL96	1167	A-131868	usUfsgCfaGfaGfg UfgaaGfcGfaAfg Ufgscsa	1213
AD- 65777	A-131875	AfscsUfuCfGcf uUfCfAfcCfuCf uGfcAfcAfL96	1168	A-131876	usGfsuGfcAfgAf gGfugaAfgCfGaf aGfusgsc	1214
AD- 61567	A-123525	GfsgsCfuGfuAf gGfCfAfuAfaAf uUfgGfuAfL96	1169	A-123526	usApscCfaAfuUfu AfugcCfuAfcAfg Cfcsusc	1215
AD- 65772	A-131873	UfsusCfGcfUf cAfCfCfuCfuGf cAfcGfuAfL96	1170	A-131874	usApscGfuGfcAf gAfgguGfaAfgCf gAfasgsu	1216
AD- 65767	A-131871	UfscsGfcUfuCfa CfCfUfcUfgCfa CfGufcAfL96	1171	A-131872	usGfsaCfGufCfa GfaggUfgAfaGfc Gfasasg	1217
AD- 65763	A-131869	CfsusUfcGfcUf uCfAfCfcUfcUf gCfaCfGufL96	1172	A-131870	asCfsgUfgCfaGfa GfgugAfaGfcGfa Afgsusg	1218
AD- 64281	A-128395	CfscsCfcGfuCfu GfUfGfcCfuUfc	1173	A-128396	usAfsuGfaGfaAf gGfcacAfgAfcGf	1219

		UfcAfuAfL96			gGfgsasg	
AD- 64311	A-128391	CfscsGfuCfuGf uGfCfCfuUfcUf cAfuCfuAfL96	1174	A-128392	usAfsGfuGfaGf aAfggcAfcAfgAf cGfgsgsg	1220
AD- 65790	A-131837	CfscsAfgCfaCfc AfUfGfcAfaCfu UfuUfuAfL96	1175	A-131838	usAfsaAfaAfgUf uGfcuGfgUfgCf uGfgsusg	1221
AD- 65761	A-131841	CfsasCfcAfgCfa CfCfAfuGfcAfa CfuUfuUfL96	1176	A-131842	asAfsaAfgUfuGfc AfuggUfgCfuGfg Ufgscsg	1222
AD- 65786	A-131849	CfsasCfcAfuGfc AfAfCfuUfuUfu CfaCfcUfL96	1177	A-131850	asGfsgUfgAfaAfa AfguuGfcAfuGfg Ufgscsu	1223
AD- 65785	A-131835	CfsasAfuGfuCfa AfCfGfaCfcGfa CfcUfuAfL96	1178	A-131836	usAfsaGfgUfcGf gUfcguUfgAfcAf uUfgscsa	1224
AD- 65787	A-131863	CfsgsCfuUfcAfc CfUfCfuGfcAfc GfuCfgAfL96	1179	A-131864	usCfsgAfcGfuGfc AfgagGfuGfaAfg Cfsgsasa	1225
AD- 65770	A-131845	AfscsCfuUfgAf gGfCfAfuAfcUf uCfaAfaGfL96	1180	A-131846	csUfsuUfgAfaGf uAfugcCfuCfaAf gGfscsg	1226
AD- 65766	A-131843	CfscsGfaCfcUfu GfAfGfgCfaUfa CfuUfcAfL96	1181	A-131844	usGfsaAfgUfaUf gCfcucAfaGfgUf cGfgsusg	1227
AD- 61555	A-123521	GfsasCfcUfuGfa GfGfCfaUfaCfu UfcAfaAfL96	1182	A-123522	usUfsuGfaAfgUf aUfgccUfcAfaGf gUfcsgsg	1228
AD- 65762	A-131855	AfscsCfcAfcCfu UfGfAfgGfcAfu AfcUfuAfL96	1183	A-131856	usAfsaGfuAfuGf cCfucAfgGfuCf gGfscsg	1229
AD- 65755	A-131827	UfscsGfcAfuGf gAfGfAfcCfaCf cGfuGfaAfL96	1184	A-131828	usUfscAfcGfgUf gGfucCfcAfuGf cGfascsg	1230

AD– 65788	A–131811	UfsusAfcAfuAf aGfAfGfgAfcUf cUfuGfgAfL96	1185	A–131812	usCfscAfaGfaGfu CfcucUfuAfuGfu Afasgsa	1231
AD– 65768	A–131803	UfscsUfuAfcAf uAfAfGfaGfgAf cUfcUfuAfL96	1186	A–131804	usAfsaGfaGfuCfc UfcuuAfuGfuAfa Gfascsc	1232
AD– 61561	A–123523	AfscsUfuCfaAfa GfAfCfuGfuUfu GfuUfuAfL96	1187	A–123524	usAfsaAfcAfaAfc AfgucUfuUfgAfa Gfusasu	1233
AD– 65764	A–131801	UfsasCfuUfcAfa AfGfAfcUfgUfu UfgUfuUfL96	1188	A–131802	asAfsaCfaAfaCfa GfucuUfuGfaAfg Ufasusg	1234
AD– 65753	A–131799	AfsusAfcUfuCf aAfAfGfaCfuGf uUfuGfuUfL96	1189	A–131800	asAfscAfaAfcAfg UfcuuUfgAfaGfu Afusgsc	1235
AD– 65765	A–131817	UfsusGfuUfuAf aAfGfAfcUfgGf gAfgGfaAfL96	1190	A–131818	usUfscCfuCfcCfa GfucuUfuAfaAfc Afasasc	1236
AD– 65769	A–131819	GfscsAfuAfcUf uCfAfAfaGfaCf uGfuUfuAfL96	1191	A–131820	usAfsaAfcAfgUfc UfuugAfaGfuAfu Gfcscsu	1237
AD– 65759	A–131815	CfsasAfaGfaCfu GfUfUfuGfuUfu AfaAfgAfL96	1192	A–131816	usCfsuUfuAfaAfc AfaacAfgUfcUfu Ufgsasa	1238
AD– 65774	A–131831	AfsgsAfcUfgUf uUfGfUfuUfaAf aGfaCfuAfL96	1193	A–131832	usAfsgUfcUfuUf aAfacaAfaCfaGfu Cfususu	1239
AD– 65778	A–131807	GfsusUfuGfuUf uAfAfAfgAfcUf gGfgAfgAfL96	1194	A–131808	usCfsuCfcCfaGfu CfuuuAfaAfcAfa Afcasag	1240
AD– 65773	A–131805	GfsgsGfgGfaGf gAfGfAfuUfaGf aUfuAfaAfL96	1195	A–131806	usUfsuAfaUfcUfa AfucuCfcUfcCfc Cfcsasa	1241
AD–	A–131825	GfsgsGfgAfgGf	1196	A–131826	csUfsuUfaAfuCfu	1242

65789		aGfAfUfuAfgAf uUfaAfaGfL96			AfaucUfcCfuCfc Cfcsca	
AD– 65783	A–131809	GfsusUfgGfgGf gAfGfGfaGfaUf uAfgAfuUfL96	1197	A–131810	asAfsuCfuAfaUfc UfccuCfcCfcCfa Afcscusc	1243
AD– 65754	A–131813	UfsusGfgGfgGf aGfGfAfgAfuUf aGfaUfuAfl96	1198	A–131814	usAfsaUfcUfaAfu CfuccUfcCfcCfc Afascsu	1244
AD– 65779	A–131821	GfsgsGfaGfgAf gAfUfUfaGfaUf uAfaAfgAfl96	1199	A–131822	usCfsuUfuAfaUfc UfaauCfuCfcUfc Cfcsesc	1245
AD– 65791	A–131851	UfsusAfgAfuUf aAfAfGfgUfcUf uUfgUfaAfl96	1200	A–131852	usUfsaCfaAfaGfa CfcuuUfaAfuCfu Afasusc	1246
AD– 65760	A–131829	UfsasGfaUfuAf aAfGfGfuCfuUf uGfuAfcUfl96	1201	A–131830	asGfsuAfcAfaAfg AfccuUfuAfaUfc Ufasasu	1247
AD– 65784	A–131823	AfsusUfaGfaUf uAfAfAfgGfuCf uUfuGfuAfl96	1202	A–131824	usAfscAfaAfgAfc CfuuuAfaUfcUfa Afuscsu	1248
AD– 65757	A–131853	GfsasGfgAfgAf uUfAfGfaUfuAf aAfgGfuAfl96	1203	A–131854	usAfscCfuUfuAfa UfcuaAfuCfuCfc Ufcsesc	1249
AD– 65775	A–131847	GfsgsAfcUfcUf uGfGfAfcUfcUf cUfgCfaAfl96	1204	A–131848	usUfsgCfaGfaGfa GfuccAfaGfaGfu Cfcsusc	1250
AD– 65780	A–131833	AfscsUfcUfuGf gAfCfUfcUfcUf gCfaAfuAfl96	1205	A–131834	usAfsuUfgCfaGfa GfaguCfcAfaGfa Gfuscsc	1251
AD– 65756	A–131839	AfsgsAfuUfaAf aGfGfUfcUfuUf gUfaCfuAfl96	1206	A–131840	usAfsgUfaCfaAfa GfaccUfuUfaAfu Cfusasa	1252

Таблица 10. Примеры немодифицированных ВГВ X ORF смысловых и антисмысловых последовательностей. (данные по активности доступны в WO2016/077321, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

<u>ИН</u> <u>дуплек</u> <u>са</u>	<u>Немодифицированная</u> <u>смысловая</u> <u>последовательность</u> <u>(5'–3')</u>	<u>SEQ ID</u> <u>NO:</u>	<u>немодифицированная</u> <u>антисмысловая</u> <u>последовательность (5'–3')</u>	<u>SEQ ID</u> <u>NO:</u>
<u>AD–</u> <u>66808</u>	<u>GUCUGUGCCUUCUC</u> <u>AUCUA</u>	<u>1253</u>	<u>UAGAUGAGAAGGCACAG</u> <u>ACUU</u>	<u>1263</u>
<u>AD–</u> <u>66809</u>	<u>GUCUGUGCCUUCUC</u> <u>AUCUA</u>	<u>1254</u>	<u>UAGAUGAGAAGGCACAG</u> <u>ACUU</u>	<u>1264</u>
<u>AD–</u> <u>66810</u>	<u>GUGUGCACUUCGCU</u> <u>UCACA</u>	<u>1255</u>	<u>UGUGAAGCGAAGUGCAC</u> <u>ACUU</u>	<u>1265</u>
<u>AD–</u> <u>66811</u>	<u>GUGUGCACUUCGCU</u> <u>UCACA</u>	<u>1256</u>	<u>UGUGAAGCGAAGUGCAC</u> <u>ACUU</u>	<u>1266</u>
<u>AD–</u> <u>66812</u>	<u>UGUGCACUUCGCUU</u> <u>CACCUCU</u>	<u>1257</u>	<u>AGAGGUGAAGCGAAGUG</u> <u>CACAUU</u>	<u>1267</u>
<u>AD–</u> <u>66813</u>	<u>UGUGCACUUCGCUU</u> <u>CACCUCU</u>	<u>1258</u>	<u>AGAGGUGAAGCGAAGUG</u> <u>CACAUU</u>	<u>1268</u>
<u>AD–</u> <u>66814</u>	<u>CACCAGCACCAUGC</u> <u>AACUUUU</u>	<u>1259</u>	<u>AAAAGUUGCAUGGUGCU</u> <u>GGUGUU</u>	<u>1269</u>

<u>AD– 66815</u>	<u>CACCAGCACCAUGC AACUUUU</u>	<u>1260</u>	<u>AAAAGUUGCAUGGUGCU GGUGUU</u>	<u>1270</u>
<u>AD– 66816</u>	<u>CACCAUGCAACUUU UUCACCU</u>	<u>1261</u>	<u>AGGUGAAAAAGUUGCAU GGUGUU</u>	<u>1271</u>
<u>AD– 66817</u>	<u>CACCAUGCAACUUU UUCACCU</u>	<u>1262</u>	<u>AGGUGAAAAAGUUGCAU GGUGUU</u>	<u>1272</u>

Таблица 11. Примеры модифицированных ВГВ X ORF смысловых и антисмысловых последовательностей. (данные по активности доступны в WO2016/077321, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

<u>ИН дуплекса</u>	<u>Модифицированная смысловая последовательность (5'–3')</u>	<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Модифицированная антисмысловая последовательность (5'–3')</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
<u>AD– 66808</u>	<u>gsuscuGfuGfCfCfuucua ucuaL96</u>	<u>1273</u>	<u>usAfsgauGfaGfAfaggcAfc Afgacsusu</u>	<u>1283</u>
<u>AD– 66809</u>	<u>gsuscuGfuGfCfCfuucua ucuaL96</u>	<u>1274</u>	<u>UfsAfsgauGfaGfAfaggcAf cAfgacsusu</u>	<u>1284</u>
<u>AD– 66810</u>	<u>gsusguGfcAfCfUfucguu cacaL96</u>	<u>1275</u>	<u>usGfsugaAfgCfGfaaguGfc Afcacsusu</u>	<u>1285</u>

<u>AD–</u> <u>66811</u>	<u>gsusguGfcAfCfUfucgcuu</u> <u>cacaL96</u>	<u>1276</u>	<u>UfsGfsugaAfgCfGfaaguGf</u> <u>cAfcacsusu</u>	<u>1286</u>
<u>AD–</u> <u>66812</u>	<u>usgsugcaCfuUfCfGfcuuc</u> <u>accucuL96</u>	<u>1277</u>	<u>asGfsaggUfgAfAfgcgaAfg</u> <u>Ufgcacasusu</u>	<u>1287</u>
<u>AD–</u> <u>66813</u>	<u>usgsugcaCfuUfCfGfcuuc</u> <u>accucuL96</u>	<u>1278</u>	<u>AfsGfsaggUfgAfAfgcgaA</u> <u>fgUfgcacasusu</u>	<u>1288</u>
<u>AD–</u> <u>66814</u>	<u>csasccagCfaCfCfAfugca</u> <u>acuuuuL96</u>	<u>1279</u>	<u>asAfsaagUfuGfCfauggUfg</u> <u>Cfuggugsusu</u>	<u>1289</u>
<u>AD–</u> <u>66815</u>	<u>csasccagCfaCfCfAfugca</u> <u>acuuuuL96</u>	<u>1280</u>	<u>AfsAfsaagUfuGfCfauggUf</u> <u>gCfuggugsusu</u>	<u>1290</u>
<u>AD–</u> <u>66816</u>	<u>csasccauGfcAfAfCfuuuu</u> <u>ucaccuL96</u>	<u>1281</u>	<u>asGfsgugAfaAfAfaguuGfc</u> <u>Afuggugsusu</u>	<u>1291</u>
<u>AD–</u> <u>66817</u>	<u>csasccauGfcAfAfCfuuuu</u> <u>ucaccuL96</u>	<u>1282</u>	<u>AfsGfsgugAfaAfAfaguuG</u> <u>fcAfuggugsusu</u>	<u>1292</u>

Таблица 12: Целевые последовательности ВГВ, показывающие сайты–мишени по № доступа X02763.1. (данные по активности и примеры химических модификаций доступны в WO2012/024170, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

Целевая последовательность	Сайт–мишень	SEQ ID NO:
UCGUGGUGGACUUCUCUCA	1663	1293
GUGGUGGACUUCUCUCAAU	1665	1294

GCCGAUCCAUAUCUGCGGAA	2669	1295
CCGAUCCAUAUCUGCGGAAC	2670	1296
CAUCCUGCUGCUAUGCCUC	1818	1297
UGCUGCUAUGCCUCAUCUU	1823	1298
GGUGGACUUCUCUCAAUUU	1667	1299
UGGUGGACUUCUCUCAAUU	1666	1300
UAGACUCGUGGUGGACUUC	1658	1301
UCCUCUGCCGAUCCAUAUCU	2663	1302
UGCCGAUCCAUAUCUGCGGA	2668	1303
UGGAUGUGUCUGCGGCGUU	1783	1304
CGAUCCAUAUCUGCGGAACU	2671	1305
CGCACCUCUCUUUACGCGG	2934	1306
CUGCCGAUCCAUAUCUGCGG	2667	1307
CGUGGUGGACUUCUCUCAA	1664	1308
CUGCUGCUAUGCCUCAUCU	1822	1309
CCUGCUGCUAUGCCUCAUC	1821	1310
CUAGACUCGUGGUGGACUU	1657	1311
UCCUGCUGCUAUGCCUCAU	1820	1312
GACUCGUGGUGGACUUCUC	1660	1313
AUCCAUAUCUGCGGAACUCC	2673	1314
CUCUGCCGAUCCAUAUCUGC	2665	1315
GAUCCAUAUCUGCGGAACUC	2672	1316
GAAGAACUCCCUCGCCUCG	567	1317
AAGCCUCCAAGCUGUGCCU	54	1318
AGAAGAACUCCCUCGCCUC	566	1319
GGAGUGUGGAUUCGCACUC	455	1320
CCUCUGCCGAUCCAUAUCUG	2664	1321
CAAGCCUCCAAGCUGUGCC	53	1322
UCCAUAUCUGCGGAACUCCU	2674	1323
CAGAGUCUAGACUCGUGGU	1651	1324
AAGAAGAACUCCCUCGCCU	565	1325
GAGUGUGGAUUCGCACUCC	456	1326
UCUAGACUCGUGGUGGACU	1656	1327

GCUGCUAUGCCUCAUCUUC	1824	1328
AGUCUAGACUCGUGGUGGA	1654	1329
CUCCUCUGCCGAUCCAUAAC	2662	1330
UGGCUCAGUUUACUAGUGC	2077	1331
GUCUAGACUCGUGGUGGAC	1655	1332
UUCAAGCCUCCAAGCUGUG	51	1333
CUAUGGGAGUGGGCCUCAG	2047	1334
CUCGUGGUGGACUUCUCUC	1662	1335
CCUAUGGGAGUGGGCCUCA	2046	1336
AAGAACUCCCUCGCCUCGC	568	1337
UCUGCCGAUCCAUAACUGCG	2666	1338
AGAGUCUAGACUCGUGGUG	1652	1339
GAAGAAGAACUCCCUCGCC	564	1340
UCAAGCCUCCAAGCUGUGC	52	1341
AGCCUCCAAGCUGUGCCUU	55	1342
AGACUCGUGGUGGACUUCU	1659	1343

Таблица 13. Различные ВГВ миРНК смысловые и антисмысловые последовательности, соответствующие идентифицированным целевым последовательностям в **таблице 1а**. (данные по активности и примеры химических модификаций доступны в WO2012/024170, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки)

Сайт– мишень	SEQ ID NO:	Смысловая последовательность	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:
1663	1344	UCGUGGUGGACUUCUCUC A	UGAGAGAAGUCCACCACG A	1395
1665	1345	GUGGUGGACUUCUCUCAA U	AUUGAGAGAAGUCCACCA C	1396
2669	1346	GCCGAUCCAUAACUGCGGA A	UUCCGCAGUAUGGAUCGG C	1397
2670	1347	CCGAUCCAUAACUGCGGAAC	GUUCCGCAGUAUGGAUCG G	1398
1818	1348	CAUCCUGCUGCUAUGCCUC	GAGGCAUAGCAGCAGGAU G	1399
1823	1349	UGCUGCUAUGCCUCAUCU	AAGAUGAGGCAUAGCAGC	1400

		U	A	
1667	1350	GGUGGACUUCUCUCAAUU U	AAAUUGAGAGAAGUCCAC C	1401
1666	1351	UGGUGGACUUCUCUCAAU U	AAUUGAGAGAAGUCCACC A	1402
1658	1352	UAGACUCGUGGUGGACUU C	GAAGUCCACCACGAGUCU A	1403
2663	1353	UCCUCUGCCGAUCCAUAU C	AGUAUGGAUCGGCAGAGG A	1404
2668	1354	UGCCGAUCCAUAACUGCGG A	UCCGCAGUAUGGAUCGGC A	1405
1783	1355	UGGAUGUGUCUGCGGCGU U	AACGCCGCAGACACAUC A	1406
2671	1356	CGAUCCAUAACUGCGGAAC U	AGUUCCGCAGUAUGGAUC G	1407
2934	1357	CGCACCUCUCUUUACGCGG G	CCGCGUAAAGAGAGGUGC G	1408
2667	1358	CUGCCGAUCCAUAACUGCGG G	CCGCAGUAUGGAUCGGCA G	1409
1664	1359	CGUGGUGGACUUCUCUCA A	UUGAGAGAAGUCCACCAC G	1410
1822	1360	CUGCUGCUAUGCCUCAUCU G	AGAUGAGGCAUAGCAGCA G	1411
1821	1361	CCUGCUGCUAUGCCUCAUC G	GAUGAGGCAUAGCAGCAG G	1412
1657	1362	CUAGACUCGUGGUGGACU U	AAGUCCACCACGAGUCUA G	1413
1820	1363	UCCUGCUGCUAUGCCUCAU A	AUGAGGCAUAGCAGCAGG A	1414
1660	1364	GACUCGUGGUGGACUUCU C	GAGAAGUCCACCACGAGU C	1415
2673	1365	AUCCAUAACUGCGGAACUC U	GGAGUUCCGCAGUAUGGA U	1416
2665	1366	CUCUGCCGAUCCAUAACUG C	GCAGUAUGGAUCGGCAGA A	1417

			G	
2672	1367	GAUCCAUAACUGCGGAACU C	GAGUUCCGCAGUAUGGAU C	1418
567	1368	GAAGAACUCCCUCGCCUCG	CGAGGCGAGGGAGUUCUU C	1419
54	1369	AAGCCUCCAAGCUGUGCCU	AGGCACAGCUUGGAGGCU U	1420
566	1370	AGAAGAACUCCCUCGCCUC	GAGGCGAGGGAGUUCUUC U	1421
455	1371	GGAGUGUGGAUUCGCACU C	GAGUGCGAAUCCACACUC C	1422
2664	1372	CCUCUGCCGAUCCAUAACUG	CAGUAUGGAUCGGCAGAG G	1423
53	1373	CAAGCCUCCAAGCUGUGCC	GGCACAGCUUGGAGGCUU G	1424
2674	1374	UCCAUAACUGCGGAACUCCU	AGGAGUUCCGCAGUAUGG A	1425
1651	1375	CAGAGUCUAGACUCGUGG U	ACCACGAGUCUAGACUCU G	1426
565	1376	AAGAAGAACUCCCUCGCCU	AGGCGAGGGAGUUCUUCU U	1427
456	1377	GAGUGUGGAUUCGCACUC C	GGAGUGCGAAUCCACACU C	1428
1656	1378	UCUAGACUCGUGGUGGAC U	AGUCCACCACGAGUCUAG A	1429
1824	1379	GCUGCUAUGCCUCAUCUUC	GAAGAUGAGGCAUAGCAG C	1430
1654	1380	AGUCUAGACUCGUGGUGG A	UCCACCACGAGUCUAGAC U	1431
2662	1381	CUCCUCUGCCGAUCCAUAAC	GUAUGGAUCGGCAGAGGA G	1432
2077	1382	UGGCUCAGUUUACUAGUG C	GCACUAGUAAACUGAGCC A	1433
1655	1383	GUCUAGACUCGUGGUGGA	GUCCACCACGAGUCUAGA	1434

		C	C	
51	1384	UUCAAGCCUCCAAGCUGU G	CACAGCUUGGAGGCUUGA A	1435
2047	1385	CUAUGGGAGUGGGCCUCA G	CUGAGGCCCACUCCCAUA G	1436
1662	1386	CUCGUGGUGGACUUCUCU C	GAGAGAAGUCCACCACGA G	1437
2046	1387	CCUAUGGGAGUGGGCCUC A	UGAGGCCCACUCCCAUAG G	1438
568	1388	AAGAACUCCCUCGCCUCGC	GCGAGGCGAGGGAGUUCU U	1439
2666	1389	UCUGCCGAUCCAUAACUGCG	CGCAGUAUGGAUCGGCAG A	1440
1652	1390	AGAGUCUAGACUCGUGGU G	CACCACGAGUCUAGACUC U	1441
564	1391	GAAGAAGAACUCCCUCGCC	GGCGAGGGAGUUCUUCUU C	1442
52	1392	UCAAGCCUCCAAGCUGUGC	GCACAGCUUGGAGGCUUG A	1443
55	1393	AGCCUCCAAGCUGUGCCUU	AAGGCACAGCUUGGAGGC U	1444
1659	1394	AGACUCGUGGUGGACUUC U	AGAAGUCCACCACGAGUC U	1445

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Специалист в данной области техники знает или способен установить, используя не более чем стандартные эксперименты, многие эквиваленты конкретным вариантам осуществления и способам, описанным в настоящем изобретении. Предполагается, что такие эквиваленты включены в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. РНКи агент и ВГВ вакцина, включая белковую вакцину и вакцину на основе нуклеиновой кислоты, для применения в лечении инфекции вирусом гепатита В (ВГВ) или способ лечения пациента, имеющего инфекцию ВГВ, включающий последовательное введение пациенту, имеющему инфекцию ВГВ:

а) РНКи агента, который ингибирует экспрессию по меньшей мере трех транскриптов ВГВ, где РНКи агент содержит смысловую цепь и антисмысловая цепь, образующие двухцепочечную область;

б) белковой вакцины, содержащей первый полипептид ВГВ ядерного антигена (НВсAg) или его иммуногенный фрагмент, и первый полипептид ВГВ поверхностного антигена (НВsAg) или его иммуногенный фрагмент; и

с) вакцины на основе нуклеиновой кислоты, содержащей экспрессирующую векторную конструкцию, кодирующую второй НВсAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и/или второй НВsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент,

где второй НВсAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и/или второй НВsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, имеют по меньшей мере один общий эпитоп по меньшей мере с одним из первого НВсAg полипептида или его иммуногенного фрагмента, и/или первого НВsAg полипептида или его иммуногенного фрагмента; с осуществлением, посредством этого, лечения пациента.

2. Применение или способ по п.1, в котором РНКи агент содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

3. Применение или способ по п.1 или 2, в котором вакцина на основе нуклеиновой кислоты содержит экспрессирующую векторную конструкцию, кодирующую второй НВсAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и второй НВsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент.

4. Применение или способ по любому из пп. 1–3, в котором по меньшей мере две дозы РНКи агента вводят пациенту.

5. Применение или способ по любому из пп. 1–4, в котором РНКи агент вводят пациенту так, что уровень НВsAg в сыворотке пациента снижается, по меньшей мере, на $0,5 \log 10$ МЕ/мл.

6. Применение или способ по любому из пп. 1–5, в котором уровень НВsAg в сыворотке пациента снижается по меньшей мере на $0,5 \log 10$ МЕ/мл перед введением первой дозы белковой вакцины.

7. Применение или способ по любому из пп. 1–6, в котором уровень НВsAg в сыворотке пациента снижается по меньшей мере на $1 \log 10$ МЕ/мл перед введением первой дозы белковой вакцины.

8. Применение или способ по любому из пп. 1–7, в котором уровень НВsAg в сыворотке пациента снижается по меньшей мере на $2 \log 10$ МЕ/мл перед введением первой дозы белковой вакцины.

9. Применение или способ по любому из пп. 1–8, в котором уровень НВeAg в

сыворотке пациента снижается по меньшей мере на $1 \log 10$ МЕ/мл перед введением первой дозы белковой вакцины.

10. Применение или способ по любому из пп. 1–9, в котором уровень HBsAg в сыворотке пациента снижается по меньшей мере на $2 \log 10$ МЕ/мл, и уровень HBeAg в сыворотке пациента снижается по меньшей мере на $1 \log 10$ МЕ/мл перед введением первой дозы белковой вакцины.

11. Применение или способ по любому из пп. 1–10, в котором пациент имеет уровень HBsAg в сыворотке 500 МЕ/мл или меньше после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

12. Применение или способ по любому из пп. 1–10, в котором пациент имеет уровень HBsAg в сыворотке 200 МЕ/мл или меньше после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

13. Применение или способ по любому из пп. 1–10, в котором пациент имеет уровень HBsAg в сыворотке 100 МЕ/мл или меньше после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

14. Применение или способ по любому из пп. 1–13, в котором пациент имеет уровень HBeAg в сыворотке 500 МЕ/мл или меньше после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

15. Применение или способ по любому из пп. 1–13, в котором пациент имеет уровень HBeAg в сыворотке 200 МЕ/мл или меньше после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

16. Применение или способ по любому из пп. 1–13, в котором пациент имеет уровень HBeAg в сыворотке 100 МЕ/мл или меньше после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

17. Применение или способ по любому из пп. 1–16, в котором пациент имеет уровень HBsAg в сыворотке 500 МЕ/мл или меньше и уровень HBeAg в сыворотке 500 МЕ/мл или меньше после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

18. Применение или способ по любому из пп. 1–16, в котором пациент имеет уровень HBsAg в сыворотке 200 МЕ/мл или меньше и уровень HBeAg в сыворотке 200 МЕ/мл или меньше после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

19. Применение или способ по любому из пп. 1–16, в котором пациент имеет уровень HBsAg в сыворотке 100 МЕ/мл или меньше и уровень HBeAg в сыворотке 100 МЕ/мл или меньше после введения РНКи агента и перед введением первой дозы белковой вакцины.

20. Применение или способ по любому из пп. 1–19, в котором дозу РНКи агента вводят пациенту не более чем один раз в неделю.

21. Применение или способ по любому из пп. 1–19, в котором дозу РНКи агента вводят пациенту не более чем один раз в четыре недели.

22. Применение или способ по любому из пп. 1–21, в котором РНКи агент вводят пациенту в дозе 0,01 мг/кг–10 мг/кг; или 0,5 мг/кг–50 мг/кг; или 10 мг/кг–30 мг/кг.

23. Применение или способ по любому из пп. 1–21, в котором РНКи агент вводят пациенту в дозе, выбранной из группы, состоящей из 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг.

24. Применение или способ по любому из пп. 1–23, в котором первый HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере одну HBsAg детерминанту, и первый HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере одну HBsAg детерминанту.

25. Применение или способ по любому из пп. 1–24, в котором второй HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере одну HBsAg детерминанту, и второй HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере одну HBsAg детерминанту.

26. Применение или способ по п.24 или 25, в котором первая и/или вторая HBsAg детерминанта содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 124–147 SEQ ID NO: 22.

27. Применение или способ по п.24 или 25, в котором первая и/или вторая HBsAg детерминанта содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 99–168 SEQ ID NO: 23.

28. Применение или способ по п.24 или 25, в котором первая и/или вторая HBsAg детерминанта содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотный остаток 80 SEQ ID NO: 24.

29. Применение или способ по п.28, в котором последовательность, содержащая аминокислоту 80 SEQ ID NO: 24, содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичной, по меньшей мере, аминокислотам 70–90 SEQ ID NO: 24.

30. Применение или способ по п.28, в котором первая и/или вторая HBsAg детерминанта содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотный остаток 138 SEQ ID NO: 24.

31. Применение или способ по п.28, в котором последовательность, содержащая аминокислоту 80 SEQ ID NO: 14, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по меньшей мере аминокислотам 128–143 SEQ ID NO: 24.

32. Применение или способ по любому из пп. 28 или 31, в котором первая и/или вторая HBsAg детерминанта содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по меньшей мере 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 смежным аминокислотам SEQ ID NO: 24.

33. Применение или способ по п.25, в котором детерминанта HBsAg содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 18–143 SEQ ID NO: 24.

34. Применение или способ по любому из пп. 1–33, в котором доза белковой вакцины, вводимой пациенту, содержит от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 1,0 мг первого HBsAg полипептида или его иммуногенного фрагмента, и дозу от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 1,0 мг первого HBsAg полипептида или его иммуногенного фрагмента.

35. Применение или способ по любому из пп. 1–34, в котором первый HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент и первый HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент присутствуют в одном составе белковой вакцины.

36. Применение или способ по любому из пп. 1–35, в котором белковая вакцина дополнительно содержит адъювант.

37. Применение или способ по п.36, в котором адъювант стимулирует сбалансированный Th1/Th2 ответ.

38. Применение или способ по п.36, в котором адъювант выбирают из группы, состоящей из монофосфориллипида A (MPL), поли(I:C), полиICLC адъюванта, CpG DNA, полиICLC адъюванта, STING агониста, к-ди-АМФ, с-ди-ГМФ, с-ди-ЦМФ; короткой 5'-трифосфат дцРНК с тупыми концами (3pRNA) Rlg-I лиганда, поли[ди(натрийкарбоксилатэтилфеноксифосфазена) (PCEP)), квасцов, виросом, цитокинов, IL-12, AS02, AS03, AS04, MF59, ISCOMATRIX®, IC31® или Rlg-I лиганда.

39. Применение или способ по п.36, в котором адъювант выбирают из группы, состоящей из полиI:C адъюванта, CpG адъюванта, STING агониста или PCEP адъюванта.

40. Применение или способ по любому из пп. 1–39, в котором дозу белковой вакцины вводят пациенту по меньшей мере два раза.

41. Применение или способ по п.40, в котором дозу белковой вакцины вводят пациенту не более чем один раз каждые две недели.

42. Применение или способ по любому из пп. 1–41, в котором дозу белковой вакцины вводят пациенту не ранее чем в день, в который вводили пациенту последнюю дозу РНКи агента.

43. Применение или способ по п.42, в котором дозу белковой вакцины вводят пациенту в тот же день, как ввели пациенту последнюю дозу РНКи агента.

44. Применение или способ по любому из пп. 1–42, в котором дозу белковой вакцины вводят пациенту не позднее одного месяца после того, как ввели пациенту последнюю дозу РНКи агента.

45. Применение или способ по любому из пп. 1–42, в котором дозу белковой вакцины вводят пациенту не позднее трех месяцев после того, как ввели пациенту последнюю дозу РНКи агента.

46. Применение или способ по любому из пп. 1–45, в котором уровень HBsAg в сыворотке пациента определяют после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением белковой вакцины.

47. Применение или способ по любому из пп. 1–45, в котором уровень HBsAg в сыворотке пациента определяют после введения по меньшей мере одной дозы РНКи

агента и перед введением белковой вакцины.

48. Применение или способ по любому из пп. 1–45, в котором уровень HBsAg и уровень HBeAg в сыворотке пациента определяют после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента и перед введением белковой вакцины.

49. Применение или способ по любому из пп. 1–45, в котором вакцина на основе нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну экспрессирующую векторную конструкцию, кодирующую второй HBcAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и второй HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент.

50. Применение или способ по п.49, в котором по меньшей мере одна экспрессирующая конструкция содержит промотор, который способствует экспрессии второго HBcAg полипептида или его иммуногенного фрагмента, и второго HBsAg полипептида или его иммуногенного фрагмента.

51. Применение или способ по п.49, в котором по меньшей мере одна экспрессирующая конструкция содержит первый и второй промотор, причем первый промотор стимулирует экспрессию второго HBcAg полипептида или его иммуногенного фрагмента, и второй промотор стимулирует экспрессию второго HBsAg полипептида или его иммуногенного фрагмента.

52. Применение или способ по п.50 или 51 в котором по меньшей мере один из промоторов выбирают из группы, состоящей из промотора респираторно–синцитиального вируса (RSV), промотора цитомегаловируса (CMV), РН5 промотора и Н1 промотора.

53. Применение или способ по любому из пп. 1–52, в котором экспрессирующая конструкция содержит вирусный вектор.

54. Применение или способ по п.53, в котором вирусный вектор выбирают из группы, состоящей из аденовирусного вектора; ретровирусного вектора, лентивирусного вектора, вектора вируса мышинного лейкоза Молони, вектора адено–ассоциированного вируса; вектора вируса простого герпеса; SV 40 вектора; вектора вируса полиомы; вектора на основе вируса папилломы; вектора на основе пикарновируса; вектора на основе поксвируса, вектора на основе ортопоксвируса, вектора на основе вируса осповакцины, вектора на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), вектора на основе авипоксвируса, вектора на основе вируса оспы канареек, вектора на основе вируса оспы птиц и вектора на основе вируса Эпштейна–Барр.

55. Применение или способ по п.53, в котором вирусный вектор представляет собой MVA вектор.

56. Применение или способ по любому из пп. 1–55, в котором доза вакцины на основе нуклеиновой кислоты, вводимая пациенту, содержит инфекционную дозу для тканевой культуры (TCID₅₀) 10⁶–10¹⁰ TCID₅₀; или 10⁶–10⁹ TCID₅₀; или 10⁶–10⁸ TCID₅₀.

57. Применение или способ по любому из пп. 1–56, в котором дозу вакцины на основе нуклеиновой кислоты вводят пациенту не ранее чем через две недели после того, как вводят пациенту последнюю дозу белковой вакцины.

58. Применение или способ по любому из пп. 1–57, в котором уровень HBsAg в

сыворотке пациента после введения по меньшей мере одной дозы РНКи агента определяют перед введением дозы вакцины на основе нуклеиновой кислоты.

59. Применение или способ по любому из пп. 1–58, в котором первую дозу вакцины на основе нуклеиновой кислоты вводят пациенту, когда уровень HBsAg в сыворотке пациента дополнительно снижается по меньшей мере на $0,5 \log 10$ МЕ/мл после введения по меньшей мере одной дозы белковой вакцины.

60. Применение или способ по любому из пп. 1–59, в котором разовую дозу вакцины на основе нуклеиновой кислоты вводят пациенту.

61. Применение или способ по любому из пп. 1–60, дополнительно включающий введение нуклеотидного (нуклеозидного) аналога пациенту.

62. Применение или способ по п.61, в котором по меньшей мере одну дозу нуклеотидного (нуклеозидного) аналога вводят пациенту перед введением РНКи агента пациенту; или несколько доз нуклеотидного (нуклеозидного) аналога вводят пациенту.

63. Применение или способ по п.61 или 62, в котором нуклеотидный (нуклеозидный) аналог выбирают из группы, состоящей из дизопроксилфумарата тенофовира (TDF), алафенамида тенофовира (TAF), ламивудина, дипивоксила адефовира, энтекавира (ETV), телбивудина, AGX–1009, эмтрицитабина, клевудина, ритонавира, дипивоксила, лобукавира, фамвира, FTC, N–ацетилцистеина (NAC), PC1323, терадигм–ВГВ, тимозина–альфа и ганцикловира, бесифовира (ANA–380/LB–80380) и тенофорвира–эксалиадов (TLX/CMX157).

64. Применение или способ по любому из пп. 1–63, в котором уровень HBsAg в сыворотке у пациента составляет менее 3000 МЕ/мл, 4000 МЕ/мл или 5000 МЕ/мл перед введением РНКи агента.

65. Применение или способ по любому из пп. 1–64, в котором уровень HBsAg в сыворотке у пациента снижается ниже уровня обнаружения с использованием клинического анализа в течение по меньшей мере шести месяцев после последней дозы вакцины на основе нуклеиновой кислоты.

66. Применение или способ по любому из пп. 1–64, в котором уровень HBeAg в сыворотке у пациента снижается ниже уровня обнаружения с использованием клинического анализа в течение по меньшей мере шести месяцев после последней дозы вакцины на основе нуклеиновой кислоты.

67. Применение или способ по любому из пп. 1–64, в котором уровень HBsAg в сыворотке и HBeAg у пациента снижается ниже уровня обнаружения с использованием клинического анализа в течение по меньшей мере шести месяцев после последней дозы вакцины на основе нуклеиновой кислоты.

68. Применение или способ по любому из пп. 1–67, дополнительно включающий введение иммуностимулятора пациенту.

69. Применение или способ по п.68, в котором иммуностимулятор выбирают из группы, состоящей из пегилированного интерферона альфа 2a (ПЭГ–IFN–альфа–2a), интерферона альфа–2b, ПЭГ–IFN–альфа–2b, интерферона лямбда, рекомбинантного

человеческого интерлейкина–7 и агониста Toll–подобного рецептора 3, 7, 8 или 9 (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), ингибитора попадания вируса в клетку, микрлюдекса, олигонуклеотида, который ингибирует секрецию или высвобождение HBsAg, REP 9AC, ингибитора сборки капсида, Bay41–4109, NVR–1221, ингибитора цкзДНК, IHVR–25) вирусного капсида, MVA капсида, регулятора иммунной контрольной точки, CTLA–4 ингибитора, ипилимумаба, PD–1 ингибитора, ниволумаба, пебролизумаба, BGB–A317 антитела, PD–L1 ингибитора, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и аффимерного биотерапевтического средства.

70. Применение или способ по любому из пп. 1–69, в котором пациент представляет собой человека.

71. Применение или способ по любому из пп. 1–70, в котором РНКи агент ингибирует экспрессию четырех транскриптов ВГВ.

72. Применение или способ по любому из пп. 1–70, в котором РНКи агент ингибирует экспрессию по меньшей мере трех транскриптов ВГВ.

73. Применение или способ по любому из пп. 1–72, в котором РНКи агент выбирают из любого из РНКи агентов в приложении А.

74. Применение или способ по п.73, в котором РНКи агент выбирают из любого из РНКи агентов в таблицах 2–11 в приложении А.

75. Применение или способ по любому из пп. 1–74, в котором РНКи агент направлен по меньшей мере на 15 непрерывных нуклеотидов нуклеотидов 1579–1597, 206–228, 207–229, 210–232, 212–234, 214–236, 215–237, 216–238, 226–248, 245–267, 250–272, 252–274, 253–275, 254–276, 256–278, 258–280, 263–285, 370–392, 373–395, 375–397, 401–423, 405–427, 410–432, 411–433, 422–444, 424–446, 425–447, 426–448, 731–753, 734–756, 1174–1196, 1250–1272, 1255–1277, 1256–1278, 1545–1567, 1547–1569, 1551–1571, 1577–1597, 1580–1598, 1806–1825, 1812–1831, 1814–1836, 1829–1851, 1831–1853, 1857–1879, 1864–1886, 2259–2281, 2298–2320 или 2828–2850 SEQ ID NO: 1 (NC_003977.1).

76. Применение или способ по любому из пп. 1–75, в котором РНКи агент направлен по меньшей мере на 15 непрерывных нуклеотидов нуклеотидов 1579–1597 или 1812–1831 SEQ ID NO: 1 (NC_003977.1).

77. Применение или способ по любому из пп. 1–75, в котором РНКи агент направлен на нуклеотиды 1579–1597 или 1812–1831 SEQ ID NO: 1 (NC_003977.1).

78. Применение или способ по п.75, в котором антисмысловая цепь РНКи агента содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'–UGUGAAGCGAAGUGCACACUU–3' (SEQ ID NO: 25) или 5'–AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU–3' (SEQ ID NO: 26).

79. Применение или способ по п.75, в котором антисмысловая цепь РНКи агента содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'–UGUGAAGCGAAGUGCACACUU–3' (SEQ ID NO: 25) или 5'–AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU–3' (SEQ ID NO: 26).

80. Применение или способ по п.75, в котором антисмысловая цепь РНКи агента

содержит нуклеотидную последовательность 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO: 25) или 5'-AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU-3' (SEQ ID NO: 26).

81. Применение или способ по любому из пп. 75-80, в котором смысловая цепь РНКи агента содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO: 27) или 5'-CACCAUGCAACUUUUUCACCU-3' (SEQ ID NO: 28).

82. Применение или способ по любому из пп. 75-80, в котором смысловая цепь РНКи агента содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO: 27) или 5'-CACCAUGCAACUUUUUCACCU-3' (SEQ ID NO: 28).

83. Применение или способ по любому из пп. 75-80, в котором смысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO: 27) или 5'-CACCAUGCAACUUUUUCACCU-3' (SEQ ID NO: 28).

84. Применение или способ по любому из пп. 75-77, в котором антисмысловая цепь РНКи агента содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO: 25), и смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO: 27).

85. Применение или способ по любому из пп. 75-77, в котором антисмысловая цепь РНКи агента содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO: 25), и смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO: 27).

86. Применение или способ по любому из пп. 75-77, в котором антисмысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO: 25), и смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO: 27).

87. Применение или способ по любому из пп. 75-77, в котором антисмысловая цепь РНКи агента содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU-3' (SEQ ID NO: 26), и смысловая цепь РНКи агента содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-CACCAUGCAACUUUUUCACCU-3' (SEQ ID NO: 28).

88. Применение или способ по любому из пп. 75-77, в котором антисмысловая цепь РНКи агента содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU-3' (SEQ ID NO: 26), и смысловая цепь РНКи агента содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-CACCAUGCAACUUUUUCACCU-3' (SEQ ID NO: 28).

89. Применение или способ по любому из пп. 75–77, в котором антисмысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность 5'–AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU–3' (SEQ ID NO: 26), и смысловая цепь РНКи агента содержит нуклеотидную последовательность 5'–CACCAUGCAACUUUUUCACCU–3' (SEQ ID NO: 28).

90. Применение или способ по любому из пп. 1–89, в котором по существу все из нуклеотидов указанной смысловой цепи и по существу все из нуклеотидов указанной антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды,

где указанная смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'–концу.

91. Применение или способ по п.90, в котором лиганд представляет собой один или более GalNAc производных, присоединенных через моновалентный линкер, двухвалентный разветвленный линкер или трехвалентный разветвленный линкер.

92. Применение или способ по п.91, в котором по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбирают из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'–концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'–О–метил модифицированного нуклеотида, 2'–фтор модифицированного нуклеотида, 2'–дезокси–модифицированного нуклеотида, замкнутого нуклеотида, разомкнутого нуклеотида, конформационно запертого нуклеотида, замкнутого этил нуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'–амино–модифицированного нуклеотида, 2'–О–аллил–модифицированного нуклеотида, 2'–С–алкил–модифицированного нуклеотида, 2'–гидроксил–модифицированного нуклеотида, 2'–метоксиэтил–модифицированного нуклеотида, 2'–О–алкил–модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран–модифицированного нуклеотида, 1,5–ангидрогекситол–модифицированного нуклеотида, циклогексенил–модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'–фосфат, и нуклеотида, содержащего 5'–фосфатный миметик.

93. Применение или способ по любому из пп. 1–92, в котором по меньшей мере одна цепь РНКи агента содержит 3' «липкий конец», по меньшей мере, из 1 нуклеотида.

94. Применение или способ по любому из пп. 1–92, в котором по меньшей мере одна цепь РНКи агента содержит 3' «липкий конец», по меньшей мере, из 2 нуклеотидов.

95. Применение или способ по любому из пп. 1–92, в котором двухцепочечная область РНКи агента составляет 15–30 нуклеотидных пар в длину.

96. Применение или способ по любому из пп. 1–92, в котором двухцепочечная область РНКи агента составляет 17–23 нуклеотидных пар в длину.

97. Применение или способ по любому из пп. 1–92, в котором двухцепочечная область РНКи агента составляет 17–25 нуклеотидных пар в длину.

98. Применение или способ по любому из пп. 1–92, в котором двухцепочечная область РНКи агента составляет 23–27 нуклеотидных пар в длину.

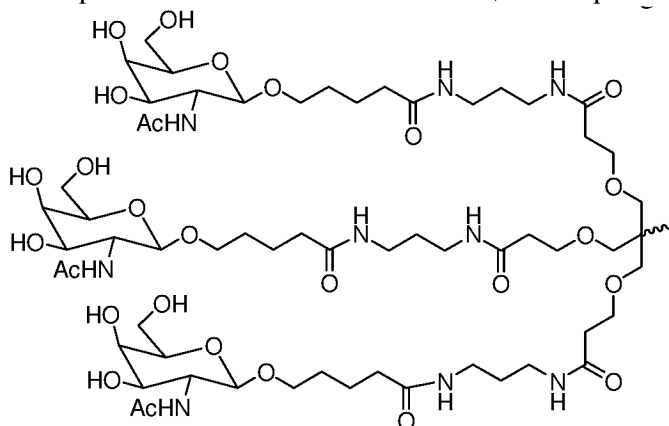
99. Применение или способ по любому из пп. 1–92, в котором двухцепочечная область РНК агента составляет 19–21 нуклеотидных пар в длину.

100. Применение или способ по любому из пп. 1–92, в котором двухцепочечная область РНК агента составляет 21–23 нуклеотидных пар в длину.

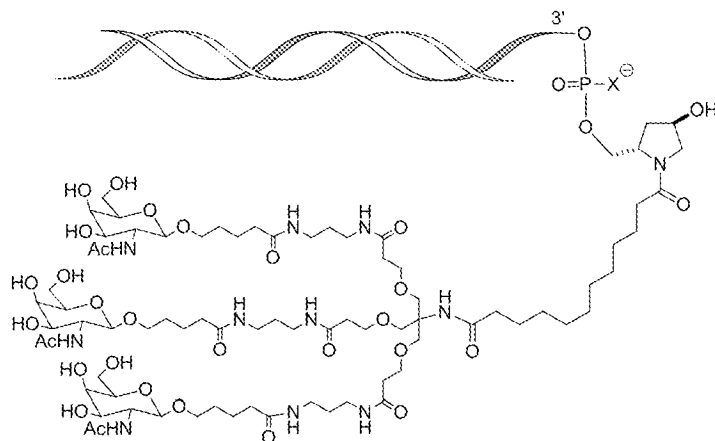
101. Применение или способ по любому из пп. 1–92, в котором каждая цепь РНК агента содержит 15–30 нуклеотидов.

102. Применение или способ по любому из пп. 1–92, в котором каждая цепь РНК агента содержит 19–30 нуклеотидов.

103. Применение или способ по п.90, в котором лиганд представляет собой



104. Применение или способ по п.90, в котором РНК агент конъюгирована с лигандом, как показано на следующем схематическом изображении



где X представляет собой O или S.

105. Применение или способ по любому из пп. 1–75, в котором РНК агент представляет собой AD–66810 или AD–66816.

106. Применение или способ по любому из пп. 1–105, в котором первый HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и/или первый HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент содержат по меньшей мере одну детерминанту, присутствующую по меньшей мере у четырех генотипов ВГВ.

107. Применение или способ по любому из пп. 1–105, в котором первый HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и/или первый HBsAg полипептид или его

иммуногенный фрагмент, содержит по меньшей мере одну детерминанту, присутствующую по меньшей мере у шести генотипов ВГВ.

108. Применение или способ по любому из пп. 1–105, в котором первый HBcAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и/или первый HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере одну детерминанту, присутствующую по меньшей мере у семи генотипов ВГВ.

109. Применение или способ по любому из пп. 1–108, в котором второй HBcAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и/или второй HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере одну детерминанту, присутствующую по меньшей мере у четырех генотипов ВГВ.

110. Применение или способ по любому из пп. 1–108, в котором второй HBcAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и/или второй HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент содержат по меньшей мере одну детерминанту, присутствующую по меньшей мере у шести генотипов ВГВ.

111. Применение или способ по любому из пп. 1–108, в котором второй HBcAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и/или второй HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент содержат по меньшей мере одну детерминанту, присутствующую по меньшей мере у семи генотипов ВГВ.

112. Набор для лечения пациента, имеющего инфекцию ВГВ, включающий:

а) РНКи агент, который ингибирует экспрессию по меньшей мере трех транскриптов ВГВ, где РНКи агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область;

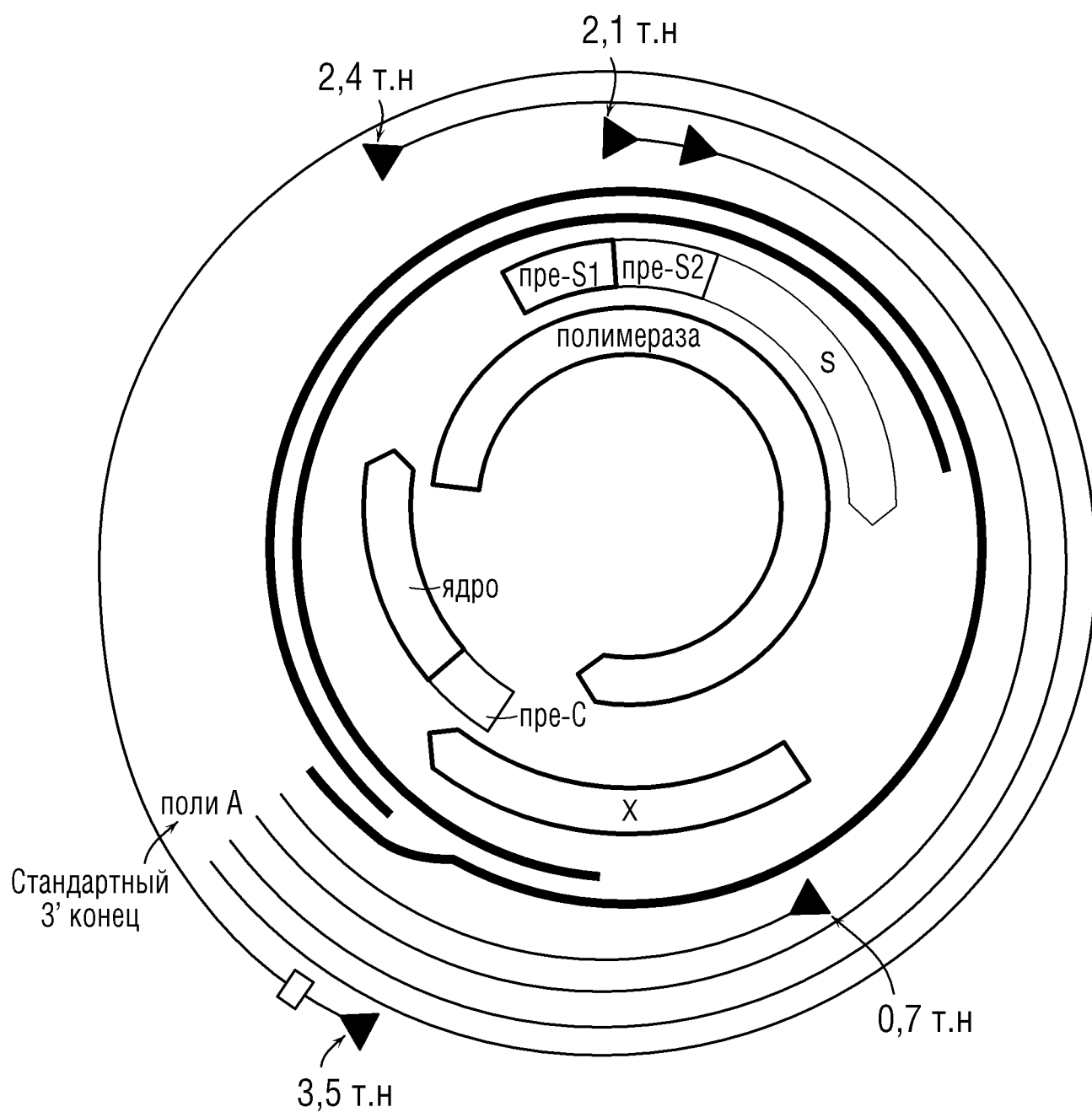
б) белковую вакцину, содержащую первый полипептид ВГВ ядерного антигена (HBcAg) или его иммуногенный фрагмент, и первый полипептид ВГВ поверхностного антигена (HBsAg) или его иммуногенный фрагмент; и

с) вакцину на основе нуклеиновой кислоты, содержащую экспрессирующую векторную конструкцию, кодирующую второй HBcAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и/или второй HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент,

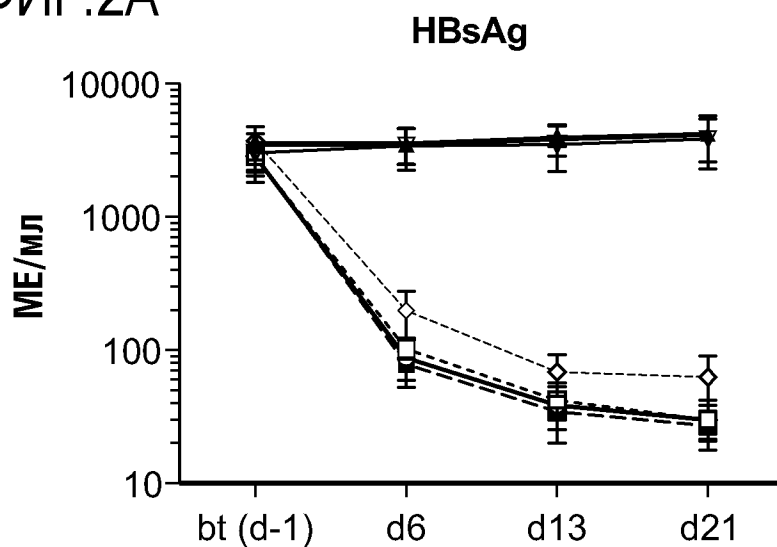
где второй HBcAg полипептид или его иммуногенный фрагмент, и/или второй HBsAg полипептид или его иммуногенный фрагмент имеют, по меньшей мере один общий эпитоп по меньшей мере с одним из первого HBcAg полипептида или его иммуногенного фрагмента, и/или первого HBsAg полипептида или его иммуногенного фрагмента; и

д) инструкции по применению согласно применениям или способам по любому из пп. 1–111.

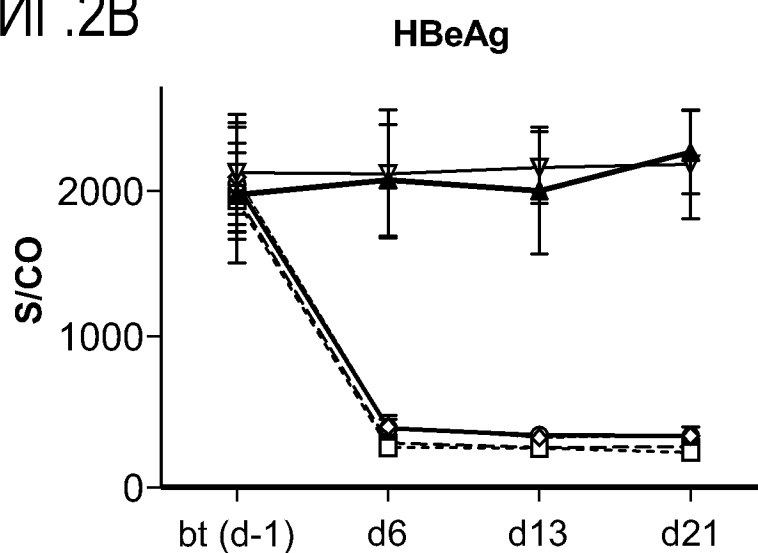
ФИГ.1



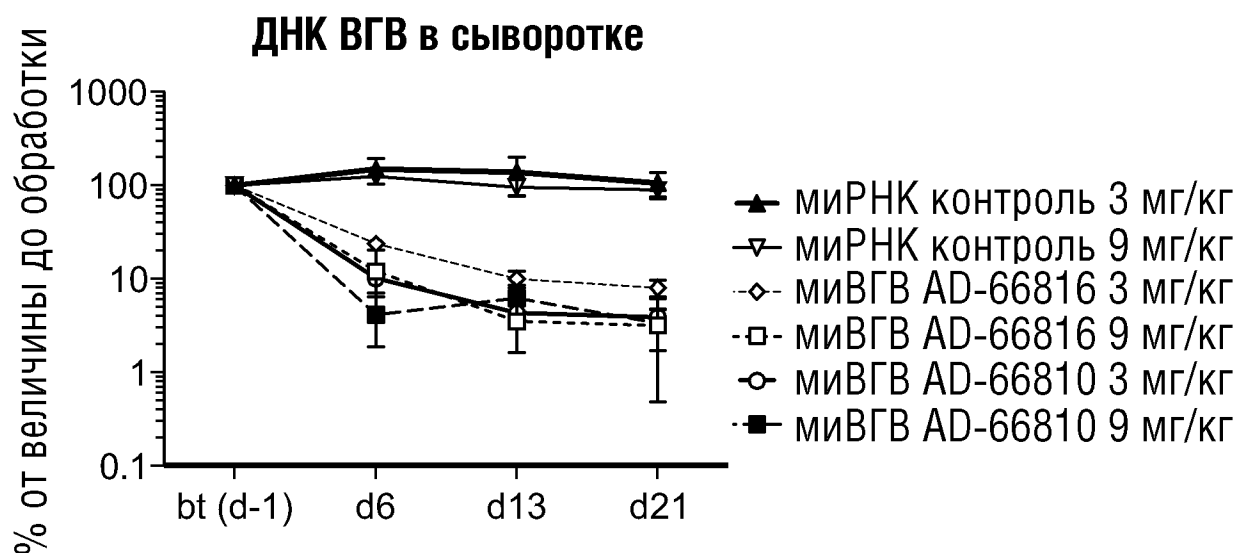
ФИГ.2А



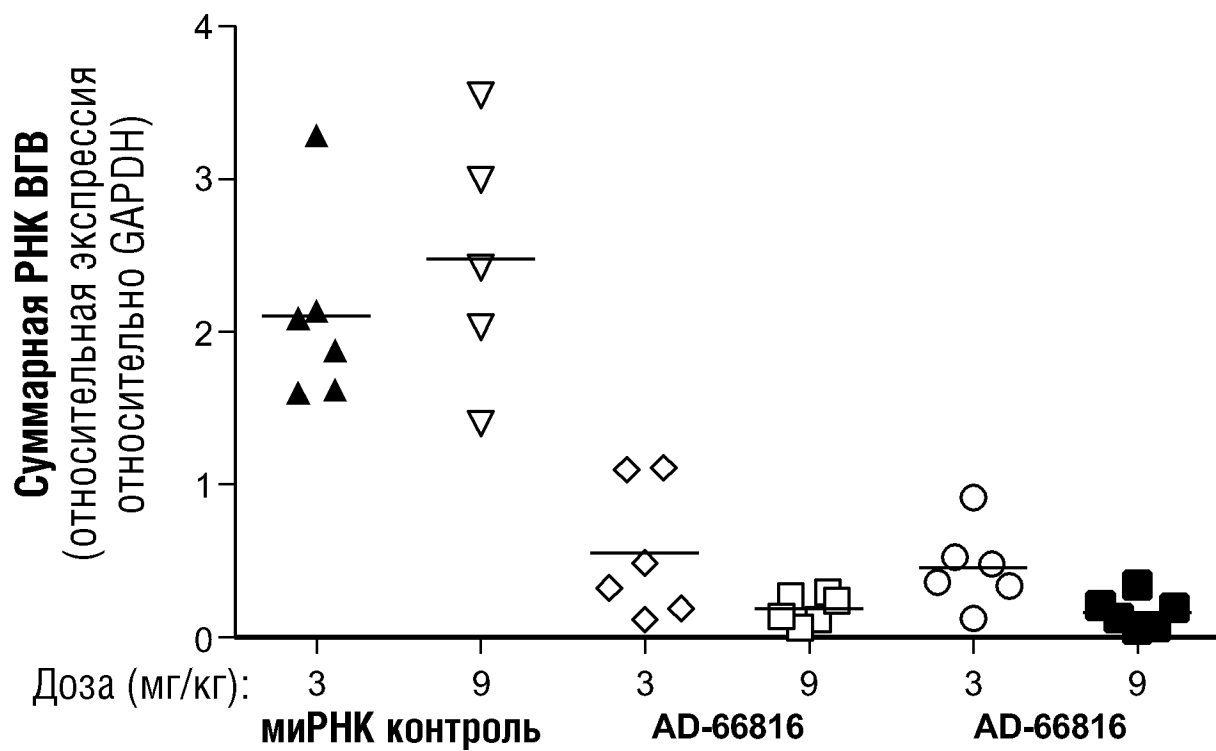
ФИГ.2В



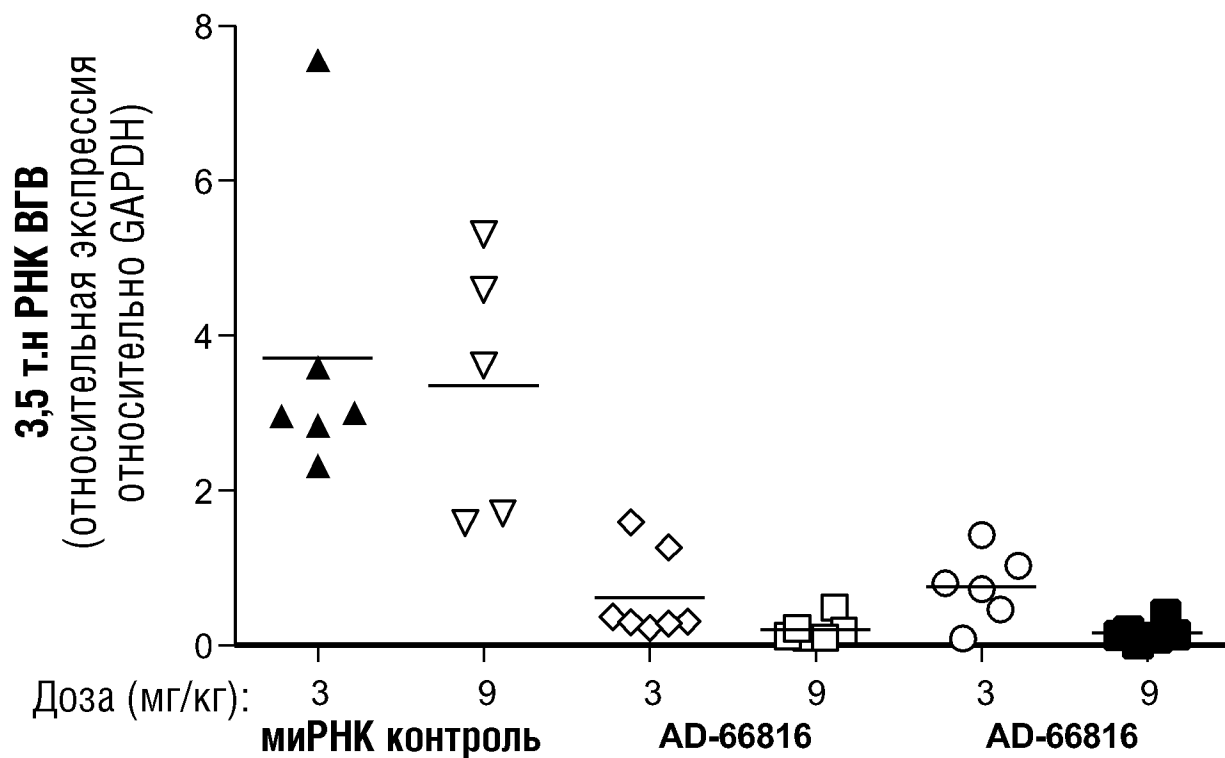
ФИГ.3С



ФИГ.2D

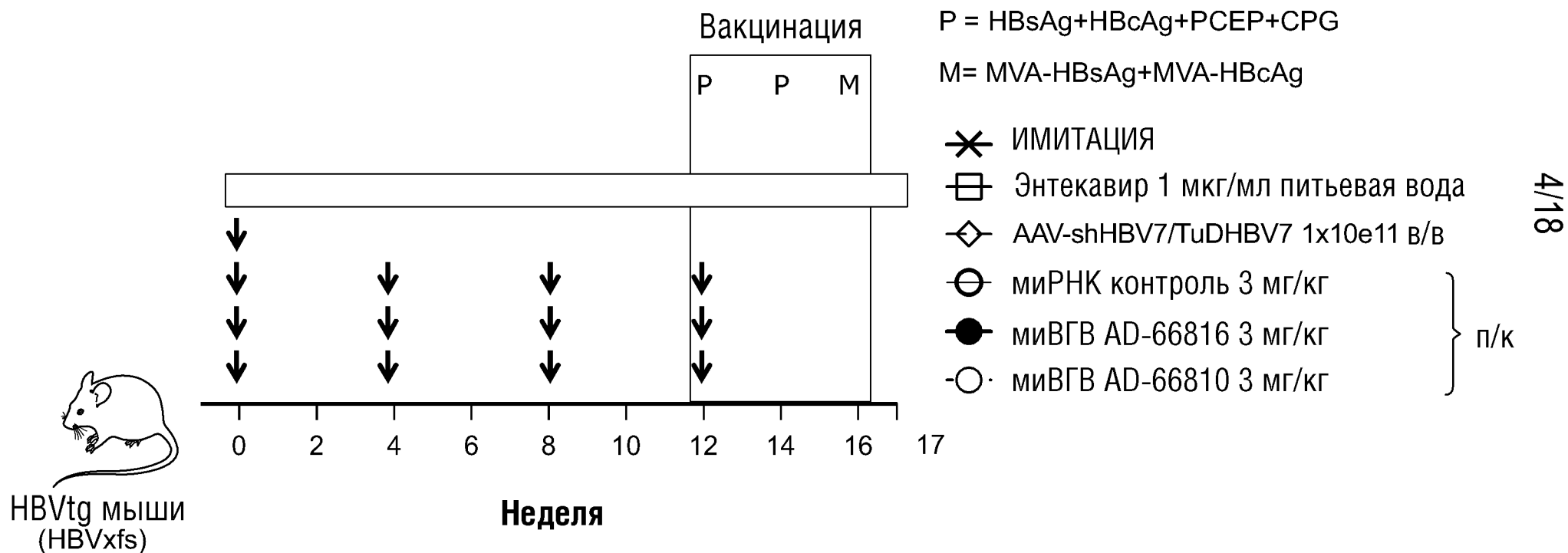


ФИГ.2E

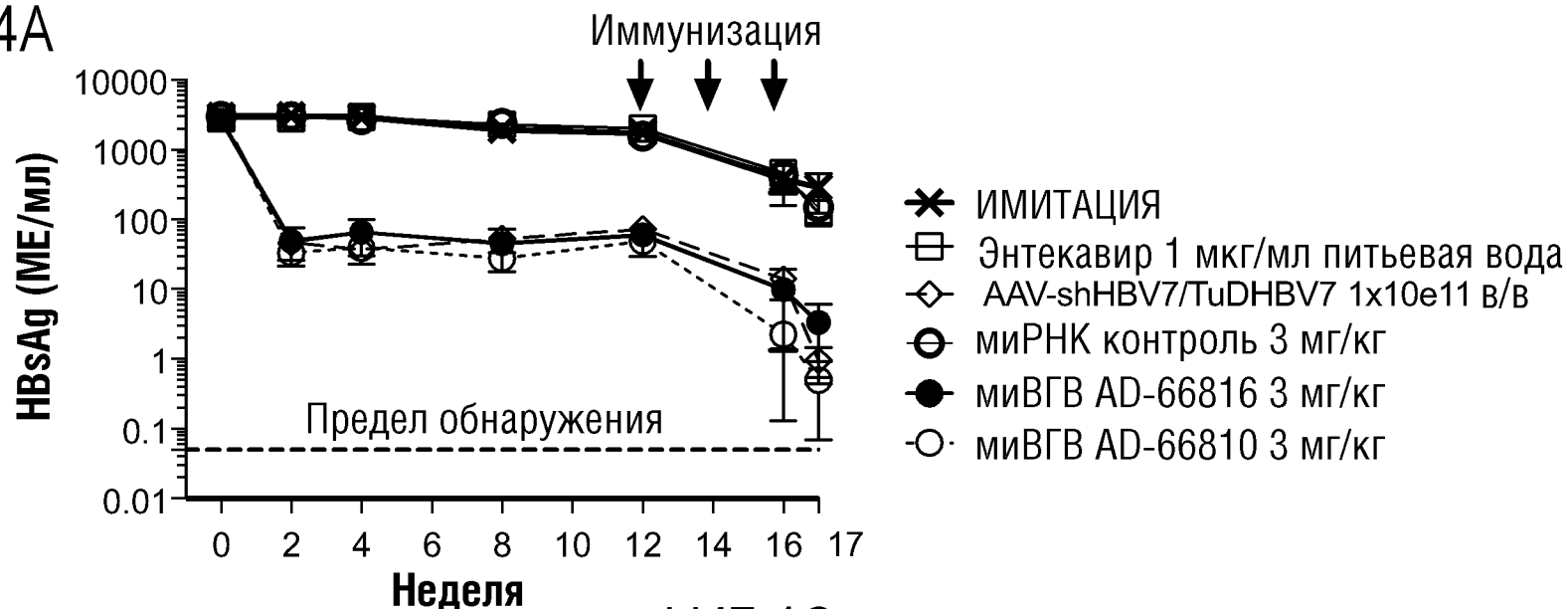


ФИГ.3

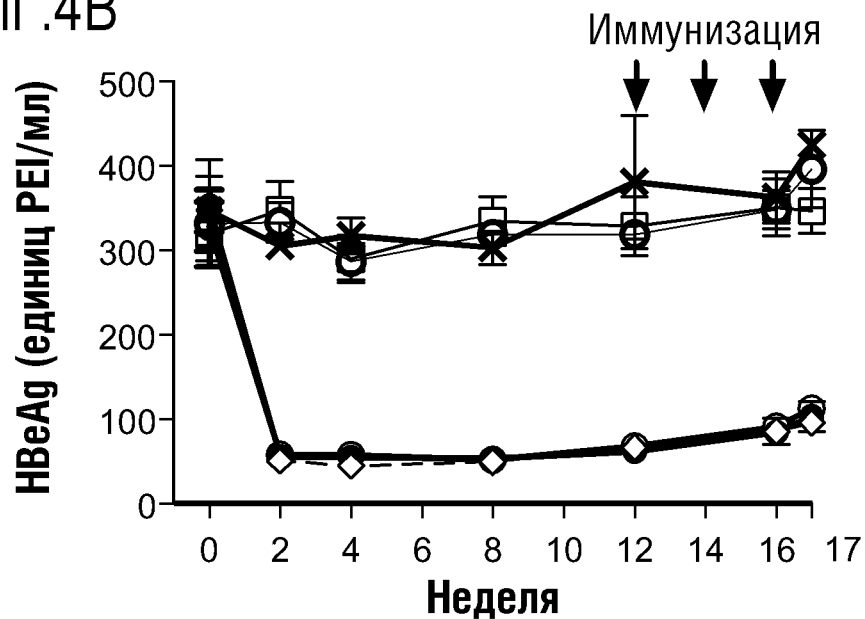
Экспериментальная модель



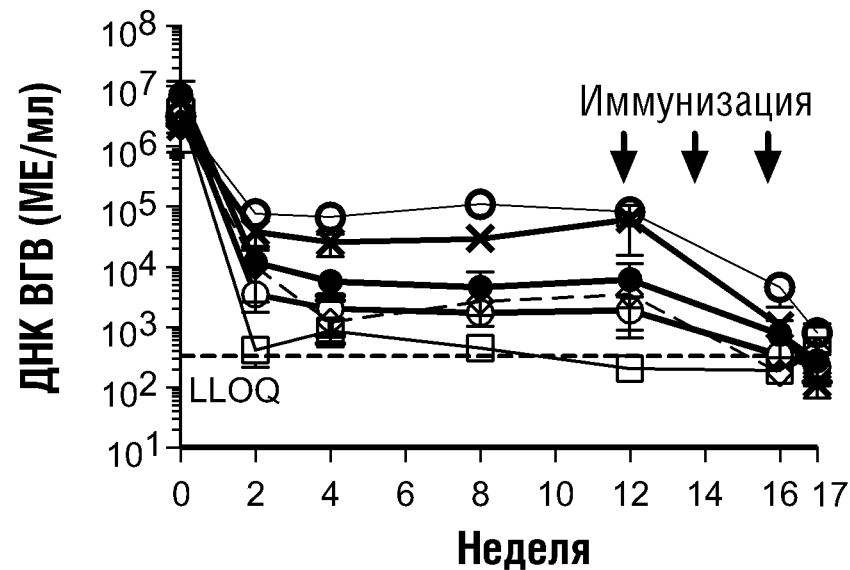
ФИГ.4А



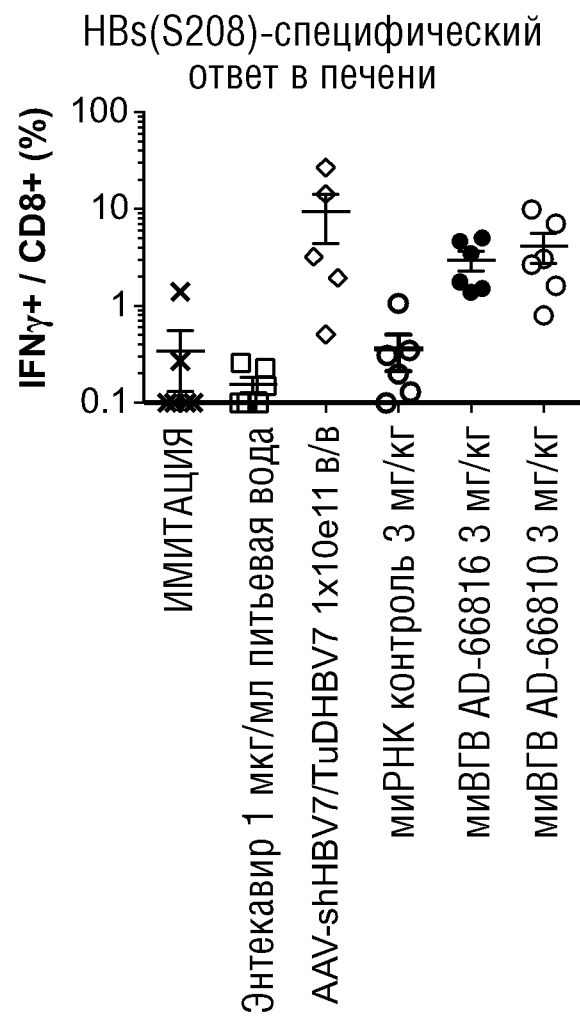
ФИГ.4В



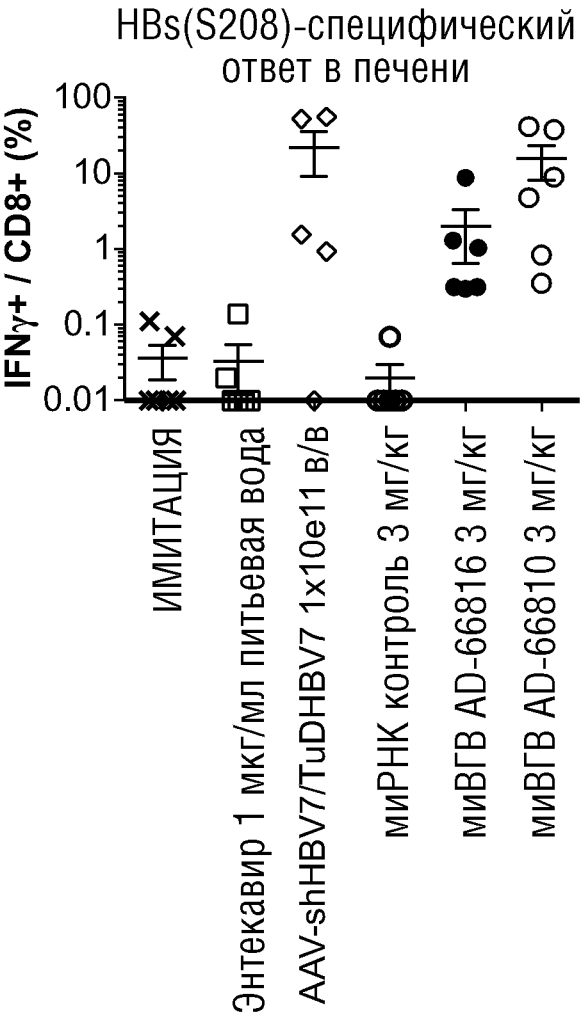
ФИГ.4С



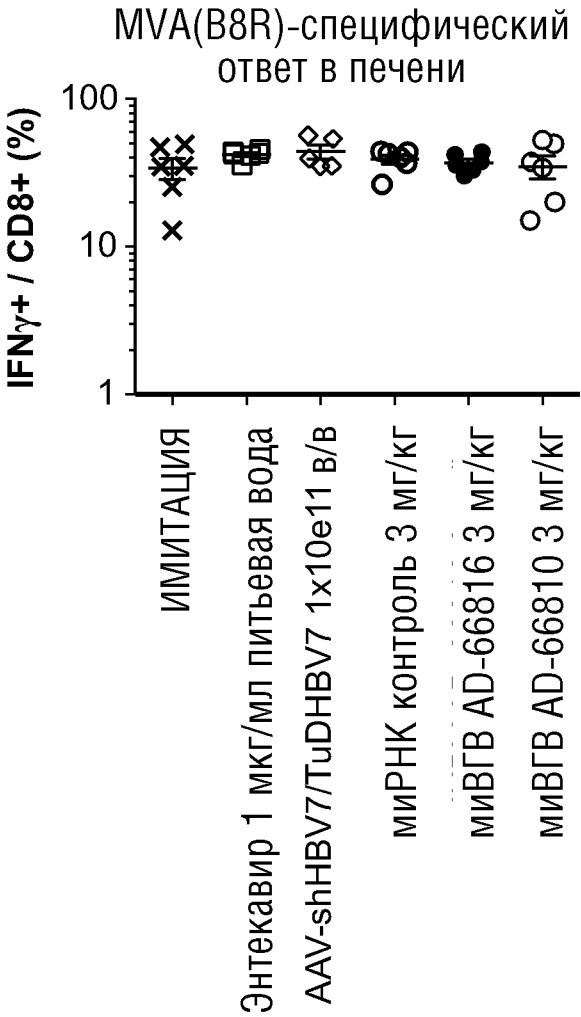
ФИГ.5А



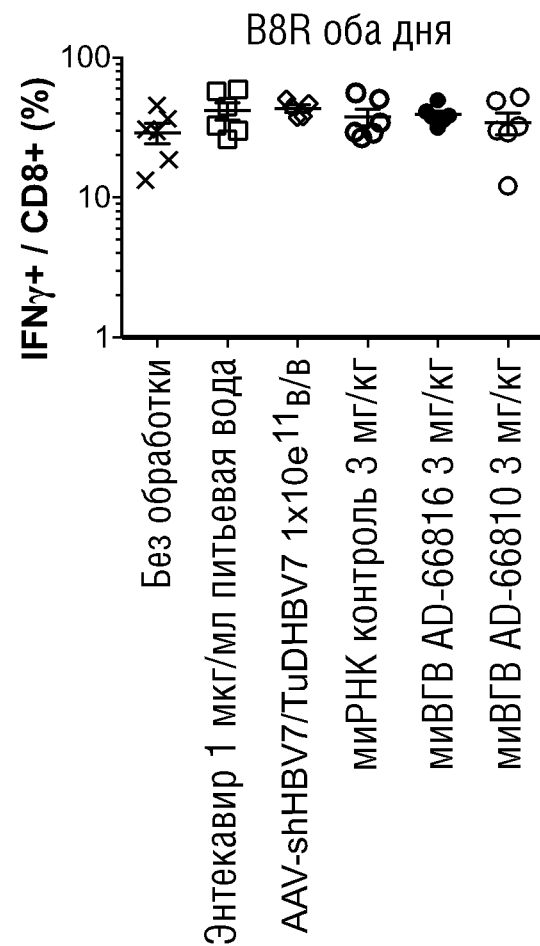
ФИГ.5В



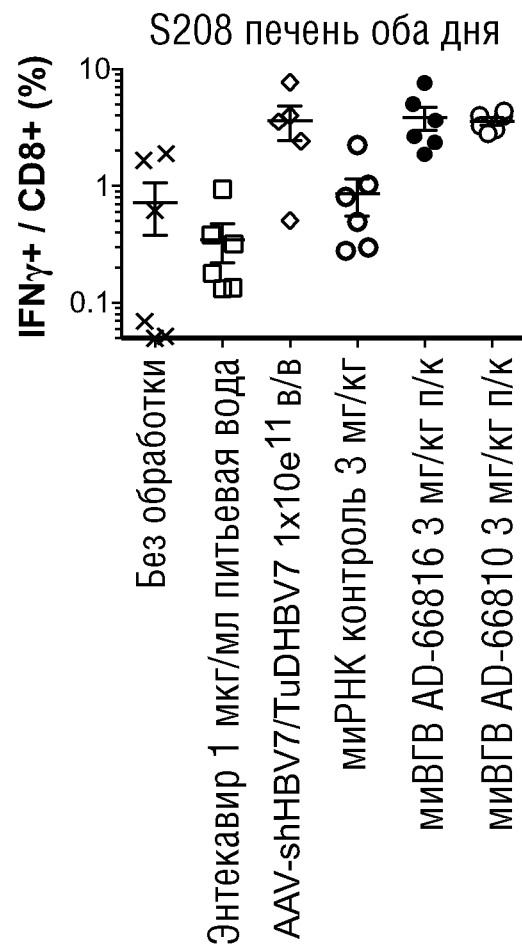
ФИГ.5С



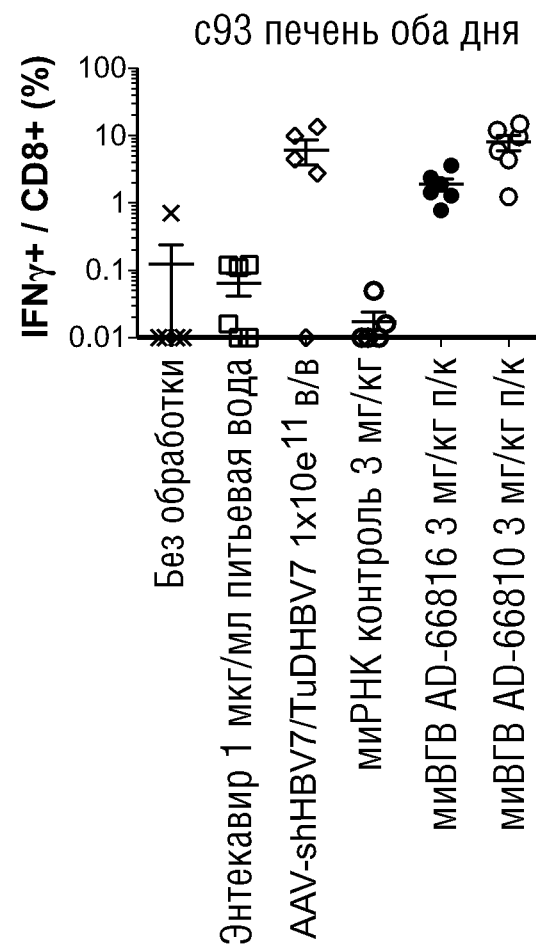
ФИГ.5D



ФИГ.5E

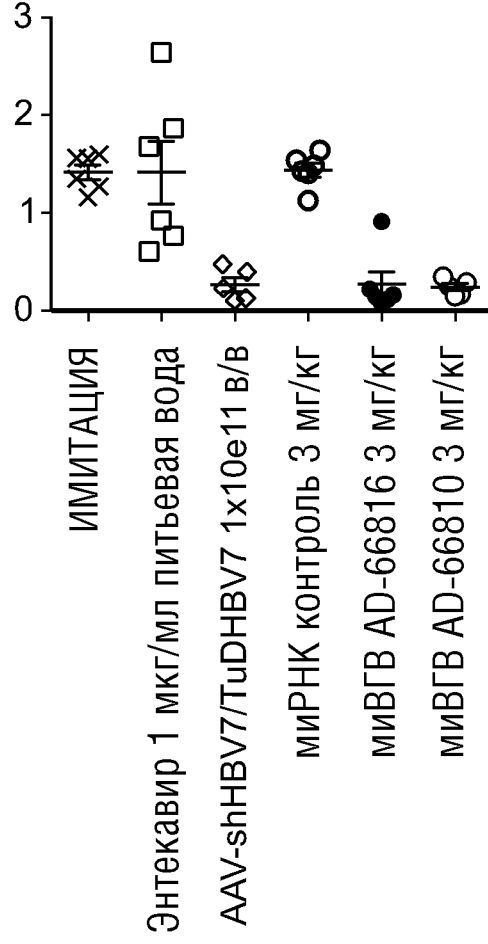


ФИГ.5F



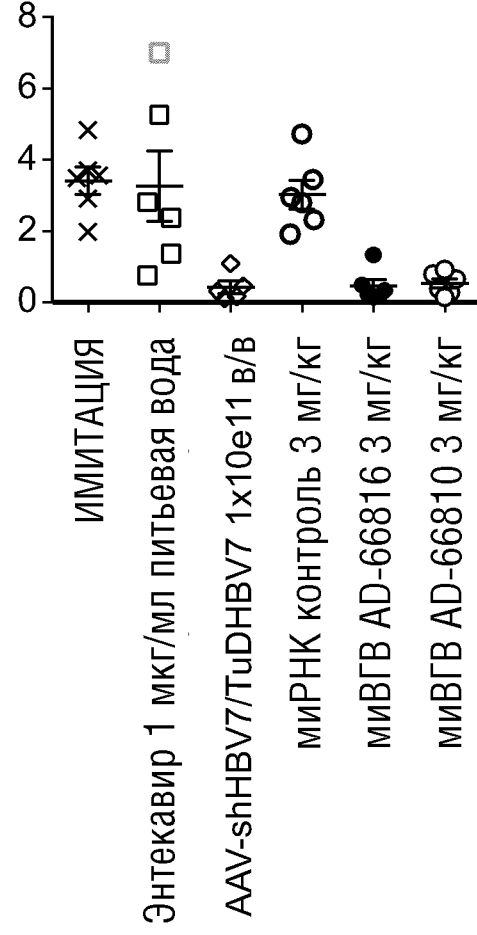
ФИГ.6А

Суммарная РНК ВГВ
(относительно GAPDH)



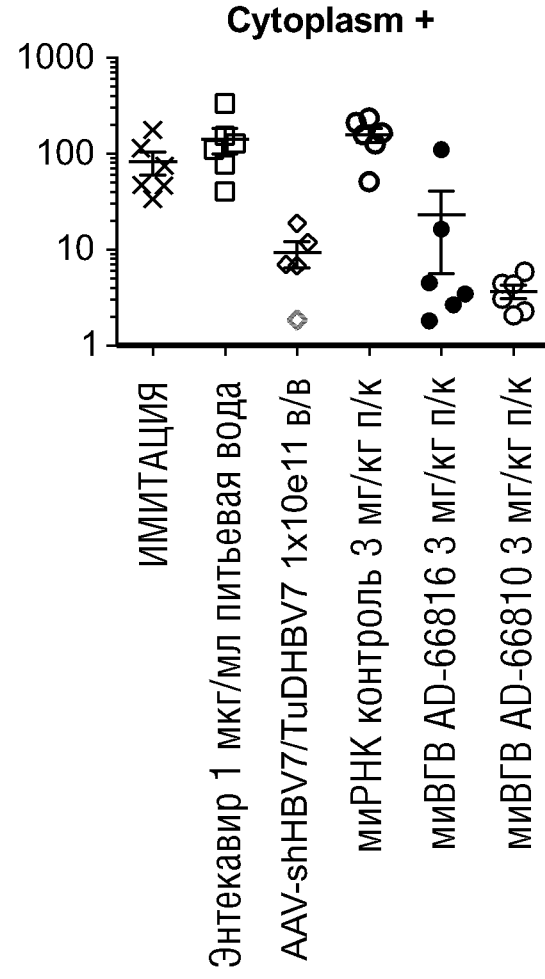
ФИГ.6В

3,5 т.н. транскрипт ВГВ
(относительно GAPDH)



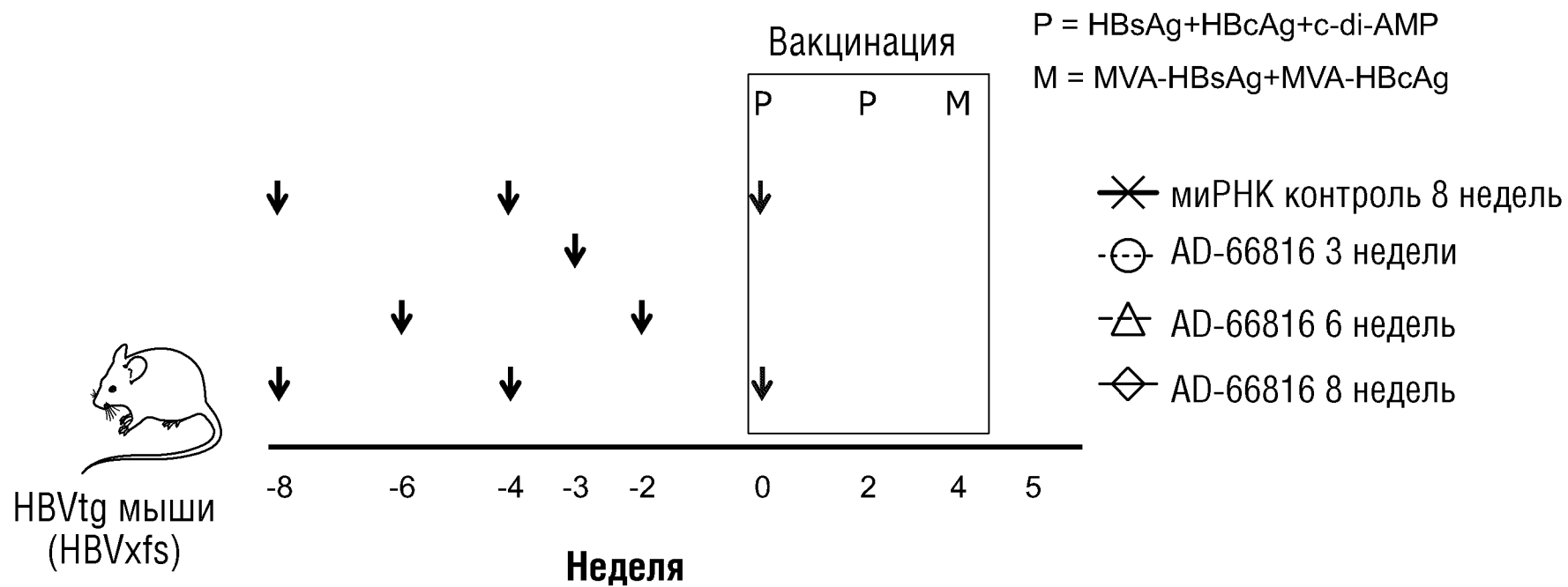
ФИГ.6С

НВс+ клеток/мм²



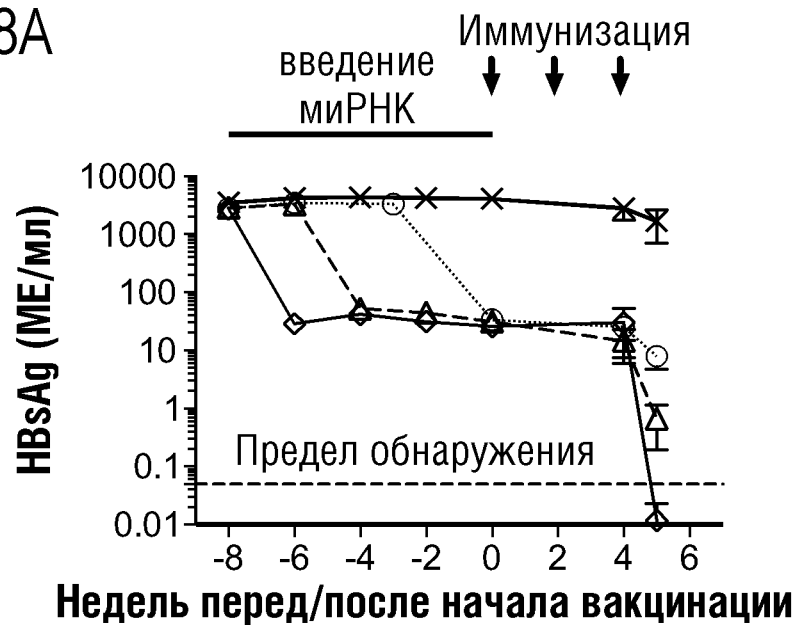
ФИГ.7

Экспериментальная модель

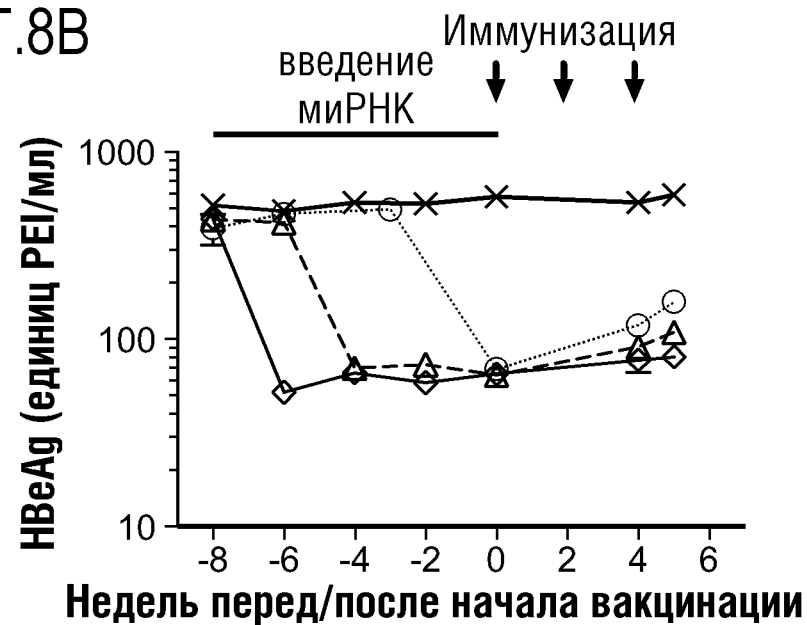


Доза миРНК: 3 мг/кг веса тела подкожно

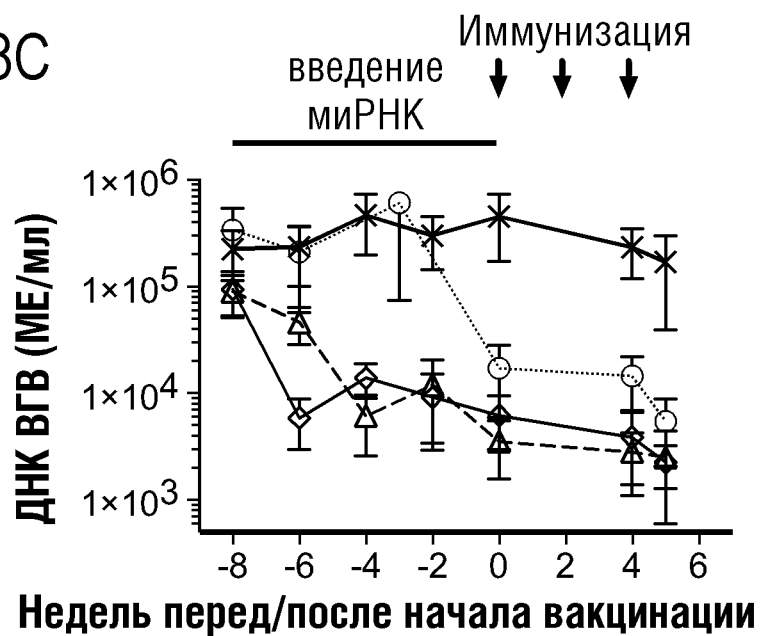
ФИГ.8А



ФИГ.8В



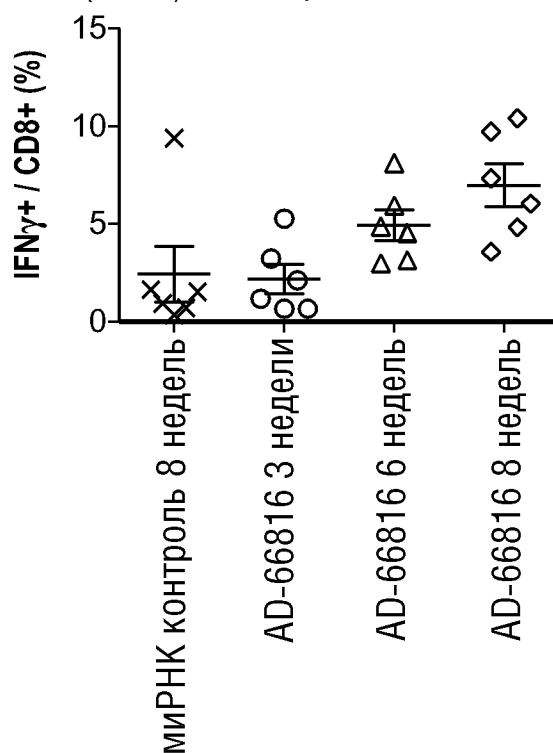
ФИГ.8С



- ×— миРНК контроль 8 недель
- AD-66816 3 недели
- △- AD-66816 6 недель
- ◇— AD-66816 8 недель

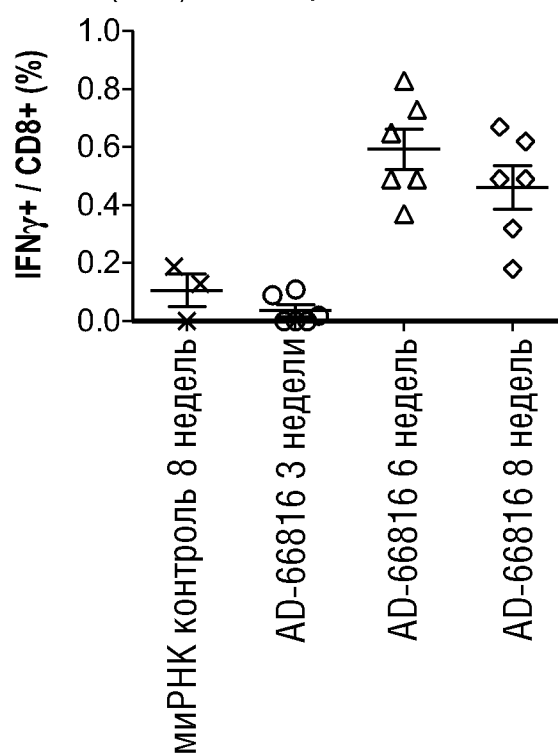
ФИГ.9А

HBs(S208)-специфич. ответ в печени



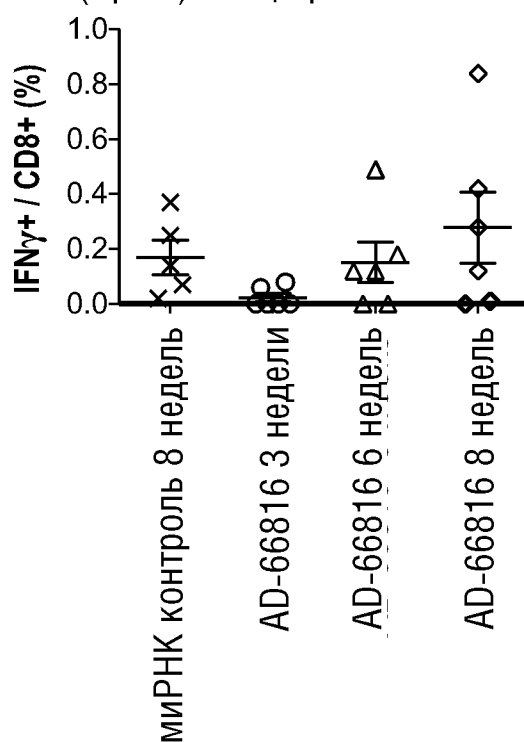
ФИГ.9В

HBs(C93)-специфич. ответ в печени



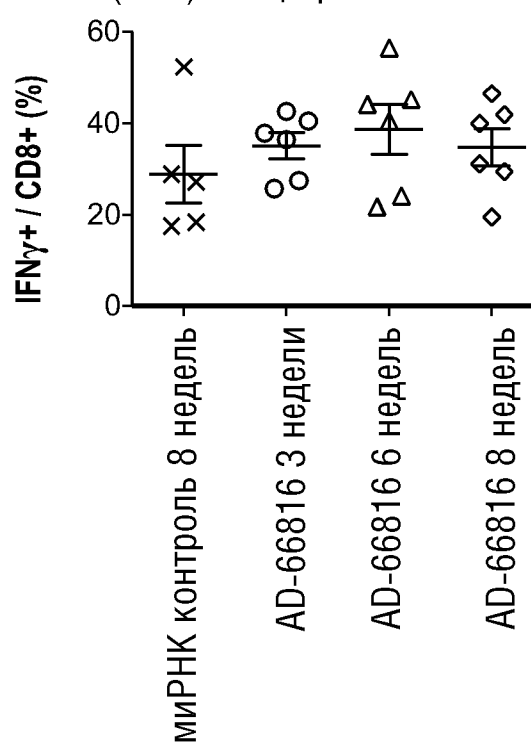
ФИГ.9С

HBs(Cpool)-специфич. ответ в печени



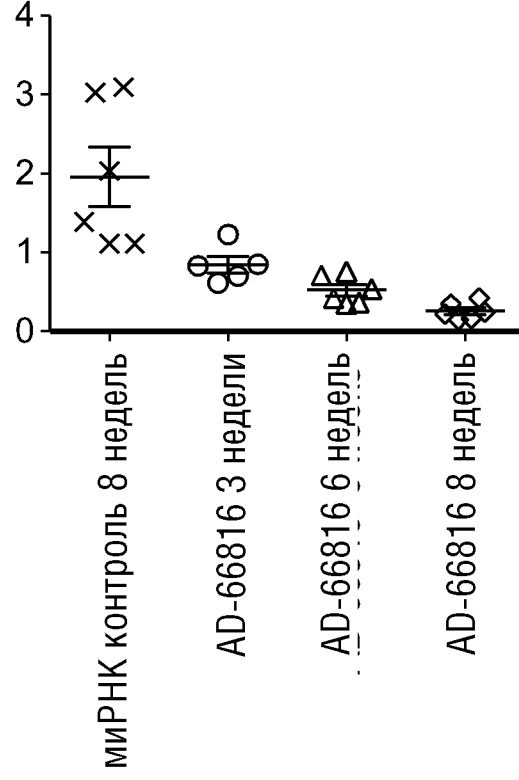
ФИГ.9D

MVA(B8R)-специфич. ответ в печени



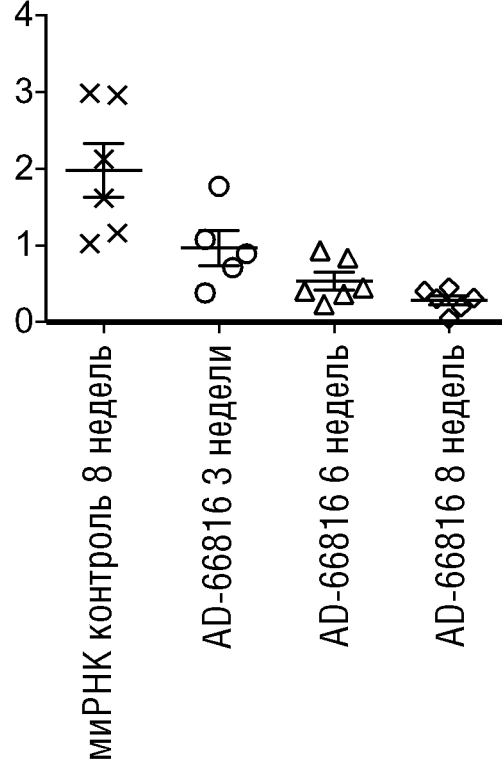
ФИГ.10А

Суммарная РНК ВГВ
(относительно GAPDH)



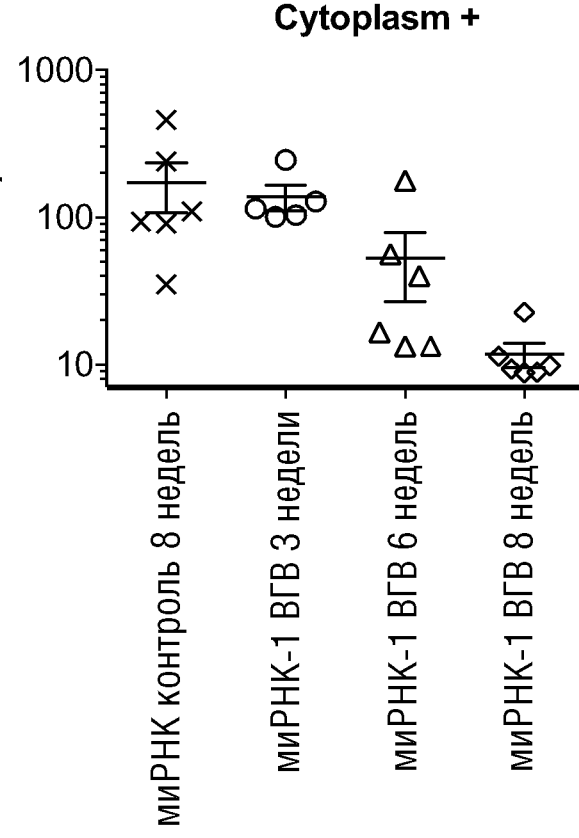
ФИГ.10В

3,5 т.н. транскрипт ВГВ
(относительно GAPDH)



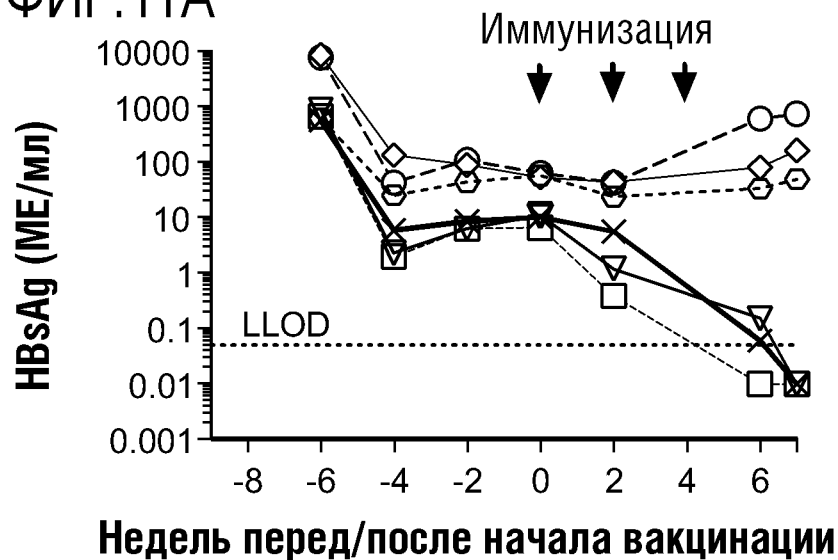
ФИГ.10С

HBs+ клеток/мм²

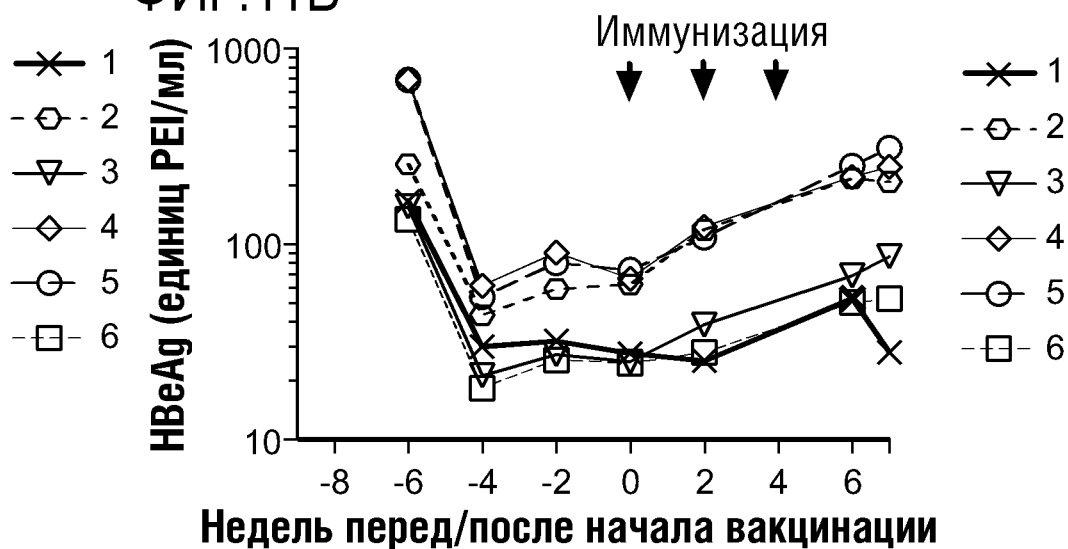


- Всех животных обрабатывали подкожно 3 мг/кг веса тела AD-66816
- Прекращение через 3 недели после последней вакцинации

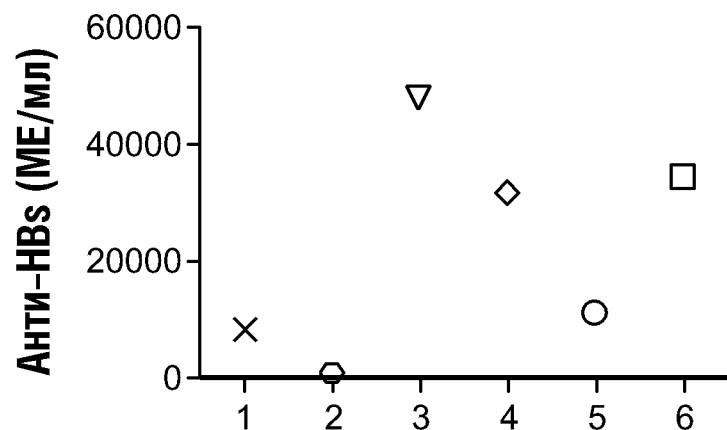
ФИГ.11А



ФИГ.11В



ФИГ.11С



ФИГ.11D



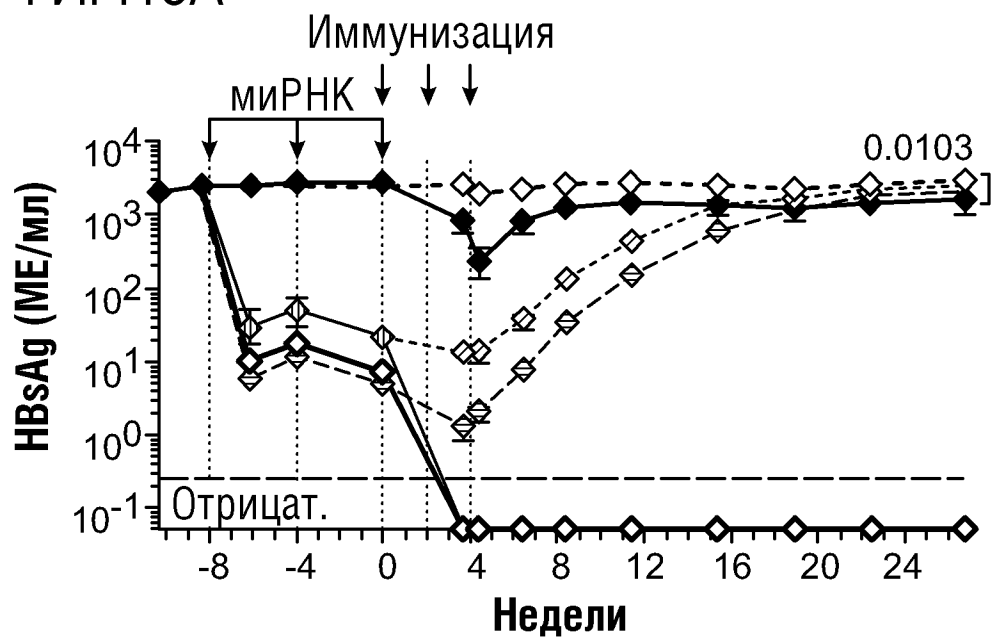
ФИГ.12



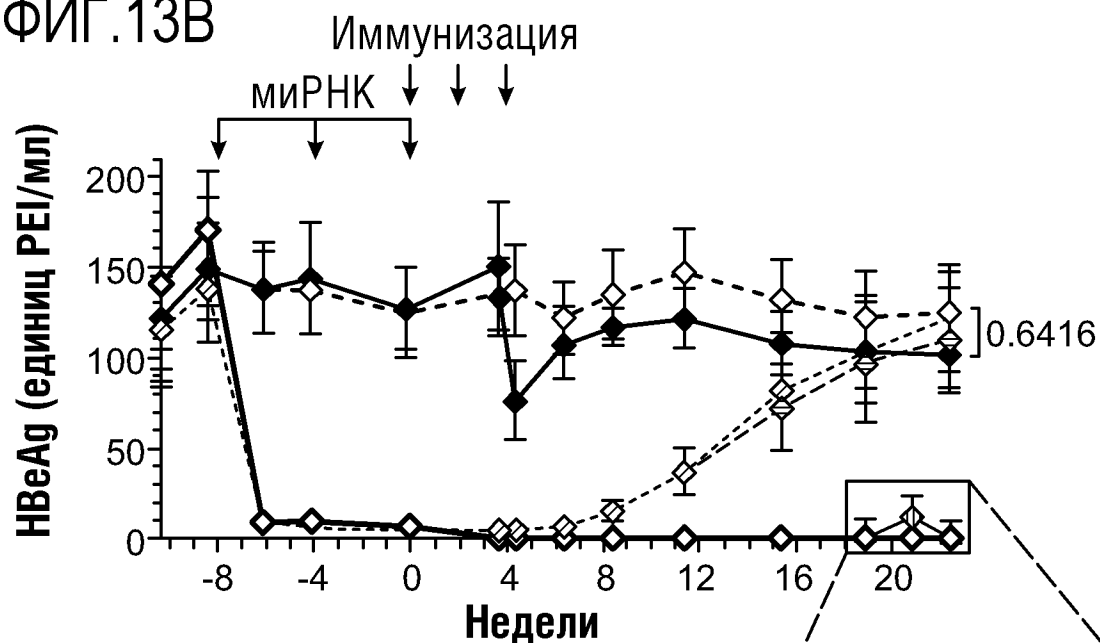
Дозирование миРНК: 3 мкг/кг подкожно

$$P = \text{HBsAg} + \text{HBcAg} + \text{c-di-AMP}$$
$$M = \text{MVA-HBsAg} + \text{MVA-HBcAg}$$

ФИГ.13А

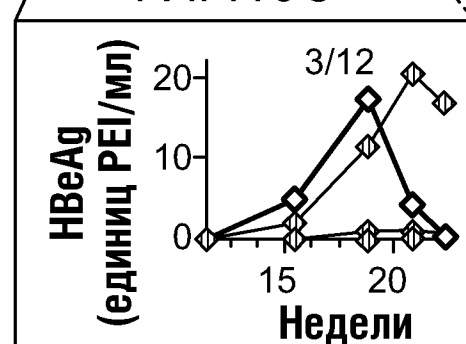


ФИГ.13В

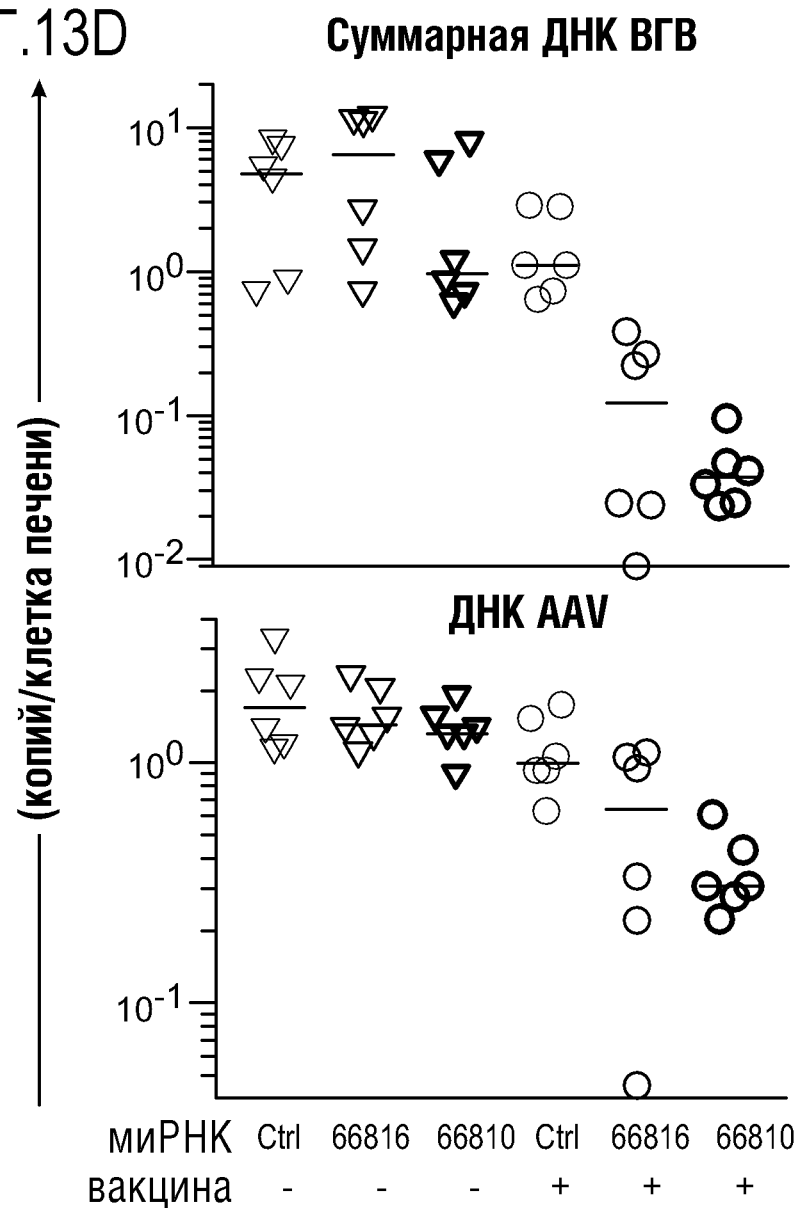


- ◇- Контрольная миРНК
- ◆- Контрольная миРНК + вакцина
- ◇-- AD-66816
- ◇- AD-66816 + вакцина
- ◇-- AD-66810
- ◇- AD-66810 + вакцина

ФИГ.13С

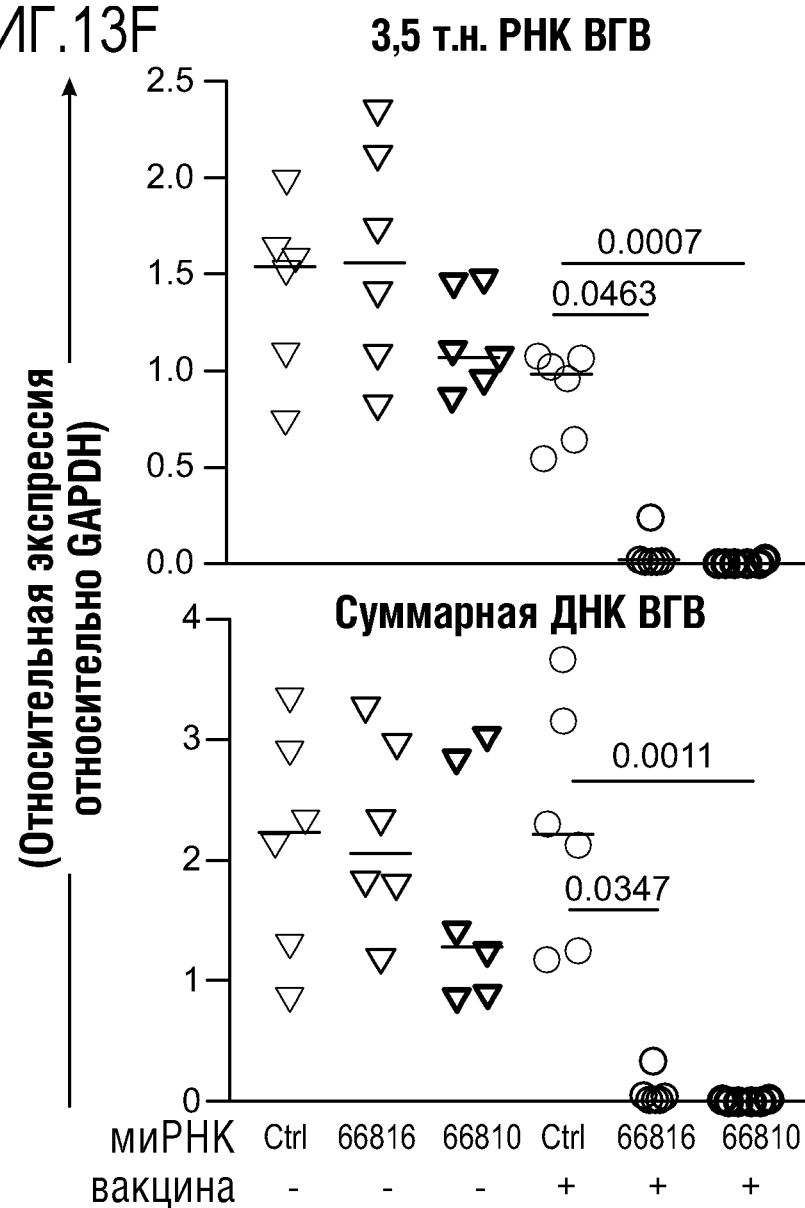


ФИГ.13D



ФИГ.13Е

ФИГ.13F



ФИГ.13G

Figure 1 is a line graph showing the development of anti-HBs antibody titer (mME/ml) over 24 weeks for three groups: Control (open circles), miRNA (open triangles), and miRNA + HBsAg (open squares). The y-axis is logarithmic, ranging from 10² to 10⁵ mME/ml. A dashed line at 10^{1.5} mME/ml indicates the cutoff. The Control group shows a rapid increase in titer, reaching approximately 10^{4.5} mME/ml by week 8 and remaining stable. The miRNA group shows a similar rapid increase, reaching approximately 10^{4.5} mME/ml by week 8 and remaining stable. The miRNA + HBsAg group shows a much slower increase, reaching approximately 10^{3.5} mME/ml by week 24. Statistical significance is indicated by brackets and p-values: 0.0730 for the comparison between Control and miRNA + HBsAg at week 20, and 0.0010 for the comparison between Control and miRNA + HBsAg at week 24. Immunization (Иммунизация) is indicated by arrows at weeks 0, 4, 8, 12, 16, and 20. miRNA treatment (миРНК) is indicated by arrows at weeks 0, 4, 8, and 12. The Control group (n.d.) is indicated by arrows at weeks 0 and 4.

- ФИГ.14С

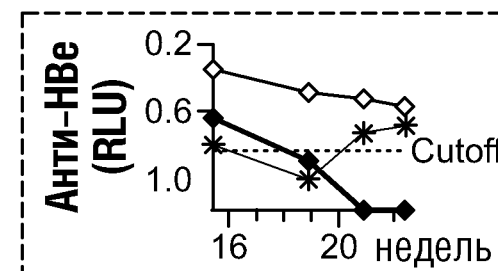
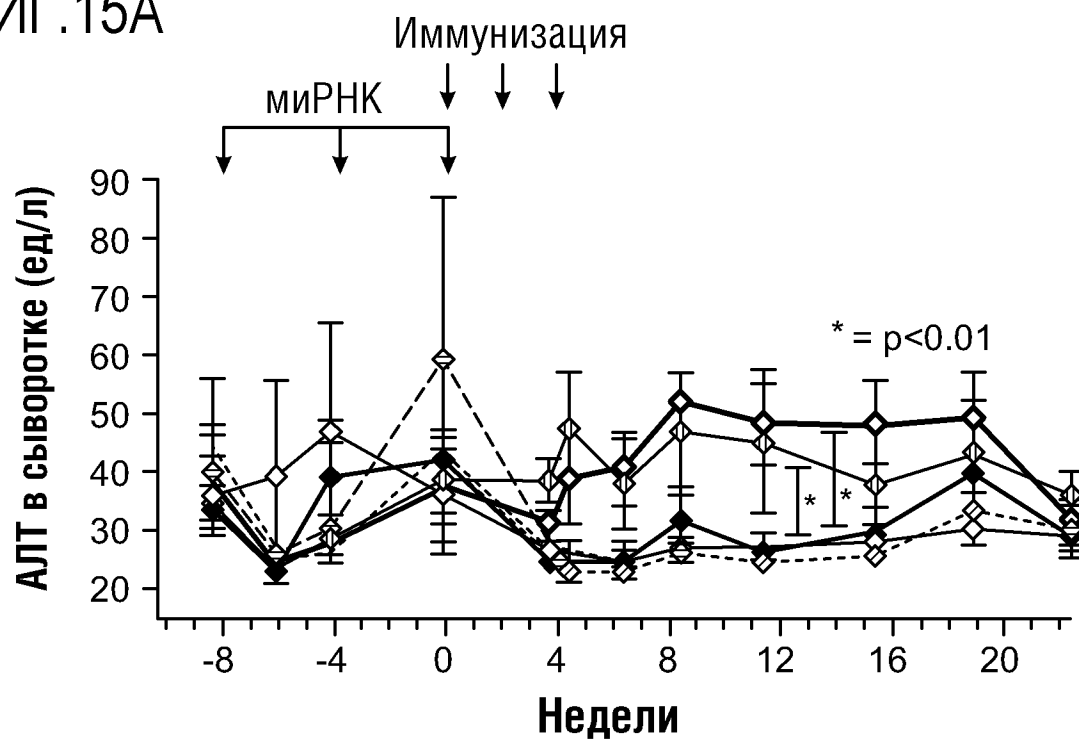


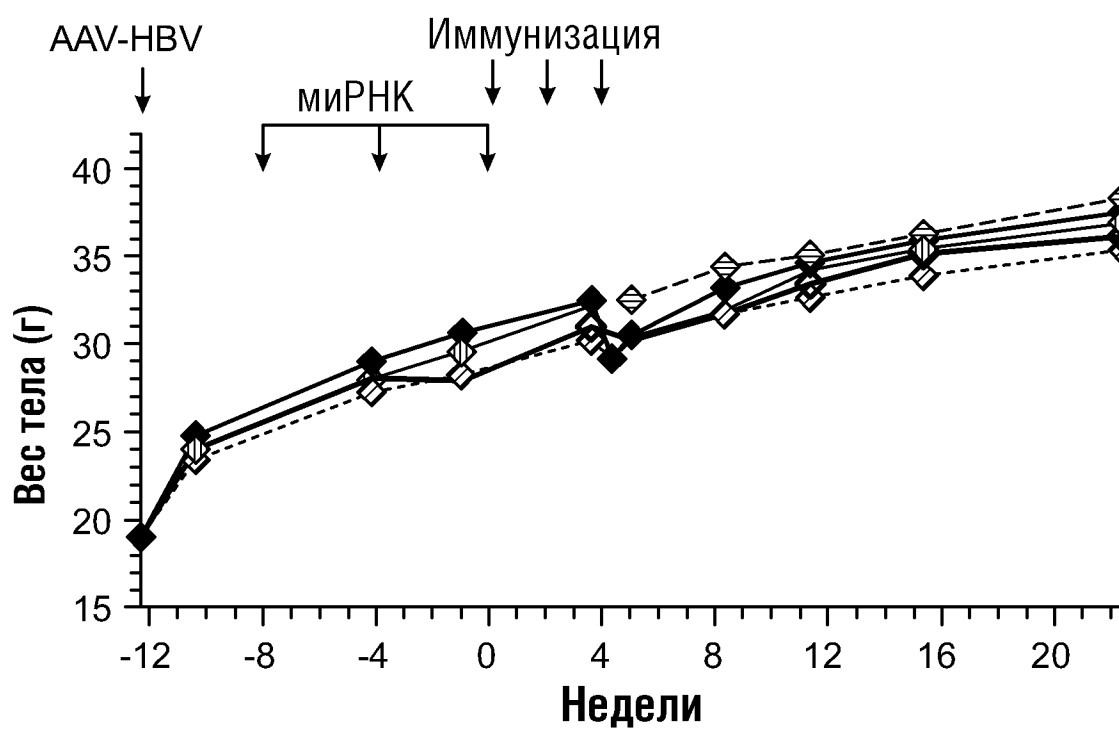
Figure 1 is a line graph showing Anti-HBs (RLU) on the y-axis (0.2 to 0.8, inverted) and weeks on the x-axis (-8 to 24). The graph compares two groups: Control (open circles) and miRNA (filled circles). Both groups show a significant increase in Anti-HBs starting at week 0, peaking around week 12, and then declining. A dashed box highlights the data from week 16 to week 24. A horizontal dashed line at 0.8 indicates the Cutoff. Arrows indicate the timing of immunization (weeks 0, 4, 8, 12) and miRNA treatment (weeks 0, 4, 8).

Week	Control (RLU)	miRNA (RLU)
-8	n.d.	n.d.
-4	n.d.	n.d.
0	~0.85	~0.85
4	~0.48	~0.60
8	~0.40	~0.85
12	~0.30	~0.32
16	~0.38	~0.85
20	~0.42	~0.55
24	~0.45	~0.85

ФИГ.15А



ФИГ.15В



- ◇-- Контрольная миРНК
- ◆— Контрольная миРНК + вакцина
- ◇--- AD-66816
- ◇— AD-66816 + вакцина
- ◇--- AD-66810
- ◇— AD-66810 + вакцина