

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202191771** (13) **A1**

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

**(43)** Дата публикации заявки  
**2022.01.31**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.11.10**

**(51)** Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)  
*A61K 47/26* (2006.01)  
*A61P 31/20* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ RNAi ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

**(31)** 62/077,672; 62/077,799; 62/137,464  
**(32)** 2014.11.10; 2014.11.10; 2015.03.24  
**(33)** US  
**(62)** 201791014; 2015.11.10  
**(71)** Заявитель:  
**ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Хинкл Грегори, Сепп-Лорензино  
Лаура, Джадхав Васант, Майер  
Мартин, Милстейн Стюарт,  
Манохаран Мутхиах, Раджив  
Каллантхоттатхил Г. (US)**

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

**(57)** Изобретение относится к средствам для RNAi, например двухнитевым средствам для RNAi, целенаправленно воздействующим на геном вируса гепатита В (HBV), к способам применения таких средств для RNAi для ингибирования экспрессии одного или нескольких генов HBV и к способам лечения субъектов с инфекцией HBV и/или ассоциированным с HBV нарушением, например хронической инфекцией, вызванной вирусом гепатита В.

**202191771**

**A1**

**A1**

**202191771**

## КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ iRNA ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

### Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 62/077799, поданной 10 ноября 2014 года, и предварительной заявки на патент США № 62/137464, поданной 24 марта 2015 года. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок на патенты включено в данный документ посредством ссылки.

Данная заявка также заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 62/077672, поданной 10 ноября 2014 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Данная заявка относится к международной патентной заявке PCT/US2015/XXXXX с названием "Композиции на основе iRNA против вируса гепатита D (HDV) и способы их применения", поданной 10 ноября 2015 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

### Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате с кодировкой ASCII и включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Указанная ASCII-копия, созданная 5 ноября 2015 года, имеет название 121301-02320\_SL.txt, и ее размер составляет 385791 байт.

### Уровень техники

Во всем мире более 400 миллионов человек имеют хроническую инфекцию, вызванную вирусом гепатита В, и, следовательно, подвергаются повышенному риску развития серьезного заболевания печени, такого как хронический гепатит, цирроз, печеночная недостаточность и гепатоцеллюлярная карцинома (HCC), из-за которых умирают примерно 600000 человек в год.

Естественное развитие хронической инфекции HBV включает четыре последовательных фазы: (1) раннюю 'иммунотолерантную' фазу, высокие уровни репликации вируса и минимальное воспаление в печени; (2) иммунореактивную фазу, значительное воспаление

печени и повышенные уровни сывороточных аминотрансфераз; при этом у некоторых пациентов происходит прогрессирование болезни до (3) 'нерепликативной' фазы, сероконверсии антител к HBe; невыявляемого или низкого уровня вирусемии (ниже 2000 МЕ/мл по результатам ПЦР-анализа); прекращение воспаления в печени; и (4) отрицательного по HBeAg хронического гепатита В, вызванного появлением конкретных мутаций в вирусе, которые предупреждают продуцирование HBeAg, но не препятствуют репликации вируса. Эта форма хронического гепатита В (CHB) характеризуется колебаниями уровней ДНК HBV в сыворотке крови и сывороточных аминотрансфераз (ALT и AST) и прогрессирующим заболеванием печени. Важно отметить, что CHB может представлять собой или положительный по HBeAg, или отрицательный по HBeAg CHB. Результаты лонгитудинальных исследований пациентов с CHB указывают на то, что 5-летняя кумулятивная частота развития цирроза варьирует в диапазоне 8-20%. 5-летняя кумулятивная частота декомпенсации функции печени составляет примерно 20%. Во всем мире растет заболеваемость НСС, и в настоящее время данное заболевание является пятым по распространенности типом рака. Ежегодная заболеваемость НСС, связанной с HBV, является высокой, составляя от 2 до 5% при возникновении цирроза печени.

Основная цель лечения HBV заключается в постоянном подавлении репликации HBV и уменьшении развития заболевания печени. Клинически важными ближайшими целями являются достижение HBeAg-сероконверсии, нормализация уровней ALT и AST в сыворотке крови, прекращения воспалительного процесса в печени и предупреждение декомпенсации функции печени. Конечной целью лечения является достижение устойчивого ответа для предупреждения развития цирроза, рака печени и увеличения продолжительности жизни. Инфекцию HBV невозможно устранить полностью по причине персистенции отдельной формы вирусной ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (cccDNA HBV) в ядрах инфицированных гепатоцитов. Тем не менее, индуцированный лечением клиренс сывороточного HBsAg является маркером прекращения хронической инфекции HBV и ассоциирован с наилучшим результатом в долгосрочной перспективе.

Современные стандартные способы лечения HBV включают использование иммунотерапевтических средств на основе интерферона или тимозина  $\alpha 1$  и супрессию продуцирования вируса путем ингибирования полимеразы HBV. Ингибиторы полимеразы HBV являются эффективными в снижении репродукции вирусов, но низкоэффективными или вообще неэффективными в отношении быстрого снижения HBsAg при длительном лечении ограниченного числа пациентов (как в случае с тенофовиром дизопроксил фумаратом). С помощью иммунотерапии на основе интерферона можно достичь и уменьшения репродукции вирусов, и ранней элиминации HBsAg из крови, но лишь у небольшого процента подвергаемых лечению субъектов. Общепризнанная функция HBsAg в крови заключается в блокировании антител к HBsAg и предоставлении инфекционным вирусным частицам возможности уклоняться от обнаружения иммунной системой, что, по-видимому, является одной из причин того, почему инфекция HBV остается хроническим состоянием. Кроме того, все HBsAg, HBeAg и HBcAg обладают иммуноингибиторными свойствами, а персистенция этих вирусных белков в крови пациентов после введения какого-либо из доступных в настоящее время средств для лечения HBV, по-видимому, оказывает существенное влияние, препятствуя осуществлению иммунного контроля инфекции HBV у пациентов.

Несмотря на то, что все три основных белка HBV (HBsAg, HBeAg и HBcAg) обладают иммуноингибиторными свойствами, HBsAg составляет основную долю белка HBV в кровотоке у субъектов, инфицированных HBV. Кроме того, несмотря на то, что устранение (посредством сероконверсии) HBeAg или уменьшение виремии в сыворотке крови не коррелирует с развитием устойчивого контроля после лечения инфекции HBV, удаление сывороточного HBsAg из крови (и сероконверсия) при инфекции HBV является хорошо известным прогностическим показателем противовирусного ответа на лечение, которое приведет к установлению контроля после лечения от инфекции HBV (хотя это происходит лишь у небольшой доли пациентов, проходящих иммунотерапию). Таким образом, несмотря на то, что уменьшение уровней всех трех основных белков HBV (HBsAg, HBeAg и HBcAg) может привести к оптимальному устранению

ингибирующего эффекта, устранение только HBsAg, по-видимому, является само по себе достаточным для устранения основного объема вирусного ингибирования иммунной функции у субъектов с инфекцией HBV.

Следовательно, при отсутствии какого-либо современного режима лечения, который может восстановить иммунологический контроль над HBV у значительной части пациентов, существует потребность в эффективном лечении инфекции HBV, которое может ингибировать репликацию вируса, а также восстанавливать иммунологический контроль у большинства пациентов. Соответственно, в данной области существует потребность в альтернативных видах терапии и комплексных видах терапии для субъектов, инфицированных HBV и/или имеющих заболевание, ассоциированное с HBV.

#### **Краткое описание изобретения**

Настоящее изобретение предлагает композиции на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена вируса гепатита В (HBV). Ген HBV может находиться в клетке, например, в клетке такого субъекта, как человек.

Настоящее изобретение также предлагает способы и виды терапии для лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение экспрессии гена HBV, например, инфекции HBV и/или заболевания, ассоциированного с HBV, как например, хроническая инфекция, вызванная вирусом гепатита В (CHB), цирроз, печеночная недостаточность и гепатоцеллюлярная карцинома (HCC), путем применения композиций на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов HBV, для ингибирования экспрессии гена HBV.

Средства для RNAi по настоящему изобретению были сконструированы для целенаправленного воздействия на участки в геноме HBV, которые являются консервативными у всех 8 серотипов HBV. Кроме того, были разработаны средства для RNAi по настоящему изобретению для ингибирования всех стадий жизненного

цикла HBV, например, репликации, сборки, секреции вируса и секреции субвирусных антигенов, путем ингибирования экспрессии нескольких генов HBV. В частности, поскольку транскрипция генома HBV приводит к образованию полицистронных перекрывающихся РНК, средство для RNAi по настоящему изобретению, которое целенаправленно воздействует на один ген HBV, приводит к значительному ингибированию экспрессии большинства или всех транскриптов HBV. Например, поскольку геном HBV транскрибируется в одну мРНК, средство для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на ген S, будет приводить к ингибированию экспрессии не только гена S, но также и экспрессии "нижележащего" гена обратной транскриптазы. Кроме того, были разработаны средства для RNAi по настоящему изобретению для ингибирования репликации вируса HBV путем целенаправленного воздействия на структурные гены HBV и ген X HBV, предоставляя возможность иммунной системе субъекта выявлять и реагировать на присутствие HBsAg с продуцированием антител к HBV для устранения инфекции HBV. Не ограничиваясь теорией, полагают, что комбинация или субкомбинация вышеуказанных свойств, и конкретных целевых участков, и/или конкретных модификаций в таких средствах для RNAi придает средствам для RNAi по настоящему изобретению улучшенную эффективность, стабильность, безопасность, активность и продолжительность действия.

Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение предлагает двухнитевые средства для RNAi для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке. Двухнитевые средства для RNAi включают в себя смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где указанная смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, а указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:2, где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные

нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где указанный лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления одно или несколько отличий по 3 нуклеотидам в нуклеотидной последовательности антисмысловой нити заключаются в ошибочном спаривании нуклеотидов в антисмысловой нити.

В другом варианте осуществления одно или несколько отличий по 3 нуклеотидам в нуклеотидной последовательности антисмысловой нити заключаются в ошибочном спаривании нуклеотидов в смысловой нити.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды указанной смысловой нити и все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления смысловая нить и антисмысловая нить содержат участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от какой-либо из последовательностей, приведенных в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 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 не встречающиеся в

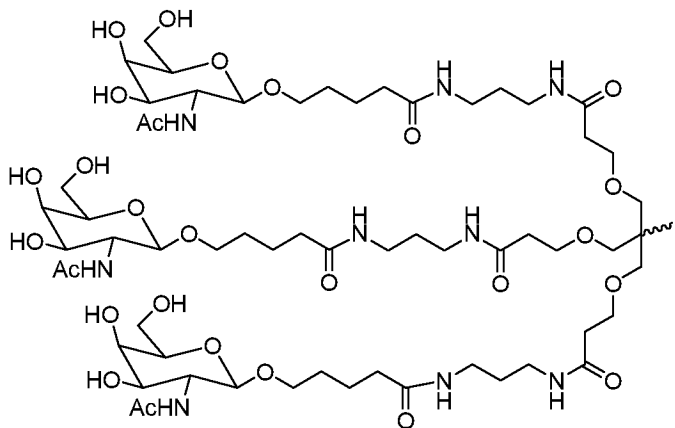
природе основания, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, и нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец, состоящий по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец, состоящий по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

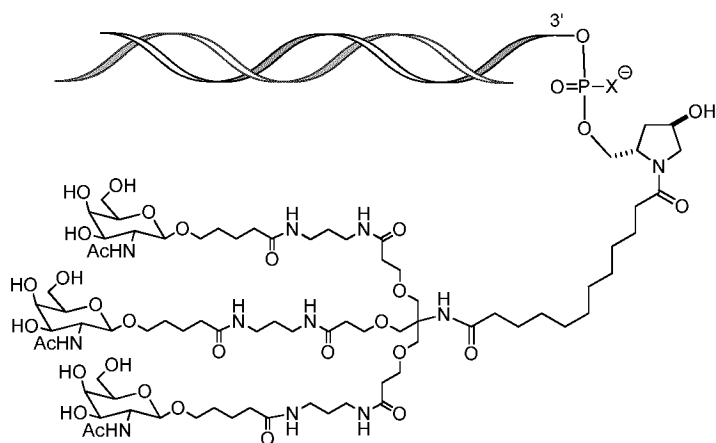
В одном варианте осуществления длина двухнитевого участка составляет 15-30 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления длина двухнитевого участка составляет 17-23 пары нуклеотидов. В еще одном варианте осуществления длина двухнитевого участка составляет 17-25 пар нуклеотидов. В одном варианте осуществления длина двухнитевого участка составляет 23-27 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления длина двухнитевого участка составляет 19-21 пару нуклеотидов. В еще одном варианте осуществления длина двухнитевого участка составляет 21-23 пары нуклеотидов.

В одном варианте осуществления каждая нить содержит 15-30 нуклеотидов. В одном варианте осуществления каждая нить содержит 19-30 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме



, где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления средство для RNAi выбрано из группы средств для RNAi, приведенных в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает двухнитевые средства для RNAi для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке. Двухнитевые средства для RNAi включают в себя смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где указанная смысловая нить содержит 5'-UCGUGGUGGACUUCUCUCA-3' (SEQ ID NO:5), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UGAGAGAAGUCCACCACGAUU-3' (SEQ ID NO:6), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где указанный лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

Настоящее изобретение также предлагает средства для RNAi, содержащие смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны по всей их длине вышеуказанным смысловой и антисмысловой нуклеотидным последовательностям.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает двухнитевые средства для RNAi для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке. Двухнитевые средства для RNAi

включают в себя смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где указанная смысловая нить содержит 5'-GUGCACUUCGCUUCACCUCUA-3' (SEQ ID NO:7), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU-3' (SEQ ID NO:8), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где указанный лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер. Настоящее изобретение также предлагает средства для RNAi, содержащие смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны по всей их длине вышеуказанным смысловой и антисмысловой нуклеотидным последовательностям.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает двухнитевые средства для RNAi для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке. Двухнитевые средства для RNAi включают в себя смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где указанная смысловая нить содержит 5'-CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU-3' (SEQ ID NO:9), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG-3' (SEQ ID NO:10), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где указанный лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. Настоящее изобретение также предлагает средства для RNAi, содержащие смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны по всей их длине вышеуказанным смысловой и антисмысловой нуклеотидным последовательностям.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает двухнитевые средства для RNAi для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке. Двухнитевые средства для RNAi включают в себя смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит 5'-CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU-3' (SEQ ID NO:37), и антисмысловая нить содержит 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU-3' (SEQ ID NO:38),

где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где указанный лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер. Настоящее изобретение также предлагает средства для RNAi, содержащие смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны по всей их длине вышеуказанным смысловой и антисмысловой нуклеотидным последовательностям.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает двухнитевые средства для RNAi для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке. Двухнитевые средства для RNAi включают в себя смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где указанная смысловая нить содержит 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA-3' (SEQ ID NO:11), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO:12), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где указанный лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. Настоящее изобретение также предлагает средства для RNAi, содержащие смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны по всей их длине вышеуказанным смысловой и антисмысловой нуклеотидным последовательностям.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает двухнитевые средства для RNAi для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке. Двухнитевые средства для RNAi включают в себя смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где указанная смысловая нить содержит 5'-GGUGGACUUCUCUCAUUA-3' (SEQ ID NO:39), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO:40), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где указанный лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. Настоящее изобретение также предлагает средства для RNAi, содержащие смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны по всей их длине вышеуказанным смысловой и антисмысловой нуклеотидным последовательностям.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды указанной смысловой нити и все нуклеотиды указанной антисмысловой нити имеют модификацию.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 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 не встречающиеся в природе основания, 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 миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления миметик 5'-фосфата представляет собой 5'-винилфосфат (5'-VP).

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca-3' (SEQ ID NO:13), а антисмысловая нить содержит 5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu-3' (SEQ ID NO:14), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и u представляют собой 2'-О-метил-(2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В другом варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca-3' (SEQ ID NO:15), а антисмысловая нить содержит 5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu-3' (SEQ ID NO:16), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и u представляют собой 2'-О-метил-(2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь; а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua-3' (SEQ ID NO:17), а антисмысловая нить содержит 5'-usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu-3' (SEQ ID NO:18), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и u представляют собой 2'-О-метил-(2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В другом варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-  
gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua-3' (SEQ ID NO:19), а антисмысловая  
нить содержит 5'-PusAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu-3' (SEQ ID  
NO:20), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U,  
содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил-  
(2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой  
2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную  
связь; а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-  
csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu-3' (SEQ ID NO:21), а антисмысловая  
нить содержит 5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg-3' (SEQ ID  
NO:22), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U,  
содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил-  
(2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой  
2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную  
связь.

В другом варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-  
csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu-3' (SEQ ID NO:23), а антисмысловая  
нить содержит 5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg-3' (SEQ ID  
NO:24), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U,  
содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил-  
(2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой  
фосфоротиоатную связь, а Р представляет собой 5'-фосфат или  
миметик 5'-фосфата.

В другом варианте осуществления смысловая нить содержит  
5'-csgsuggudGgucdTucucuaaaauu-3' (SEQ ID NO:35), а  
антисмысловая нить содержит

5'-asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu-3' (SEQ ID NO:36), где A,  
C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а,  
г, с и у представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G;  
dA, dC, dG и dT представляют собой A, C, G и T, содержащие  
дезоксирибозу; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-  
gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuaa-3' (SEQ ID NO:25), а антисмысловая  
нить содержит 5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc-3' (SEQ ID

NO:26), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

В другом варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuaa-3' (SEQ ID NO:27), а антисмысловая нить содержит

5'-PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc-3' (SEQ ID NO:28), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфотиоатную связь, а P представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

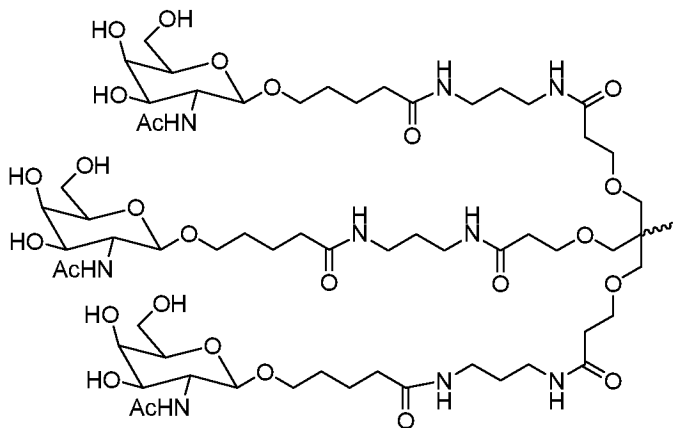
В другом варианте осуществления смысловая нить содержит

5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:41), а антисмысловая нить содержит

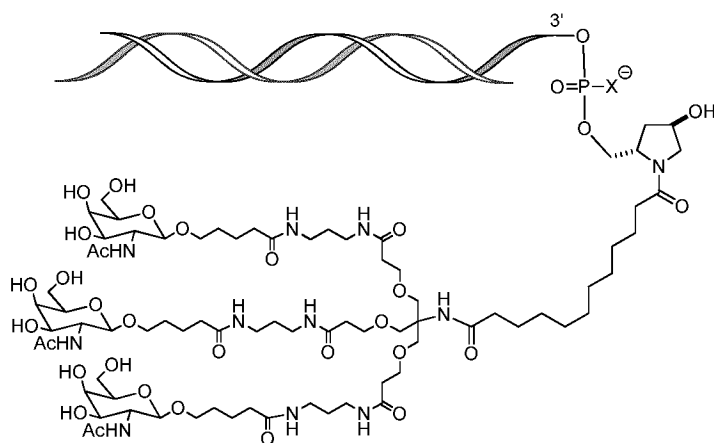
5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:42), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, что показано на следующей схеме:



, где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления Р представляет собой миметик 5'-фосфата. В одном варианте осуществления миметик 5'-фосфата представляет собой 5'-винилфосфат (5'-VP).

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает композиции, содержащие два или более двухнитевых средств для RNAi для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке, где каждое двухнитевое средство для RNAi независимо содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где каждая из указанных смысловых нитей независимо содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, а каждая из указанных антисмысловых нитей независимо содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:2, где, по сути, все нуклеотиды каждой из указанных смысловых нитей и, по сути, все нуклеотиды каждой из указанных антисмысловых нитей независимо представляют собой модифицированные нуклеотиды, где каждая из указанных смысловых нитей конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где указанный лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном или нескольких вариантах осуществления одно или несколько отличий по 3 нуклеотидам в нуклеотидной последовательности антисмысловой нити заключаются в ошибочном

спаривании нуклеотидов в антисмысловой нити. В другом варианте осуществления одно или несколько отличий по 3 нуклеотидам в нуклеотидной последовательности антисмысловой нити заключаются в ошибочном спаривании нуклеотидов в смысловой нити.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды в указанной смысловой нити и все нуклеотиды в указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления смысловая нить и указанная антисмысловая нить содержат участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от какой-либо из последовательностей, приведенных в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 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 не встречающиеся в природе основания, 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 миметик 5'-фосфата.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает композиции для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке, при этом композиция содержит (а) первое двухнитевое

средство для RNAi, содержащее первую смысловую нить и первую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды указанной первой смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды первой антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная первая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; и (b) второе двухнитевое средство для RNAi, содержащее вторую смысловую нить и вторую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды указанной второй смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной второй антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная вторая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; где каждая из первой и второй смысловых нитей независимо содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ IDNO:5),  
 5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ IDNO:7),  
 5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ IDNO:9),  
 5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ IDNO:37),  
 5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ IDNO:11), и

5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ IDNO:39) (или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанным нуклеотидным последовательностям), и где каждая из первой и второй антисмысловых нитей независимо содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6),  
 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8),  
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10),  
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38),  
 5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12), и

5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40) (или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанным нуклеотидным последовательностям).

В одном варианте осуществления первая и вторая смысловая нить и/или нуклеотиды первой и второй смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 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 не встречающиеся в природе основания, 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 миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления первое и второе средства для RNAi выбраны из группы, состоящей из:

5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca - 3' (SEQ ID NO:13)

5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu - 3' (SEQ ID NO:14);

5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca - 3' (SEQ ID NO:15)

5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu - 3' (SEQ ID NO:16);

5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua - 3' (SEQ ID NO:17)

5'-usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu - 3' (SEQ ID NO:18);

5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua - 3' (SEQ ID NO:19)

5'-PusAfsagGfugaagcgAfaGfugcacsusu - 3' (SEQ ID NO:20);  
 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu - 3' (SEQ ID NO:21)  
 5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg - 3' (SEQ ID NO:22);  
 5'- csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu - 3' (SEQ ID NO:23)  
 5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg - 3' (SEQ ID NO:24);  
 5'-csgsuggudGgucdTucucuaaaauu - 3' (SEQ ID NO:35)  
 5'- asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu - 3' (SEQ ID NO:36);  
 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu - 3' (SEQ ID NO:25)  
 5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccacccsasc - 3' (SEQ ID NO:26);  
 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu - 3' (SEQ ID NO:27)  
 5'- PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccacccsasc - 3' (SEQ ID NO:28);

и

5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)

5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:42), где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОMe-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; dA, dC, dG и dT представляют собой А, С, G и Т, содержащие дезоксирибозу; s представляет собой фосфоротиоатную связь, а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления первое и второе средства для RNAi представляют собой

5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca - 3' (SEQ ID NO:15)

5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu - 3' (SEQ ID NO:16);

5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu - 3' (SEQ ID NO:21)

5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg - 3' (SEQ ID NO:22),

где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОMe-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; s представляет собой фосфоротиоатную связь, а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В другом варианте осуществления первое и второе средства для RNAi представляют собой

5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu - 3' (SEQ ID NO:25)

5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccacccsasc - 3' (SEQ ID NO:26);

и

5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)

5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-OMe-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-A, G, C или U; s представляет собой фосфоротиоатную связь, а P представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает двухнитевое средство для RNAi, предусматривающее средства для RNAi, приведенные в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26.

Настоящее изобретение также предлагает векторы и клетки, содержащие двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает фармацевтические композиции, содержащие двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению, или композиции по настоящему изобретению, или векторы по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводится в небуферизованном растворе. В одном варианте осуществления небуферизованный раствор представляет собой солевой раствор или воду.

В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят с буферным раствором. В одном варианте осуществления буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В другом варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В (HBV) в клетке. Способы включают приведение в контакт клетки с двухнитевым средством для RNAi по настоящему изобретению, или с композицией по настоящему изобретению, или с вектором по настоящему изобретению, или с фармацевтической композицией по настоящему изобретению; и поддержание полученной клетки в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена

HBV, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена HBV в клетке.

В одном варианте осуществления ген HBV выбран из группы, состоящей из C, X, P, S и их комбинации.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы ингибирования репликации вируса гепатита В (HBV) в клетке. Способы включают приведение в контакт клетки с двухнитевым средством для RNAi по настоящему изобретению, или с композицией по настоящему изобретению, или с вектором по настоящему изобретению, или с фармацевтической композицией по настоящему изобретению; и поддержание полученной клетки в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена HBV, за счет чего обеспечивается ингибирование репликации HBV в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится в субъекте. В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления субъект страдает от заболевания, ассоциированного с HBV.

В одном варианте осуществления экспрессию гена HBV ингибируют по меньшей мере на приблизительно 30%, на приблизительно 40%, на приблизительно 50%, на приблизительно 60%, на приблизительно 70%, на приблизительно 80%, на приблизительно 90%, на приблизительно 95%, на приблизительно 98% или на приблизительно 100%.

В одном варианте осуществления репликацию HBV в клетке ингибируют по меньшей мере на приблизительно 30%, на приблизительно 40%, на приблизительно 50%, на приблизительно 60%, на приблизительно 70%, на приблизительно 80%, на приблизительно 90%, на приблизительно 95%, на приблизительно 98% или на приблизительно 100%.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы снижения уровня ДНК вируса гепатита В (HBV) у субъекта, инфицированного HBV. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, или композиции по настоящему изобретению, или вектора по настоящему изобретению, или

фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего снижается уровень ссcDNA HBV у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы снижения уровня антигена вируса гепатита В (HBV) у субъекта, инфицированного HBV. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, или композиции по настоящему изобретению, или вектора по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего снижается уровень антигена HBV у субъекта.

В одном варианте осуществления антиген HBV представляет собой HBsAg. В другом варианте осуществления антиген HBV представляет собой HBeAg.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы снижения вирусной нагрузки, создаваемой вирусом гепатита В (HBV), у субъекта, инфицированного HBV. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, или композиции по настоящему изобретению, или вектора по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего снижается вирусная нагрузка, создаваемая HBV, у субъекта.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы снижения уровня аланинаминотрансферазы (ALT) у субъекта, инфицированного HBV. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, или композиции по настоящему изобретению, или вектора по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего снижается уровень ALT у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы снижения уровня аспартатаминотрансферазы (AST) у субъекта, инфицированного HBV. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, или композиции по настоящему изобретению, или вектора по настоящему изобретению, или

фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего снижается уровень AST у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы повышения уровня антител к вирусу гепатита В (HBV) у субъекта, инфицированного HBV. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, или композиции по настоящему изобретению, или вектора по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего повышается уровень антител к HBV у субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, или композиции по настоящему изобретению, или вектора по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего осуществляется лечение указанного субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, или композиции по настоящему изобретению, или вектора по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего осуществляется лечение указанного субъекта.

В одном варианте осуществления нарушение, ассоциированное с HBV, выбрано из группы, состоящей из инфекции, вызванной вирусом гепатита D, дельта-гепатита, острого гепатита В; острого молниеносного гепатита В; хронического гепатита В; фиброза печени; терминальной стадии заболевания печени; гепатоцеллюлярной карциномы.

В одном варианте осуществления нарушение, ассоциированное с HBV, представляет собой хронический гепатит, а субъект является положительным по HBeAg. В другом варианте осуществления

нарушение, ассоциированное с HBV, представляет собой хронический гепатит, а субъект является отрицательным по HBeAg.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит 5'-UCGUGGUGGACUUCUCUCA-3' (SEQ ID NO:5) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UGAGAGAAGUCCACCACGAUU-3' (SEQ ID NO:6) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит 5'-UCGUGGUGGACUUCUCUCA-3' (SEQ ID NO:5) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей

длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UGAGAGAAGUCCACCACGAUU-3' (SEQ ID NO:6) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит 5'-GUGCACUUCGCUUCACCUCUA-3' (SEQ ID NO:7) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU-3' (SEQ ID NO:8) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного

разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит 5'-GUGCACUUCGCUUCACCUCUA-3' (SEQ ID NO:7) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU-3' (SEQ ID NO:8) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит 5'-CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU-3' (SEQ ID NO:9) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG-3' (SEQ ID NO:10) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит 5'-CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU-3' (SEQ ID NO:9) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG-3' (SEQ ID NO:10) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где

лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где смысловая нить содержит 5'-CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU-3' (SEQ ID NO:37) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а антисмысловая нить содержит 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU-3' (SEQ ID NO:38) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит 5'-CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU-3' (SEQ ID NO:37) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%

идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а антисмысловая нить содержит 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU-3' (SEQ ID NO:38) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA-3' (SEQ ID NO:11) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO:12) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного

разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит 5'-GGUGGACUUCUCUCAUUUUUA-3' (SEQ ID NO:11) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO:12) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO:39) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO:40) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO:39) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), а указанная антисмысловая нить содержит 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO:40) (или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанной нуклеотидной последовательности), где, по сути, все нуклеотиды указанной смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных

посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды указанной смысловой нити и все нуклеотиды указанной антисмысловой нити имеют модификацию.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 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 не встречающиеся в природе основания, 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 миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления миметик 5'-фосфата представляет собой 5'-винилфосфат (5'-VP).

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca-3' (SEQ ID NO:13), а антисмысловая нить содержит 5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu-3' (SEQ ID NO:14), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОMe-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В другом варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca-3' (SEQ ID NO:15), а антисмысловая нить содержит 5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu-3' (SEQ ID NO:16), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил-(2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиаотную связь; а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-gsusgscacUfuCfGfCfuucaccucua-3' (SEQ ID NO:17), а антисмысловая нить содержит 5'-usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu-3' (SEQ ID NO:18), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил-(2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиаотную связь.

В другом варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-gsusgscacUfuCfGfCfuucaccucua-3' (SEQ ID NO:19), а антисмысловая нить содержит 5'-PusAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu-3' (SEQ ID NO:20), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил-(2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиаотную связь; а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu-3' (SEQ ID NO:21), а антисмысловая нить содержит 5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg-3' (SEQ ID NO:22), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил-(2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиаотную связь.

В другом варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu-3' (SEQ ID NO:23), а антисмысловая нить содержит

5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg-3' (SEQ ID NO:24), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь, а P представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В другом варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-csgsuggudGgucdTucucuaaaauu-3' (SEQ ID NO:35), а антисмысловая нить содержит 5'-asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu-3' (SEQ ID NO:36), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G; dA, dC, dG и dT представляют собой A, C, G и T, содержащие дезоксирибозу; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuua-3' (SEQ ID NO:25), а антисмысловая нить содержит 5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc-3' (SEQ ID NO:26), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В другом варианте осуществления смысловая нить содержит 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuua-3' (SEQ ID NO:27), а антисмысловая нить содержит

5'-PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc-3' (SEQ ID NO:28), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь, а P представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

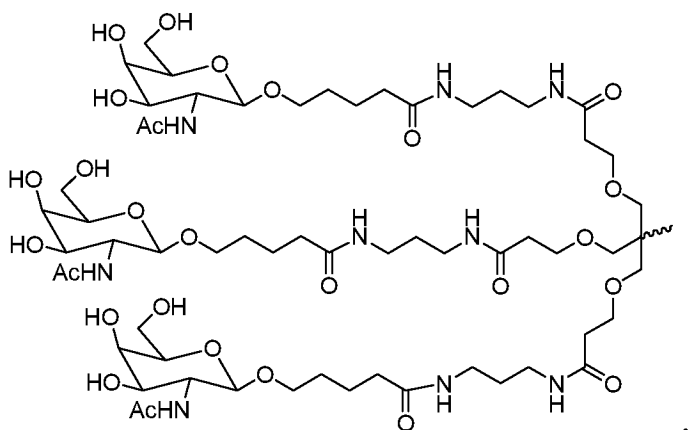
В другом варианте осуществления смысловая нить содержит

5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:41), а антисмысловая нить содержит

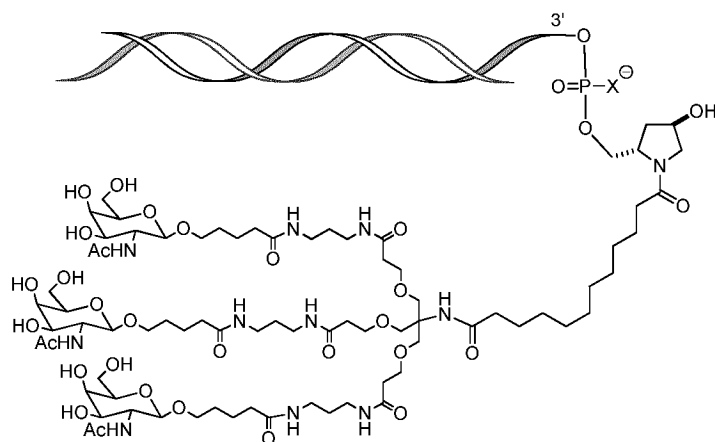
5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:42), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-O-метил- (2'-OMe-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиатовую связь.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



, где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления нарушение, ассоциированное с HBV, выбрано из группы, состоящей из инфекции, вызванной вирусом гепатита D, дельта-гепатита, острого гепатита В; острого молниеносного гепатита В; хронического гепатита В; фиброза печени; терминальной стадии заболевания печени; гепатоцеллюлярной карциномы.

В одном варианте осуществления нарушение, ассоциированное с HBV, представляет собой хронический гепатит, а субъект является положительным по HBeAg. В другом варианте осуществления

нарушение, ассоциированное с HBV, представляет собой хронический гепатит, а субъект является отрицательным по HBeAg.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке. Композиция включает: (a) первое двухнитевое средство для RNAi, содержащее первую смысловую нить и первую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды указанной первой смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной первой антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная первая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; и (b) второе двухнитевое средство для RNAi, содержащее вторую смысловую нить и вторую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды указанной второй смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной второй антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная вторая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; где каждая и первая, и вторая смысловые нити независимо содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ IDNO:5),

5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ IDNO:7),

5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ IDNO:9),

5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ IDNO:37),

5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ IDNO:11), и

5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ IDNO:39) (или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине какой-либо из вышеуказанных нуклеотидных

последовательностей), и где каждая из первой и второй антисмысловых нитей независимо содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'-UGAGAGAAGUCCACCACGAUU-3' (SEQ ID NO:6);

5'-UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU-3' (SEQ ID NO:8);

5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG-3' (SEQ ID NO:10);

5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU-3' (SEQ ID NO:38),

5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO:12), и

5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO:40) (или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине какой-либо из вышеуказанных нуклеотидных последовательностей), за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с вирусом гепатита В (HBV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке. Композиция включает: (a) первое двухнитевое средство для RNAi, содержащее первую смысловую нить и первую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды указанной первой смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной первой антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная первая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; и (b) второе двухнитевое средство для RNAi, содержащее вторую смысловую нить и вторую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды указанной второй смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной второй антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная вторая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько

производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; где каждая из первой и второй смысловых нитей независимо содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'-UCGUGGUGGACUUCUCUCA-3' (SEQ IDNO:5),

5'-GUGCACUUCGCUUCACCUCUA-3' (SEQ IDNO:7),

5'-CGUGGUGGACUUCUCUCAUUU-3' (SEQ IDNO:9),

5'-CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU-3' (SEQ IDNO:37),

5'-GGUGGACUUCUCUCAUUUUUA-3' (SEQ IDNO:11), и

5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ IDNO:39) (или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине какой-либо из вышеуказанных нуклеотидных последовательностей), и где каждая из первой и второй антисмысловых нитей независимо содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'-UGAGAGAAGUCCACCACGAUU-3' (SEQ ID NO:6);

5'-UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU-3' (SEQ ID NO:8);

5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG-3' (SEQ ID NO:10);

5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU-3' (SEQ ID NO:38),

5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO:12), и

5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO:40) (или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине какой-либо из вышеуказанных нуклеотидных последовательностей), за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды первой и второй смысловой нити и все нуклеотиды первой и второй антисмысловой нити имеют модификацию.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида,

конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 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 не встречающиеся в природе основания, 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 миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления первое и второе средства для RNAi выбраны из группы, состоящей из:

5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca - 3' (SEQ ID NO:13)  
 5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu - 3' (SEQ ID NO:14);  
 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca - 3' (SEQ ID NO:15)  
 5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu - 3' (SEQ ID NO:16);  
 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua - 3' (SEQ ID NO:17)  
 5'-usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu - 3' (SEQ ID NO:18);  
 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua - 3' (SEQ ID NO:19)  
 5'-PusAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu - 3' (SEQ ID NO:20);  
 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu - 3' (SEQ ID NO:21)  
 5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg - 3' (SEQ ID NO:22);  
 5'- csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu - 3' (SEQ ID NO:23)  
 5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg - 3' (SEQ ID NO:24);  
 5'-csgsuggudGgucdTucucuaaaauu - 3' (SEQ ID NO:35)  
 5'- asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu - 3' (SEQ ID NO:36);  
 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu - 3' (SEQ ID NO:25)  
 5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc - 3' (SEQ ID NO:26);  
 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu - 3' (SEQ ID NO:27)  
 5'- PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc - 3' (SEQ ID NO:28);

и

5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)

5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; dA, dC, dG и dT представляют собой А, С, G и Т, содержащие дезоксирибозу; s представляет собой фосфоротиоатную связь, а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления первое и второе средства для RNAi представляют собой

5'-uscsuguGfgUfGfGfacuucucuca - 3' (SEQ ID NO:15)

5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu - 3' (SEQ ID NO:16); и

5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu - 3' (SEQ ID NO:21)

5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg - 3' (SEQ ID NO:22), где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; s представляет собой фосфоротиоатную связь, а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В другом варианте осуществления первое и второе средства для RNAi представляют собой

5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu - 3' (SEQ ID NO:25)

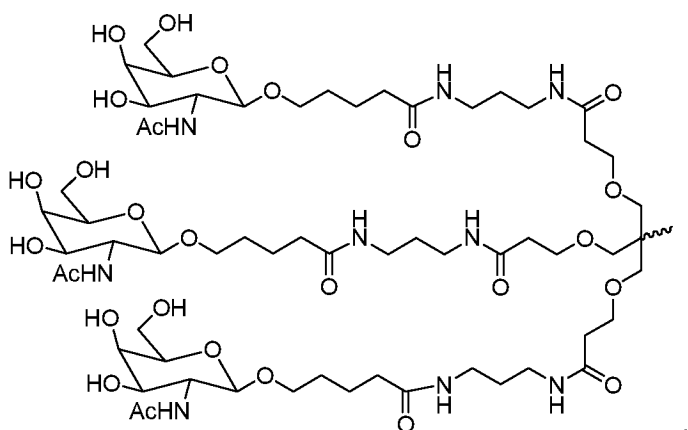
5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc - 3' (SEQ ID NO:26);

и

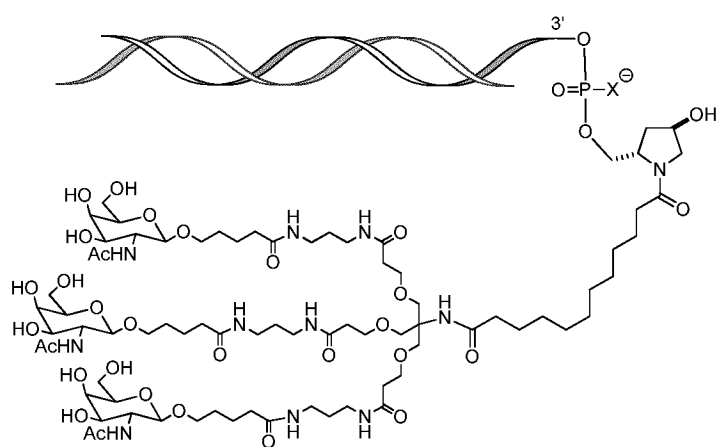
5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)

5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; s представляет собой фосфоротиоатную связь, а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



, где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления нарушение, ассоциированное с HBV, выбрано из группы, состоящей из инфекции, вызванной вирусом гепатита D, дельта-гепатита, острого гепатита B; острого молниеносного гепатита B; хронического гепатита B; фиброза печени; терминальной стадии заболевания печени; гепатоцеллюлярной карциномы.

В одном варианте осуществления нарушение, ассоциированное с HBV, представляет собой хронический гепатит, а субъект является положительным по HBeAg. В другом варианте осуществления нарушение, ассоциированное с HBV, представляет собой хронический гепатит, а субъект является отрицательным по HBeAg.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей приблизительно 3 мг/кг. В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей приблизительно 10 мг/кг.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, два раза в неделю.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 50 мг до 200 мг.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят подкожно. В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят внутривенно.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят в двух или более дозах.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят с интервалами, выбранными из группы, состоящей из одного раза приблизительно каждые 12 часов, одного раза приблизительно каждые 24 часа, одного раза приблизительно каждые 48 часов, одного раза приблизительно каждые 72 часа и одного раза приблизительно каждые 96 часов.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят два раза в неделю. В другом варианте осуществления средство для RNAi вводят один раз в две недели.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из противовирусного средства, ингибитора обратной транскриптазы, иммуностимулятора, терапевтической вакцины, ингибитора проникновения вируса, олигонуклеотида, который ингибирует секрецию или высвобождение HbsAg, ингибитора сборки капсида,

ингибитора образования cccDNA и любой комбинации из вышеперечисленного.

В другом варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают введение субъекту ингибитора обратной транскриптазы. В еще одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают введение субъекту ингибитора обратной транскриптазы и иммуностимулятора.

В одном варианте осуществления ингибитор обратной транскриптазы выбран из группы, состоящей из тенофовира дизопроксил фумарата (TDF), тенофовира алафенамида, ламивудина, адефовира дипивоксила, энтекавира (ETV), телбивудина и AGX-1009.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно предусматривают лечение у субъекта вирусного гепатита D (HDV). Способы лечения могут включать любые способы лечения, которые известны в данной области. В определенных вариантах осуществления лечение HDV у субъекта осуществляют с применением одного из нескольких средств на основе iRNA, целенаправленно воздействующих на HBV, что описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают способы модуляции, например, снижения, экспрессии PD-L1. Композиции и способы снижения экспрессии PD-L1 приведены, например, в публикации согласно РСТ под WO2011/127180, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления иммуностимулятор выбран из группы, состоящей из пегилированного интерферона альфа-2а (PEG-IFN- $\alpha$ 2а), интерферона альфа-2b, рекомбинантного человеческого интерлейкина-7 и агониста Toll-подобного рецептора 7 (TLR7).

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с вирусом гепатита В (HBV), предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi,

где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов и отличается не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:29, а указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:30,

где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды,

где смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение также предлагает способ лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV), предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке, при этом указанная композиция содержит

(a) первое двухнитевое средство для RNAi, содержащее первую нить и первую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где, по сути, все нуклеотиды первой смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды первой антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды,

где указанная первая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; и

(b) второе двухнитевое средство для RNAi, содержащее вторую смысловую нить и вторую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где, по сути, все нуклеотиды второй смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды второй антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды,

где вторая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и

где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера;

где первая смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов и отличается не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, а указанная первая антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:2,

где вторая смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов и отличается не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:29, а вторая антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:30, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В некоторых вариантах осуществления первая смысловая нить содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ IDNO:5),

5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ IDNO:7),

5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAUU -3' (SEQ IDNO:9),

5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAUU -3' (SEQ IDNO:37)

5'- GGUGGACUUCUCUCAUUUUA -3' (SEQ IDNO:11), и

5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ IDNO:39), (или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанным нуклеотидным последовательностям), а вторая антисмысловая нить содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6);

5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8);

5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10);

5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38);

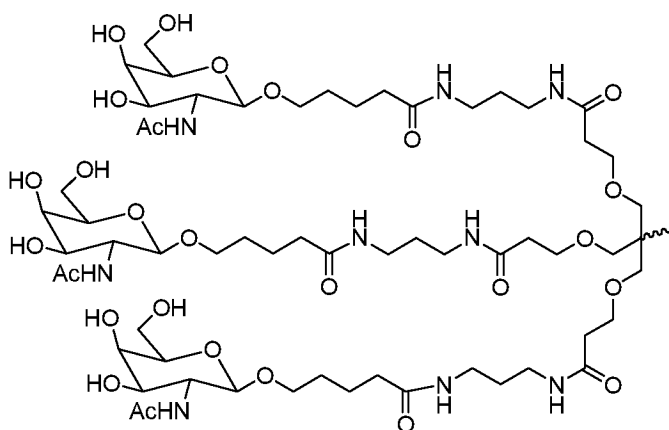
5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12); и

5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40) (или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине вышеуказанным нуклеотидным последовательностям).

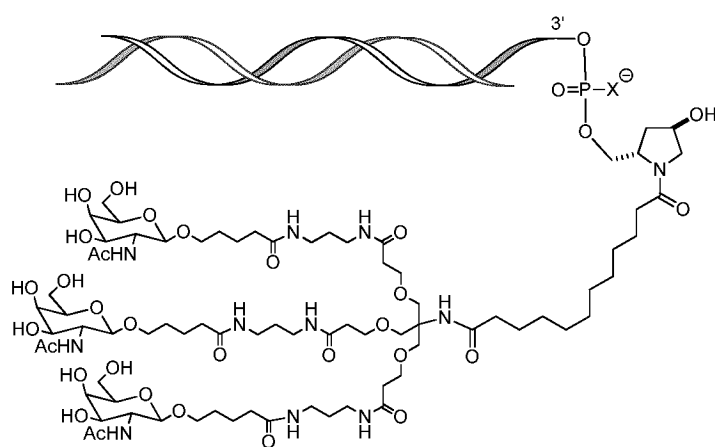
В некоторых аспектах все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 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 не встречающиеся в природе основания, 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 миметик 5'-фосфата.

В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой



В конкретном варианте осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



, где X представляет собой O или S.

В определенных вариантах осуществления предлагаемые в данном документе двухнитевые средства для RNAi и композиции применяют для лечения инфекции HDV и/или ассоциированного с HDV нарушения.

Соответственно, настоящее изобретение предлагает способы ингибирования репликации вируса гепатита D (HDV) в клетке. Способы включают (a) приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi, композицией, вектором или фармацевтической композицией, которые предложены в данном документе; и (b) поддержание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена HBV, за счет чего обеспечивается ингибирование репликации HDV в клетке.

В определенных вариантах осуществления клетка находится в субъекте. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает способы снижения уровня антигена вируса гепатита D (HDV) у субъекта, инфицированного HDV. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, композиции, вектора или фармацевтической композиции, которые предложены в данном документе, за счет чего у субъекта снижают уровень антигена HDV, например, S-HDAg или L-HDAg.

Настоящее изобретение также предлагает способы снижения вирусной нагрузки, создаваемой вирусом гепатита D (HDV), у субъекта, инфицированного HDV. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, композиции, вектора или фармацевтической композиции, которые предложены в данном документе, за счет чего обеспечивается снижение вирусной нагрузки, создаваемой HDV, у субъекта.

Настоящее изобретение также предлагает способы лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита D (HDV), предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, композиции, вектора или фармацевтической композиции, которые предложены в данном документе, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок. Смысловая нить и антисмысловые нити могут быть выбраны из следующих средств для RNAi, где смысловая нить содержит 5'-UCGUGGUGGACUUCUCUCA-3' (SEQ ID NO:5), а антисмысловая нить содержит 5'-UGAGAGAAGUCCACCACGAUU-3' (SEQ ID NO:6); смысловая нить содержит 5'-GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ ID NO:7), а антисмысловая нить содержит 5'-UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU-3' (SEQ ID NO:8); смысловая нить содержит 5'-CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU-3' (SEQ ID NO:9), а антисмысловая нить содержит 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG-3' (SEQ ID NO:10); смысловая нить содержит 5'-CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU-3' (SEQ ID NO:37), а антисмысловая нить содержит 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU-3' (SEQ ID NO:38); смысловая нить содержит 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA-3' (SEQ ID NO:11), а

антисмысловая нить содержит 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO:12); или смысловая нить содержит 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO:39), а антисмысловая нить содержит 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO:40), где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 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 не встречающиеся в природе основания, 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 миметик 5'-фосфата. В определенных вариантах осуществления миметик 5'-фосфата представляет собой 5'-винилфосфат (5'-VP).

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca-3' (SEQ ID NO:13), а антисмысловая нить содержит 5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu-3' (SEQ ID NO:14), где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca-3' (SEQ ID NO:15), а антисмысловая нить содержит 5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu-3' (SEQ ID NO:16), где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь; а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua-3' (SEQ ID NO:17), а антисмысловая нить содержит 5'-usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu-3' (SEQ ID NO:18), где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua-3' (SEQ ID NO:19), а антисмысловая нить содержит 5'-PusAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu-3' (SEQ ID NO:20), где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь; а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu-3' (SEQ ID NO:21), а

антисмысловая нить содержит 5'-AfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg-3' (SEQ ID NO:22), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu-3' (SEQ ID NO:23), а антисмысловая нить содержит

5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg-3' (SEQ ID NO:24), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь, а P представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит

5'-csgsuggudGgucdTucucuaaaauu-3' (SEQ ID NO:35), а антисмысловая нить содержит

5'-asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu-3' (SEQ ID NO:36), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G; dA, dC, dG и dT представляют собой A, C, G и T, содержащие дезоксирибозу; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит

5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu-3' (SEQ ID NO:25), а антисмысловая нить содержит

5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc-3' (SEQ ID NO:26), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит

5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu-3' (SEQ ID NO:27), а антисмысловая нить содержит

5'-PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc-3' (SEQ ID NO:28), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОMe-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфотриоатную связь, а P представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

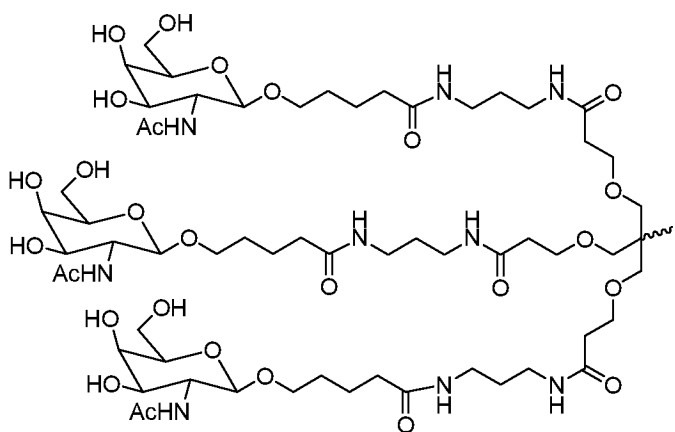
В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит

5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:41), а антисмысловая нить содержит

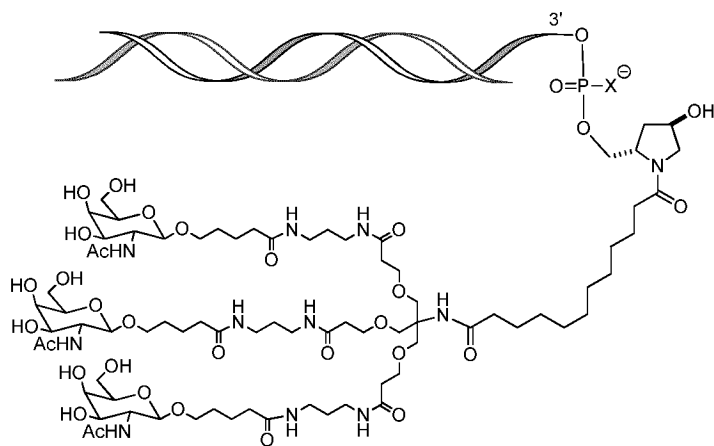
5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:42), где A, C, G и U представляют собой A, C, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и у представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОMe-) A, U, C или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой

2'-фтор-A, G, C или U; и s представляет собой фосфотриоатную связь.

В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой



В определенных вариантах осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



, где X представляет

собой O или S.

Настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита D (HDV). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке, при этом композиция содержит (а) первое двухнитевое средство для RNAi, содержащее первую смысловую нить и первую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды первой смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды первой антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где первая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; и (b) второе двухнитевое средство для RNAi, содержащее вторую смысловую нить и вторую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды второй смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды второй антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где вторая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; где каждая из первой и второй смысловых нитей независимо содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ ID NO:5),

5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ ID NO:7),

5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ ID NO:9),  
 5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ ID NO:37),  
 5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ ID NO:11), и  
 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ IDNO:39), и где каждая из  
 первой и второй антисмысловых нитей независимо содержит  
 последовательность, выбранную из группы, состоящей из  
 5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6);  
 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8);  
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10);  
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38),  
 5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12), и  
 5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40), за счет чего  
 осуществляется лечение субъекта.

В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды первой и второй смысловой нити и все нуклеотиды первой и второй антисмысловой нити имеют модификацию. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 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 не встречающиеся в природе основания, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфотриоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, и нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата.

В определенных вариантах осуществления первое и второе средства для RNAi выбраны из группы:

5'-uscsGuGfgUfGfGfacuucucuca - 3' (SEQ ID NO:13)  
 5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu - 3' (SEQ ID NO:14);  
 5'-uscsGuGfgUfGfGfacuucucuca - 3' (SEQ ID NO:15)  
 5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu - 3' (SEQ ID NO:16);  
 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua - 3' (SEQ ID NO:17)  
 5'-usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu - 3' (SEQ ID NO:18);  
 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua - 3' (SEQ ID NO:19)  
 5'-PusAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu - 3' (SEQ ID NO:20);  
 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu - 3' (SEQ ID NO:21)  
 5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg - 3' (SEQ ID NO:22);  
 5'- csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu - 3' (SEQ ID NO:23)  
 5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg - 3' (SEQ ID NO:24);  
 5'-csgsuggudGgucdTucucuaaaauu - 3' (SEQ ID NO:35)  
 5'- asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu - 3' (SEQ ID NO:36);  
 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu - 3' (SEQ ID NO:25)  
 5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc - 3' (SEQ ID NO:26);  
 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu - 3' (SEQ ID NO:27)  
 5'- PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc - 3' (SEQ ID NO:28);

и

5'- gsusGuGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)

5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:42), где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие рибозу; а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОМе-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; dA, dC, dG и dT представляют собой А, С, G и Т, содержащие дезоксирибозу; s представляет собой фосфоротиоатную связь, а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В определенных вариантах осуществления первое и второе средства для RNAi представляют собой

5'-uscsGuGfgUfGfGfacuucucuca - 3' (SEQ ID NO:15)  
 5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu - 3' (SEQ ID NO:16); и  
 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu - 3' (SEQ ID NO:21)  
 5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg - 3' (SEQ ID NO:22),  
 где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие

рибозу; а, г, с и и представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОMe-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; s представляет собой фосфоротиоатную связь, а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В определенных вариантах осуществления первое и второе средства для RNAi представляют собой

5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuuа - 3' (SEQ ID NO:25)

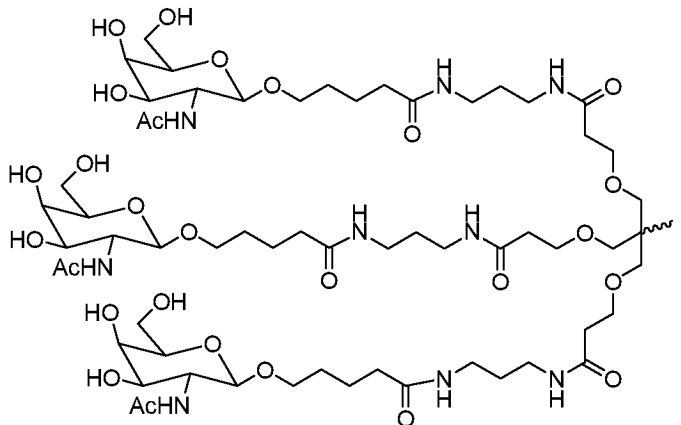
5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc - 3' (SEQ ID NO:26);

и

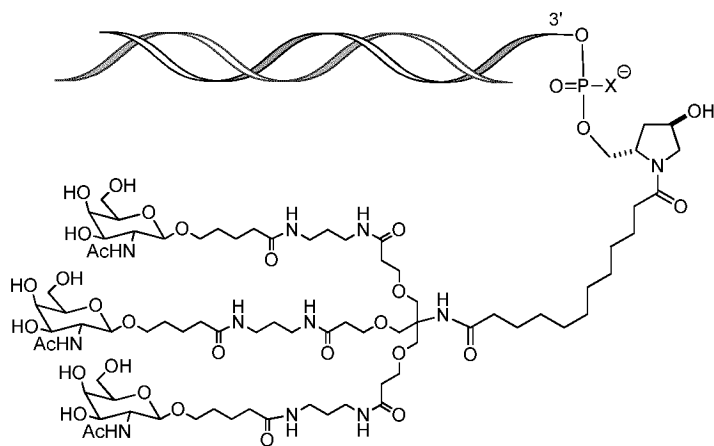
5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)

5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), где А, С, G и U представляют собой А, С, G или U, содержащие рибозу; а, г, с и и представляют собой 2'-О-метил- (2'-ОMe-) А, U, С или G; Af, Cf, Gf или Uf представляют собой 2'-фтор-А, G, С или U; s представляет собой фосфоротиоатную связь, а Р представляет собой 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата.

В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой



В определенных вариантах осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



, где X представляет

собой O или S.

В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей приблизительно 3 мг/кг. В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей приблизительно 10 мг/кг. В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, два раза в неделю. В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 50 мг до 200 мг.

В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят подкожно.

В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят внутривенно.

В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят в двух или более дозах. В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят с интервалами, выбранными из группы, состоящей из одного раза приблизительно каждые 12 часов, одного раза приблизительно каждые 24 часа, одного раза

приблизительно каждые 48 часов, одного раза приблизительно каждые 72 часа и одного раза приблизительно каждые 96 часов. В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят два раза в неделю. В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят один раз в две недели. В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят один раз в месяц. В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят один раз в два месяца. В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят один раз в три месяца.

В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят субъекту с дополнительным терапевтическим средством. Дополнительные терапевтические средства включают, например, противовирусное средство, ингибитор обратной транскриптазы, иммуностимулятор, терапевтическую вакцину, ингибитор проникновения вируса, олигонуклеотид, который ингибирует секрецию или высвобождение HbsAg, ингибитор сборки капсида, ингибитор образования ковалентно замкнутой кольцевой (ССС) ДНК HBV и любую комбинацию из вышеперечисленного.

В определенных вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор обратной транскриптазы. В определенных вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор обратной транскриптазы и иммуностимулятор. Иллюстративные ингибиторы обратной транскриптазы включают тенофовир дизопроксил фумарат (TDF), тенофовир алафенамид, ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин и AGX-1009. Иллюстративные иммуностимуляторы включают пегилированный интерферон альфа-2а (PEG-IFN- $\alpha$ 2а), интерферон альфа-2b, рекомбинантный человеческий интерлейкин-7 и агонист Toll-подобного рецептора 7 (TLR7).

Настоящее изобретение дополнительно предлагает способы лечения субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гепатита D (HDV), предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке, при этом композиция содержит (а) первое двухнитевое средство для RNAi, содержащее первую нить

и первую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды первой смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды первой антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где первая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; и (b) второе двухнитевое средство для RNAi, содержащее вторую смысловую нить и вторую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды второй смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды второй антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где вторая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; где первая смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, а первая антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:2, где вторая смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:29, а вторая антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:30, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В определенных вариантах осуществления первая смысловая нить содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

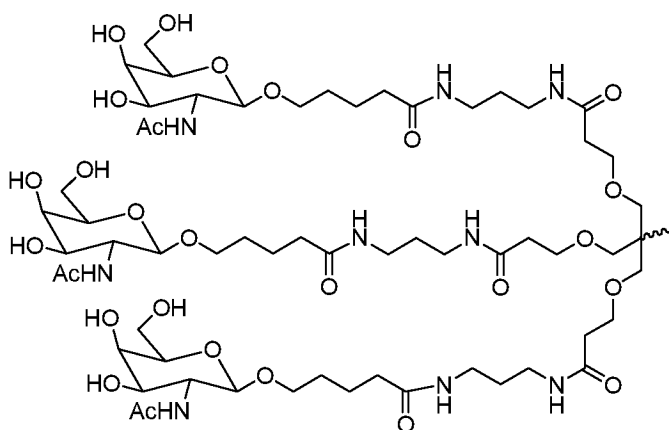
- 5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ IDNO:5),
- 5'- GUGCACUUCGCUUACCUCUA -3' (SEQ ID NO:7),
- 5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ ID NO:9),
- 5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ ID NO:37),
- 5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ ID NO:11), и

5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ IDNO:39), и  
 вторая антисмысловая нить содержит последовательность,  
 выбранную из группы, состоящей из

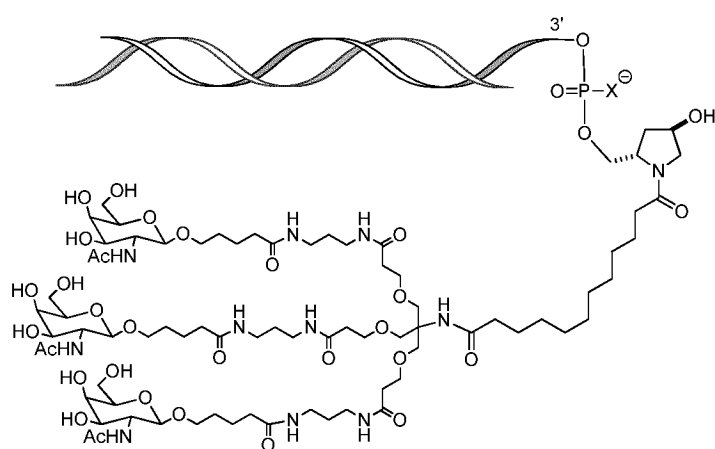
5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6);  
 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8);  
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10);  
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38),  
 5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12), и  
 5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40).

В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию. В определенных вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов, который выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 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 не встречающиеся в природе основания, 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 миметик 5'-фосфата.

В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой



В определенных вариантах осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



, где X представляет собой O или S.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующим подробным описанием и графическими материалами.

#### Краткое описание графических материалов

На фигуре 1 схематически изображена структура двухнитевого генома HBV размером примерно 3,2 т. п. о. Репликация генома HBV происходит за счет промежуточной РНК и дает в результате 4 перекрывающихся вирусных транскрипта (транскрипт размером приблизительно 3,5 т. п. о., транскрипт размером приблизительно 2,4 т. п. о., транскрипт размером приблизительно 2,1 т. п. о. и транскрипт размером приблизительно 0,7 т. п. о.), кодирующих семь вирусных белков (pre-S1, pre-S2, S, P, X, pre-C и C), которые транслируются с трех рамок считывания.

На фигуре 2 представлен график, на котором изображено log-снижение уровней HBsAg в сыворотке крови, нормализованных по уровням HBsAg в сыворотке крови до введения дозы, после введения

разовой дозы указанных средств на основе iRNA, составляющей 3 мг/кг.

На фигуре 3 представлен график, на котором изображено log-снижение уровней HBsAg в сыворотке крови, нормализованных по уровням HBsAg в сыворотке крови до введения дозы, после введения разовой дозы указанных средств на основе iRNA, составляющей 3 мг/кг.

На фигуре 4 представлен график, на котором изображен процент HBsAg до введения дозы, который остается в дни 5 и 10 после введения разовой дозы указанных средств на основе iRNA, составляющей 3 мг/кг. На фигуре 4 также изображен процент HBsAg, который остается в день 10 после введения дозы, относительно процента HBsAg, который остается в день 10 после введения дозы, у животного, которому вводили 3 мг/кг контрольной dsRNA, целенаправленно воздействующий на мышинный/крысиный транстиретин (mrTTR).

На фигуре 5 представлен график, на котором изображено log-снижение уровней HBsAg в сыворотке крови, нормализованных по уровням HBsAg в сыворотке крови до введения дозы, после введения разовой дозы AD-65403, составляющей 3 мг/кг.

На фигуре 6А представлен график, на котором изображено снижение уровней HBsAg в сыворотке крови, нормализованных по уровням HBsAg в сыворотке крови до введения дозы, на стандартной линейной шкале после подкожного введения разовой дозы AD-66810, составляющей 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 9 мг/кг.

На фигуре 6В представлен график, на котором изображено снижение уровней HBsAg в сыворотке крови, нормализованных по уровням HBsAg в сыворотке крови до введения дозы, на  $\log_{10}$ -шкале после введения разовой подкожной дозы AD-66810, составляющей 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 9 мг/кг.

На фигуре 7 представлен график, на котором изображено снижение уровней HBsAg в плазме крови, нормализованных по уровням HBsAg в плазме крови до введения дозы, на  $\log_{10}$ -шкале после подкожного введения трех еженедельных доз 3 мг/кг AD-66810.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение предлагает композиции на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена вируса гепатита В (HBV). Ген может находиться в клетке, например, в клетке субъекта, такого как человек. Применение этих iRNA обеспечивает возможность целенаправленного разрушения мРНК соответствующего гена (гена HBV) у млекопитающих.

Средства для RNAi по настоящему изобретению были сконструированы для целенаправленного воздействия на участки в геноме HBV, которые являются консервативными у всех 8 серотипов HBV. Кроме того, были разработаны средства для RNAi по настоящему изобретению для ингибирования HBV на всех стадиях жизненного цикла, например, репликации, сборки, секреции вируса и секреции субвирусных антигенов, путем ингибирования экспрессии нескольких генов HBV. В частности, поскольку транскрипция генома HBV приводит к образованию полицистронных перекрывающихся РНК, средство для RNAi по настоящему изобретению, которое целенаправленно воздействует на один ген HBV, приводит к значительному ингибированию экспрессии большинства или всех транскриптов HBV. Например, поскольку геном HBV транскрибируется в одну мРНК, средство для RNAi по настоящему изобретению, которое целенаправленно воздействует на ген S, будет приводить к ингибированию не только экспрессии гена S, но также и к экспрессии "нижележащего" гена полимеразы. Кроме того, были разработаны средства для RNAi по настоящему изобретению для ингибирования репликации вируса HBV путем целенаправленного воздействия на структурные гены HBV и ген X HBV, предоставляя возможность иммунной системе субъекта выявлять и реагировать на присутствие HBsAg с продуцированием антител к HBV для устранения инфекции HBV. Не ограничиваясь теорией, полагают, что комбинация или субкомбинация вышеуказанных свойств, и конкретных целевых участков, и/или конкретных модификаций в таких средствах для RNAi придает средствам для RNAi по настоящему изобретению улучшенную эффективность, стабильность, безопасность, активность и продолжительность действия.

С помощью *in vitro* и *in vivo* анализов авторами настоящего изобретения было продемонстрировано, что молекулы iRNA, целенаправленно воздействующие на ген HBV, способны активно содействовать RNAi, что приводит в результате к значительному ингибированию экспрессии более чем одного гена HBV. Авторами настоящего изобретения также было продемонстрировано, что средства для RNAi по настоящему изобретению исключительно стабильны в цитоплазме и лизосоме. Таким образом, способы и композиции, включающие эти iRNA, применимы для лечения субъекта с инфекцией HBV и/или с заболеванием, ассоциированным с HBV, таким как хронический гепатит В (CHB).

Соответственно, настоящее изобретение также предлагает способы лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение экспрессии гена HBV, например, заболевания, ассоциированного с HBV, такого как хроническая инфекция, вызванная вирусом гепатита В (CHB), путем применения композиций на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена HBV.

Очень низкие дозировки iRNA по настоящему изобретению могут, в частности, специфично и эффективно содействовать РНК-интерференции (RNAi), приводя в результате к значительному ингибированию экспрессии соответствующего гена (гена HBV).

iRNA по настоящему изобретению включают нить РНК (антисмысловую нить) с участком, длина которого составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше, например, 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 нуклеотида в длину, причем этот участок, по сути, комплементарен по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена HBV.

В следующем подробном описании раскрывается, как получать и применять композиции, содержащие iRNA, для ингибирования

экспрессии гена HBV, а также композиции, пути применения и способы лечения субъектов с заболеваниями и нарушениями, на которые будут оказывать благоприятное воздействие ингибирование и/или снижение экспрессии гена HBV.

## **I. Определения**

Для того чтобы настоящее изобретение можно было легче понять, вначале даны определения некоторым терминам. Кроме того, следует отметить, что во всех случаях перечисления значения или диапазона значений параметра подразумевают, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Форму единственного числа используют в данном документе для обозначения одного или нескольких (т. е. по меньшей мере одного) грамматических объектов данной заявки. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или несколько элементов, например, множество элементов.

Термин "включающий" используют в данном документе для обозначения фразы "включающий без ограничения" и используют взаимозаменяемо с ней.

Термин "или" используют в данном документе для обозначения термина "и/или" и используют взаимозаменяемо с ним, если контекст явно не указывает иное.

В контексте данного документа выражение "вирус гепатита В", используемое взаимозаменяемо с термином "HBV", относится к хорошо известному нецитопатическому гепатотропному ДНК-вирусу, принадлежащему к семейству *Hepadnaviridae*.

Геном HBV представляет собой частично двухнитевую кольцевую ДНК с перекрывающимися рамками считывания (см., например, фиг. 1).

Существует четыре известных гена, закодированных в геноме HBV, которые называются С, Х, Р и S. Коровый белок кодируется геном С (HBsAg). Антиген вируса гепатита В (HBeAg) образуется в результате протеолитического процессинга предшественника корового (пре-С) белка. ДНК-полимераза кодируется геном Р. Ген S представляет собой ген, который кодирует поверхностный антиген (HBsAg). Ген HBsAg представляет собой одну длинную открытую

рамку считывания, но содержит три находящихся в рамке "стартовых" кодона (ATG), которые делят ген на три части, pre-S1, pre-S2 и S. Благодаря нескольким стартовым кодам образуются полипептиды трех различных размеров, которые называются большими, средними и малыми (pre-S1+pre-S2+S, pre-S2+S или S). Функция неструктурного белка, кодируемого геном X, изучена не полностью, но он ассоциируется с развитием рака печени и кодирует белок-ловушку, который позволяет HBsAg в крови блокировать антитела к HBsAg и предоставляет инфекционным вирусным частицам возможность уклониться от выявления иммунной системой.

В число белков, кодируемых геномом HBV, входят белки оболочки: i) малый - поверхностный антиген гепатита В (HBsAg); ii) средний - preS2 плюс HBsAg; iii) большой - preS1 плюс preS2 плюс HBsAg; нуклеокапсидный белок, капсидный антиген вируса гепатита В (HBcAg). Антиген е вируса гепатита В (HBeAg) представляет собой неструктурный белок, продуцируемый в ходе репликации HBV, который характеризуется 90% подобием по аминокислотам с нуклеокапсидом HBcAg; а белок X представляет собой неструктурный белок (HBx), который свою функцию проявляет в цитоплазме, и заключается в активации различных сигнальных путей, многие из которых контролируются модуляцией цитозольного кальция, и в ядре, и заключается в регуляции транскрипции посредством прямого взаимодействия с различными транскрипционными факторами, а в некоторых случаях усиления их связывания с конкретными транскрипционными элементами.

HBV является одним из немногих ДНК-вирусов, которые используют обратную транскриптазу в процессе репликации, который включает несколько стадий, в том числе проникновение, декапсидацию и перенос генома вируса в ядро. Исходно репликация генома HBV включает в себя образование промежуточной РНК, которая затем подвергается обратной транскрипции с получением вирусного генома в виде ДНК.

После инфицирования клетки HBV, вирусная геномная релаксированная кольцевая ДНК (rcDNA) переносится в ядроклетки и превращается в эписомальную ковалентно замкнутую кольцевую ДНК

(сссDNA), которая служит в качестве матрицы транскрипции для вирусных мРНК. После транскрипции и экспорта из ядра цитоплазматическая вирусная прегеномная РНК (pgRNA) собирается с полимеразой HBV и капсидными белками с образованием нуклеокапсида, внутри которого катализируемая полимеразой обратная транскрипция дает на выходе минус-нить ДНК, которая затем копируется в плюс-нить ДНК с образованием потомственного rcDNA-генома. Затем зрелые нуклеокапсиды или упаковываются с вирусными белками оболочки для выхода уже в виде вирионных частиц, или перемещаются в ядро для амплификации запаса сссDNA посредством внутриклеточного пути амплификации сссDNA. сссDNA является важным компонентом в цикле репликации HBV и отвечает за развитие инфекции и персистенции вируса.

Инфекция HBV приводит в результате к образованию двух различных частиц: 1) собственно вируса HBV (или частицы Дейна), который включает в себя собранный из HBcAg вирусный капсид и покрыт HBsAg, и он способен к повторной инфекции клеток, и 2) субвирусных частиц (или SVP), которые представляют собой частицы по типу липопротеинов высокой плотности, состоящие из липидов, холестерина, сложных эфиров холестерина и малых и средних форм поверхностного антигена HBsAg гепатита В, которые не являются инфекционными. На каждую образовавшуюся вирусную частицу в кровь высвобождается 1000-10000 SVP. По этой причине SVP (и белок HBsAg, которые они несут) представляют подавляющее большинство вирусного белка в крови. Инфицированные HBV клетки также секретируют растворимый продукт протеолиза предшественника корового белка, называемого е-антиген HBV (HBeAg).

Было определено восемь генотипов HBV, обозначаемых А-Н, причем каждый из них имеет индивидуальное географическое распространение. Вирус является нецитопатическим, причем вирусспецифический клеточный иммунитет является основным фактором, определяющим исход острой инфекции HBV с прекращением заболеваний печени через 6 месяцев или с хронической инфекцией HBV, которая часто ассоциируется с прогрессирующим повреждением печени.

Термин "HBV" включает какой-либо из восьми генотипов HBV (A-H). Аминокислотную и полную кодирующую последовательность эталонной последовательности генома HBV можно найти, например, под номерами доступа в GenBank GI:21326584 (SEQ ID NO:1) и GI:3582357 (SEQ ID NO:3).

Дополнительные примеры последовательностей мРНК HBV легко доступны в общедоступных базах данных например, GenBank, UniProt и OMIM.

Используемый в данном документе термин "HBV" также относится к встречающимся в природных условиях изменениям в последовательности ДНК генома HBV.

В контексте данного документа термин "вирус гепатита D", используемый взаимозаменяемо с термином "HDV", относится к хорошо известному нецитопатическому гепатотропному ДНК-вирусу, принадлежащему к семейству *Hepadnaviridae*. См., например, Ciancio и Rizzetto, *Nat. Rev.* 11:68-71, 2014; Le Gal et al., *Emerg. Infect. Dis.* 12:1447-1450, 2006; и Abbas и afzal, *World J. Hep.*, 5:666-675, 2013, все из которых включены посредством ссылки. Если не указано иное, HDV относится ко всем кладам и вариантам HDV.

HDV продуцирует один белок, а именно HDAg. Он существует в двух формах: большой HDAg размером 27 кДа (также называемый в данном документе как lHD, L-HDAg и большой антиген HDV) и малый HDAg размером 24 кДа (также называемый в данном документе как sHD, S-HDAg и малый антиген HDV). N-концы обеих форм идентичны, они различаются по 19 аминокислотам в С-конце большого HDAg. Обе изоформы продуцируются с одной рамки считывания, которая содержит стоп-кодон UAG в кодоне 196, что обычно дает в результате лишь малый HDAg. Тем не менее, редактирование посредством клеточного фермента аденозиндезаминазы-1 заменяет стоп-кодон на UCG, обеспечивая продуцирование большого HDAg. Несмотря на то, что их последовательности на 90% идентичны, эти два белка выполняют разные функции в ходе развития инфекции. HDAg-S продуцируется на ранних стадиях инфекции, и проникает в ядро, поддерживая вирусную репликацию. Напротив, HDAg-L продуцируется на более поздних стадиях инфекции, выступает в

качестве ингибитора вирусной репликации и является необходимым для сборки вирусных частиц.

Дополнительные примеры последовательностей мРНК HDV легко доступны в общедоступных базах данных, например, в GenBank, UniProt и OMIM.

Используемый в данном документе термин "HDV" также относится к встречающимся в природных условиях изменениям в последовательности ДНК генома HDV.

Использованный в данном документе термин "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся в процессе транскрипции гена HBV, в том числе к мРНК, которая является продуктом 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 управляемого iRNA расщепления в этой части или рядом с этой частью нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся в процессе транскрипции гена HBV.

Длина целевой последовательности может составлять приблизительно 9-36 нуклеотидов, например, приблизительно 15-30 нуклеотидов. Например, длина целевой последовательности может составлять 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 нуклеотида. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Используемый в данном документе термин "нить, содержащая последовательность" относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описывается последовательностью, обозначаемой с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждый из "G", "C", "A", "T" и "U", как правило, обозначает нуклеотид, который соответственно содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания. Однако будет понятно, что термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" также может означать модифицированный нуклеотид, более подробно описанный ниже, или имитирующий заменяющий фрагмент (см., например, таблицу 2). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть заменены другими фрагментами практически без изменения свойств образования пар оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения нуклеотид, содержащий инозин в качестве основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях dsRNA, представленных в настоящем изобретении, нуклеотидами, содержащими, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть соответственно заменены гуанином и урацилом с образованием неоднозначных пар оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, представленных в настоящем изобретении.

Термины "iRNA", "средство для RNAi", "средство на основе iRNA", "'средство для РНК-интерференции", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к средству, которое содержит РНК, в том значении, в котором этот термин определен в данном документе, и которое опосредует целенаправленное разрушение РНК-транскрипта посредством пути с участием РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). iRNA управляет специфичным в отношении последовательности разрушением мРНК посредством процесса, который известен как РНК-интерференция (RNAi). iRNA модулирует, например, ингибирует, экспрессию гена HBV (например, одного или нескольких генов HBV) в клетке, например, клетке в субъекте, таком как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению включает в себя одонитевую РНК, которая

взаимодействует с последовательностью целевой РНК, например, последовательностью целевой мРНК HBV, для управления расщеплением целевой РНК. Не ограничиваясь теорией, полагают, что длинная двухнитевая РНК, вводимая в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной под названием Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, представляющий собой фермент, подобный рибонуклеазе III типа, осуществляет процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Затем siRNA встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к одонитевой siRNA (ssRNA), образующейся внутри клетки, которая способствует образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга целевого гена, т. е. гена HBV. Соответственно, термин "siRNA" также используют в данном документе для обозначения RNAi, что описано выше.

В другом варианте осуществления средство для RNAi может быть одонитевой siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одонитевые средства для RNAi связываются с Argonaute 2, обладающим эндонуклеазной активностью в комплексе RISC, который затем отщепляет целевую мРНК. Одонитевые siRNA, как правило, содержат 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Конструирование и тестирование одонитевых siRNA описаны в патенте США № 8101348 и в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Любые антисмысловые нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, можно использовать в качестве одонитевой siRNA, которая описана в

данном документе или которая химически модифицирована способами, описанными в Lima et al., (2012) *Cell* 150:883-894.

В другом варианте осуществления "iRNA" для применения в композициях, путях применения и способах по настоящему изобретению представляет собой двухнитевую РНК, и в данном документе ее называют "двухнитевым средством для RNAi", "молекулой двухнитевой РНК (dsRNA)", "средством на основе dsRNA" или "dsRNA". Термин "dsRNA" относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты с дуплексной структурой, содержащему две антипараллельные и, по сути, комплементарные нити нуклеиновой кислоты, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к целевой РНК, т. е. гену HBV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевая РНК (dsRNA) запускает разрушение целевой РНК, например, мРНК, через пост-транскрипционный механизм сайленсинга генов, называемый в данном документе РНК-интерференцией или RNAi.

Как правило, большинство нуклеотидов каждой нити молекулы dsRNA являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе нити могут также содержать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, используемый в настоящем описании термин "средство для RNAi" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; средство для RNAi может включать значительные модификации множества нуклеотидов. Используемый в данном документе термин "модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, независимо имеющему модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь и/или модифицированное нуклеотидное основание. Таким образом, выражение "модифицированный нуклеотид" охватывает замены, добавления или удаления, например, функциональной группы или атома, в межнуклеозидных связях, сахарных фрагментах или нуклеотидных основаниях. Модификации, подходящие для применения в средствах по настоящему изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в данной

области. Любые такие модификации, которые используются в молекуле типа siRNA, охвачены термином "средство для RNAi" в контексте данных описания и формулы изобретения.

Дуплексный участок может быть любой длины, которая позволяет осуществлять специфическое разрушение требуемой целевой РНК посредством пути с участием RISC, и может варьироваться по длине в диапазоне от приблизительно 9 до 36 пар оснований, например, его длина может составлять приблизительно 15-30 пар оснований, 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, как например, 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 пары оснований. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Две нити, образующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной большей молекулы РНК, или они могут быть отдельными молекулами РНК. В тех случаях, если две нити являются частью одной более крупной молекулы и, следовательно, соединены непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити к 5'-концу соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, то соединительную цепь РНК называют "петлей шпилькой". 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 больше неспаренных нуклеотидов.

Если две, по сути, комплементарные нити dsRNA образованы отдельными молекулами РНК, то эти молекулы не обязательно должны, но могут быть соединены ковалентно. В тех случаях, если две нити соединены ковалентно иным образом, нежели непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити к 5'-концу соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, то соединительную структуру называют "линкером". Нити РНК могут иметь одинаковое или разное число нуклеотидов. Максимальное число пар оснований представляет собой число нуклеотидов в самой короткой нити dsRNA за вычетом каких-либо выступающих концов, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплексной структуры средство для RNAi может содержать один или несколько нуклеотидных выступов.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению представляет собой dsRNA, каждая нить которой содержит 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, с целевой последовательностью мРНК HBV, для управления расщеплением целевой РНК. Не ограничиваясь теорией, длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной под названием Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, представляющий собой фермент, подобный рибонуклеазе III типа, осуществляет процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). siRNA затем встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188).

Используемое в данном документе выражение "нуклеотидный выступающий конец" относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной

структуры iRNA, например, dsRNA. Например, если 3'-конец одной нити dsRNA выходит за пределы 5'-конца другой нити или наоборот, то образуется нуклеотидный выступающий конец. dsRNA может содержать выступающий конец по меньшей мере из одного нуклеотида; альтернативно выступающий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный выступающий конец может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него. Выступающий(выступающие) конец(концы) может(могут) находиться в пределах смысловой нити, антисмысловой нити или их комбинации. Кроме того, нуклеотид(нуклеотиды) выступающего конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой нити dsRNA.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить dsRNA содержит 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В одном варианте осуществления смысловая нить dsRNA содержит 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В другом варианте осуществления один или несколько нуклеотидов выступающего конца заменены нуклеозидтиофосфатом.

"Затупленный конец" или "тупой конец" означают, что на конце двухнитевого средства RNAi отсутствуют неспаренные нуклеотиды, т. е. отсутствует нуклеотидный выступающий конец. Средство для RNAi "с тупыми концами" представляет собой dsRNA, которая является двухнитевой по всей своей длине, т. е. не имеет нуклеотидного выступающего конца на любом конце молекулы. Средства для RNAi по настоящему изобретению включают в себя средства для RNAi с нуклеотидным выступающим концом на одном конце (т. е. средства с одним выступающим концом и одним тупым концом) или с нуклеотидными выступающими концами на обоих концах.

Термин "антисмысловая нить" или "направляющая нить" относится к нити iRNA, например, dsRNA, которая содержит участок, по сути, комплементарный целевой последовательности, например, мРНК HBV. Используемый в данном документе термин "участок комплементарности" относится к участку на антисмысловой нити, по сути, комплементарному последовательности, например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности HBV, которая определена в данном документе. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, во внутренних или концевых участках молекулы могут присутствовать ошибки спаривания. Как правило, наиболее допустимые ошибки спаривания находятся в концевых участках, например, в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида 5'- и/или 3'-конца iRNA. В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению предусматривает ошибочное спаривание нуклеотидов в антисмысловой нити. В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению предусматривает ошибочное спаривание нуклеотидов в смысловой нити. В одном варианте осуществления ошибочное спаривание нуклеотидов происходит, например, в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от 3'-конца iRNA. В другом варианте осуществления ошибочное спаривание нуклеотидов происходит, например, по 3'-концевому нуклеотиду iRNA.

Термин "смысловая нить" или "сопровождающая нить", используемый в данном документе, относится к нити iRNA, которая содержит участок, по сути, комплементарный участку антисмысловой нити, в том значении, в котором этот термин определен в данном документе.

Используемый в данном документе термин "участок расщепления" относится к участку, который непосредственно прилегает к сайту расщепления. Сайт расщепления является сайтом в мишени, по которому происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит три основания в любом из концов сайта расщепления, который непосредственно прилегает к нему. В некоторых вариантах

осуществления участок расщепления содержит два основания в любом из концов сайта расщепления, который непосредственно прилегает к нему. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления, в частности, находится в сайте, граничащем с нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой нити, и участок расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

Используемый в данном документе термин "комплементарный", если не указано иное, при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности означает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, что будет понятно специалисту в данной области. Такие условия, например, могут быть жесткими условиями, при этом жесткие условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующим отмыванием (см., например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Можно использовать другие условия, такие как физиологически соответствующие условия, которые могут встречаться в организме. Специалист в данной области сможет определить набор условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в iRNA, например, в dsRNA, описанной в данном документе, включают образование пар оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую полинуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. В данном документе такие последовательности могут называться "полностью комплементарными" по отношению друг

к другу. Тем не менее, в случае, когда первую последовательность считают "по сути, комплементарной" по отношению ко второй последовательности в данном документе, две последовательности могут быть полностью комплементарными, или в них может иметь место ошибочное спаривание одной или нескольких, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 пар оснований при гибридизации с образованием дуплекса до 30 пар оснований, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, ингибированию экспрессии гена посредством пути RISC. Однако когда два олигонуклеотида сконструированы с тем, чтобы образовывать при гибридизации один или несколько односторонних выступающих концов, то такие выступающие концы не будут считаться несовпадениями применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может при этом называться "полностью комплементарной" для целей, описанных в данном документе.

"Комплементарные" последовательности, применяемые в данном документе, могут также включать или могут быть образованы полностью из пар оснований, составленных не по модели Уотсона-Крика, и/или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, в такой степени, при которой выполняются вышеуказанные требования по отношению к их способности гибридизоваться. Такие пары оснований, образованные не по модели Уотсона-Крика, включают без ограничения неоднозначные G:U или Хугстинговские пары оснований.

Выражения "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по сути, комплементарный" в данном документе можно применять по отношению к соответствию оснований между смысловой нитью и антисмысловой нитью dsRNA или между антисмысловой нитью средства на основе iRNA и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их применения.

Используемый в данном документе полинуклеотид, который "по сути, комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который, по сути, комплементарен непрерывной части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей ген HBV). Например, полинуклеотид является комплементарным по меньшей мере части мРНК HBV, если последовательность, по сути, комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей HBV.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления раскрываемые в данном документе полинуклеотиды антисмысловой цепи полностью комплементарны целевой последовательности HBV. В других вариантах осуществления раскрываемые в данном документе полинуклеотиды антисмысловой нити, по сути, комплементарны целевой последовательности HBV и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1 или фрагмента под SEQ ID NO:1, как например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению включает в себя смысловую нить, которая, по сути, комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен целевой последовательности HBV, и при этом полинуклеотид смысловой нити содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности какой-либо из последовательностей под SEQ ID NO:6, 8, 10, 12, 38 и 40 или фрагмента какой-либо из последовательностей под SEQ ID NO:6, 8, 10, 12, 38 и 40, как например, комплементарна на

приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%. В другом варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению включает антисмысловую нить, которая, по сути, комплементарна целевой последовательности HBV и содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности какой-либо из последовательностей под SEQ ID NO:5, 7, 9, 11, 37 и 39 или фрагмента какой-либо из последовательностей под SEQ ID NO:5, 7, 9, 11, 37 и 39, как например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В некоторых вариантах осуществления большинство нуклеотидов каждой нити являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе нити могут также включать в себя один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, "iRNA" может содержать рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в данной области. Любые такие модификации, которые используются в молекуле iRNA, охватываются термином "iRNA" в контексте данных описания и формулы изобретения.

В одном аспекте настоящего изобретения средство для применения в способах и композициях по настоящему изобретению представляет собой молекулу однонитевой антисмысловой

нуклеиновой кислоты, которая ингибирует целевую мРНК посредством механизма антисмыслового ингибирования. Молекула одонитевой антисмысловой РНК комплементарна последовательности в целевой мРНК. Одонитевые антисмысловые олигонуклеотиды могут ингибировать трансляцию стехиометрическим образом путем спаривания оснований с мРНК и физического нарушения механизма трансляции, см. Dias, N. et al., (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Длина молекулы одонитевой антисмысловой РНК может составлять от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов и иметь последовательность, комплементарную целевой последовательности. Например, молекула одонитевой антисмысловой РНК может содержать последовательность, которая содержит по меньшей мере приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше смежных нуклеотидов из какой-либо из антисмысловых последовательностей, описанных в данном документе.

Как используется в данном документе, "субъект" представляет собой животное, такое как млекопитающее, в том числе примата (такого как человек, примат, отличный от человека, например, обезьяну и шимпанзе), отличного от примата животного (такого как корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит) или птицу (например, утку или гуся). В одном варианте осуществления субъектом является человек, такой как человек, проходящий лечение или оцениваемый в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии и/или репликации гена HBV; человек, подвергаемый риску возникновения заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии и/или репликации гена HBV; человек с заболеванием, нарушением или состоянием, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии и/или репликации гена HBV; и/или человек, проходящий лечение от заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии и/или репликации гена HBV, как описано в данном документе. В другом варианте осуществления у субъекта имеется инфекция,

вызванная вирусом гепатита В (HBV). В другом варианте осуществления у субъекта имеется и инфекция, вызванная вирусом гепатита В (HBV), и инфекция вызванная вирусом гепатита D (HDV).

Используемые в данном документе термины "осуществление лечения" или "лечение" относятся к благоприятному или требуемому результату, включающему без ограничения облегчение или ослабление тяжести одного или нескольких симптомов, ассоциированных с нежелательной экспрессией гена HBV и/или с репликацией HBV, например, присутствие сссDNA HBV в сыворотке крови и/или печени, присутствие антигена HBV в сыворотке крови и/или печени, например, HBsAg и/или HBeAg, повышенный уровень ALT, повышенный уровень AST, отсутствие или низкий уровень антител к HBV, повреждение печени; цирроз; дельта-гепатит, острый гепатит В; острый молниеносный гепатит В; хронический гепатит В; фиброз печени; терминальную стадию заболевания печени; гепатоцеллюлярную карциному; сывороточно-подобный синдром; анорексию; тошноту; рвоту, субфебрильную температуру тела; миалгию; утомляемость; нарушенные вкусовые и обонятельные функции (отвращение к пище и сигаретам); и/или боль в правом верхнем квадранте и в эпигастральной области (эпизодическая, от легкой до умеренной); печеночную энцефалопатию; сонливость; нарушения сна; спутанность сознания; кому; асцит; кровотечения в желудочно-кишечном тракте; коагулопатию; желтуху; гепатомегалию (слабо увеличенную, мягкую печень); спленомегалию; ладонную эритему; паукообразную гемангиому; атрофию мышц; формы звездчатой ангиомы; васкулит; варикозное кровотечение; периферический отек; гинекомастию; атрофию яичек; расширение коллатеральных вен живота ("голова медузы"); высокие уровни аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) в диапазоне 1000–2000 МЕ/мл, хотя также могут быть выявлены значения в 100 раз превышающие верхнюю границу нормы (ULN); уровни ALT, превышающие уровни AST; повышенные уровни гамма-глутамилтранспептидазы (GGT) и щелочной фосфатазы (ALP) (например, не более чем в 3 раза превышающие ULN); незначительно сниженные уровни альбумина; повышенные уровни железа в сыворотке крови; лейкопению (т. е. гранулоцитопению); лимфоцитоз;

повышенную скорость оседания эритроцитов (ESR); сниженную продолжительность жизни эритроцитов; гемолиз; тромбоцитопению; удлинение международного нормализованного отношения (INR); присутствие в сыворотке крови и/или печени HBsAg, HBeAg, антитела к коровому белку вируса гепатита В (антитела к HBc) в форме иммуноглобулина М (IgM); антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В (антитела к HBs), антитела к оболочечному антигену вируса гепатита В (антитела к HBe) и/или ДНК HBV; повышенные уровни аминотрансфераз ( $\leq 5$  раз от ULN); уровни ALT, превышающие уровни AST; повышенные уровни билирубина, удлиненное протромбиновое время (PT); гиперглобулинемию; присутствие неспецифических для тканей антител, таких как антитела к клеткам гладких мышц (ASMA) или антинуклеарные антитела (ANA) (10–20%); присутствие тканеспецифических антител, таких как антитела к клеткам щитовидной железы (10–20%); повышенные уровни ревматоидного фактора (RF); гипербилирубинемия, удлиненное PT, низкий уровень тромбоцитов и лейкоцитов, уровни AST, превышающие уровни ALT; повышенные уровни щелочной фосфатазы (ALP) и GGT; печеночные дольки с дегенеративными и регенеративными гепатоцеллюлярными изменениями и сопутствующим воспалением; преимущественно центрилобулярный некроз, как выявляемый, так и не выявляемый. "Лечение" также может означать удлинение срока выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Термин "более низкий" применительно к уровню экспрессии гена HBV и/или репликации HBV у субъекта или в качестве маркера или симптома заболевания относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или больше, и предпочтительно до уровня, принятого в качестве

находящегося в диапазоне показателей в норме для индивидуума без такого нарушения. В некоторых вариантах осуществления экспрессия цели является нормализованной, т. е. сниженной до уровня, приемлемого в пределах диапазона показателей в норме для индивидуума без такого нарушения, например, уровень маркера заболевания, такого маркера как ALT или AST, снижен до уровня, принятого в качестве находящегося в диапазоне показателей в норме для индивидуума без такого нарушения.

Используемое в данном документе выражение "предупреждение" или "осуществление предупреждения", при использовании в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии и/или репликации гена HBV, относится к снижению вероятности того, что у субъекта разовьется симптом, ассоциированный с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например, симптом нежелательной инфекции HBV, такой как присутствие cccDNA HBV в сыворотке крови и/или в печени, присутствие ДНК HBV в сыворотке крови, присутствие антигена HBV в сыворотке крови и/или в печени, например, HBsAg и/или HBeAg, повышенный уровень ALT, повышенный уровень AST, отсутствие или низкий уровень антител к HBV, повреждение печени; цирроз; дельта-гепатит, острый гепатит В; острый молниеносный гепатит В; хронический гепатит В; фиброз печени; терминальную стадию заболевания печени; гепатоцеллюлярную карциному; сывороточно-подобный синдром; анорексию; тошноту; рвоту, субфебрильную температуру тела; миалгию; утомляемость; нарушенные вкусовые и обонятельные функции (отвращение к пище и сигаретам); и/или боль в правом верхнем квадранте и в эпигастральной области (эпизодическая, от легкой до умеренной); печеночную энцефалопатию; сонливость; нарушения сна; спутанность сознания; кому; асцит; кровотечения в желудочно-кишечном тракте; коагулопатию; желтуху; гепатомегалию (слабо увеличенную, мягкую печень); спленомегалию; ладонную эритему; паукообразную гемангиому; атрофию мышц; формы звездчатой ангиомы; васкулит; варикозное кровотечение; периферический отек; гинекомастию; атрофию яичек; расширение коллатеральных вен живота ("голова медузы"); высокие уровни

аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) в диапазоне 1000–2000 МЕ/мл, хотя также могут быть выявлены значения в 100 раз превышающие верхнюю границу нормы (ULN); уровни ALT, превышающие уровни AST; повышенные уровни гамма-глутамилтранспептидазы (GGT) и щелочной фосфатазы (ALP) (например, не более чем в 3 раза превышающие ULN); незначительно сниженные уровни альбумина; повышенные уровни железа в сыворотке крови; лейкопению (т. е. гранулоцитопению); лимфоцитоз; повышенную скорость оседания эритроцитов (ESR); сниженную продолжительность жизни эритроцитов; гемолиз; тромбоцитопению; удлинение международного нормализованного отношения (INR); присутствие в сыворотке крови и/или печени HBsAg, HBeAg, антитела к коровому белку гепатита В (антитела к HBc) в форме иммуноглобулина М (IgM); антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В (антитела к HBs), антитела к оболочечному антигену вируса гепатита В (антитела к HBe) и/или ДНК HBV; повышенные уровни аминотрансфераз ( $\leq 5$  раз от ULN); уровни ALT, превышающие уровни AST; повышенные уровни билирубина, удлиненное протромбиновое время (PT); гиперглобулинемию; присутствие неспецифических для тканей антител, таких как антитела к клеткам гладких мышц (ASMA) или антинуклеарные антитела (ANA) (10–20%); присутствие тканеспецифических антител, таких как антитела к клеткам щитовидной железы (10–20%); повышенные уровни ревматоидного фактора (RF); гипербилирубинемия, удлиненное PT, низкий уровень тромбоцитов и лейкоцитов, уровни AST, превышающие уровни ALT; повышенные уровни щелочной фосфатазы (ALP) и GGT; печеночные дольки с дегенеративными и регенеративными гепатоцеллюлярными изменениями и сопутствующим воспалением; преимущественно центрилобулярный некроз, как выявляемый, так и невыявляемый. Вероятность развития, например, фиброза печени, снижается, например, если у индивидуума, у которого имеется один или несколько факторов риска развития фиброза печени, например, хронический гепатит В, или не развивается фиброз печени, или развивается фиброз печени с меньшей степенью тяжести относительной группы, у которой имеются те же факторы риска и не

получающие лечение, как описано в данном документе. Неспособность к развитию заболевания, нарушения или состояния, или ослабление развития симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (например, по меньшей мере на приблизительно 10% по принятой в клинической практике шкале для этого заболевания или нарушения), или отсрочивание проявления латентных симптомов (например, на несколько дней, недель, месяцев или лет) считается эффективным предупреждением.

Используемое в данном документе выражение "ассоциированное с вирусом гепатита В заболевание" или "ассоциированное с HBV заболевание" означает заболевание или нарушение, которое вызвано или ассоциировано с инфекцией и/или репликацией HBV. Термин "ассоциированное с HBV заболевание" включает заболевание, нарушение или состояние, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии и/или репликации гена HBV. Неограничивающие примеры ассоциированных с HBV заболеваний включают, например, инфекцию, вызванную вирусом гепатита D, дельта-гепатит, острый гепатит В; острый молниеносный гепатит В; хронический гепатит В; фиброз печени; терминальную стадию заболевания печени; гепатоцеллюлярную карциному.

В одном варианте осуществления ассоциированное с HBV заболевание представляет собой инфекцию, вызванную вирусом гепатита D. Вирус гепатита D или вирус дельта-гепатита (HDV) является патогеном для человека. Тем не менее, вирус является дефектным и зависит от облигатных хелперных функций, обеспечиваемых вирусом гепатита В (HBV) для передачи; в действительности, для HDV необходимо, чтобы ассоциированная или уже существующая инфекция HBV стала генерализованной и развилась, в частности, вирусная оболочка, содержащая поверхностный антиген гепатита В. HDV может привести к развитию тяжелых острых и хронических форм заболевания печени в ассоциации с HBV. Инфекция вирусом гепатита D и/или дельта-гепатит является высоко эндемичной для нескольких африканских стран, амазонского региона и Ближнего Востока, в то время как в

промышленно развитых странах, за исключением Средиземноморья, ее распространенность низкая.

Передача HDV может происходить либо путем одновременного заражения HBV (коинфекция), либо сочетаться с хроническим гепатитом В или происходить при состоянии носительства гепатита В (суперинфекция). Как суперинфекция, так и коинфекция HDV приводят в результате к более тяжелым осложнениям по сравнению с инфекцией только HBV. Такие осложнения включают более высокую вероятность возникновения печеночной недостаточности при острых инфекциях и быстрое прогрессирование цирроза печени с повышенной вероятностью развития рака печени при хронических инфекциях. В сочетании с вирусом гепатита В гепатит D имеет наиболее высокий уровень смертности при любой инфекции гепатита, который составляет 20%.

В одном варианте осуществления ассоциированное с HBV заболевание представляет собой острый гепатит В. Острый гепатит В включает воспаление печени, которое длится менее шести месяцев. Типичными симптомами острого гепатита В являются усталость, анорексия, тошнота и рвота. Зачастую отмечают очень высокие значения аминотрансферазы ( $>1000$  ЕД/л) и гипербилирубинемии. Тяжелые случаи острого гепатита В могут быстро прогрессировать до острой печеночной недостаточности, для которой характерна плохая синтетическая функция печени. Ее зачастую определяют как протромбиновое время (PT), составляющее 16 секунд, или международное нормализованное отношение (INR), составляющее 1,5, в отсутствие предшествующего заболевания печени. Острый гепатит В может развиваться в хронический гепатит В.

В одном варианте осуществления ассоциированное с HBV заболевание представляет собой хронический гепатит. Хронический гепатит В (CHB) включает воспаление печени, которое длится более шести месяцев. Субъекты с заболеванием в виде хронического гепатита В могут быть иммунотолерантными или иметь хроническую инфекцию в неактивной фазе без каких-либо признаков активного заболевания, а также у них отсутствуют какие-либо симптомы. У пациентов с хроническим активным гепатитом, особенно в

репликативном состоянии, могут быть симптомы, схожие с симптомами острого гепатита. Персистенция инфекции HBV у субъектов с СНВ обусловлена cccDNA HBV. В одном варианте осуществления субъект с СНВ является положительным по HBeAg. В другом варианте осуществления субъект с СНВ является отрицательным по HBeAg. Субъекты с СНВ имеют уровень ДНК HBV в сыворотке крови, составляющий менее приблизительно  $10^5$ , и стойкое повышение уровня трансаминаз, например, ALT, AST и гамма-глутамилтрансферазы. У субъекта с СНВ показатель, полученный при биопсии печени, может составлять менее приблизительно 4 (например, показатель некровоспалительной активности). Кроме того, у субъекта с СНВ может быть

В одном варианте осуществления ассоциированное с HBV заболевание представляет собой острый молниеносный гепатит В. У субъекта с острым молниеносным гепатитом В присутствуют симптомы острого гепатита и дополнительные симптомы спутанности сознания или комы (в связи с неспособностью печени нейтрализовать токсичные химические вещества) и синяки или кровотечение (в связи с отсутствием факторов свертывания крови).

У субъектов с инфекцией HBV, например, СНВ, может развиваться фиброз печени. Соответственно, в одном варианте осуществления ассоциированное с HBV заболевание представляет собой фиброз печени. Фиброз печени или цирроз определяют по результатам гистологического анализа как диффузный печеночный процесс, характеризующийся фиброзом (избытком грубоволокнистой соединительной ткани) и превращением нормальной структуры печени в структурно аномальные узлы.

У субъектов с инфекцией HBV, например, СНВ, может развиваться терминальная стадия заболевания печени. Соответственно, в одном варианте осуществления ассоциированное с HBV заболевание представляет собой терминальную стадию заболевания печени. Например, фиброз печени может прогрессировать до такого уровня, когда организм больше не сможет компенсировать, например, сниженную функцию печени, являющуюся следствием фиброза печени, и привести, например, к психическим и неврологическим симптомам и печеночной недостаточности.

У субъектов с инфекцией HBV, например, CHB, может развиваться гепатоцеллюлярная карцинома (HCC), также известная как злокачественная гепатома. Соответственно, в одном варианте осуществления ассоциированное с HBV заболевание представляет собой HCC. HCC обычно развивается у субъектов с CHB и может быть фиброламеллярной, псевдожелезистой (аденоидной), плеоморфной (гигантоклеточной) или светлоклеточной.

"Ассоциированное с HDV нарушение" или "ассоциированное с вирусом гепатита D нарушение" является заболеванием или нарушением, ассоциированным с экспрессией HDV. Иллюстративные ассоциированные с HDV нарушения включают инфекцию, вызванную вирусом гепатита B, острый гепатит B, острый гепатит D; острый молниеносный гепатит D; хронический гепатит D; фиброз печени; терминальную стадию заболевания печени и гепатоцеллюлярную карциному.

"Терапевтически эффективное количество", используемое в данном документе, понимают как включающее количество средства для RNAi, которого, при введении пациенту для лечения субъекта с инфекцией HBV и/или с ассоциированным с HBV заболеванием, достаточно для эффективного лечения заболевания (например, путем уменьшения, ослабления тяжести существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания или поддержания организма при существующем заболевании). "Терапевтически эффективное количество" может варьироваться в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, заболевания и его тяжести и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетической характеристики, стадии патологических процессов, опосредованных экспрессией гена HBV, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Профилактически эффективное количество", используемое в данном документе, подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого при введении субъекту, у которого еще не возникли или не проявились симптомы инфекции HBV и/или ассоциированного с HBV заболевания, но у которого может иметься

предрасположенность к заболеванию, достаточно для предупреждения или ослабления тяжести заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Ослабление тяжести заболевания включает замедление течения болезни или снижение тяжести заболевания, которое разовьется позже. "Профилактически эффективное количество" может варьироваться в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, степени риска развития заболевания и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетической характеристики, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включает количество средства для RNAi, которое вызывает некоторый желательный локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, принятом по отношению к любому лечению. Средства для RNAi, применяемые в способах по настоящему изобретению, можно вводить в количестве, достаточном для получения приемлемого соотношения польза/риск, принятого по отношению к такому лечению.

Термин "образец", используемый в данном документе, предусматривает совокупность сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму крови, спинномозговую жидкость, внутриглазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т. п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. В определенных вариантах осуществления образцы могут быть получены из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты), сетчатки или части сетчатки (например, пигментного эпителия сетчатки), центральной нервной системы или частей центральной нервной системы (например,

желудочков или хороидного сплетения) или поджелудочной железы или определенных клеток или частей поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления "полученный из организма субъекта образец" относится к спинномозговой жидкости, полученной из организма субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает кровь или плазму крови, взятые у субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "полученный из организма субъекта образец" относится к ткани печени (или ее составляющим компонентам) или ткани сетчатки (или ее составляющим компонентам), полученным из организма субъекта.

## **II. iRNA по настоящему изобретению**

Настоящее изобретение предлагает iRNA, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких генов HBV. В одном варианте осуществления средство на основе iRNA включает в себя молекулы двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена HBV в клетке, такой как клетка внутри субъекта, например, млекопитающего, такого как человек с ассоциированным с HBV заболеванием, например, хроническим гепатитом В. dsRNA включает в себя антисмысловую нить с участком комплементарности, который комплементарен по меньшей мере части мРНК, образованной при экспрессии гена HBV. Длина участка комплементарности составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше (например, длину составляет приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов или меньше). При контакте с клеткой, экспрессирующей ген HBV, iRNA ингибирует экспрессию гена HBV по меньшей мере на приблизительно 10%, что установлено при помощи анализа, например, при помощи ПЦР, или способа с использованием разветвленной ДНК (bDNA), или с помощью способа на основе анализа белков, как например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием, например, методик вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

dsRNA содержит две нити РНК, которые являются комплементарными и гибридизируются с образованием дуплексной структуры при условиях, в которых dsRNA будет применяться. Одна нить dsRNA (антисмысловая нить) содержит участок

комплементарности, который, по сути, комплементарен и обычно полностью комплементарен целевой последовательности. Целевую последовательность можно получить из последовательности мРНК, образующейся в процессе экспрессии гена HBV. Другая нить (смысловая нить) содержит участок, который комплементарен антисмысловой нити таким образом, что две нити гибридизируются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в другом месте в данном документе и как известно в данной области, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в виде самокомплементарных участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не располагаться на отдельных олигонуклеотидах.

Обычно длина дуплексной структуры составляет от 15 до 30 пар оснований, например, длина составляет 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 пары оснований. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Аналогично длина участка комплементарности для целевой последовательности составляет от 15 до 30 нуклеотидов, например, длина составляет 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 нуклеотида. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления длина dsRNA составляет от приблизительно 15 до приблизительно 20 нуклеотидов или длина составляет от приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов. Как правило, dsRNA является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, как хорошо известно в данной области, dsRNA, длина которых составляет более приблизительно 21-23 нуклеотидов, могут служить субстратами для Dicer. Также специалисту будет понятно, что участок РНК, являющийся целевым для расщепления, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, зачастую молекулы мРНК. Где это уместно, "частью" мРНК-мишени является непрерывная последовательность целевой мРНК достаточной длины, чтобы позволить ей быть субстратом для RNAi-направленного отщепления (т. е., отщепление через путь RISC).

Специалисту в данной области также будет понятно, что дуплексный участок представляет собой основную функциональную часть dsRNA, например, дуплексный участок из приблизительно 9-36 пар оснований, например, из 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 они становятся процессированными до функционального дуплекса из, например, 15-30 пар оснований, который целенаправленно воздействует на требуемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющие дуплексный участок размером более 30 пар оснований, представляют собой dsRNA. Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления miRNA

представляет собой dsRNA. В другом варианте осуществления dsRNA представляет собой не встречающуюся в природе miRNA. В другом варианте осуществления средство на основе iRNA, применимое для целенаправленного воздействия на экспрессию гена HBV, не образуется в целевой клетке при расщеплении более крупной dsRNA.

Описанная в данном документе dsRNA может дополнительно содержать один или несколько односторонних нуклеотидных выступающих концов, например, из 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. dsRNA, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступающий конец, могут обладать неожиданно более высокими ингибирующими свойствами по сравнению с их аналогами с тупыми концами. Нуклеотидный выступающий конец может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него. Выступающий(выступающие) конец(концы) может(могут) находиться в пределах смысловой нити, антисмысловой нити или их комбинации. Кроме того, нуклеотид(нуклеотиды) выступающего конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой нити dsRNA.

dsRNA можно синтезировать с помощью стандартных способов, известных в данной области, дополнительно обсуждаемых ниже, например, с применением автоматического синтезатора ДНК, такого как коммерчески доступный от, например, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Соединения на основе iRNA по настоящему изобретению можно получать с применением двухстадийной процедуры. Во-первых, отдельные нити молекулы двухнитевой РНК получают отдельно. Затем составляющие нити отжигают. Отдельные цепи соединения siRNA можно получать с применением синтеза в жидкой фазе или твердофазного органического синтеза, или и первого, и второго. Органический синтез дает преимущество в том, что можно легко получать олигонуклеотидные нити, содержащие не встречающиеся в природе или модифицированные нуклеотиды. Односторонние олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или и первого, и второго.

В одном аспекте dsRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловая нить выбрана из группы последовательностей, приведенных в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26, а соответствующая антисмысловая нить для смысловой нити выбрана из группы последовательностей из какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей, по сути, комплементарна последовательности мРНК, образующейся при экспрессии гена HBV. В связи с этим в данном аспекте dsRNA будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая нить в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26, а второй олигонуклеотид описывается как соответствующая антисмысловая нить для смысловой нити в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26. В одном варианте осуществления, по сути, комплементарные последовательности dsRNA содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления, по сути, комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

Будет понятно, что хотя некоторые из последовательностей в таблицах 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26 описаны как модифицированные и/или конъюгированные последовательности, РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например, dsRNA по настоящему изобретению, может содержать какую-либо из последовательностей, изложенных в таблицах 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26, которая является немодифицированной, неконъюгированной, и/или модифицированной, и/или конъюгированной иным образом, чем описано в них.

Специалисту в данной области хорошо известно, что dsRNA с дуплексной структурой из приблизительно 20-23 пар оснований, например, из 21 пары оснований, были расценены как особенно эффективные в отношении индукции РНК-интерференции (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Однако другими исследователями

было обнаружено, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu и Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim et al. (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). В вышеописанных вариантах осуществления в соответствии с природой олигонуклеотидных последовательностей, приведенных в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26, dsRNA, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере одну нить, длина которой составляет минимально 21 нуклеотид. С достаточной вероятностью можно предположить, что более короткие дуплексы с одной из последовательностей из какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26, за исключением лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть эффективными, аналогично описанным выше dsRNA. Следовательно, dsRNA с последовательностью по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена HBV не более чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от dsRNA, содержащей полную последовательность, рассматриваются как находящиеся в пределах объема настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, приведенные в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26, идентифицируют сайт(сайты) в транскрипте HBV, которые являются чувствительными к опосредованному RISC расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно представлены iRNA, которые целенаправленно воздействуют на один из этих сайтов. Применимо к данному документу говорят, что iRNA целенаправленно воздействует на конкретный сайт РНК-транскрипта, если iRNA способствует расщеплению транскрипта в любом месте этого конкретного сайта. Такая iRNA будет, как правило, содержать по меньшей мере приблизительно 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26, соединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из участка, смежного с выбранной последовательностью в гене HBV.

При том, что длина целевой последовательности, как правило, составляет приблизительно 15–30 нуклеотидов, существует широкий спектр пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для управления расщеплением любой заданной целевой РНК. Различные пакеты программного обеспечения и принципы, изложенные в данном документе, предоставляют руководство по идентификации оптимальных целевых последовательностей для любого данного гена-мишени, но также можно принять эмпирический подход, в котором "окно" или "маска" данного размера (в качестве неограничивающего примера 21 нуклеотид) буквально или фигурально (в том числе, например, *in silico*), размещены на последовательности целевой РНК для идентификации последовательностей в диапазоне размеров, которые могут служить в качестве целевых последовательностей. Постепенно перемещая "окно" последовательности на один нуклеотид выше или ниже исходного положения целевой последовательности, можно идентифицировать следующую потенциальную целевую последовательность, пока не будет идентифицирован полный набор возможных последовательностей для любого заданного выбранного целевого размера. С помощью этого способа в сочетании с системным синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с применением анализов, описанных в данном документе или известных в данной области) для идентификации последовательностей с оптимальными характеристиками можно идентифицировать те последовательности РНК, которые при нацеливании со средством на основе iRNA опосредуют наилучшее ингибирование экспрессии целевого гена. Таким образом, при том, что идентифицированные последовательности, например, в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26, представляют собой эффективные целевые последовательности, предполагается, что дополнительная оптимизация эффективности ингибирования может быть достигнута путем постепенного "перемещения окна" на один нуклеотид выше или ниже относительно заданных последовательностей для идентификации последовательностей с такими же или лучшими характеристиками ингибирования.

Кроме того, также предполагается, что для какой-либо идентифицированной последовательности, например, в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26, дополнительная оптимизация может быть достигнута путем систематического или добавления, или удаления нуклеотидов с получением более длинных или более коротких последовательностей и тестирования этих последовательностей, полученных путем перемещения окна, более длинного или более короткого по размеру, выше или ниже относительно целевой РНК в данной точке. Также результатом объединения этого подхода для получения новых мишеней-кандидатов вместе с тестированием эффективности iRNA на основе этих целевых последовательностей в анализе ингибирования, известном в данной области или описанном в данном документе, могут быть дополнительные улучшения в эффективности ингибирования. Более того, такие оптимизированные последовательности можно корректировать путем, например, введения модифицированных нуклеотидов, как описано в данном документе или известно в данной области, добавлением или изменением выступающего конца или другими модификациями, известными в данной области и/или описанными в данном документе, для дальнейшей оптимизации молекулы (например, увеличение стабильности в сыворотке крови или периода полужизни в кровотоке, увеличение термостабильности, улучшение трансмембранной доставки, целенаправленное воздействие на конкретное положение или конкретный тип клетки, увеличение взаимодействия с ферментами пути сайленсинга, увеличение высвобождения из эндосом) в качестве ингибитора экспрессии.

iRNA, как описано в данном документе, может содержать одно или несколько ошибок спаривания с целевой последовательностью. В одном варианте осуществления iRNA, описанная в данном документе, содержит не более 3 ошибок спаривания. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы область ошибочного спаривания находилась не в центре участка комплементарности. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы ошибка спаривания была ограничена в пределах последних 5 нуклеотидов либо от 5'-, либо от 3'-конца

участка комплементарности. Например, в случае средства на основе iRNA из 23 нуклеотидов нить, комплементарная участку гена HBV, обычно не содержит какой-либо ошибки спаривания в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в данном документе, или способы, известные в данной области, можно применять для определения того, является ли iRNA, содержащая ошибочно спаренное основание относительно целевой последовательности, эффективной в ингибировании экспрессии гена HBV. Рассмотрение эффективности iRNA с ошибочно спаренными основаниями в ингибировании экспрессии гена HBV является важным, особенно, если известно, что конкретный участок комплементарности в гене HBV характеризуется вариабельностью полиморфных последовательностей в популяции.

### **III. Модифицированные iRNA по настоящему изобретению**

В одном варианте осуществления РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например, dsRNA, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации и/или конъюгации, известные в данной области и описанные в данном документе. В другом варианте осуществления РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например, dsRNA, является химически модифицированной с целью улучшения стабильности или других полезных характеристик. В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению, по сути, все из нуклеотидов iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления по настоящему изобретению все нуклеотиды в iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными. iRNA по настоящему изобретению, в которых "по сути, все нуклеотиды являются модифицированными", являются в значительной степени, но не полностью модифицированными и могут содержать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, описанных в настоящем изобретении, могут быть синтезированы и/или модифицированы с помощью способов, хорошо известных в данной области, таких как описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA,

который включен в данный документ посредством ссылки. Модификации включают в себя, например, концевые модификации, например, модификации 5'-конца (фосфорилирование, конъюгирование, инвертированные связи) или модификации 3'-конца (конъюгирование, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и. т. д.); модификации оснований, например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пару оснований с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (нуклеотиды с удаленным азотистым основанием) или конъюгирование оснований; модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара и/или модификации остова, в том числе модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений на основе iRNA, применимых в описанных в данном документе вариантах осуществления, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или не встречающиеся в природе межнуклеозидные связи. РНК с модифицированными остовами включают, среди прочего, такие, которые не содержат атом фосфора в остове. Для целей данного описания и как иногда упоминается в данной области, модифицированные РНК, не содержащие атом фосфора в своем межнуклеозидном остове, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная iRNA будет содержать атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфоротииаты, хиральные фосфоротииаты, фосфородитииаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминокилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, в том числе 3'-алкиленфосфонаты, и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминокилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты с нормальными 3'-5'-связями, их аналоги с 2'-5'-связями, а также таковые с инвертированной полярностью, где соседние пары нуклеозидных звеньев соединены в направлении от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения вышеуказанных фосфорсодержащих связей, включают без ограничения патенты США №№ 3687808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6,239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7321029 и патент США RE39464, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат атом фосфора в своем составе, представляют собой остовы, образованные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают остовы с морфолиновыми связями (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, содержащие смесь составляющих частей N, O, S и CH<sub>2</sub>.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения вышеуказанных олигонуклеозидов, включают без ограничения патенты США №№ 5034506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; и,

5677439, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

В других вариантах осуществления рассматриваются подходящие миметики РНК для применения в iRNA, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т. е. остов нуклеотидных звеньев, заменены новыми группами. Структурные единицы в виде оснований сохраняются для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, который, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен амидсодержащим остовом, в частности, аминоэтилглициновым остовом. Нуклеотидные основания сохраняются и связываются непосредственно или опосредованно с атомами азота азогруппы амидной части остова. Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения соединений PNA, включают без ограничения патенты США №№ 5539082; 5714331 и 5719262, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в iRNA по настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфотриоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами и, в частности, --CH<sub>2</sub>--NH--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub>-- [известный как метилен (метиляминовый) или MMI остов], --CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>-- и --N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>-- [где нативный фосфодиэфирный остов представлен как --O--P--O--CH<sub>2</sub>--] согласно вышеупомянутому патенту США № 5489677 и амидные остовы согласно вышеупомянутому патенту США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в данном документе, имеют морфолиновые структуры остова согласно вышеупомянутому патенту США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько замещенных сахарных фрагментов. iRNA, например, dsRNA, представленные в данном документе, могут содержать одно из

следующего в 2'-положении: 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<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>алкилом или C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>алкенилом и алкинилом. Иллюстративные подходящие модификации включают  $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ ,  $O(CH_2)_nOCH_3$ ,  $O(CH_2)_nNH_2$ ,  $O(CH_2)_nCH_3$ ,  $O(CH_2)_nONH_2$  и  $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ , где n и m составляют от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA включают в себя одно из следующих в 2'-положении: низшего C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>алкила, замещенного низшего алкила, алкарила, аралкила, O-алкарила или O-аралкила, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, гетероциклоалкила, гетероциклоалкарила, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенного силила, расщепляющей РНК группы, репортерной группы, интеркалятора, группы для улучшения фармакокинетических свойств iRNA или группы для улучшения фармакодинамических свойств iRNA и других заместителей с аналогичными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает в себя 2'-метоксиэтоксид (2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) т. е. алкокси-алкоксигруппу. Другой иллюстративной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтоксид, т. е. группа  $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ , также известная как 2'-DMAOE, описанная в примерах в данном документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксидэтоксид (также известная в уровне техники как 2'-O-диметиламиноэтоксидэтил или 2'-DMAEOE), т. е. 2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-аминопропокси (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях в РНК из числа iRNA, в частности, в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в dsRNA с 2'-5'-связями и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. iRNA также могут содержать миметики сахаров, такие как циклобутильные фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара. Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения таких модифицированных сахарных структур, включают без ограничения патенты США № 44981957;

5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137;  
 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427;  
 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873;  
 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; и 5700920, некоторые из которых  
 имеют общего заявителя с настоящей заявкой. Полное содержание  
 каждого из вышеупомянутых источников тем самым включено в данный  
 документ посредством ссылки.

iRNA также может содержать модификации или замещения нуклеотидного основания (часто называемого в данной области просто как "основание"). Используемые в данном документе "немодифицированные" или "природные" нуклеотидные основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеотидные основания включают другие синтетические и природные нуклеотидные 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 соединения урацила и цитозина, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезазагуанин и 7-дезазааденин, а также 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин. Дополнительные нуклеотидные основания включают такие, которые раскрыты в патенте США № 3687808, раскрытые в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; раскрытые в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, раскрытые в *Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и раскрытые в *Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S. T. и Lebleu, B.,

Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеотидных оснований особенно применимы для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и O-6-замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замещения повышают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. и Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) и представляют собой иллюстративные замещения оснований, еще более конкретно в сочетании с 2'-O-метоксиэтильными модификациями сахаров.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения некоторых из вышеуказанных модифицированных нуклеотидных оснований, а также других модифицированных нуклеотидных оснований, включают без ограничения вышеуказанные патенты США №№ 3687808; 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672; и 7495088, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

РНК из числа iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или несколько бициклических сахарных фрагментов. "Бициклический сахар" представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное посредством связывания мостиком двух атомов. "Бициклический нуклеозид" ("BNA") представляет собой нуклеозид с сахарным фрагментом, содержащим мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, образуя таким образом бициклическую кольцевую систему. В определенных вариантах осуществления мостик соединяет 4'-атом углерода и 2'-атом углерода в сахарном кольце. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления средство по настоящему изобретению может

содержать одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированный рибозный фрагмент, где рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'. Эта структура эффективно "запирает" рибозу в структурной конформации 3'-эндо. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в siRNA повышает стабильность siRNA в сыворотке крови и снижает число нецелевых эффектов (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 по настоящему изобретению включают без ограничения нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами кольца рибозильного остатка. В определенных вариантах осуществления средства на основе антисмысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению содержат один или несколько бициклических нуклеозидов, содержащих мостик 4'-2'. Примеры таких бициклических нуклеозидов с мостиком 4'-2' включают без ограничения 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' (также называемый "конформационно затрудненный этилом" или "сEt") и 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, Chattopadhyaya et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); и 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные патенты США и публикации патентов США, в которых изложена идея получения нуклеотидов запертых нуклеиновых кислот, включают, без ограничения, следующие: патенты США №№ 6268490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,034,133; 7,084,125; 7,399,845; 7,427,672; 7,569,686; 7,741,457; 8,022,193; 8,030,467; 8,278,425; 8,278,426; 8,278,283; US 2008/0039618 и US 2009/0012281, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Какой-либо из вышеизложенных бициклических нуклеозидов можно получить с имеющим одну или несколько стереохимических конфигураций сахаров, в том числе, например,  $\alpha$ -L-рибофуранозу и  $\beta$ -D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

РНК из числа iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или несколько затрудненных этилом нуклеотидов. Как используется в данном документе, "затрудненный этилом нуклеотид" или "cEt" представляет собой запертую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'. В одном варианте осуществления затрудненный этилом нуклеотид находится в S-конформации, называемой в данном документе "S-cEt".

iRNA по настоящему изобретению может также содержать один или несколько "конформационно ограниченных нуклеотидов" ("CRN"). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим C2'- и C4'-атомы углерода рибозы или C3- и C5'-атомы углерода рибозы. CRN запирает рибозное кольцо в стабильную конформацию и повышает аффинность гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину для помещения атома кислорода в оптимальное положение для стабильности и аффинности, что приводит в результате к меньшему "сморщиванию" рибозного кольца.

Иллюстративные публикации, в которых изложена идея получения некоторых из вышеуказанных CRN, включают, без ограничения, публикацию патента США № 2013/0190383 и публикацию согласно РСТ WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Один или несколько нуклеотидов iRNA по настоящему изобретению также могут включать гидроксиметилзамещенный нуклеотид. "Гидроксиметилзамещенный нуклеотид" представляет собой ациклический 2'-3'-секонуклеотид, также известный как модификация под названием "незапертая нуклеиновая кислота" ("UNA").

Иллюстративные публикации США, в которых изложена идея получения UNA, включают без ограничения патент США № 8314227 и публикации патентов США №№ 2013/0096289; 2013/0011922 и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-NHAc), N-капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-NHAc), тимидин-2'-O-дезокситимидин (простой эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноилуридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT (idT) и др. Раскрытие этой модификации можно найти в публикации согласно РСТ № WO 2011/005861.

Другие модификации нуклеотидов iRNA по настоящему изобретению включают 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, например, 5'-концевой фосфат или миметик фосфата на антисмысловой нити средства для RNAi. Подходящие миметики фосфатов раскрыты, например, в публикации патента США № 2012/0157511, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

*А. Модифицированные iRNA, содержащие мотивы по настоящему изобретению*

В некоторых аспектах настоящего изобретения двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению включают средства с химическими модификациями, которые раскрыты, например, в WO 2013/075035, поданной 16 ноября 2012 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Как показано в данном документе и в публикации согласно РСТ № WO 2013/075035, превосходный результат может быть получен путем

введения одного или нескольких мотивов с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в смысловую нить и/или антисмысловую нить средства для RNAi, в частности, в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить средства для RNAi могут быть полностью модифицированы иным способом. Введение таких мотивов нарушает паттерн модификаций, если он имеется, смысловой и/или антисмысловой нити. Средство для RNAi, к примеру смысловая нить, может быть необязательно конъюгировано с лигандом, представляющим собой производное GalNAc. Полученные в результате средства для RNAi характеризуются превосходной активностью в отношении сайленсинга генов.

Более конкретно, неожиданно было обнаружено, что в тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить двухнитевого средства для RNAi полностью модифицированы так, что имеют один или несколько мотивов с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления по меньшей мере одной нити средства для RNAi или рядом с ним, тогда активность средства для RNAi в отношении сайленсинга генов была наилучшим образом повышена.

Соответственно, настоящее изобретение предлагает двухнитевые средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т.е гена HBV) *in vivo*. Средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Длина каждой нити средства для RNAi может варьироваться от 12 до 30 нуклеотидов. Например, длина каждой нити может составлять от 14 до 30 нуклеотидов, от 17 до 30 нуклеотидов, от 25 до 30 нуклеотидов, от 27 до 30 нуклеотидов, от 17 до 23 нуклеотидов, от 17 до 21 нуклеотида, от 17 до 19 нуклеотидов, от 19 до 25 нуклеотидов, от 19 до 23 нуклеотидов, от 19 до 21 нуклеотида, 21 до 25 нуклеотидов или от 21 до 23 нуклеотидов.

Смысловая нить и антисмысловая нить, как правило, образуют двухнитевой РНК-дуплекс ("dsRNA"), также называемый в данном документе как "средство для RNAi". Дуплексный участок средства для RNAi может составлять 12-30 пар нуклеотидов в длину. Например, длина дуплексного участка может составлять 14-30 пар

нуклеотидов, 17-30 пар нуклеотидов, 27-30 пар нуклеотидов, 17-23 пары нуклеотидов, 17-21 пару нуклеотидов, 17-19 пар нуклеотидов, 19-25 пар нуклеотидов, 19-23 пары нуклеотидов, 19-21 пару нуклеотидов, 21-25 пар нуклеотидов или 21-23 пары нуклеотидов. В другом примере дуплексный участок выбран по длине из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления средство для RNAi может содержать один или несколько выступающих участков и/или кэпирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах одной или обеих нитей. Длина выступающего конца может составлять 1-6 нуклеотидов, например, 2-6 нуклеотидов, 1-5 нуклеотидов, 2-5 нуклеотидов, 1-4 нуклеотида, 2-4 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 2-3 нуклеотида или 1-2 нуклеотида. Выступающие концы могут быть обусловлены тем, что одна нить длиннее другой, или могут быть обусловлены тем, что две нити одинаковой длины расположены со сдвигом. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК или он может быть комплементарным целевым последовательностям генов или может иметь другую последовательность. Первая и вторая нити также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием "шпильки" или при помощи других не содержащих основания линкеров.

В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в выступающем участке средства для RNAi независимо может представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, в том числе без ограничения с сахаром с 2'-модификацией, такой как 2-F, 2'-O-метил, тимидин (Т), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Сео) и их любые комбинации. Например, последовательность выступающего конца на обоих концах каждой нити может представлять собой ТТ. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК или он может быть комплементарным целевым последовательностям генов или может иметь другую последовательность.

5'- или 3'-выступающие концы смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей средства для RNAi могут быть

фосфорилированными. В некоторых вариантах осуществления выступающий (выступающие) участок (участки) содержит (содержат) два нуклеотида с фосфоротиоатом между двумя нуклеотидами, при этом два нуклеотида могут быть одинаковыми или отличающимися. В одном варианте осуществления выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В одном варианте осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в антисмысловой нити. В одном варианте осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в смысловой нити.

Средство для RNAi может содержать только один выступающий конец, который может повышать интерферирующую активность RNAi без воздействия на его общую стабильность. Например, одонитевой выступающий конец может быть расположен на 3'-конце смысловой нити или в качестве альтернативы на 3'-конце антисмысловой нити. RNAi также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой нити (или 3'-конце смысловой нити) или *vice versa*. Как правило, антисмысловая нить RNAi имеет нуклеотидный выступающий конец на 3'-конце, а 5'-конец является тупым концом. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и 3'-концевой выступающий конец антисмысловой нити способствуют включению направляющей нити в процесс с участием RISC.

В одном варианте осуществления средство для RNAi представляет собой олигонуклеотид с обоими тупыми концами, длина которого составляет 19 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В другом варианте осуществления средство для RNAi представляет собой олигонуклеотид с обоими тупыми концами, длина которого составляет 20 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех

последовательных нуклеотидов в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В еще одном варианте осуществления средство для RNAi представляет собой олигонуклеотид с обоими тупыми концами, длина которого составляет 21 нуклеотид, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую нить из 21 нуклеотида и антисмысловую нить из 23 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства для RNAi тупой, в то время как другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Предпочтительно выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити.

В тех случаях, когда выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, между тремя концевыми нуклеотидами могут быть две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. В одном варианте осуществления средство для RNAi дополнительно содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити. В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляет собой модифицированный нуклеотид. В одном варианте осуществления

каждый остаток независимо модифицирован 2'-О-метилом или 3'-фтором, например, в чередующемся мотиве. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc<sub>3</sub>).

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую и антисмысловую нить, где длина смысловой нити составляет 25-30 нуклеотидных остатков, в которой, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положения 1), положения 1-23 первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой нити составляет 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой нити с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой нити является неспаренным со смысловой нитью и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов являются неспаренными со смысловой нитью, образуя тем самым 3'-однонитевой выступающий конец из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой нити содержит от 10-30 последовательных нуклеотидов, неспаренных со смысловой нитью, образуя тем самым 5'-однонитевой выступающий конец из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой нити являются спаренными основаниями с нуклеотидами антисмысловой нити, при этом смысловая и антисмысловая нити выровнены для максимальной комплементарности, образуя тем самым, по сути, дуплексный участок между смысловой и антисмысловой нитями; и антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов антисмысловой нити в длину для уменьшения экспрессии целевого гена при введении двухнитевой нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления или рядом с ним.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую и антисмысловую нити, где средство для RNAi содержит

первую нить, длина которой составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и вторую нить, длина которой составляет не более 30 нуклеотидов, по меньшей мере с одним мотивом из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положении 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой нити и 5'-конец второй нити образуют тупой конец, а вторая нить на своем 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем первая нить, где длина дуплексного участка составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, а вторая нить в достаточной степени комплементарна целевой мРНК на протяжении по меньшей мере 19 нуклеотидов длины второй нити, для снижения экспрессии целевого гена, где средство для RNAi вводят в клетку млекопитающего, и где расщепление средства для RNAi при помощи дайсера (Dicer) предпочтительно дает в результате siRNA, содержащую 3'-конец второй нити, за счет чего обеспечивается снижение экспрессии целевого гена у млекопитающего. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi содержит по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить средства для RNAi может также содержать по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити или рядом с ним.

Для средства для RNAi с дуплексным участком, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, сайт расщепления антисмысловой цепи находится обычно приблизительно в 10, 11 и 12 положениях от 5'-конца. Таким образом, мотивы с тремя одинаковыми модификациями могут находиться в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях или 13, 14, 15 положениях антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1<sup>го</sup> нуклеотида от 5'-конца антисмысловой нити, или отсчет начинается с 1<sup>го</sup> спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити. Сайт расщепления в антисмысловой нити может

также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка средства для RNAi от 5'-конца.

Смысловая нить средства для RNAi может содержать по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити; а антисмысловая нить может иметь по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити или рядом с ним. В тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить образуют дуплекс dsRNA, смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выровнены так, что один мотив из трех нуклеотидов в смысловой нити и один мотив из трех нуклеотидов в антисмысловой нити имеют перекрытие по меньшей мере в один нуклеотид, т.е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой нити образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой нити. В качестве альтернативы по меньшей мере два нуклеотида могут перекрываться или все три нуклеотида могут перекрываться.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать несколько мотивов с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов. Первый мотив может находиться в сайте расщепления нити или рядом с ним, а другие мотивы могут представлять собой фланкирующую модификацию. Термин "фланкирующая модификация" в данном документе относится к мотиву, находящемуся в другой части нити, который отделен от мотива в сайте расщепления той же нити или находится рядом с ним. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. В тех случаях, когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу, химическая структура мотивов отличается друг от друга, а если мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, то химические структуры могут быть одинаковыми или разными. Могут присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, если присутствуют две фланкирующие модификации, то каждая фланкирующая модификация может встречаться на одном конце относительно первого мотива, который

находится в сайте расщепления или рядом с ним, или с обеих сторон основного мотива.

Подобно смысловой нити, антисмысловая нить средства для RNAi может содержать несколько мотивов с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления нити или рядом с ним. Данная антисмысловая нить может также содержать одну или несколько фланкирующих модификаций, при выравнивании подобных фланкирующим модификациям, которые могут присутствовать в смысловой нити.

В одном варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для RNAi обычно не включает первый один или первые два концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

В другом варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для RNAi обычно не включает первый один или первые два спаренных нуклеотида в дуплексном участке на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

В тех случаях, если каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит по меньшей мере одну фланкирующую модификацию, то фланкирующие модификации могут попадать на один и тот же конец дуплексного участка и иметь перекрытие в один, два или три нуклеотида.

В тех случаях, если каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит по меньшей мере две фланкирующие модификации, то смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выравнены так, что две модификации, каждая от одной нити, попадают на один конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая от одной нити, попадают на другой конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации одной нити попадают по обе стороны от основного мотива с перекрытием в один, два или три нуклеотида в дуплексном участке.

В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, может быть модифицированным. Каждый нуклеотид может быть модифицированным одинаковыми или разными модификациями, которые могут включать одно или несколько изменений одного или обоих несвязанных с фосфатом атомов кислорода и/или одного или нескольких связанных с фосфатом атомов кислорода; изменение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила в рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента "дефосфорилированными" линкерами; модификацию или замену встречающегося в природе основания и замену или модификацию рибозофосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, то многие модификации встречаются в положении, которое повторяется в пределах нуклеиновой кислоты, например, модификация основания, или фосфатного фрагмента, или не образующего связь атома O фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет находиться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не будет. В качестве примера модификация может находиться только в 3'- или 5'-концевом положении, может находиться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити. Модификация может находиться в двухнитевом участке, в однонитевом участке или в обоих. Модификация может находиться только в двухнитевом участке РНК или может находиться только в однонитевом участке РНК. Например, фосфоротиоатная модификация в положении несвязанного O может находиться только на одном или обоих концах, может находиться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити, или может находиться в двухнитевом и однонитевом участках, в частности, на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированными.

Это создает возможность, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступающие

концы или для включения нуклеотидов с модификациями или имитаторов нуклеотидов в односторонние выступающие концы, например, в 5'- или 3'-выступающий конец или в оба. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступающие концы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые основания в 3'- или 5'-выступающем конце могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в данном документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара при помощи модификаций, которые известны в данной области, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксид-2'-фтор- (2'-F) или 2'-O-метил-модифицированных вместо рибозного сахара азотистого основания, и модификации фосфатной группы, например, модификации фосфоротиоата. Выступающие концы необязательно должны быть гомологичными целевой последовательности.

В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-O-метилом, 2'-O-аллилом, 2'-C-аллилом, 2'-дезоксид, 2'-гидроксидом или 2'-фтором. Нити могут содержать более одной модификации. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-O-метила или 2'-фтора.

По меньшей мере две различные модификации, как правило, присутствуют в смысловой нити и антисмысловой нити. Эти две модификации могут быть 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификациями или другими модификациями.

В одном варианте осуществления N<sub>a</sub> и/или N<sub>b</sub> содержат модификации чередующегося паттерна. Термин "чередующийся мотив", используемый в данном документе, относится к мотиву с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной нити. Чередующийся нуклеотид может относиться к каждому второму нуклеотиду или к каждому третьему нуклеотиду или аналогичному паттерну. Например, если каждый из A, B и C представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой

"АВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...",  
 "АААВАААВАААВ...", "АААВВВАААВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..." и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или разным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующиеся паттерны, т. е. модификации каждого второго нуклеотида, могут быть одинаковым, но каждая из смысловой нити или антисмысловой нити может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, как например, "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВДВДВД..." или "СДСДСД..." и т. д.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит паттерн модификаций для чередующегося мотива смысловой нити, сдвинутый относительно паттерна модификации для чередующегося мотива антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует модифицированной другим способом группе нуклеотидов антисмысловой нити и *vice versa*. Например, при спаривании смысловой нити с антисмысловой нитью в дуплексе dsRNA чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "АВАВАВ" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВАВАВА" от 5'- к 3'-концу нити в дуплексном участке. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "ААВВААВВ" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВВААВВАА" от 5'- к 3'-концу нити в дуплексном участке, так что между смысловой нитью и антисмысловой нитью имеется полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

В одном варианте осуществления средство для RNAi, содержащее паттерн чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловой нити, исходно имеет сдвиг в отношении паттерна чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в антисмысловой нити, т. е. 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид в парах оснований смысловой нити с 2'-F-модифицированным нуклеотидом в антисмысловой нити и

наоборот. Положение 1 в смысловой нити может начинаться с 2'-F-модификации, а 1 положение в антисмысловой нити может начинаться с 2'-O-метил-модификации.

Введение одного или нескольких мотивов с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в смысловую нить и/или антисмысловую нить нарушает исходный паттерн модификаций, присутствующий в смысловой нити и/или антисмысловой нити. Такое нарушение паттерна модификаций смысловой и/или антисмысловой нити путем введения одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую и/или антисмысловую нить неожиданно повышает активность сайленсинга генов в отношении целевого гена.

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов вводят в любую из цепей, модификация нуклеотида, следующего после мотива, является модификацией, отличной от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой "...N<sub>a</sub>Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>N<sub>b</sub>...", где "Y" представляет собой модификацию мотива с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, а "N<sub>a</sub>" и "N<sub>b</sub>" представляют собой модификацию нуклеотида, следующего после мотива "Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>", которая отличается от модификации Y, и где N<sub>a</sub> и N<sub>b</sub> могут быть одинаковыми или разными модификациями. В качестве альтернативы N<sub>a</sub> и/или N<sub>b</sub> могут присутствовать или отсутствовать в том случае, если присутствует фланкирующая модификация.

Средство для RNAi может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотриоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфотриоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может присутствовать у любого нуклеотида смысловой нити или антисмысловой нити или обеих нитей в любом положении нити. Например, модификация межнуклеотидной связи может присутствовать у каждого нуклеотида смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая модификация межнуклеотидной связи может присутствовать в чередующемся паттерне в смысловой нити и/или антисмысловой нити; или смысловая нить или

антисмысловая нить могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификаций межнуклеотидной связи в антисмысловой нити. В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi содержит 6–8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая нить содержит по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

В одном варианте осуществления средство для RNAi имеет модификацию фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексном участке. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и необязательно могут присутствовать дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, после которого следует выступающий нуклеотид. Например, между тремя концевыми нуклеотидами могут присутствовать по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды, а третий является спаренным нуклеотидом, следующим после выступающего нуклеотида. Эти три концевые нуклеотида могут быть на 3'-конце антисмысловой нити, 3'-конце смысловой нити, 5'-конце антисмысловой нити и/или 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити и между тремя концевыми нуклеотидами присутствуют две фосфотриоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом, следующим после выступающего нуклеотида. Необязательно средство для RNAi может дополнительно иметь две фосфотриоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит ошибочное (ошибочные) спаривание (спаривания) с мишенью, в дуплексе или их комбинации. Несовпадение может встречаться в выступающем участке или дуплексном участке. Пары оснований можно выстраивать на основании их способности содействовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации определенного спаривания, при этом наиболее простым подходом является изучение пар по отдельности для каждой пары оснований, однако также можно применять анализ ближайшего соседа или подобный). С точки зрения содействия диссоциации: A:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна, чем G:C; а I:C более предпочтительна, чем G:C (I=инозин). Ошибочные спаривания, например, неканонические или отличные от канонических типы спаривания (описанные в других местах данного документа), предпочтительнее канонических типов спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических типов спаривания.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных участках от 5'-конца антисмысловой нити, независимо выбранную из группы, состоящей из: A:U, G:U, I:C и ошибочно спаренных пар, например, неканонических, или отличных от канонических типов спаривания, или типов спаривания, которые включают универсальное основание, для содействия диссоциации антисмысловой нити на 5'-конце дуплекса.

В одном варианте осуществления нуклеотид в положении 1 в пределах дуплексного участка, в направлении от 5'-конца антисмысловой нити, выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в пределах дуплексного участка, в направлении от 5'-конца антисмысловой нити, представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в пределах дуплексного участка, в направлении от 5'-конца антисмысловой нити, представляет собой пару оснований AU.

В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи представляет собой дезокси-тимин (dT). В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокси-тимин (dT). В одном варианте осуществления присутствует короткая последовательность дезокси-тиминовых нуклеотидов, например, два dT нуклеотида на 3'-конце смысловой и/или антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления последовательность смысловой нити может быть представлена формулой (I):



, где:

каждый из  $i$  и  $j$  независимо равняется 0 или 1;

каждый из  $p$  и  $q$  независимо равняется 0-6;

каждый  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый  $N_b$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

каждый  $n_p$  и  $n_q$  независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

где  $N_b$  и  $Y$  имеют неодинаковую модификацию; и

каждый из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов. Предпочтительно в YYY все нуклеотиды 2'-F-модифицированы.

В одном варианте осуществления  $N_a$  и/или  $N_b$  содержит модификации чередующегося паттерна.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, то мотив YYY может находиться в сайте расщепления или около него (например, может находиться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) в смысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца.

В одном варианте осуществления  $i$  равняется 1, а  $j$  равняется 0, или  $i$  равняется 0, а  $j$  равняется 1, или  $i$  и  $j$  равняются 1. Таким образом, смысловая нить может быть представлена следующими формулами:

5'  $n_p$ - $N_a$ -YYY- $N_b$ -ZZZ- $N_a$ - $n_q$  3' (Ib);

5'  $n_p$ - $N_a$ -XXX- $N_b$ -YYY- $N_a$ - $n_q$  3' (Ic); или

5'  $n_p$ - $N_a$ -XXX- $N_b$ -YYY- $N_b$ -ZZZ- $N_a$ - $n_q$  3' (Id).

В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ib), тогда  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

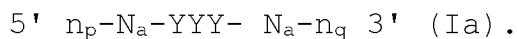
В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ic), тогда  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Id), каждый  $N_b$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно  $N_b$  равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Каждый  $N_a$  независимо может представлять собой

олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

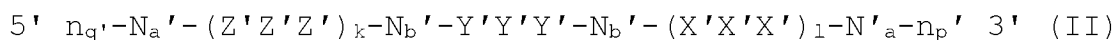
Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличным от остальных.

В других вариантах осуществления  $i$  равняется 0, а  $j$  равняется 0, и смысловая нить может быть представлена формулой:



В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ia), каждый  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления последовательность антисмысловой нити RNAi может быть представлена формулой (II):



, где:

каждый из  $k$  и  $l$  независимо равняется 0 или 1;

каждый из  $p'$  и  $q'$  независимо равняется 0-6;

каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

каждый  $n_p'$  и  $n_q'$  независимо представляют собой выступающий нуклеотид;

где  $N_b'$  и  $Y'$  имеют неодинаковую модификацию; и

каждый из  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$  и  $Z'Z'Z'$  независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления  $N_a'$  и/или  $N_b'$  содержит модификации чередующегося паттерна.

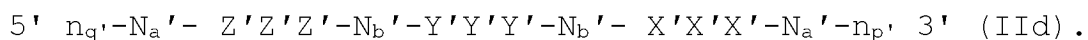
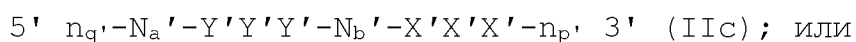
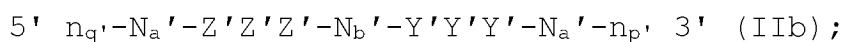
Мотив  $Y'Y'Y'$  находится в сайте расщепления антисмысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, то мотив  $Y'Y'Y'$  может находиться в положениях 9, 10, 11; 10, 11,

12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 или 13, 14, 15 антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексный участок от 5'-конца. Предпочтительно мотив Y'Y'Y' находится в положениях 11, 12, 13.

В одном варианте осуществления в мотиве Y'Y'Y' все нуклеотиды 2'-ОМе-модифицированы.

В одном варианте осуществления k равняется 1, а l равняется 0, или k равняется 0, а l равняется 1, или и k, и l равняются 1.

Таким образом, антисмысловая нить может быть представлена следующими формулами:

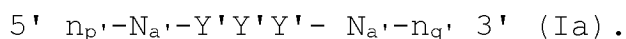


В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIb), N<sub>b</sub>' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N<sub>a</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIc), N<sub>b</sub>' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N<sub>a</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IId), каждый N<sub>b</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N<sub>a</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно N<sub>b</sub> равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В других вариантах осуществления  $k$  равняется 0, а 1 равняется 0, и антисмысловая нить может быть представлена формулой:



В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIa), тогда каждый  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждый из  $X'$ ,  $Y'$  и  $Z'$  может быть одинаковым или отличным от остальных.

Каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити может быть независимо модифицирован LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-O-метилом, 2'-O-аллилом, 2'-C-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-O-метилом или 2'-фтором. Каждый  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ,  $X'$ ,  $Y'$  и  $Z'$ , в частности, может представлять собой 2'-O-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать мотив  $YYY$ , находящийся в положениях 9, 10 и 11 нити, в тех случаях, когда дуплексный участок составляет 21 нуклеотид, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и  $Y$  представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая нить может дополнительно содержать мотив  $XXX$  или мотивы  $ZZZ$  в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка; и каждый из  $XXX$  и  $ZZZ$  независимо представляет собой 2'-OMe-модификацию или 2'-F-модификацию.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить может содержать мотив  $Y'Y'Y'$ , находящийся в положениях 11, 12, 13 нити, при этом отсчет начинается с 1<sup>го</sup> нуклеотида от 5'-конца, или, необязательно, отсчет начинается с 1<sup>го</sup> спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и  $Y'$  представляет собой 2'-O-метил-модификацию. Антисмысловая нить может дополнительно содержать мотив  $X'X'X'$  или мотивы  $Z'Z'Z'$  в качестве фланкирующих

модификаций на противоположном конце дуплексного участка; и каждый из  $X'X'X'$  и  $Z'Z'Z'$  независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

Смысловая нить, представленная любой из вышеприведенных формул (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), образует дуплекс с антисмысловой нитью, представленной какой-либо из формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId) соответственно.

Соответственно, средства для RNAi для применения в способах по настоящему изобретению могут содержать смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 30 нуклеотидов, дуплекс RNAi, представленный формулой (III):

смысловая нить:  $5' \text{ } n_p \text{ } -N_a - (X \text{ } X \text{ } X)_i - N_b - Y \text{ } Y \text{ } Y - N_b' - (Z \text{ } Z \text{ } Z)_j - N_a' - n_q \text{ } 3'$

антисмысловая нить:  $3' \text{ } n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' \text{ } 5'$

(III)

, где:

каждый из  $i$ ,  $j$ ,  $k$  и  $l$  независимо равняется 0 или 1;

каждый из  $p$ ,  $p'$ ,  $q$  и  $q'$  независимо равняется 0-6;

каждый  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

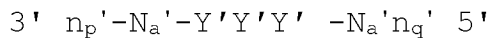
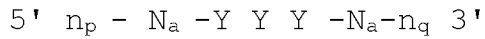
где каждый  $n_p'$ ,  $n_p$ ,  $n_q'$  и  $n_q$ , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; и

каждый из  $XXX$ ,  $YYY$ ,  $ZZZ$ ,  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$  и  $Z'Z'Z'$  независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов.

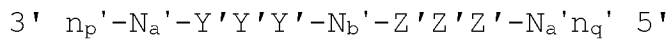
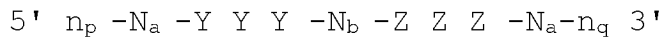
В одном варианте осуществления  $i$  равняется 0, а  $j$  равняется 0; или  $i$  равняется 1, а  $j$  равняется 0; или  $i$  равняется 0, а  $j$  равняется 1; или  $i$  и  $j$  равняются 0; или  $i$  и  $j$  равняются 1.

В другом варианте осуществления  $k$  равняется 0, а  $l$  равняется 0; или  $k$  равняется 1, а  $l$  равняется 0;  $k$  равняется 0, а  $l$  равняется 1; или как  $k$ , так и  $l$  равняется 0; или и  $k$ , и  $l$  равняются 1.

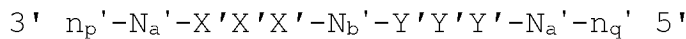
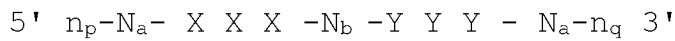
Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс  $\text{RNAi}$ , включают формулы, приведенные ниже:



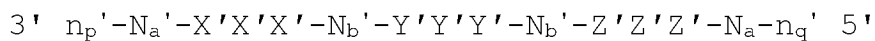
(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

В тех случаях, когда средство для  $\text{RNAi}$  представлено формулой (IIIa), тогда каждый  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для  $\text{RNAi}$  представлено формулой (IIIb), тогда каждый  $N_b$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для  $\text{RNAi}$  представлено формулой (IIIc), тогда каждый  $N_b$ ,  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), каждый  $N_b$ ,  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a$ ,  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из  $N_a$ ,  $N_a'$ ,  $N_b$  и  $N_b'$  независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

Каждый из X, Y и Z в формулах (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId) может быть одинаковым или отличным от остальных.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), тогда по меньшей мере один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Y'. В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'; или все три из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIb) или (IIId), по меньшей мере один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z'. Альтернативно по меньшей мере два из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'; или все три из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIc) или (IIId), тогда по меньшей мере один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X'. В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'; или все три из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'.

В одном варианте осуществления модификация нуклеотида Y отличается от модификации нуклеотида Y', модификация нуклеотида Z отличается от модификации нуклеотида Z', и/или модификация нуклеотида X отличается от модификации нуклеотида X'.

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, и  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотриоатной связи. В еще одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотриоатной связи, а смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описанного ниже). В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотриоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотриоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIa), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотриоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотриоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления средство для RNAi является мультимером, содержащим по меньшей мере два дуплекса,

представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может целенаправленно воздействовать на один и тот же ген или на два различных гена; или каждый из дуплексов может целенаправленно воздействовать на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления средство для RNAi является мультимером, содержащим три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может целенаправленно воздействовать на один и тот же ген или на два различных гена; или каждый из дуплексов может целенаправленно воздействовать на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления два средства для RNAi, представленные формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), соединены друг с другом на 5'-конце, и один или оба 3'-конца необязательно конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может целенаправленно воздействовать на один и тот же ген или на два разных гена; или каждое из средств может целенаправленно воздействовать на один и тот же ген в двух разных целевых сайтах.

В различных публикациях описаны мультимерные средства для RNAi, которые можно применять в способах по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США № 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Как описано более подробно ниже, средство для RNAi, содержащее один или нескольких углеводных фрагментов, конъюгированных со средством для RNAi, может улучшать одно или несколько свойств средства для RNAi. Во многих случаях углеводный фрагмент будет прикреплен к модифицированный

субъединице средства для RNAi. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц средства на основе dsRNA можно заменять другими фрагментами, например, отличным от углевода (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, называют в данном документе субъединицей с модификацией путем замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может быть карбоциклической кольцевой системой, т. е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклической кольцевой системой, т. е. один или несколько атомов в кольце могут быть гетероатомами, например, азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может быть моноциклической кольцевой системой или может содержать два или более колец, например, конденсированных колец. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему, или он может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду *посредством* носителя. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". "Точка присоединения к остову", используемая в данном документе, относится к функциональной группе, например, гидроксильной группе, или, как правило, связи, доступной для встраивания носителя в остов, например, фосфатный или модифицированный фосфатный, например, серосодержащий, остов, и которая подходит для этого, рибонуклеиновой кислоты. "Связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в кольцо атому циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может быть например, углеводом, например, моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, тетрасахаридом, олигосахаридом и полисахаридом. Необязательно выбранный фрагмент присоединен посредством промежуточного связывающего фрагмента к циклическому носителю.

Таким образом, циклический носитель будет часто включать функциональную группу, например, аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, подходящую для введения или связывания другого химического структурного элемента, например, лиганда, в состав кольца.

Средства для RNAi можно конъюгировать с лигандом через носитель, где носитель может быть циклической группой или ациклической группой; при этом предпочтительно циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]-диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно ациклическая группа выбрана из остова, представляющего собой сериол, или остова, представляющего собой диэтаноламин.

В некоторых конкретных вариантах осуществления средство для RNAi для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из группы средств, приведенных в какой-либо из таблиц 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 и 26. Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

#### **IV. iRNA, конъюгированные с лигандами**

Другая модификация РНК из числа iRNA по настоящему изобретению включает химическое связывание РНК с одним или несколькими лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение iRNA. Такие фрагменты включают без ограничений липидные фрагменты, такие как холестериновый фрагмент (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556), холевую кислоту (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), простой тиоэфир, например, берил-S-третилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), алифатическую цепь, например, додекандиоловый или ундециловый 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-рац-глицерин или триэтиламмония 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), полиамин или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), или октадециламиновый или гексиламинокарбонилхлестериновый фрагмент (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

В одном варианте осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время действия средства на основе iRNA, в которое он введен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например, клеточного компартмента или части органа, ткани, органа или участка тела, как например, по сравнению с видами, у которых отсутствует такой лиганд. Предпочтительные лиганды не будут принимать участие в спаривании дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать вещество, встречающееся в природе, 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 также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер L-лактида и гликолида, сополимер простого дивинилового эфира и малеинового ангидрида, N-(2-гидроксипропил) метакриламидный сополимер (HMPA),

полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, полиамин-псевдопептид, полиамин-пептидомиметик, полиамин-дендример, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, нацеливающее на клетку или ткань средство, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, например клеткой почки. Нацеливающей группой может быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин B12, витамин А, биотин, или RGD-пептид, или миметик RGD-пептида.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), 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 средства, фосфат, амино, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопами маркеры, ферменты, гаптены (например,

биотин), вещества, способствующие транспорту/абсорбции (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплекс  $\text{Eu}^{3+}$  тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лигандами могут быть белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы со специфической аффинностью в отношении ко-лиганда, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, например, клеткой печени. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать отличные от пептидов соединения, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. Например, лигандом может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF- $\kappa$ B.

Лигандом может быть вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение средства на основе iRNA клеткой, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственным средством может быть, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен к iRNA, как описано в данном документе, и действует как фармакокинетический модулятор (PK-модулятор). PK-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т. д. Иллюстративные PK-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т. д. Олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфоротиоатных связей, также, как известно, связываются с

сывороточным белком, следовательно, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфоротиоатных связей в осто́ве, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связываются сывороточными компонентами (например, сывороточными белками), также пригодны для применения в качестве РК-модулирующих лигандов в описанных в данном документе вариантах осуществления.

Конъюгированные с лигандами олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно синтезировать с применением олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, такого как, полученного в результате присоединения связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид может вступать в реакцию с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезируют с наличием какой-либо из разнообразных защитных групп, или лигандами, которые имеют связующий фрагмент, присоединенный к ним.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно получать при помощи удобного и стандартного способа хорошо известного твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими фирмами-изготовителями, включая, например, Applied Biosystems (Фостер Сити, Калифорния). Дополнительно или альтернативно можно использовать любые другие средства для такого синтеза, известные в данной области. Также известно применение аналогичных методик для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

Лиганд-конъюгированные олигонуклеотиды и лиганд-молекула, несущая последовательность-специфические связанные нуклеозиды по настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с применением стандартных предшественников нуклеотида или нуклеозида, или предшественников нуклеотид- или нуклеозид-конъюгата, которые уже

несут связывающий фрагмент, предшественников лиганд-нуклеотида или нуклеозид-конъюгата, которые уже несут молекулу лиганда, или строительных блоков, несущих лиганд, отличный от нуклеозида.

При применении предшественников нуклеотид-конъюгата, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез последовательность-специфических связанных нуклеозидов, как правило, завершают и молекулу лиганда затем подвергают взаимодействию со связывающим фрагментом с образованием лиганд-конъюгированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотида или связанные нуклеозиды по настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с применением фосфорамидитов, полученных из лиганд-нуклеозидных конъюгатов, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые коммерчески доступны и обычно применяются в синтезе олигонуклеотидов.

#### *А. Конъюгаты липидов*

В одном варианте осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липидную молекулу или молекулу на основе липида. Такая липидная молекула или молекула на основе липида предпочтительно связывается с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд обеспечивает распределение конъюгата в целевой ткани, например, в отличной от ткани почек целевой ткани организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно использовать другие молекулы, которые могут связывать HSA. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липидный лиганд или лиганд на основе липида может (а) повышать устойчивость к разрушению конъюгата, (b) повышать нацеливающую способность или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану, и/или (с) может быть использован для корректировки связывания с сывороточным белком например, HSA.

Лиганд на основе липида можно применять для ингибирования, например, регулирования связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липидный лиганд или лиганд на основе липида, который

связывается с HSA более сильно, с меньшей вероятностью будет нацеливаться на почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липидный лиганд или лиганд на основе липида, который менее прочно связывается с HSA, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

В предпочтительном варианте осуществления лиганд на основе липида связывается с HSA. Предпочтительно он связывает HSA с аффинностью, достаточной для того, чтобы конъюгат предпочтительно распределялся в ткань, отличную от ткани почек. Однако предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько сильной, чтобы связывание HSA-лиганд было необратимым.

В другом предпочтительном варианте осуществления лиганд на основе липида связывается с HSA слабо или вообще не связывается, так что конъюгат предпочтительно будет распределяться в почку. Другие фрагменты, которые нацеливаются на клетки почки, также можно использовать вместо или в дополнение к лиганду на основе липида.

В другом аспекте лигандом является фрагмент, например, витамин, который поглощается целевой клеткой, например, пролиферирующей клеткой. Он является особенно применимым для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или доброкачественного типа, например, раковых клеток. Иллюстративные витамины включают витамины А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают витамины группы В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины, или нутриенты, поглощаемые целевыми клетками, например, клетками печени. Также включены HAS и липопротеин низкой плотности (LDL).

#### *В. Средства, обеспечивающие проникновение в клетку*

В другом аспекте лигандом является средство, обеспечивающее проникновение в клетку, предпочтительно спиральное средство, обеспечивающее проникновение в клетку. Предпочтительно средство является амфипатическим. Иллюстративным средством является пептид, такой как tat или antennopodia. Если средство представляет собой пептид, то он может быть модифицированным, в том числе пептидилмиметик, инвертомеры, отличные от пептидных

или псевдопептидные связи, а также в нем могут использоваться D-аминокислоты. Спиральное средство предпочтительно представляет собой альфа-спиральное средство, которое предпочтительно характеризуется липофильной и липофобной фазами.

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) является молекулой, способной укладываться в определенную трехмерную структуру, аналогичную природному пептиду. Прикрепление пептида и пептидомиметиков к средствам, представляющим собой iRNA, может повлиять на фармакокинетическое распределение iRNA, например, путем повышения клеточного распознавания и абсорбции. Длина пептидного фрагмента или фрагмента пептидомиметика может составлять приблизительно 5-50 аминокислот, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Пептидом или пептидомиметиком может быть, например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий, главным образом, из Tyr, Trp или Phe). Пептидным фрагментом может быть пептид-дендример, конформационно затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность, контролирующую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным содержащим гидрофобную MTS пептидом является RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 43). RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 44), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может представлять собой "доставляющий" пептид, который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из Tat-белка HIV (GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO: 45) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 46) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик может кодироваться случайной

последовательностью ДНК, как например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (ОВОС) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Примером пептида или пептидомиметика, связанного со средством на основе dsRNA посредством введенной мономерной единицы, является нацеливающий на клетку пептид, состоящий из аргинина-глицина-аспарагиновой кислоты (RGD), или RGD-миметик. Длина пептидного фрагмента может варьироваться от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, как например, для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже.

RGD-пептид для применения в композициях и способах по настоящему изобретению может быть линейным или циклическим, и может быть модифицированным, например, гликозилированным или метилированным, для облегчения нацеливания на конкретную (конкретные) ткань (ткани). Пептиды, содержащие RGD, и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацеливаю лиганд интегрин. Предпочтительные конъюгаты с таким лигандом нацелены на PECAM-1 или VEGF.

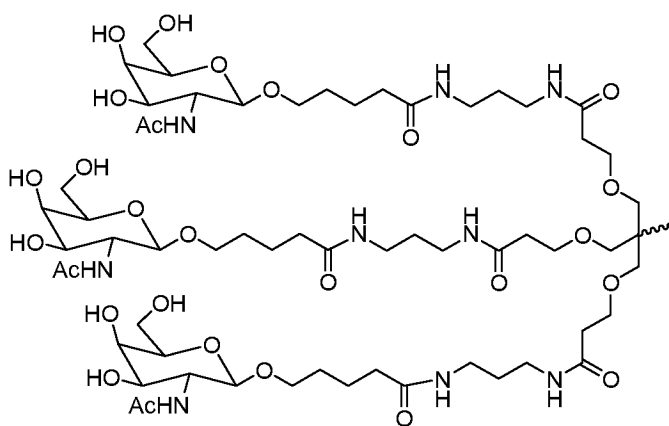
"Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку" способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибная клетка, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, обеспечивающим проникновение в микробную клетку, например, может быть  $\alpha$ -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Ceropin P1), содержащий дисульфидную связь пептид (например,  $\alpha$ -дефензин,  $\beta$ -дефензин или бактенецин) или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может включать клеточный сигнал внутриядерной локализации (NLS). Например, пептидом, обеспечивающим проникновение в

клетку, может быть двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена пептида слияния gp41 HIV-1 и NLS из большого Т-антигена SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

### С. Углеводные конъюгаты

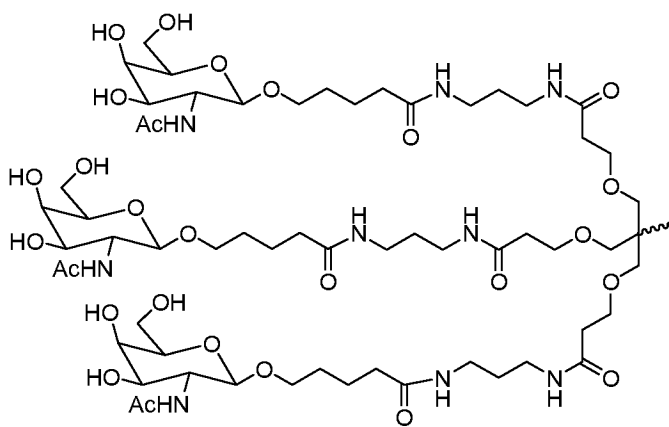
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению предлагается олигонуклеотид iRNA, дополнительно содержащий углевод. Конъюгированная с углеводом iRNA является предпочтительной для *in vivo* доставки нуклеиновых кислот, а также композиций, подходящих для *in vivo* терапевтического применения, описанного в данном документе. Используемый в данном документе термин "углевод" относится к соединению, которое представляет собой углевод *per se*, образованный из одного или нескольких моносахаридных звеньев, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или к соединению, имеющему в качестве его части углеводный фрагмент, образованный из одного или нескольких моносахаридных звеньев, каждое из которых имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие от примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 единиц моносахарида) и полисахариды, такие как крахмалы, целлюлоза, гликоген и полисахаридные смолы. Определенные моносахариды включают HBV и выше (например, HBV, C6, C7 или C8) сахара; ди- и трисахариды включают сахара с двумя или тремя звеньями моносахаридов (например, HBV, C6, C7 или C8).

В одном варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой моносахарид. В одном варианте осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как

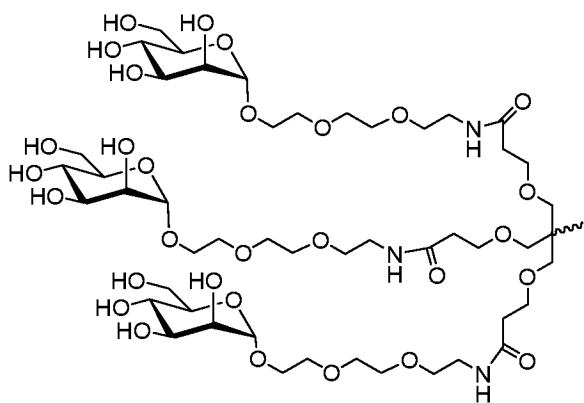


формула II.

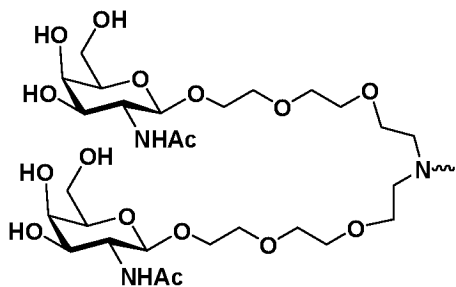
В другом варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из:



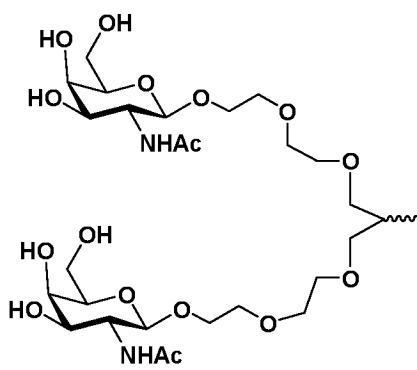
формула II,



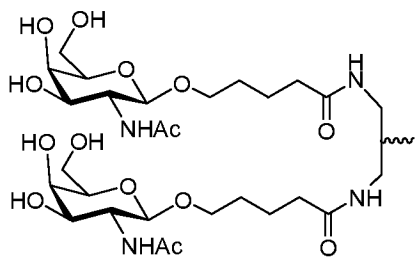
формула III,



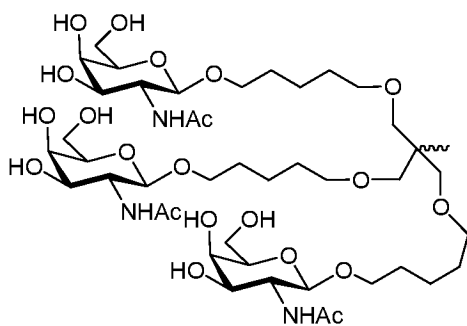
, формула IV,



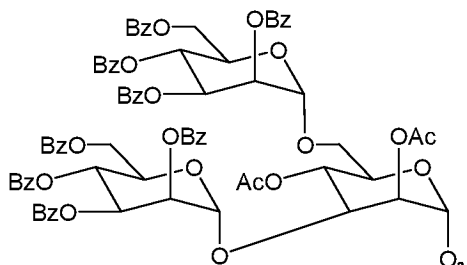
, формула V,



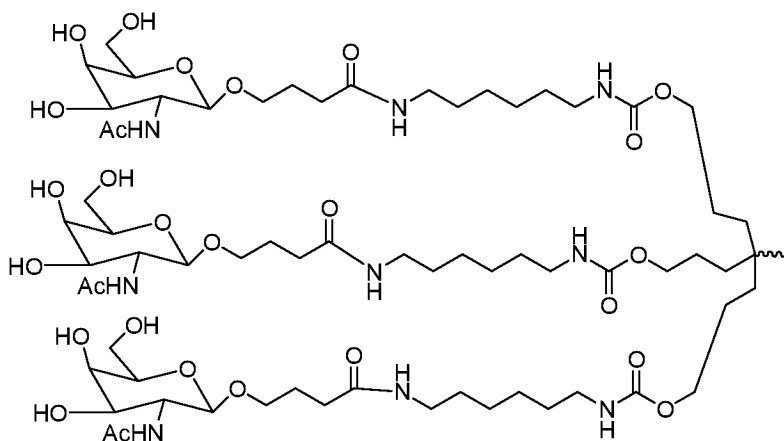
, формула VI,



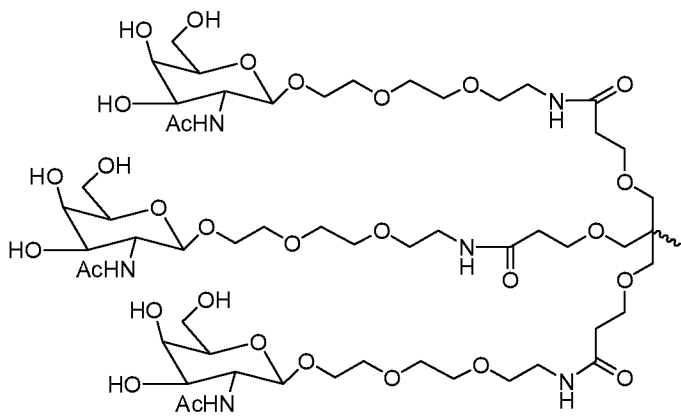
формула VII,



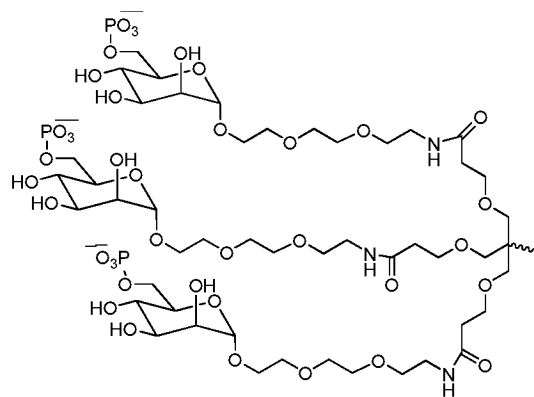
формула VIII,



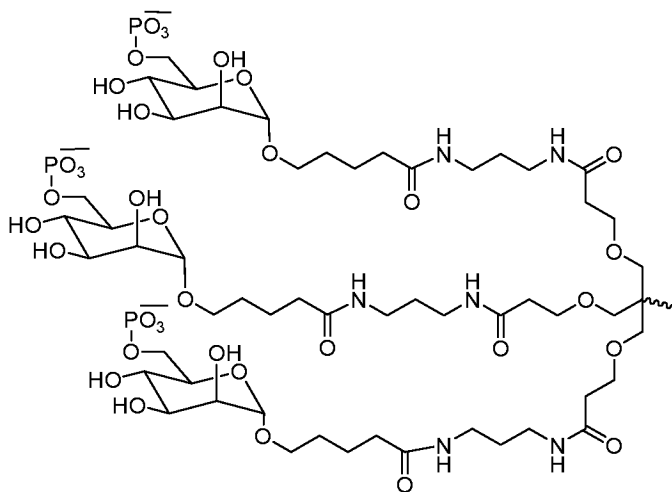
, формула IX,



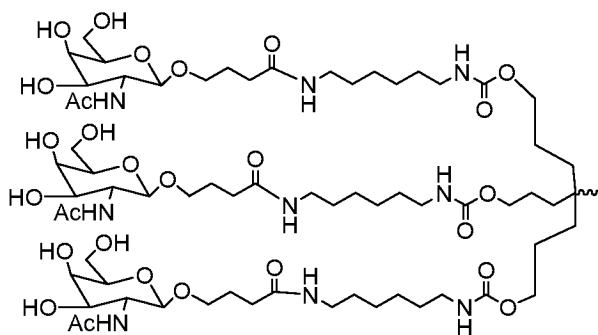
, формула X,



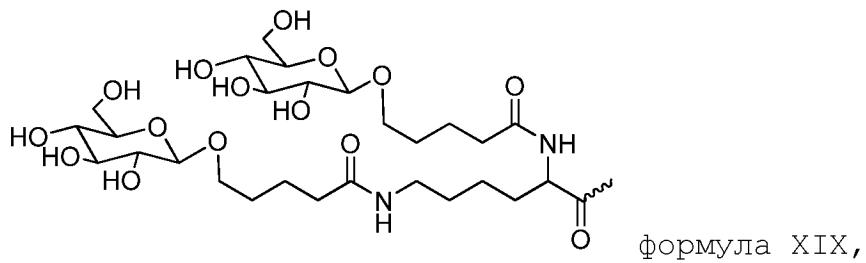
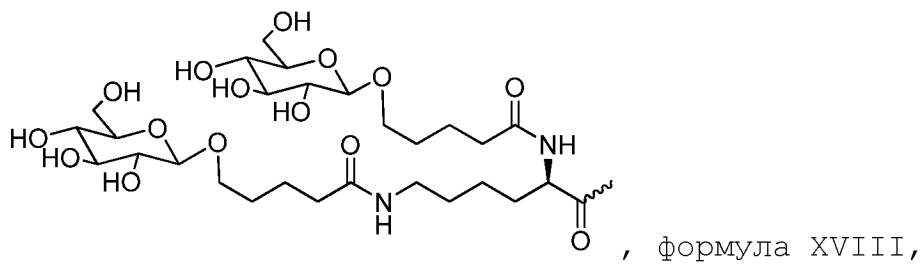
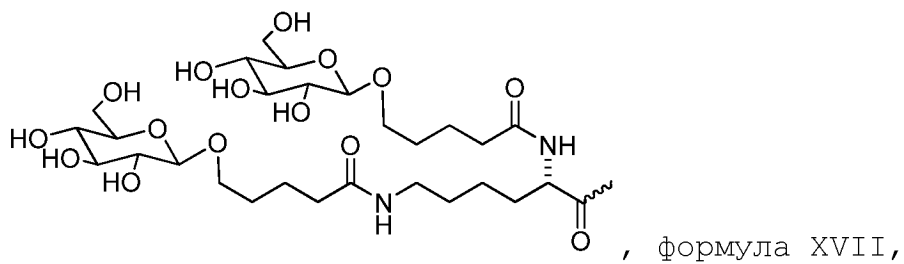
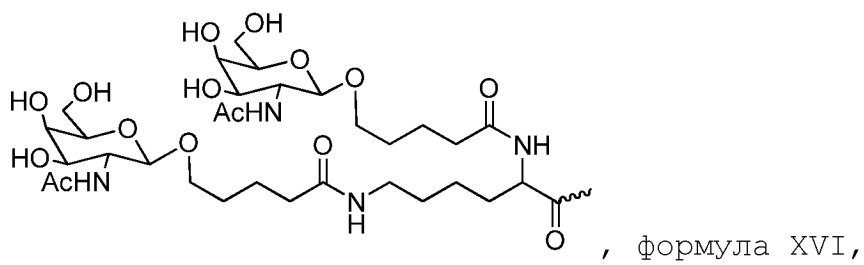
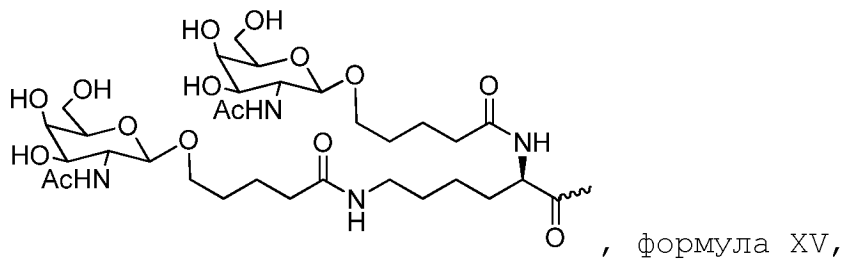
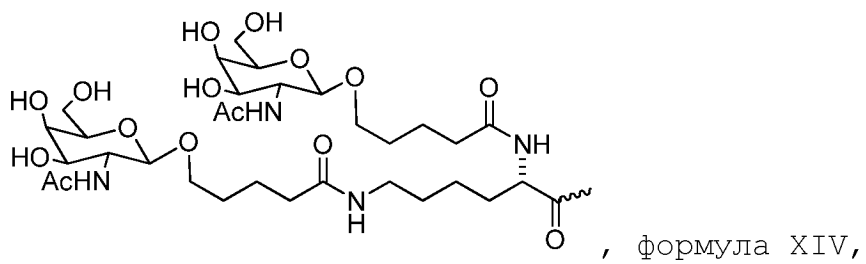
, формула XI,

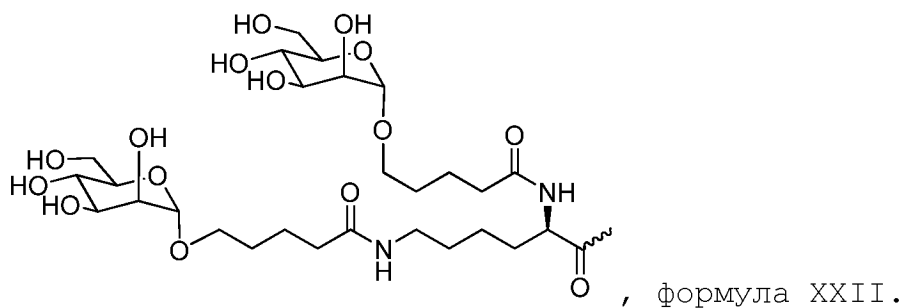
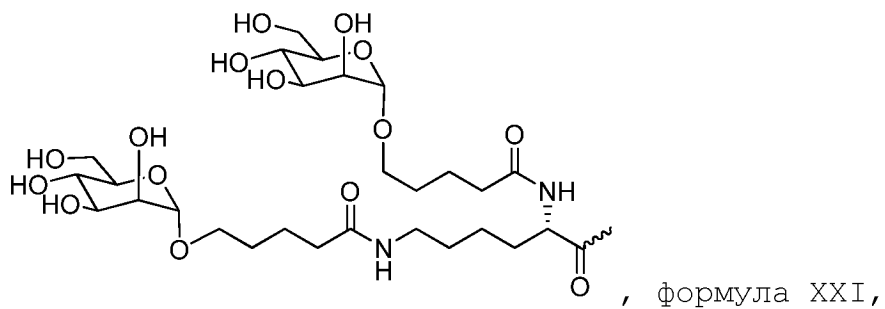
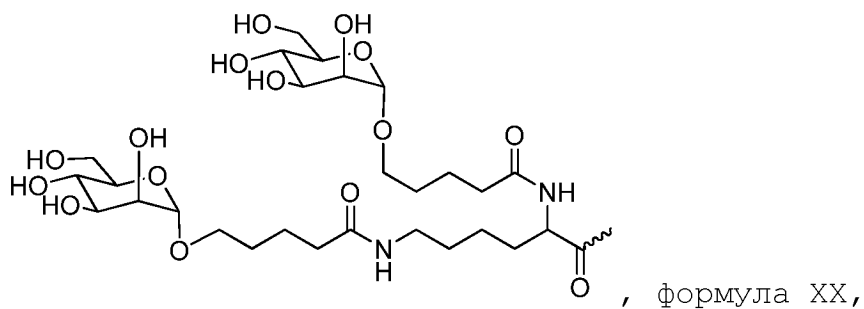


, формула XII,

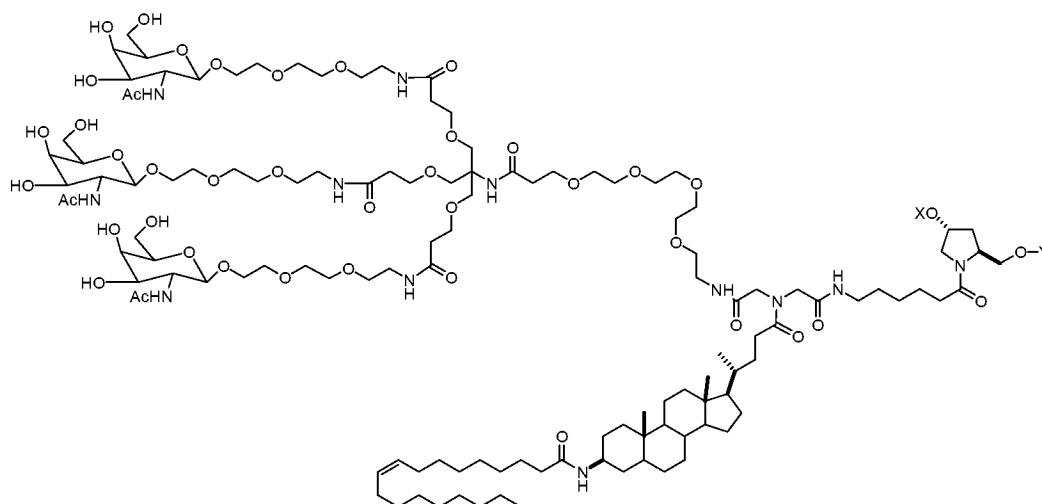


, формула XIII,





Другой типичный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в данном документе, включает без ограничения



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

В некоторых вариантах осуществления конъюгат углевода дополнительно содержит один или несколько дополнительных

лигандов, как описано выше, таких как без ограничения РК-модулятор и/или пептид, обеспечивающий проникновение в клетку.

Дополнительные углеводные конъюгаты (и линкеры), подходящие для применения в настоящем изобретении, включают такие, как описанные в публикациях РСТ с №№ WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

#### *D. Линкеры*

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанные в данном документе, могут быть присоединены к олигонуклеотиду iRNA различными линкерами, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Выражение "линкер" или "линкерная группа" означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, связывает ковалентными связями две части соединения. Линкеры, как правило, содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, единицу, такую как NR<sub>8</sub>, C(O), C(O)NH, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>NH, или цепь из атомов, такую как без ограничения 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, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил,

алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, в котором один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sub>8</sub>), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенным или незамещенным гетероциклил; где R<sub>8</sub> представляет собой водород, ацил, алифатический или замещенный алифатический компонент. В одном варианте осуществления линкер составляет приблизительно 1-24 атома, 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.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая достаточно стабильна вне клетки, но которая при проникновении в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется в приблизительно 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или больше или по меньшей мере в приблизительно 100 раз быстрее в целевой клетке или при первом стандартном условии (которое можно, например, выбрать для имитации или моделирования внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или при втором стандартном условии (которое можно, например, выбрать для имитации или моделирования условий, которые присутствуют в крови или сыворотке крови).

Расщепляемые линкерные группы восприимчивы к факторам расщепления, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Как правило, факторы расщепления более распространены или встречаются на более высоких уровнях или обладают большей активностью внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких разрушающих средств включают окислительно-восстановительные средства, которые выбирают для конкретных субстратов или которые не обладают специфичностью к субстратам, в том числе, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать редокс-расщепляемую линкерную группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, такие, которые

приводят к значению рН, равному пяти или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемую кислотой линкерную группу, действуя в качестве универсальной кислоты, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к значению рН. Значение рН сыворотки крови человека составляет 7,4, в то время как среднее значение рН внутри клетки немного ниже и находится в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым значением рН в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым значением рН, около 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется в условиях предпочтительного рН, тем самым высвобождая катионный липид из лиганда внутри клетки или в требуемый компартмент клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется под действием конкретного фермента. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, на которую производится нацеливание. Например, лиганд, нацеливающий на печень, может быть связан с катионным липидом через линкер, который содержит сложноэфирную группу. Клетки печени характеризуются высоким содержанием эстераз и, следовательно, линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, а не в типах клеток, для которых не характерно высокое содержание эстераз. Другие типы клеток с высоким содержанием эстераз включают клетки легкого, коркового вещества почки и яичка.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно применять при нацеливании на типы клеток с высоким содержанием пептидаз, такие как клетки печени и синовиоциты.

Как правило, пригодность кандидатной расщепляемой линкерной группы может быть оценена с помощью тестирования способности разрушающего средства (или условия) расщеплять эту кандидатную линкерную группу. Кроме того, желательно также тестировать кандидатную расщепляемую линкерную группу в отношении

способности противостоять расщеплению в крови или при приведении в контакт с другой нецелевой тканью. Таким образом, можно определить относительную чувствительность к расщеплению между первым и вторым условиями, где первое выбирают в качестве показателя расщепления в целевой клетке, а второе выбирают в качестве показателя расщепления в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке крови. Измерения можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на животных в целом. Может быть полезно произвести первичные оценки в бесклеточных или культуральных условиях и подтвердить дальнейшими оценками на животных в целом. В предпочтительных вариантах осуществления применимые кандидатные соединения расщепляются по меньшей мере в приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или в приблизительно 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой крови (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

*i. Расщепляемые с помощью окислительно-восстановительных реакций линкерные группы*

В одном варианте осуществления расщепляемая связывающая группа представляет собой окислительно-восстановительную расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является ли кандидатная расщепляемая линкерная группа подходящей "расщепляемой при восстановлении линкерной группой" или, например, подходящей для применения с конкретным фрагментом iRNA и конкретным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидат может быть оценен путем инкубирования с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных в данной области, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например, целевой клетке. Кандидаты

также могут быть оценены в условиях, которые выбирают для имитации условий в крови или сыворотке крови. В одном варианте осуществления кандидатные соединения расщепляются не более чем на приблизительно 10% в крови. В других вариантах осуществления пригодные кандидатные соединения разрушаются по меньшей мере в приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или в приблизительно 100 раз быстрее в клетке (или в *in vitro* условиях, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или *in vitro* условиями, выбранными для имитации внеклеточных условий). Степень расщепления кандидатных соединений можно определить с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнить с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

#### *ii. Фосфатные расщепляемые линкерные группы*

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе фосфата. Расщепляемая связывающая группа на основе фосфата расщепляется средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы клетки. Примерами фосфатных линкерных групп являются  $-O-P(O)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(S)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(S)(SRk)-O-$ ,  $-S-P(O)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(O)(ORk)-S-$ ,  $-S-P(O)(ORk)-S-$ ,  $-O-P(S)(ORk)-S-$ ,  $-S-P(S)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(O)(Rk)-O-$ ,  $-O-P(S)(Rk)-O-$ ,  $-S-P(O)(Rk)-O-$ ,  $-S-P(S)(Rk)-O-$ ,  $-S-P(O)(Rk)-S-$ ,  $-O-P(S)(Rk)-S-$ . Предпочтительными вариантами осуществления являются  $-O-P(O)(OH)-O-$ ,  $-O-P(S)(OH)-O-$ ,  $-O-P(S)(SH)-O-$ ,  $-S-P(O)(OH)-O-$ ,  $-O-P(O)(OH)-S-$ ,  $-S-P(O)(OH)-S-$ ,  $-O-P(S)(OH)-S-$ ,  $-S-P(S)(OH)-O-$ ,  $-O-P(O)(H)-O-$ ,  $-O-P(S)(H)-O-$ ,  $-S-P(O)(H)-O-$ ,  $-S-P(S)(H)-O-$ ,  $-S-P(O)(H)-S-$ ,  $-O-P(S)(H)-S-$ . Предпочтительный вариант осуществления представляет собой  $-O-P(O)(OH)-O-$ . Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

#### *iii. Расщепляемые кислотой линкерные группы*

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой связывающую группу. Расщепляемая

кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется при кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде с рН приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже) или с помощью средств, таких как ферменты, которые могут действовать как обычная кислота. В клетке определенные органеллы с низким значением рН, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить расщепляющую среду для расщепляемых кислотами линкерных групп. Примеры расщепляемых кислотами линкерных групп включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотами группы могут характеризоваться общей формулой  $-C=NN-$ ,  $C(O)O$  или  $-OC(O)$ . Предпочтительным вариантом осуществления является случай, когда атом углерода, присоединенный к кислороду сложноэфирной группы (в алкоксигруппе), входит в состав арильной группы, замещенной алкильной группы или четвертичной алкильной группы, такой как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

#### *iv. Сложноэфирные линкерные группы*

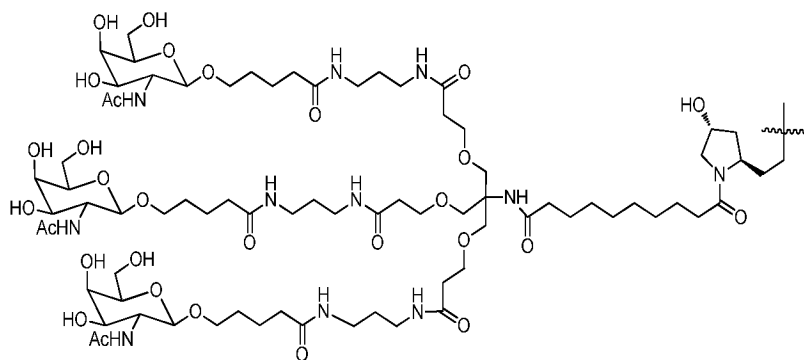
В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит связывающую группу на основе сложного эфира. Расщепляемая связывающая группа на основе сложного эфира расщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы, в клетках. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают без ограничения сложные эфиры с алкиленовыми, алкениленовыми и алкиниленовыми группами. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой  $-C(O)O-$  или  $-OC(O)-$ . Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

#### *v. Расщепляемые группы на основе пептидов*

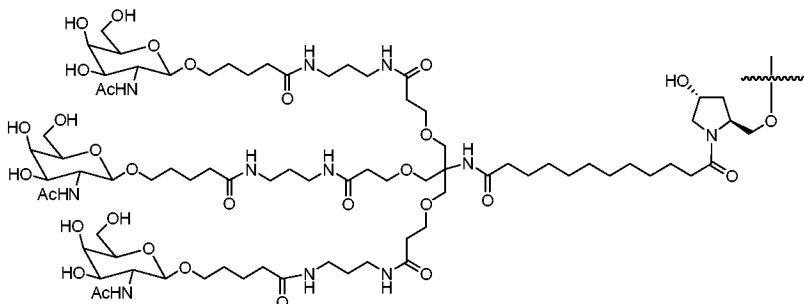
В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе пептида. Расщепляемая связывающая группа на основе пептида расщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Расщепляемые линкерные группы на основе пептида представляют

собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептида не включают амидную группу ( $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкинеленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида, как правило, ограничена пептидной связью (т. е. амидной связью), образующейся между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает всю амидную функциональную группу. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида представлены общей формулой  $-\text{NHCHRAC}(\text{O})\text{NHCHRBC}(\text{O})-$ , где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

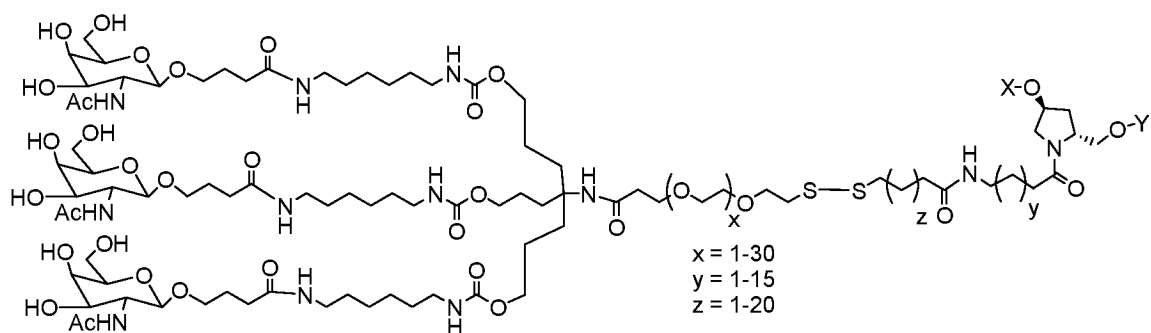
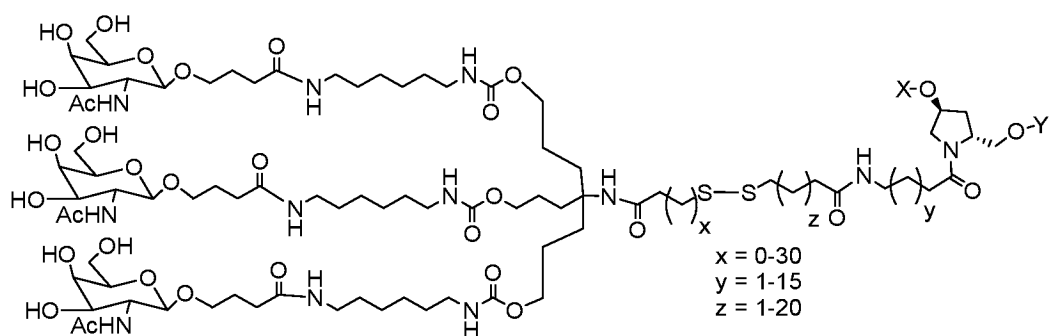
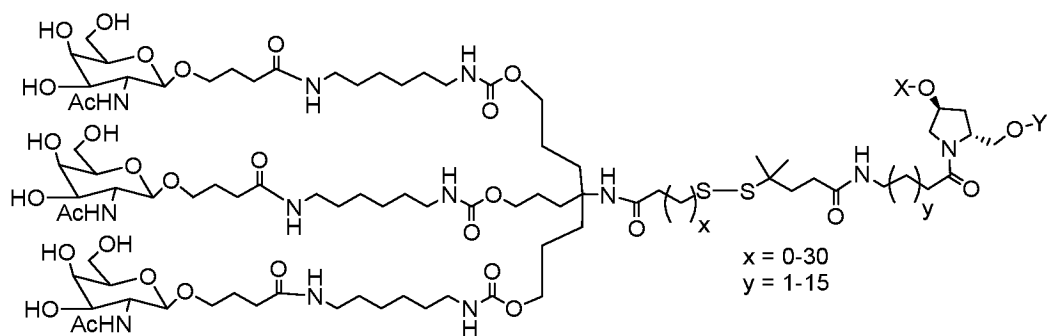
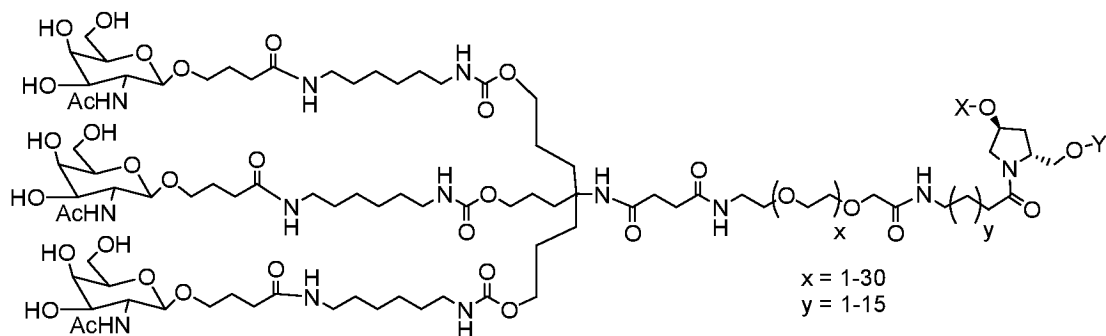
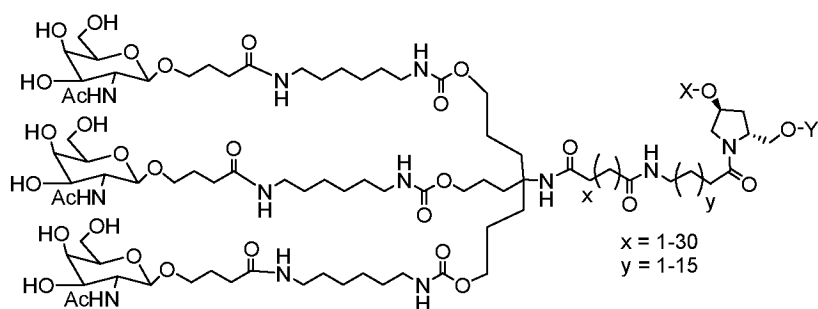
В одном варианте осуществления iRNA по настоящему изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов iRNA с линкерами в композициях и способах по настоящему изобретению, включают без ограничения

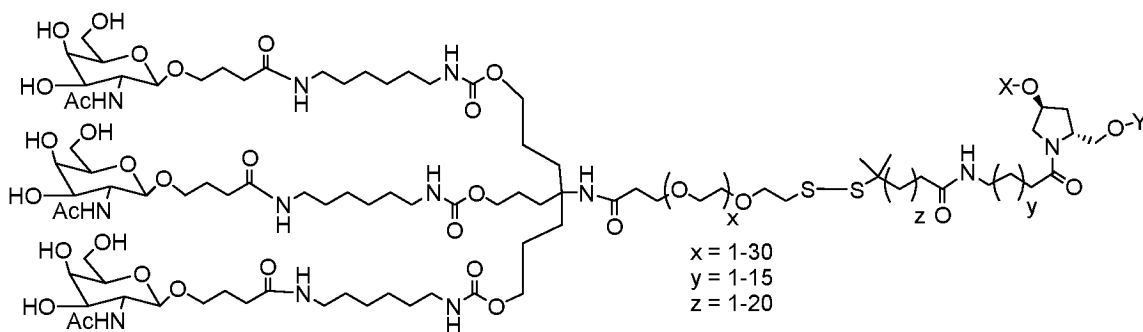


(формула XXIV),



(формула XXV),





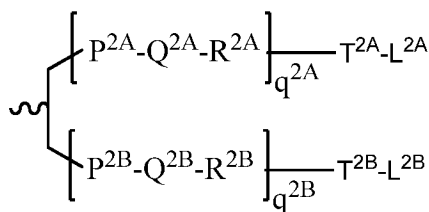
(формула XXXI),

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

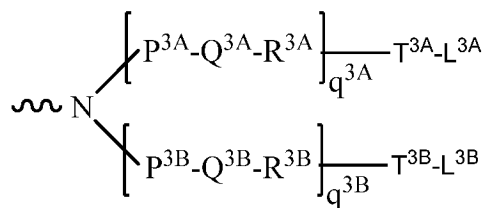
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению лиганд представляет собой одно или несколько производных "GalNAc" (N-ацетилгалактозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления dsRNA по настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в какой-либо из формул (XXXII) - (XXXV):

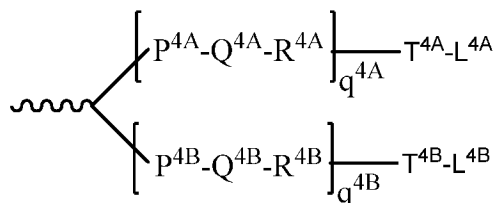
формула XXXII формула XXXIII



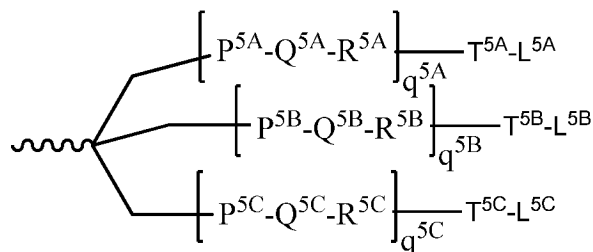
(IV)



Formula (V)



Formula (VI)



Formula (VII)

формула XXXIV формула XXXV

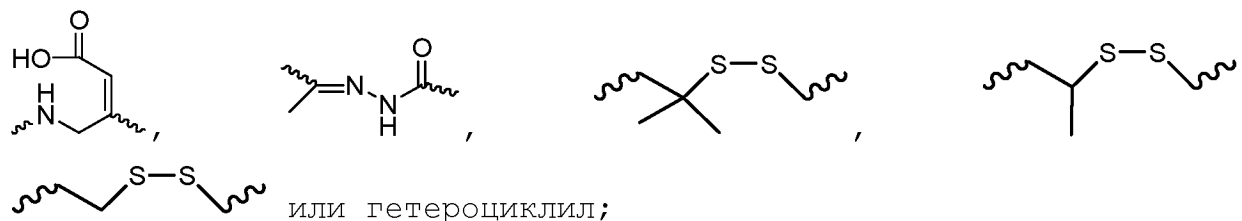
, где:

$q2A$ ,  $q2B$ ,  $q3A$ ,  $q3B$ ,  $q4A$ ,  $q4B$ ,  $q5A$ ,  $q5B$  и  $q5C$  независимо представляют собой для каждого случая 0–20 и где повторяющиеся единицы могут быть одинаковыми или различными;

каждый из  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{5C}$ ,  $T^{2A}$ ,  $T^{2B}$ ,  $T^{3A}$ ,  $T^{3B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{4B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{5B}$ ,  $T^{5C}$  независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH или CH<sub>2</sub>O;

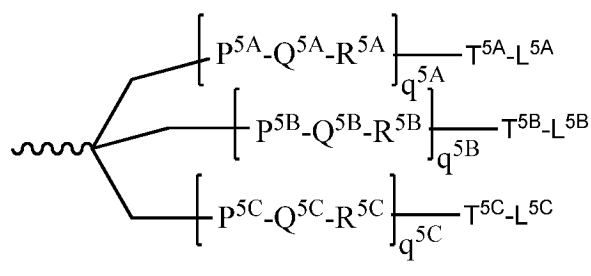
$Q^{2A}$ ,  $Q^{2B}$ ,  $Q^{3A}$ ,  $Q^{3B}$ ,  $Q^{4A}$ ,  $Q^{4B}$ ,  $Q^{5A}$ ,  $Q^{5B}$ ,  $Q^{5C}$  независимо для каждого случая отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

каждый из  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{5C}$  независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH<sub>2</sub>, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R<sup>a</sup>)C(O), -C(O)-CH(R<sup>a</sup>)-NH-, CO, CH=N-O,



$L^{2A}$ ,  $L^{2B}$ ,  $L^{3A}$ ,  $L^{3B}$ ,  $L^{4A}$ ,  $L^{4B}$ ,  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  и  $L^{5C}$  представляют собой лиганд; т. е. каждый из них независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R<sup>a</sup> представляет собой H или аминокислотную боковую цепь. Трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc особенно пригодны для применения со средствами для RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена, такие как с формулой (XXXVI):

формула XXXVI



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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгированных с производными GalNac, включают без ограничения структуры, указанные выше как формулы II, VII, XI, X и XIII.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения конъюгатов РНК, включают без ограничения 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 данный документ посредством ссылки.

Не является необходимым, чтобы все положения в данном соединении были единообразно модифицированными, и в действительности несколько из вышеуказанных модификаций могут быть включены в отдельное соединение или даже в отдельный нуклеозид в iRNA. Настоящее изобретение также включает соединения на основе iRNA, которые представляют собой химерные соединения.

"Химерные" соединения на основе iRNA или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения на основе iRNA, предпочтительно dsRNA, которые содержат два или более химически отличающихся участка, каждый из которых состоит по меньшей мере из одного мономерного звена, т. е. нуклеотида, в случае соединения на основе dsRNA. Такие iRNA обычно содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицирована таким образом, чтобы наделить iRNA повышенной устойчивостью к разрушению нуклеазой, увеличенным клеточным поглощением и/или увеличенной аффинностью связывания в отношении целевой нуклеиновой кислоты. Дополнительный участок iRNA может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК.

В качестве примера, РНКазы Н является клеточной эндонуклеазой, которая расщепляет нить РНК в РНК:ДНК-дуплексе. Активация РНКазы Н, следовательно, приводит к расщеплению целевой РНК, тем самым значительно повышая эффективность ингибирования экспрессии гена с помощью iRNA. Следовательно, сравнимые результаты зачастую можно получить с более короткими iRNA при применении химерных dsRNA по сравнению с фосфоротиоатными дезокси-гибридизациями dsRNA того же целевого участка. Расщепление РНК-мишени обычно можно обнаружить с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, с помощью методик гибридизации связанных нуклеиновых кислот, известных в данной области.

В некоторых случаях РНК из числа iRNA может быть модифицирована группой, не являющейся лигандом. Ряд молекул, не являющихся лигандами, конъюгировали с iRNA для усиления активности, распределения в клетке или клеточного поглощения iRNA, и процедуры для выполнения таких типов конъюгирования доступны в научной литературе. Такие не являющиеся лигандами фрагменты имеют включенные липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (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), простой тиоэфир, например, гексил-S-тримитилтиол (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, додекандиоловый или ундециловый 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-рац-глицерин или триэтиламмония 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), полиамин или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., *Biochim.*

*Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), или октадециламиновый или гексиламинокарбонилноксистероидный фрагмент (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Иллюстративные патенты Соединенных Штатов, в которых изложена идея получения таких конъюгатов РНК, были приведены выше. Типичные схемы конъюгирования предусматривают синтез РНК, несущих аминоклипер в одном или нескольких положениях последовательности. Аминогруппа затем вступает в реакцию с молекулой, подлежащей конъюгации, с применением соответствующего конденсирующего или активирующего реагента. Реакцию конъюгирования можно выполнять с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после расщепления РНК, в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью HPLC, как правило, приводит к получению чистого конъюгата.

#### **V. Доставка iRNA по настоящему изобретению**

Доставку iRNA по настоящему изобретению к клетке, например, клетке субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект с заболеванием, нарушением или состоянием ассоциированным с инфекцией HBV), можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с iRNA по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей iRNA, например, dsRNA. В качестве альтернативы доставку *in vivo* можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют iRNA и управляют ее экспрессией. Такие альтернативные случаи дополнительно описаны ниже.

Как правило, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с iRNA по настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. и Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые тем самым включены в данный документ с помощью ссылки в полном их объеме). Что касается доставки *in vivo*, то факторы, которые учитывают в контексте доставки молекулы iRNA, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предупреждение неспецифических эффектов и

накопление доставляемой молекулы в целевой ткани. Неспецифические эффекты iRNA могут быть сведены к минимуму путем локального введения, например путем прямой инъекции или вживления в ткань, или местного введения препарата. Локальное введение в место обработки максимально увеличивает локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые в ином случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и позволяет вводить более низкую суммарную дозу молекулы iRNA. Из результатов нескольких исследований виден эффективный нокдаун генных продуктов при местном введении iRNA. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF как путем инъекции в стекловидное тело макаков-крабоедов (Tolentino, MJ., et al (2004) *Retina* 24:132-138), так и путем субретинальных инъекций мышам (Reich, SJ., et al (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предупреждает неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, непосредственная внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам уменьшает размер опухоли (Pille, J., et al (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может продлевать время жизни мышей с опухолями (Kim, WJ., et al (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., et al (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). Было показано, что РНК-интерференция также успешна при локальной доставке к CNS путем непосредственной инъекции (Dorn, G., et al. (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., et al (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., et al (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., et al (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., et al (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) и к легким путем интраназального введения (Howard, KA., et al (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., et al (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., et al (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Что касается системного введения iRNA для лечения заболевания, то РНК может быть модифицирована или, альтернативно, доставлена при помощи системы доставки лекарственного средства; оба способа служат для предупреждения быстрого разрушения dsRNA эндо- и экзонуклеазами *in vivo*.

Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут делать возможным нацеливание композиции с iRNA на целевую ткань, и с их помощью можно избежать нежелательных нецелевых эффектов. Молекулы iRNA можно модифицировать при помощи химического конъюгирования с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения поглощения клеткой и предупреждения разрушения. Например, iRNA, направленную против AroB, которая конъюгирована с липофильным фрагментом, представляющим собой холестерин, системно вводили мышам, что приводило к нокдауну мРНК aroB как в печени, так и в тонком кишечнике (Soutschek, J., et al (2004) *Nature* 432:173-178). Как было показано, конъюгация iRNA с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регресс опухоли на мышинных моделях рака предстательной железы (McNamara, JO., et al (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления iRNA можно доставлять с помощью систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы iRNA (отрицательно заряженной), а также увеличивают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения iRNA клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть либо связанными с iRNA, либо на них воздействуют для образования везикулы или мицеллы (см., например, Kim SH., et al (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себя iRNA. Образование везикул или мицелл также предупреждает разрушение iRNA при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов с iRNA находятся в пределах квалификации специалистов в данной области (см., 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 данный документ посредством ссылки в полном объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, применимых для системной доставки iRNA, включают DOTAP (Sorensen, DR., et al (2003), выше; Verma, UN., et al (2003),

выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (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), полиэтиленимин (Bonnet ME., et al (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (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 iRNA образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции с iRNA и циклодекстринами можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ посредством ссылки в полном его объеме.

#### *А. Кодированные вектором iRNA по настоящему изобретению*

iRNA, целенаправленно воздействующая на ген HBV, может экспрессироваться единицами транскрипции, вставленными в ДНК-или РНК-векторы (см., например, Couture, A, et al., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22113, Conrad, международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка от нескольких часов до недель) или длительной (от недель до месяцев или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевых ткани или типа клеток. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансгены также могут быть сконструированы с возможностью наследования их в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Отдельные нить или нити iRNA могут транскрибироваться с промотора вектора экспрессии. В целевую клетку можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфицирования) для экспрессии двух отдельных нитей с получением, например, dsRNA. В альтернативном случае каждая отдельная нить dsRNA может транскрибироваться с участием

промоторов, оба из которых расположены в одной и той же плазмиде экспрессии. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированным повтором, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью так, что dsRNA имеет структуру типа "стебель-петля".

Векторы экспрессии iRNA, как правило, являются ДНК-плазмидами или вирусными векторами. Векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно использовать для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии iRNA, которая описана в данном документе. Векторы экспрессии для эукариотических клеток хорошо известны в данной области и доступны из ряда коммерческих источников. Как правило, предусмотрено, что такие векторы содержат подходящие сайты рестрикции для вставки необходимого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих iRNA, может быть системной, как например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные от пациента, с последующим обратным введением пациенту или путем любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в необходимую целевую клетку.

Целевые клетки можно трансфицировать плазмидами экспрессии iRNA в виде комплекса с носителями-катионными липидами (например, олигофектамином) или носителями на основе некатионных липидов (например, Transit-ТКО™). В настоящем изобретении также рассматриваются множественные трансфекции при помощи липидов для iRNA-опосредованных нокдаунов, целенаправленно воздействующих на различные участки целевой РНК, на протяжении недели или больше. Успешное введение векторов в клетки-хозяева можно контролировать при помощи разнообразных известных способов. Например, временную трансфекцию можно выявить при помощи репортера, такого как флуоресцентный маркер, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильная трансфекция клеток *ex vivo* может быть подтверждена с применением маркеров, которые обеспечивают устойчивость трансфицированной клетки к определенным факторам

окружающей среды (например, антибиотикам и лекарственным средствам), как например, устойчивость к гигромицину В.

Системы вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают без ограничения (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышинного лейкоза Молони и т. д; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавируса; (i) векторы на основе поксвируса, такого как ортопокс, например, векторы на основе вируса осповакцины, или авипокс, например, канарипокс или оспы кур; и (j) хелпер-зависимый или "слабый" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы, дефектные по репликации. Различные векторы будут встраиваться в геном клеток или не будут встраиваться в геном клеток. При необходимости, конструкции могут включать последовательности вирусов для трансфекции. В качестве альтернативы конструкция может быть включена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы на основе EPV и EBV. В конструкциях для рекомбинантной экспрессии iRNA, как правило, будут необходимы регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т. д., для обеспечения экспрессии iRNA в целевых клетках. Другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций, дополнительно описаны ниже.

Векторы, применимые для доставки iRNA, будут включать в себя регуляторные элементы (промотор, энхансер и т. д.), достаточные для экспрессии iRNA в требуемой целевой клетке или ткани. Регуляторные элементы можно выбирать для получения либо конститутивной, либо регулируемой/индуцибельной экспрессии.

Экспрессию iRNA можно точно регулировать, например, путем использования индуцибельной регуляторной последовательности, которая чувствительна к определенным физиологическим регуляторам, например, уровням глюкозы в крови или гормонам (Docherty et al., 1994, *FASEB J.* 8:20-24). Такие индуцибельные экспрессирующие системы, подходящие для управления экспрессией

dsRNA в клетках или у млекопитающих, включают, например, регулирование при помощи экдизона, при помощи эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопропил-бета-D1-тиогалактопиранозида (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на предполагаемое использование трансгена iRNA.

Можно использовать вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие iRNA. Например, можно использовать ретровирусный вектор (см. Miller *et al.*, *Meth. Enzymol.* 217:581-599 (1993)). Данные ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для правильной упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие iRNA, клонируют в один или несколько векторов, которые облегчают доставку нуклеиновой кислоты пациенту. Более подробное описание ретровирусных векторов можно найти, например, в Boesen *et al.*, *Biotherapy* 6:291-302 (1994), в котором описано применение ретровирусного вектора для доставки гена *mdr1* к гемопоэтическим стволовым клеткам для придания стволовым клеткам большей устойчивости к химиотерапии. Другими источниками, иллюстрирующими применение ретровирусных векторов в генной терапии, являются: Clowes *et al.*, *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem *et al.*, *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons и Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); и Grossman и Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Лентивирусные векторы, предусматриваемые для применения, включают, например, векторы на основе HIV, описанные в патентах США № 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ посредством ссылки.

Также для применения в доставке iRNA по настоящему изобретению предусматриваются аденовирусы. Аденовирусы представляют собой особенно перспективные носители, например, для доставки генов в эпителий респираторного тракта. Аденовирусы естественным образом инфицируют эпителий респираторного тракта, где они вызывают заболевание с легким течением. Другими мишенями

для систем доставки на основе аденовирусов являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышцы. Аденовирусы обладают преимуществом в том, что способны инфицировать неделящиеся клетки. Kozarsky и Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) представляют собой обзор аденовирусной генной терапии. Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) продемонстрировали применение аденовирусных векторов для переноса генов в эпителий респираторного тракта макак-резусов. Другие примеры применения аденовирусов в генной терапии можно найти в Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); публикации согласно PCT WO94/12649; и Wang, et al., *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). Подходящий AV-вектор для экспрессии iRNA, описанной в настоящем изобретении, способ конструирования рекомбинантного AV-вектора и способ доставки вектора в целевые клетки описаны в Xia H et al. (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) также можно использовать для доставки iRNA по настоящему изобретению (Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993) патент США № 5436146). В одном варианте осуществления iRNA может экспрессироваться в виде двух отдельных комплементарных одонитевых молекул РНК при помощи рекомбинантного AAV-вектора, например, либо с РНК-промоторами, U6 или H1, либо с промотором цитомегаловируса (CMV). Подходящие AAV-векторы для экспрессии dsRNA, описанной в настоящем изобретении, способы конструирования рекомбинантного AAV-вектора и способы доставки векторов в целевые клетки описаны в Samulski R et al. (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), *J. Virol.* 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; патенте США № 5252479; патенте США № 5139941; международной заявке на патент № WO 94/13788 и международной заявке на патент № WO 93/24641, полное раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки.

Другой вирусный вектор, подходящий для доставки iRNA по настоящему изобретению, представляет собой поксвирус, такой как вирус коровьей оспы, например, аттенуированный вирус коровьей оспы, как например, модифицированный вирус Анкара (MVA) или NYVAC, авипоксвирус, как например, оспа кур или оспа канареек.

В случае необходимости тропизм вирусных векторов может быть модифицирован путем псевдотипирования векторов белками оболочки или другими поверхностными антигенами из других вирусов или путем замещения различных вирусных капсидных белков. Например, лентивирусные векторы можно подвергать псевдотипированию поверхностными белками из вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса бешенства, вируса Эбола, вируса Мокола и т. п. AAV-векторы можно получать для нацеливания на различные клетки путем конструирования векторов таким образом, чтобы они экспрессировали различные серотипы капсидных белков; см., например, Rabinowitz J E et al. (2002), *J Virol* 76:791-801, полное раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки.

Фармацевтический препарат на основе вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе, или может включать матрицу замедленного высвобождения, в которую включено средство доставки генов. В качестве альтернативы в случае, когда вектор доставки целого гена может продуцироваться нативно рекомбинантными клетками, например, ретровирусными векторами, тогда фармацевтический препарат может включать одну или несколько клеток, которые продуцируют систему доставки генов.

#### **VI. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению**

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают iRNA по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предложены фармацевтические композиции, содержащие iRNA, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие iRNA, применимы для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью гена HBV. Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа

доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем подкожной (SC) или внутривенной (IV) доставки. Другим примером являются композиции, которые составлены для непосредственной доставки в паренхиму головного мозга, например, путем инфузии в головной мозг, как например, непрерывной инфузии при помощи насоса. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена HBV.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению вводят субъекту в виде дозы по весу. "Доза по весу" (например, доза в мг/кг) представляет собой дозу средства на основе iRNA, которая будет изменяться в зависимости от веса субъекта. В другом варианте осуществления средство на основе iRNA вводят субъекту в виде фиксированной дозы. "Фиксированная доза" (например, доза в мг) означает, что для всех субъектов применяют одну дозу средства на основе iRNA независимо от каких-либо конкретных связанных с субъектом факторов, таких как вес. В одном конкретном варианте осуществления фиксированная доза средства на основе iRNA по настоящему изобретению основана на предварительно определенном весе или возрасте.

Как правило, приемлемая доза iRNA по настоящему изобретению будет составлять в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграмм на килограмм веса тела реципиента в день, как правило, в диапазоне от приблизительно 1 до 50 мг на килограмм веса тела в день. Например, dsRNA можно вводить в количестве, составляющем приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг на разовую дозу.

Например, dsRNA можно вводить в дозе, составляющей приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3,

2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления dsRNA вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 30 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 35 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 40 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 45 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно

[illegible]

2,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг или от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Например, dsRNA можно вводить в дозе, составляющей приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к

перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления dsRNA вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 30 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 35 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 40 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 45 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 30 до приблизительно

[illegible]

20 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг или от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг. В одном варианте осуществления dsRNA вводят в дозе, составляющей от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Например, субъектам можно вводить, например, подкожно или внутривенно, разовое терапевтическое количество iRNA, такое как приблизительно 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления субъектам вводят, например, подкожно или внутривенно, множество доз терапевтического количества iRNA, такого как доза в приблизительно 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525,

0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Многодозовый режим может включать введение терапевтического количества iRNA ежедневно, например, в течение двух дней, трех дней, четырех дней, пяти дней, шести дней, семи дней или дольше.

В других вариантах осуществления субъектам вводят, например, подкожно или внутривенно, повторную дозу терапевтического количества iRNA, такого как доза в приблизительно 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5,, 2,7, 2,82,6, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Схема с повторной дозой

может включать введение терапевтического количества iRNA на регулярной основе, как например, один раз в двое суток, один раз в трое суток, один раз в четверо суток, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц.

В определенных вариантах осуществления, например, когда композиция по настоящему изобретению содержит dsRNA, как описано в данном документе, и липид, субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, например, составляющее от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,4 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,4 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 2,5 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от

приблизительно 5,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от  
 приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от  
 приблизительно 6,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от  
 приблизительно 7 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от  
 приблизительно 7,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от  
 приблизительно 8 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от  
 приблизительно 8,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от  
 приблизительно 9 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от  
 приблизительно 9,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Значения и  
 диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям,  
 также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Например, dsRNA можно вводить в дозе, составляющей  
 приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,  
 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3,  
 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6,  
 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9,  
 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2,  
 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5,  
 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8,  
 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или  
 приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по  
 отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как  
 часть настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления настоящего  
 изобретения, например, когда двухнитевое средство для RNAi  
 включает в себя модификацию (например, один или несколько  
 мотивов из трех идентичных модификаций трех последовательных  
 нуклеотидов), включающую один такой мотив в сайте расщепления  
 средства или рядом с ним, шесть фосфоротиоатных связей и лиганд,  
 такое средство вводят в дозе, составляющей от приблизительно  
 0,01 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,01 до  
 приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,01 до  
 приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,01 до  
 приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,01 до  
 приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до  
 приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до

[illegible]

приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг или от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к вышеупомянутым значениям, также являются частью настоящего изобретения, например, средство для RNAi можно вводить субъекту в дозе, составляющей от приблизительно 0,015 мг/кг до приблизительно 0,45 мг/кг.

Например, средство для RNAi, например, средство для RNAi в фармацевтической композиции, можно вводить в дозе, составляющей приблизительно 0,01 мг/кг, 0,0125 мг/кг, 0,015 мг/кг, 0,0175 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,0225 мг/кг, 0,025 мг/кг, 0,0275 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,0325 мг/кг, 0,035 мг/кг, 0,0375 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,0425 мг/кг, 0,045 мг/кг, 0,0475 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,0525 мг/кг, 0,055 мг/кг, 0,0575 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,0625 мг/кг, 0,065 мг/кг, 0,0675 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,0725 мг/кг, 0,075 мг/кг, 0,0775 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,0825 мг/кг, 0,085 мг/кг, 0,0875 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,0925 мг/кг, 0,095 мг/кг, 0,0975 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,125 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,175 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,225 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,275 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,325 мг/кг, 0,35 мг/кг, 0,375 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,425 мг/кг, 0,45 мг/кг, 0,475 мг/кг или приблизительно 0,5 мг/кг. Значения, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также являются частью настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 100 мг до приблизительно 900 мг, например, от приблизительно 100 мг до приблизительно 850 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 750 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 200 мг до

приблизительно 850 мг, от приблизительно 200 мг до  
 приблизительно 800 мг, от приблизительно 200 мг до  
 приблизительно 750 мг, от приблизительно 200 мг до  
 приблизительно 700 мг, от приблизительно 200 мг до  
 приблизительно 650 мг, от приблизительно 200 мг до  
 приблизительно 600 мг, от приблизительно 200 мг до  
 приблизительно 550 мг, от приблизительно 200 мг до  
 приблизительно 500 мг, от приблизительно 300 мг до  
 приблизительно 850 мг, от приблизительно 300 мг до  
 приблизительно 800 мг, от приблизительно 300 мг до  
 приблизительно 750 мг, от приблизительно 300 мг до  
 приблизительно 700 мг, от приблизительно 300 мг до  
 приблизительно 650 мг, от приблизительно 300 мг до  
 приблизительно 600 мг, от приблизительно 300 мг до  
 приблизительно 550 мг, от приблизительно 300 мг до  
 приблизительно 500 мг, от приблизительно 400 мг до  
 приблизительно 850 мг, от приблизительно 400 мг до  
 приблизительно 800 мг, от приблизительно 400 мг до  
 приблизительно 750 мг, от приблизительно 400 мг до  
 приблизительно 700 мг, от приблизительно 400 мг до  
 приблизительно 650 мг, от приблизительно 400 мг до  
 приблизительно 600 мг, от приблизительно 400 мг до  
 приблизительно 550 мг или от приблизительно 400 мг до  
 приблизительно 500 мг.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi  
 вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 100 мг,  
 приблизительно 125 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 175  
 мг, 200 мг, приблизительно 225 мг, приблизительно 250 мг,  
 приблизительно 275 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 325  
 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно  
 400 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 450 мг,  
 приблизительно 475 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 525  
 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 575 мг, приблизительно  
 600 мг, приблизительно 625 мг, приблизительно 650 мг,  
 приблизительно 675 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 725  
 мг, приблизительно 750 мг, приблизительно 775 мг, приблизительно

800 мг, приблизительно 825 мг, приблизительно 850 мг, приблизительно 875 мг или приблизительно 900 мг.

Фармацевтическую композицию можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, как например, в течение периода 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21, 22, 23, 24 или приблизительно 25 минут. Введение можно повторять, например, регулярно, как например, один раз в неделю, один раз в две недели (т. е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После проведения режима первичного лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Например, после введения один раз в неделю или один раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше.

Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в день или iRNA можно вводить в виде двух, трех или более частей дозы через определенные интервалы на протяжении дня, или даже при помощи непрерывной инфузии, или доставки посредством состава с контролируемым высвобождением. В таком случае, количество iRNA, содержащееся в каждой части дозы, должно быть соответственно меньше, чтобы обеспечить суммарную суточную дозу. Единица дозирования также может быть составлена для доставки в течение нескольких дней, например, при помощи традиционного состава с замедленным высвобождением, который обеспечивает замедленное высвобождение iRNA в течение периода в несколько дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны в данной области и особенно применимы для доставки средств в определенный участок, например, их можно применять со средствами по настоящему изобретению. В данном варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее количество суточной дозы.

В других вариантах осуществления разовая доза фармацевтических композиций может быть длительного действия, так что последующие дозы вводят с интервалами не более 3, 4 или 5 дней или с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения разовую дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению

вводят один раз в неделю. В других вариантах осуществления настоящего изобретения разовую дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят два раза в месяц. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения разовую дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят один раз в месяц, один раз в два месяца или один раз в квартал (т. е. раз в три месяца).

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозу и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, в том числе без ограничения тяжесть заболевания или нарушения, типы предшествующего лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать один период лечения или серию периодов лечения. Расчеты эффективных доз и периодов полужизни *in vivo* для отдельных iRNA, охваченных настоящим изобретением, можно проводить с применением традиционных методологий или на основе тестирования *in vivo* с применением соответствующей животной модели, как описано в другом месте в данном документе.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, необходимо ли локальное или системное лечение, и от области, подлежащей обработке. Введение может быть местным (например, при помощи трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе при помощи ингалятора; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает в себя внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; субдермальное, например, посредством имплантированного устройства; или интракраниальное, например, интрапаренхиматозное, интратекальное или интравентрикулярное введение.

iRNA можно доставлять таким образом, чтобы происходило целенаправленное воздействие на конкретную ткань, такую как печень (например, гепатоциты печени).

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, распыляемые растворы, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т. п. Также могут быть применимы презервативы, перчатки с покрытием и т. п. Подходящие составы для местного введения включают составы, в которых iRNA, описанные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеилфосфатидилэтаноламин (DOTMA)). iRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы iRNA могут образовывать комплексы с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают без ограничения арахионовую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую 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-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложные C<sub>1-20</sub>алкильные эфиры (например, изопропилмиристат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного введения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ посредством ссылки.

# *А. Составы на основе iRNA, содержащие мембранные молекулярные ансамбли*

iRNA для применения в композициях и способах по настоящему изобретению могут быть составлены для доставки в мембранном молекулярном ансамбле, например, липосоме или мицелле. Используемый в данном документе термин "липосома" относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных в виде по меньшей мере одного бислоя, например, одного бислоя или множества бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю среду. Водная часть содержит композицию на основе iRNA. Липофильный материал отделяет водную внутреннюю среду от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию на основе iRNA, хотя в некоторых примерах может включать. Липосомы пригодны для переноса и доставки активных ингредиентов к участку их действия. Благодаря тому, что мембрана липосомы структурно подобна биологическим мембранам, в случае введения липосом в ткань бислой липосомы сливается с бислоем клеточных мембран. По мере того как идет слияние липосомы и клетки, внутреннее водное содержимое, которое включает iRNA, доставляется в клетку, где iRNA может специфически связываться с целевой РНК и может опосредовать iRNA. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеливающими, например, для направления iRNA в конкретные типы клеток.

Липосомы, содержащие средство на основе iRNA, можно получать при помощи ряда способов. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в детергенте для образования мицелл из липидного компонента. Например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может характеризоваться высокой критической концентрацией мицеллообразования и может быть неионогенным. Иллюстративные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Препарат средства на основе iRNA затем добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы липида взаимодействуют со

средством на основе iRNA и конденсируются вокруг средства на основе iRNA с образованием липосомы. После конденсации моющее средство удаляют, например, путем диализа, с получением липосомного препарата со средством на основе iRNA.

При необходимости соединение-носитель, которое содействует конденсации, можно добавлять в ходе реакции конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может быть полимером, отличным от нуклеиновой кислоты (например, спермином или спермидином). Также можно корректировать pH для содействия конденсации.

Способы получения стабильных средств для доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотида/катионного липида в качестве структурных компонентов средств для доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Образование липосом может также включать один или несколько аспектов иллюстративных 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.* 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. Широко применяемые методики получения липидных агрегатов соответствующего размера для использования в качестве средств для доставки включают разрушение ультразвуком и замораживание-оттаивание с экструзией (см., например, Mayer, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986). Микрофлюидизацию можно использовать в тех случаях, когда необходимы стабильно малые (от 50 до 200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984). Такие способы легко адаптировать для упаковки препаратов средства на основе iRNA в липосомы.

Липосомы делятся на два больших класса. Катионные липосомы являются положительно заряженными липосомами, которые

взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот с образованием стабильных комплексов. Положительно заряженный комплекс нуклеиновой кислоты/липосомы связывается с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализируется в эндосому. Вследствие того, что внутри эндосомы значение pH кислое, липосомы разрываются, высвобождая свое содержимое в клеточную цитоплазму (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

Липосомы, которые являются pH-чувствительными или отрицательно заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты вместо образования с ними комплекса. Поскольку и нуклеиновая кислота, и липид имеют одинаковый заряд, то происходит отталкивание вместо образования комплекса. Тем не менее, некоторая часть нуклеиновых кислот захватывается водной внутренней средой этих липосом. pH-чувствительные липосомы использовали для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, в монослой клеток в культуре. Экспрессию экзогенного гена выявляли в целевых клетках (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Один основной тип липосомных композиций включает фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина природного происхождения. Композиции для нейтральных липосом, например, могут быть образованы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Композиции для анионных липосом, как правило, образованы из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные фузогенные липосомы образованы преимущественно из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомных композиций образован из фосфатидилхолина (PC), такого, как например, PC соевых бобов и PC яиц. Другой тип образован из смесей фосфолипида, и/или фосфатидилхолина, и/или холестерина.

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

Также исследовали неионогенные липосомные системы для определения их пригодности в доставке лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина-А в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионогенные липосомные системы были эффективны в обеспечении депонирования циклоспорина А в различных слоях кожи (Hu *et al.* *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4(6) 466).

Липосомы также включают "пространственно стабилизированные" липосомы, термин, используемый в данном документе, относится к липосомам, содержащим один или несколько специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени полужизни в кровотоке по сравнению с липосомами, у которых отсутствуют такие специальные липиды. Примерами пространственно стабилизированных липосом являются липосомы, в которых часть образующей везикулу липидной составляющей липосомы (А) содержит один или несколько гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид G<sub>M1</sub>, или (В) получена из одного или нескольких гидрофильных полимеров, таких как полиэтиленгликолевый (PEG) фрагмент. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, в данной области полагают, что по меньшей мере для пространственно стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-производные липиды, увеличенное время полужизни в кровотоке этих пространственно стабилизированных липосом является следствием сниженной степени поглощения клетками ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen *et al.*, *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu *et al.*, *Cancer Research*, 1993, 53, 3765).

Различные липосомы, содержащие один или несколько гликолипидов, известны в данной области. Papahadjopoulos *et al.* (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозида G<sub>M1</sub>, сульфата галактоцереброзида и

фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти полученные данные были прокомментированы Gabizon *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба из которых принадлежат Allen *et al.*, раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид G<sub>m1</sub> или сложный эфир сульфата галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb *et al.*) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim *et al.*).

В одном варианте осуществления применяют катионные липосомы. Преимущество катионных липосом состоит в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и не могут сливаться настолько эффективно с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo*, и их можно использовать для доставки средств на основе iRNA к макрофагам.

Дополнительные преимущества липосом включают следующее: липосомы, полученные из натуральных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразрушаемыми; липосомы могут включать широкий диапазон воды и жирорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные средства на основе iRNA во внутренних компартментах от метаболизма и разрушения (Rosoff, в "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными факторами, которые необходимо учитывать при получении липосомных составов, являются поверхностный заряд липида, размер везикулы и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), можно использовать для образования малых липосом, которые самопроизвольно взаимодействуют с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток культуры тканей, что приводит к доставке средства на основе iRNA (см., например, Felgner, P. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413-7417, 1987 и патент США № 4897355 касательно описания DOTMA и его применения с ДНК).

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеоилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно применять в комбинации с фосфолипидом с образованием везикул, образующих комплекс с ДНК. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) представляет собой эффективное средство для доставки высокоанионных нуклеиновых кислот в живые клетки культуры тканей, которое содержит положительно заряженные DOTMA-липосомы, которые самопроизвольно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. Суммарный заряд полученных комплексов является также положительным в тех случаях, когда используют липосомы с достаточным положительным зарядом. Положительно заряженные комплексы, полученные таким способом, самопроизвольно присоединяются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры тканей. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеоилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что олеиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

Другие опубликованные соединения с катионными липидами включают такие соединения, которые были конъюгированы с рядом фрагментов, в том числе, например, карбоксиспермин, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения, как 5-карбоксиспермилглициндиоктаолеоиламид ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина 5-карбоксиспермил-амид ("DPPEs") (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат с катионным липидом предусматривает получение производных липида с помощью холестерина ("DC-Chol"), которые были составлены в виде липосом в комбинации с DOPE (см., Gao, X. и Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Сообщалось, что липополилизин, полученный путем конъюгации полилизина с DOPE, является эффективным для

трансфекции в присутствии сыворотки крови (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Сообщается, что в случае определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, проявляют более низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем DOTMA-содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты на основе катионных липидов включают DMRIE и DMRIE-HP (Vical, Ла-Хойя, Калифорния) и Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомные составы особенно подходят для местного введения, при этом липосомы обладают некоторыми преимуществами по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженные побочные действия по отношению к высокой системной абсорбции вводимого лекарственного средства, повышенное накопление вводимого лекарственного средства в необходимой мишени и возможность вводить средство на основе iRNA в кожу. В некоторых вариантах осуществления липосомы используют для доставки средства на основе iRNA к эпидермальным клеткам, а также для усиления проникновения средства на основе iRNA в дермальные ткани, например, в кожу. Например, липосомы можно вводить местно. Была описана местная доставка лекарственных средств, составленных в виде липосом, в кожу (см., например, Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 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).

Также исследовали неионогенные липосомные системы для определения их пригодности в доставке лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомные составы, содержащие Novasome I

(глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки лекарственного средства в дерму кожи мышей. Такие составы со средством на основе iRNA применимы для лечения дерматологического нарушения.

Липосомы, которые включают iRNA, могут быть получены с высокой способностью к деформации. Такая способность к деформации может позволить липосомам проникать через пору, которая меньше среднего радиуса липосомы. Например, типом способных к деформации липосом являются трансферсомы. Трансферсомы можно получать путем добавления поверхностных пограничных активаторов, обычно поверхностно-активных веществ, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы, которые включают средство на основе iRNA, можно доставлять, например, подкожно путем инъекции для доставки средства на основе iRNA к кератиноцитам в коже. Для того, чтобы пройти сквозь неповрежденную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны проникнуть через ряд мелких пор, каждая диаметром менее 50 нм, под воздействием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, благодаря свойствам липидов, такие трансферсомы могут быть самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися, и, зачастую, могут достигать свои мишени без разделения на фрагменты, и часто могут быть самозагружающимися.

Другие составы, подходящие для практического осуществления настоящего изобретения, описаны, например, в публикации согласно РСТ № WO 2008/042973, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Трансферсомы представляют собой еще один тип липосом и являются высокодеформируемыми липидными агрегатами, которые являются перспективными кандидатами как средства для доставки лекарственных средств. Трансферсомы могут быть описаны как липидные капельки, которые обладают настолько высокой способностью деформироваться, что они легко могут проникать через поры, меньшие, чем капельки. Трансферсомы являются приспособляемыми к окружающей среде, в которой их используют,

например, они являются самооптимизирующимися (приспосабливаются к форме пор кожи), самовосстанавливающимися, зачастую достигают своих мишеней без разделения на фрагменты и часто могут быть самозагружающимися. Для получения трансферсом можно добавлять поверхностные пограничные активаторы, обычно поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы применяли для доставки сывороточного альбумина в кожу. Как было показано, опосредованная трансферсомами доставка сывороточного альбумина была такой же эффективной, как подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как эмульсии (в том числе микроэмульсии) и липосомы. Наиболее распространенным способом классифицирования и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как естественных, так и синтетических, является применение гидрофильно-липофильного баланса (HLB). Природа гидрофильной группы (также известной как "головка") предоставляет наиболее эффективное средство для распределения по категориям различных поверхностно-активных веществ, применяемых в составах (Rieger, в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизирована, то ее классифицируют как неионогенное поверхностно-активное вещество. Неионогенные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах, и их применяют при широком диапазоне значений pH. Обычно их значения HLB находятся в диапазоне от 2 до приблизительно 18, в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионогенные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные глицериловые эфиры, сложные полиглицериловые эфиры, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Неионогенные алканоамиды и простые эфиры, как например, этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блок-сополимеры, также

включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее распространенными представителями класса неионогенных 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, как например, омыляющие вещества, ациллактилаты, ациламидаминокислот, 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 омыляющие вещества.

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. Соли четвертичного аммония являются наиболее используемыми представителями данного класса.

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

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

iRNA для применения в способах по настоящему изобретению может также предлагаться в виде мицеллярных составов. "Мицеллы" в данном документе определены как конкретный тип молекулярной сборки, в которой амфипатические молекулы расположены в виде

сферической структуры, так что все гидрофобные части молекул направлены вовнутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Противоположное расположение имеет место, если окружающая среда гидрофобная.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через трансдермальные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции на основе siRNA, C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, экстракт ромашки, экстракт огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланил-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, простые эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканол-алкильные эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения можно добавлять одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться практически при любом типе смешивания ингредиентов, но для получения мицелл с меньшим размером требуется интенсивное перемешивание.

В одном способе получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию на основе siRNA и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Первую мицеллярную композицию затем смешивают по меньшей мере с тремя мицеллообразующими соединениями с образованием смешанной мицеллярной композиции. В другом способе мицеллярную композицию получают путем смешивания композиции на основе siRNA, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из мицеллообразующих соединений с последующим добавлением оставшихся мицеллообразующих соединений при интенсивном перемешивании.

Фенол и/или м-крезол можно добавлять к смешанной мицеллярной композиции для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. В качестве альтернативы фенол и/или м-крезол

можно добавлять с мицеллообразующими ингредиентами. Изотоническое средство, такое как глицерин, также можно добавлять после образования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде распыляемого раствора состав можно поместить в аэрозольный распылитель и распылитель зарядить газом-вытеснителем. Газ-вытеснитель, который пребывает под давлением, находится в жидкой форме в распылителе. Соотношения ингредиентов корректируют так, что водная фаза и фаза газа-вытеснителя становятся единым целым, т. е. присутствует одна фаза. Если присутствуют две фазы, то необходимо встряхнуть распылитель перед распылением порции содержимого, например, через дозирующий клапан. Распыляемая доза фармацевтического средства вытесняется из дозирующего клапана в виде мелкодисперсного распыляемого раствора.

Газы-вытеснители могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, простой диметилловый эфир и простой диэтиловый эфир. В определенных вариантах осуществления можно применять HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации основных ингредиентов могут быть определены путем проведения относительно простых экспериментов. Для абсорбции через ротовую полость часто требуется увеличить, например, по меньшей мере удвоить или утроить, дозу, предназначенную для инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

#### *В. Липидные частицы*

iRNA, например, dsRNA, по настоящему изобретению могут быть полностью инкапсулированы в липидном составе, например, LNP или другой частице на основе нуклеиновой кислоты-липид.

Используемый в данном документе термин "LNP" относится к стабильной частице нуклеиновой кислоты-липид. LNP, как правило, содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предупреждает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). LNP исключительно пригодны для системных применений, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в кровотоке после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливаются в дистальных

участках (например, участках, физически отделенных от места введения). LNP включают "pSPLP", которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, который изложен в публикации согласно РСТ № WO 00/03683. Средний диаметр частиц по настоящему изобретению обычно составляет от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, чаще от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, чаще от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм, наиболее часто от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, и они являются практически нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда присутствуют в частицах нуклеиновой кислоты-липида по настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к разрушению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыты, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации США № 2010/0324120 и публикации согласно РСТ № WO 96/40964.

В одном варианте осуществления соотношение липида и лекарственного средства (соотношение вес/вес) (например, соотношение липида и dsRNA) будет находится 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. Диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Катионный липид может представлять собой, например, хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTAP), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLenDMA), 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-дилинолеил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMA), хлористую соль 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), хлористую соль 1,2-дилинолеил-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-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или его аналоги, (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), (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)этилазандиол)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать от приблизительно 20 мол. % до приблизительно 50 мол. % или приблизительно 40 мол. % от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В другом варианте осуществления можно использовать соединение 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан для получения наночастиц на основе липида-siRNA. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в предварительной заявке на патент США номер 61/107998, поданной 23 октября 2008 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления частица на основе липида-siRNA включает 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана: 10% DSPC: 40% холестерина: 10% PEG-C-DMG (молярный процент) с размером частиц, составляющим  $63,0 \pm 20$  нм, и соотношением siRNA/липид, составляющим 0,027.

Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, в том числе без

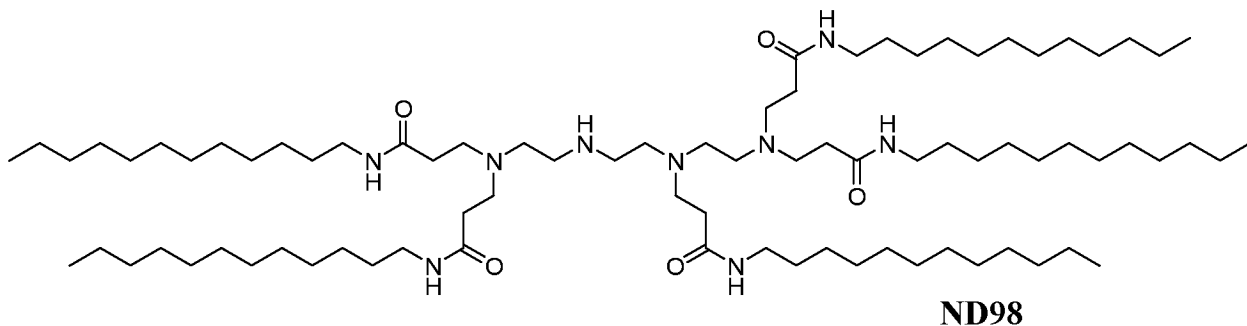
ограничения дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтанолламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтанолламин-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтанолламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтанолламин (SOPE), холестерин или их смесь. Содержание некатионного липида может составлять от приблизительно 5 мол. % до приблизительно 90 мол. %, приблизительно 10 мол. % или приблизительно 58 мол. %, если холестерин включен, от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

Конъюгированный липид, который препятствует агрегации частиц, может представлять собой, например, конъюгат полиэтиленгликоль (PEG)-липид, в том числе без ограничения PEG-диацилглицерин (DAG), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer) или их смесь. Конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил (C<sub>12</sub>), PEG-димиристоилоксипропил (C<sub>14</sub>), PEG-дипальмитилоксипропил (C<sub>16</sub>) или PEG-дистеарилоксипропил (C<sub>18</sub>). Содержание конъюгированного липида, который предупреждает агрегацию частиц, может составлять от 0 мол. % до приблизительно 20 мол. % или приблизительно 2 мол. % от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В некоторых вариантах осуществления частица на основе нуклеиновой кислоты-липиды дополнительно включает холестерин в количестве, например, от приблизительно 10 мол. % до приблизительно 60 мол. % или приблизительно 48 мол. % от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В одном варианте осуществления липидоид ND98·4HCl (MW 1487) (см. заявку на патент США № 12/056230, поданную 26 марта 2008 г., которая включена в данный документ посредством ссылки),

холестерин (Sigma-Aldrich) и PEG-церамид C16 (Avanti Polar Lipids) можно использовать для получения наночастиц на основе липида-dsRNA (т. е. частиц LNP01). Маточные растворы в этаноле каждого из них могут быть получены следующим образом: ND98, 133 мг/мл; холестерин, 25 мг/мл, PEG-церамид C16, 100 мг/мл. Маточные растворы ND98, холестерина и PEG-церамида C16 можно затем объединять, например, в молярном соотношении 42:48:10. Объединенный липидный раствор можно смешивать с водным раствором dsRNA (например, в ацетате натрия, pH 5) так, чтобы конечная концентрация этанола составляла приблизительно 35-45%, а конечная концентрация ацетата натрия составляла приблизительно 100-300 мМ. Наночастицы на основе липида-dsRNA обычно образуются самопроизвольно при смешивании. В зависимости от необходимого распределения частиц по размеру, полученную смесь наночастиц можно продавливать через поликарбонатную мембрану (например, с отсечением по размеру в 100 нм) с использованием, например, экструдера с термоцилиндром, как например, Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях стадию экструзии можно пропустить. Удаление этанола и одновременная замена буфера могут быть осуществлены, например, при помощи диализа или тангенциальной поточной фильтрации. Буфер можно заменить, например, фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) со значением pH, составляющим приблизительно 7, например, pH, составляющим приблизительно 6,9, pH, составляющим приблизительно 7,0, pH, составляющим приблизительно 7,1, pH, составляющим приблизительно 7,2, pH, составляющим приблизительно 7,3, или pH, составляющим приблизительно 7,4.



Формула 1

Составы LNP01 описаны, например, в публикации международной заявки № WO 2008/042973, которая настоящим включена при помощи ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы на основе липид-dsRNA описаны в таблице 1.

**Таблица 1**

|             | <b>Ионизируемый/катионный липид</b>                                                                                    | <b>Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид</b><br><b>Соотношение липид:siRNA</b> |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SNALP<br>-1 | 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)                                                                   | DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA<br>(57,1/7,1/34,4/1,4)<br>липид:siRNA ~ 7:1                             |
| 2-ХТС       | 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)                                                                | ХТС/DPPC/холестерин/PEG-cDMA<br>57,1/7,1/34,4/1,4<br>липид:siRNA ~ 7:1                                   |
| LNP05       | 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)                                                                | ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>57,5/7,5/31,5/3,5<br>липид:siRNA ~ 6:1                                    |
| LNP06       | 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)                                                                | ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>57,5/7,5/31,5/3,5<br>липид:siRNA ~ 11:1                                   |
| LNP07       | 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)                                                                | ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>60/7,5/31/1,5<br>липид:siRNA ~ 6:1                                        |
| LNP08       | 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)                                                                | ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>60/7,5/31/1,5<br>липид:siRNA ~ 11:1                                       |
| LNP09       | 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)                                                                | ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>липид:siRNA 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/PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>липид:siRNA 10:1                                     |

|       |                                                                                                                                                                   |                                                                                      |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| LNP11 | (6Z, 9Z, 28Z, 31Z) – гептатриаконт-<br>6, 9, 28, 31-тетраен-19-ил-4-<br>(диметиламино) бутаноат (MC3)                                                             | MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>липид:siRNA 10:1                   |
| LNP12 | 1,1'-(2-(4-(2-(2-(бис(2-<br>гидроксидодецил) амино) этил) (2-<br>гидроксидодецил) амино) этил) пипер-<br>азин-1-<br>ил) этилазандиил) дидодекан-2-ол<br>(Tech G1) | Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>липид:siRNA 10:1                |
| LNP13 | XTC                                                                                                                                                               | XTC/DSPC/холест./PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>липид:siRNA: 33:1                      |
| LNP14 | MC3                                                                                                                                                               | MC3/DSPC/холест./PEG-DMG<br>40/15/40/5<br>липид:siRNA: 11:1                          |
| LNP15 | MC3                                                                                                                                                               | MC3/DSPC/холест./PEG-DSG/GalNAc-<br>PEG-DSG<br>50/10/35/4,5/0,5<br>липид:siRNA: 11:1 |
| LNP16 | MC3                                                                                                                                                               | MC3/DSPC/холест./PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>липид:siRNA: 7:1                       |
| LNP17 | MC3                                                                                                                                                               | MC3/DSPC/холест./PEG-DSG<br>50/10/38,5/1,5<br>липид:siRNA: 10:1                      |
| LNP18 | MC3                                                                                                                                                               | MC3/DSPC/холест./PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>липид:siRNA: 12:1                      |
| LNP19 | MC3                                                                                                                                                               | MC3/DSPC/холест./PEG-DMG<br>50/10/35/5<br>липид:siRNA: 8:1                           |
| LNP20 | MC3                                                                                                                                                               | MC3/DSPC/холест./PEG-DPG<br>50/10/38,5/1,5<br>липид:siRNA: 10:1                      |
| LNP21 | C12-200                                                                                                                                                           | C12-200/DSPC/холест./PEG-DSG<br>50/10/38,5/1,5<br>липид:siRNA: 7:1                   |
| LNP22 | XTC                                                                                                                                                               | XTC/DSPC/холест./PEG-DSG<br>50/10/38,5/1,5<br>липид:siRNA: 10:1                      |

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин;

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин;

PEG-DMG: PEG-дидимиристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со ср. мол. весом 2000);

PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со ср. мол. весом 2000);

PEG-cDMA: PEG-карбамоил-1,2-димиристоилоксипропиламин (PEG со ср. мол. весом 2000).

Составы, содержащие SNALP (1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации № WO2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая включена посредством ссылки.

Содержащие ХТС составы описаны, например, в публикации согласно РСТ № WO 2010/088537, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Составы, содержащие MC3, описаны, например, в публикации США № 2010/0324120, поданной 10 июня 2010 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Содержащие ALNY-100 составы описаны, например, в публикации согласно РСТ № WO 2010/054406, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Содержащие C12-200 составы описаны в РСТ публикации согласно РСТ № WO 2010/129709, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики-саше, таблетки или минитаблетки. Могут потребоваться загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления составы для перорального введения являются такими, в которых dsRNA, описанные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или несколькими веществами, способствующими проникновению, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их

сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксиходезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюкохолевую кислоту, гликохолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидро-фузидат натрия 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-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации веществ, способствующих проникновению, например, жирные кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные вещества, способствующие проникновению, включают полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. DsRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть доставлены перорально, в форме гранул, в том числе частиц, высушенных распылением, или в комплексе с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают поли-аминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные виды желатина, альбумины, виды крахмала, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и виды крахмала; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, поллуланы, виды целлюлозы и виды крахмала. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминостирол

(например, п-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изотексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D, L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислот (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Составы для перорального введения для dsRNA и их получение описаны подробно в патенте США № 6887906, публикации патента США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), интратекального, интравентрикулярного или внутривенного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие соответствующие добавки, такие как без ограничения вещества, способствующие проникновению, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения растворы, эмульсии и содержащие липосомы составы. Такие композиции могут быть получены из ряда компонентов, который включает без ограничения предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. В частности, предпочтительными являются составы, которые целенаправленно воздействуют на печень при лечении заболеваний печени, таких как гепатокарцинома.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые в целях удобства могут находиться в виде единичной лекарственной формы, можно получать согласно традиционным методикам, хорошо известным в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию приведения активных ингредиентов во взаимодействие с фармацевтическим(фармацевтическими) носителем(носителями) или наполнителем(наполнителями). Как правило, составы получают путем равномерного и тщательного

приведения активных ингредиентов во взаимодействие с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или и первыми, и вторыми, а затем, при необходимости, придания продукту формы.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в какой-либо из многих возможных лекарственных форм, как например, без ограничения таблеток, капсул, желатиновых капсул, жидких сиропов, мягких гелей, суппозиторий и клизм. Композиции по настоящему изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии дополнительно могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

#### *С. Дополнительные составы*

##### *і. Эмульсии*

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, представляют собой гетерогенные системы одной жидкости, диспергированной в другой в форме капелек, в диаметре обычно превышающих 0,1 мкм (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешиваемые жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В тех случаях, когда водная фаза является

тонкораспыленной в общем объеме масляной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы в тех случаях, когда масляная фаза является мелкораспыленной в общем объеме водной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты дополнительно к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, масляной фазе, либо собственно в качестве отдельной фазы. Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, такие как например в случае эмульсий по типу "масло-в-воде-в-масле" (o/w/o) и "вода-в-масле-в-воде" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии по типу o/w включают маленькие водные капельки, составляют эмульсию по типу w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию по типу o/w/o.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической стабильностью либо ее отсутствием. Часто диспергированная или дисперсная фаза эмульсии хорошо диспергирована в дисперсионной или диспергирующей фазе и поддерживается в такой форме при помощи эмульгаторов или вязкости состава. Любая фаза эмульсии может быть полутвердой или твердой, как и в случае подобных эмульсии мазевых основ и кремов. Другие способы стабилизации эмульсий охватывают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы в целом можно разделить на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, природные эмульгаторы, абсорбирующие основы и

мелкодисперсные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как ПАВ, нашли широкое применение в составе эмульсий и рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную части. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного вещества называют гидрофильно-липофильным балансом (HLB), и оно является ценным инструментом в распределении на категории и выборе поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно разделить на различные классы в зависимости от природы гидрофильной группы: неионогенные, анионные, катионные и амфотерные (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, используемые в составах эмульсий, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбирующие основы, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин, обладают гидрофильными свойствами, так что они могут впитывать воду с образованием эмульсий по типу вода/масло, сохраняя при этом свою полутвердую

консистенцию. Тонкоизмельченные твердые вещества также использовали в качестве подходящих эмульгаторов, в особенности в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерил тристеарат.

Большое разнообразие неэмульгирующих материалов также включают в составы эмульсий, и они обуславливают определенные свойства эмульсий. К ним относятся жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Гидрофильные коллоиды или гидроколлоиды включают встречающиеся в природе смолы и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, гуммиарабик, агар, альгиновую кислоту, каррагенан, гуаровую камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу и карбоксипропилцеллюлозу) и синтетические полимеры (например, карбомеры, простые эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии путем образования прочных межфазных пленок вокруг капелек диспергированной фазы и путем повышения вязкости дисперсионной фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат некоторое количество ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут легко поддерживать рост микробов, то такие составы часто включают консерванты. Широко используемые консерванты, включенные в составы эмульсий, включают метилпарабен,

пропилпарабен, соли четвертичного аммония, бензалкония хлорид, сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты и борную кислоту. Антиоксиданты также обычно добавляют к составам эмульсий для предупреждения ухудшения качества состава. Используемые антиоксиданты могут быть акцепторами свободных радикалов, как например, токоферолы, алкил галлаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановителями, такими как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и синергистами антиоксидантов, такими как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их получения рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Из-за простоты составления, а также эффективности с точки зрения абсорбции и биодоступности широкое применение получили эмульсионные составы для пероральной доставки (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минеральных масел, жирорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира находятся в числе материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий по типу масло/вода.

#### *ii. Микроэмульсии*

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции на основе iRNA и нуклеиновых кислот составлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система

воды, масла и амфифила, которая является единственным оптически изотропным и термодинамически стабильным жидким раствором (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии являются системами, которые получают сперва путем диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи для образования прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически устойчивые, изотропно чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируются межфазными пленками поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Микроэмульсии обычно получают путем объединения от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. Является ли микроэмульсия микроэмульсией по типу "вода в масле" (w/o) или "масло в воде" (o/w), зависит от свойств используемых масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Был тщательно проработан феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм, и это дало специалисту в данной области обширные познания о том, как составлять микроэмульсии (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.

245; Block, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). По сравнению с традиционными эмульсиями микроэмульсии имеют преимущество солюбилизации водонерастворимых лекарственных средств в составе термодинамически стабильных капелек, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают без ограничения ионные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, простые полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокапрат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), декаглицерина секвиолеат (SO750), декаглицерина декаолеат (DAO750) отдельно или в комбинации с вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно являющееся спиртом с короткой цепью, таким как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести путем проникновения в пленку из поверхностно-активного вещества и соответственно создания неупорядоченной пленки из-за пустого пространства, образующегося среди молекул поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без использования вторичных поверхностно-активных веществ, и в данной области известны самоэмульгирующиеся системы микроэмульсий без спирта. Водной фазой, как правило, без ограничения может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать в себя без ограничения такие материалы, как Captex 300, Captex 355, Carmul MSM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C8-C12) моно-, ди- и триглицериды, сложные полиоксиэтилированные эфиры жирных кислот и глицерила, жирные спирты, полиглицеролизированные глицериды, насыщенные полиглицеролизированные C8-C10глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения растворимости лекарственного средства и повышенной абсорбции лекарственных средств. Липидные микроэмульсии (и масло в воде, и вода в масле) были предложены для увеличения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патенты США № 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества в виде улучшенной растворимости лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного увеличения абсорбции лекарственного средства за счет индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести мембран и проницаемости, удобства получения, удобства перорального введения по сравнению с твердой лекарственной формой, улучшенной клинической активностью и пониженной токсичности (см., например, патенты США № 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты объединяют при температуре окружающей среды. Это может быть в особенности преимущественным, когда составляют термолабильные лекарственные средства, пептиды или iRNA. Микроэмульсии также были эффективными при трансдермальной доставке активных компонентов как при косметических, так и при фармацевтических применениях. Предполагается, что композиции и составы микроэмульсий по настоящему изобретению будут способствовать повышенной системной абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшать локальное клеточное поглощение iRNA и нуклеиновых кислот.

Микроэмульсии по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), Labrasol и вещества, способствующие проникновению, для улучшения свойств состава и для повышения абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Вещества, способствующие проникновению,

используемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, могут быть классифицированы, как принадлежащие к одной из пяти основных категорий – поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие вещества, отличные от поверхностно-активных веществ (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Каждый из этих классов рассмотрен выше.

#### *iii. Микрочастицы*

Средство на основе iRNA по настоящему изобретению может быть включено в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы можно получать при помощи высушивания распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдоожиженном слое, сушкой в вакууме или при помощи комбинации этих методик.

#### *iv. Вещества, способствующие проникновению*

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении применяют разнообразные вещества, способствующие проникновению, для воздействия на эффективную доставку нуклеиновых кислот, в частности iRNA, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной форме. Однако, как правило, только жирорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрана, через которую необходимо пройти, обработана веществом, способствующим проникновению. Вдобавок к содействию диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны вещества, способствующие проникновению, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Вещества, способствующие проникновению, могут быть классифицированы, как принадлежащие к одной из пяти основных категорий, т. е. поверхностно-активным веществам, жирным кислотам, солям желчных кислот, хелатирующим средствам и нехелатирующим веществам, отличным от поверхностно-активных

веществ (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Каждый из вышеуказанных классов веществ, способствующих проникновению, описан ниже более подробно.

Поверхностно-активные вещества (или "сурфактанты") являются химическими структурными единицами, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего повышается абсорбция iRNA через слизистую. Помимо солей желчных кислот и жирных кислот, эти вещества, способствующие проникновению, включают, например, лаурилсульфат натрия, простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и простой полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92); и перфторированные эмульсии, такие как FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые действуют как вещества, способствующие проникновению, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахионовую кислоту, глицерин 1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их сложные C1-20алкильные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т. е. олеат, лаурат, капрат, миридат, пальмитат, стеарат, линолеат и т. д.) (см., например, Touitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7,

1-33; El Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает содействие в распределении и абсорбции липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Разные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют как вещества, способствующие проникновению. Таким образом, термин "соли желчных кислот" включает любые встречающиеся в природе компоненты желчи, а также любые из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюкохолевую кислоту (глюкохолат натрия), гликохолевую кислоту (гликохолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), таурodeзоксихолевую кислоту (таурodeзоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидро-фузидат натрия (STDHF), гликодигидрофузидат натрия и простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (POE) (см. например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583).

Хелатирующие средства, используемые применительно к настоящему изобретению, можно определить как соединения, которые удаляют ионы металла из раствора путем образования комплексов с

ними, в результате чего повышается абсорбция iRNA через слизистую. В отношении их применения в качестве веществ, способствующих проникновению, в настоящем изобретении хелатирующие средства обладают дополнительным преимуществом, также выступая в качестве ингибиторов ДНКазы, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют двухвалентный ион металла для катализа и таким образом ингибируются хелатирующими средствами (Jarrett, J. *Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие средства включают без ограничения динатриевый этилендиаминтетраацетат (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомовалинат), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетонных (енамины) (см. например, Katdare, A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Используемые в данном документе нехелатирующие соединения, отличные от поверхностно-активных веществ, которые способствуют проникновению, могут быть определены как соединения, которые проявляют небольшую активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые тем не менее повышают абсорбцию iRNA через слизистую пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Этот класс веществ, способствующих проникновению, включает, например, ненасыщенные цикломочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазацикло-алканона (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92) и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Средства, которые повышают захват iRNA на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям по

настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка согласно РСТ WO 97/30731), также, как известно, усиливают захват dsRNA клетками. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), iRNAMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции XtremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass<sup>a</sup> D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytfectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции

BaculoPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Для повышения проникновения введенных нуклеиновых кислот можно использовать другие средства, в том числе гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

#### *v. Носители*

Определенные композиции по настоящему изобретению также содержат в составе соединения-носители. Как используется в данном документе, термины "соединение-носитель" или "носитель" могут означать нуклеиновую кислоту или ее аналог, которые являются инертными (т. е. сами по себе не обладают биологической активностью), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты *in vivo* процессами, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты, обладающей биологической активностью, например, путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или путем содействия ее удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, обычно с избытком последнего вещества, может привести к существенному сокращению количества нуклеиновой кислоты, извлекаемого в печени, почках или других внесосудистых депо, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, извлечение частично фосфоротиоатной dsRNA тканью печени может быть сокращено при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетиамидо-4'-изотиоцианостильбен-2,2'-дисульфокислотой (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

#### *vi. Наполнители*

В отличие от соединения-носителя "фармацевтический носитель" или "наполнитель" представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или любое другое фармакологически инертное средство для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот в организм животного. Наполнитель может быть жидким или твердым веществом и его выбирают с учетом предполагаемого способа введения с тем, чтобы обеспечить необходимый объем, консистенцию и т. д., при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают без ограничения связывающие средства (например, прежелатинизированный маисовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т. д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или вторичный кислый фосфат кальция и т. д.); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т. д.); разрыхлители (например, крахмал, натрия крахмалгликолат и т. д.) и смачивающие средства (например, лаурилсульфат натрия и т. д.).

Также для составления композиций по настоящему изобретению можно применять фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

Составы для местного введения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие

подходящие добавки. Можно использовать фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые наполнители включают без ограничения воду, солевые растворы, спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

#### *vii. Другие компоненты*

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, традиционно встречающиеся в фармацевтических композициях, при уровнях применения, установленных в данной области. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные материалы, применимые для физического составления композиций по настоящему изобретению в различных лекарственных формах, такие как красители, ароматизирующие вещества, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны в значительной степени препятствовать проявлению биологических активностей компонентов композиций по настоящему изобретению. Составы могут быть стерильными и, при необходимости, их можно смешивать со вспомогательными средствами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для воздействия на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами и/или отдушками и т. п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновой (нуклеиновыми) кислотой (кислотами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например,

карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, включают (a) одно или несколько соединений на основе iRNA и (b) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от iRNA, и которые применимы в лечении инфекции HBV. К примерам таких средств относятся без ограничения противовирусные средства, направленные на подавление или разрушение HBV путем нарушения репликации вируса; и иммуномодуляторы, направленные на стимуляцию иммунной системы человека для защиты от вируса. И напротив, иммуномодуляторы, такие как кортикостероиды, которые индуцируют повышенную экспрессию вируса и вирусных антигенов и супрессию функции Т-лимфоцитов, или аденин-арабинозид, ацикловир или дидезоксинозин, являются нецелесообразными для лечения хронического гепатита В. Подходящие средства рассмотрены подробнее ниже.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (дозы, летальной для 50% группы) и ED50 (дозы, терапевтически эффективной для 50% группы). Соотношение доз между токсичным и терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом, и его можно выражать как соотношение LD50/ED50. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные в анализах с клеточными культурами и исследованиях на животных, можно использовать при составлении ряда доз для применения у людей. В настоящем изобретении доза композиций, описанных в данном документе, как правило, находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включают ED50 с малой токсичностью или без таковой. Доза может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемых лекарственной формы и пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, описанных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную

дозу можно первоначально установить по результатам анализов с клеточными культурами. Доза может быть составлена для животных моделей для получения диапазона циркулирующей концентрации в плазме крови соединения или, при необходимости, полипептидного продукта целевой последовательности (например, достижения уменьшенной концентрации полипептида), что включает IC50 (т. е. концентрацию исследуемого соединения, при помощи которой достигают полумаксимальное ингибирование симптомов), при определении на клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения применимой у людей дозы. Уровни в плазме крови можно измерять, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, рассматриваемому выше, iRNA, описанные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией HBV. В любом случае, курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения iRNA, исходя из результатов, наблюдаемых при использовании стандартных средств измерения эффективности, известных в данной области или описанных в данном документе.

## **VII. Способы по настоящему изобретению**

Настоящее изобретение предлагает терапевтические и профилактические способы, которые предусматривают введение субъекту с инфекцией HBV, и/или с ассоциированным с HBV заболеванием, нарушением и/или состоянием, или который склонен к развитию, ассоциированного с HBV заболевания, нарушения и/или состояния (например, CHB), композиций, содержащих средство на основе iRNA, или фармацевтических композиций, содержащих средство на основе iRNA, или векторов, содержащих iRNA по настоящему изобретению.

Способы по настоящему изобретению применимы для лечения субъекта с инфекцией HBV, например, субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена HBV и/или репликации HBV. В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы снижения уровня cccDNA вируса гепатита В у

субъекта, инфицированного HBV. В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы снижения уровня антигена HBV, например, HBsAg и/или HBeAg, у субъекта, инфицированного HBV. В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы снижения вирусной нагрузки, создаваемой HBV, у субъекта, инфицированного HBV. Настоящее изобретение также предлагает способы снижения уровня аланинаминотрансферазы (ALT) и/или аспартатаминотрансферазы (AST) у субъекта, инфицированного HBV. В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы повышения уровня антител к HBV у субъекта, инфицированного HBV. В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с инфекцией HBV. В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения субъекта с ассоциированным с HBV заболеванием, например, инфекции, вызванной вирусом гепатита D, дельта-гепатита, острого гепатита В; острого молниеносного гепатита В; хронического гепатита В; фиброза печени; терминальной стадии заболевания печени; гепатоцеллюлярной карциномы. Кроме того, поскольку инфекция HDV зависит от обязательных хелперных функций, обеспечиваемых HBV для передачи, а субъекты с инфекцией HBV также могут иметь инфекцию HDV, описанные в данном документе способы лечения также пригодны для лечения субъекта с инфекцией HDV и/или ассоциированного с HDV нарушения, такого как инфекция, вызванная вирусом гепатита В, хроническая инфекция, вызванная вирусом гепатита В (CHB), хроническая инфекция, вызванная вирусом гепатита В (CHB), цирроз, печеночная недостаточность и гепатоцеллюлярная карцинома (HCC). Способы лечения (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например, человеку, терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген HBV, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующих на ген HBV, или вектора по настоящему изобретению, содержащего средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген HBV.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с инфекцией HBV, например, с присутствием сссDNA HBV в сыворотке крови и/или печени, присутствием ДНК HBV в сыворотке крови, присутствием антигена HBV в сыворотке крови и/или печени, например, HBsAg и/или HBeAg, повышенным уровнем ALT, повышенным уровнем AST, отсутствием или низким уровнем антител к HBV, повреждением печени; циррозом; дельта-гепатитом, острым гепатитом В; острым молниеносным гепатитом В; хроническим гепатитом В; фиброзом печени; конечной стадией заболевания печени; гепатоцеллюлярной карциномой; сывороточно-подобным синдромом; анорексией; тошнотой; рвотой, субфебрильной температурой тела; миалгией; утомляемостью; нарушенными вкусовыми и обонятельными функциями (отвращением к пище и сигаретам); и/или болью в правом верхнем квадранте и в эпигастральной области (эпизодической, от легкой до умеренной); печеночной энцефалопатией; сонливостью; нарушением сна; спутанностью сознания; комой; асцитом; кровотечениями в желудочно-кишечном тракте; коагулопатией; желтухой; гепатомегалией (слабо увеличенной, мягкой печенью); спленомегалией; ладонной эритемой; паукообразной гемангиомой; атрофией мышц; формой звездчатой ангиомы; васкулитом; варикозным кровотечением; периферическими отеками; гинекомастией; атрофией яичек; расширением коллатеральных вен живота ("головой медузы"); высокими уровнями аланинаминотрансферазы (ALT) и аспаратаминотрансферазы (AST) в диапазоне 1000-2000 МЕ/мл, хотя также могут быть выявлены значения в 100 раз превышающие верхнюю границу нормы (ULN); уровнями ALT, превышающими уровни AST; повышенными уровнями гамма-глутамилтранспептидазы (GGT) и щелочной фосфатазы (ALP) (например, не более чем в 3 раза превышающими ULN); незначительно сниженными уровнями альбумина; повышенными уровнями железа в сыворотке крови; лейкопенией (т. е. гранулоцитопенией); лимфоцитозом; повышенной скоростью оседания эритроцитов (ESR); сниженной продолжительностью жизни эритроцитов; гемолизом; тромбоцитопенией; удлинением международного нормализованного отношения (INR); присутствием в

сыворотке крови и/или печени HBsAg, HBeAg, антитела к коровому белку вируса гепатита В (антитела к HBc) в форме иммуноглобулина М (IgM); антителом к поверхностному антигену вируса гепатита В (антителом к HBs), антителом к поверхностному антигену вируса гепатита В (антителом к HBe) и/или ДНК HBV; повышенными уровнями аминотрансфераз ( $\leq 5$  раз от ULN); уровнями ALT, превышающими уровни AST; повышенными уровнями билирубина, удлинённым протромбиновым временем (PT); гиперглобулинемией; присутствием неспецифических для тканей антител, таких как антитела к клеткам гладких мышц (ASMA) или антиядерные антитела (ANA) (10-20%); присутствием тканеспецифических антител, таких как антитела к клеткам щитовидной железы (10-20%); повышенными уровнями ревматоидного фактора (RF); гипербилирубинемией, удлинённым PT, низким уровнем тромбоцитов и лейкоцитов, уровнями AST, превышающими уровни ALT; повышенными уровнями щелочной фосфатазы (ALP) и GGT; печеночными дольками с дегенеративными и регенеративными гепатоцеллюлярными изменениями и сопутствующим воспалением; преимущественно центрилобулярным некрозом. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA, например, dsRNA, фармацевтических композиций или векторов по настоящему изобретению, за счет чего обеспечивается предупреждение по меньшей мере одного симптома у субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена HBV, у такого как субъект с инфекцией HBV или субъект с инфекцией и HBV, и HDV.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает применение терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA по настоящему изобретению для лечения субъекта, например, субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена HBV, у такого как субъект с инфекцией HBV или субъект с инфекцией и HBV, и HDV.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предлагает применения средства на основе iRNA, например, dsRNA по

настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген HBV, или фармацевтические композиции, содержащие средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген HBV, в изготовлении лекарственного препарата для лечения субъекта, например, субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена HBV и/или репликации HBV, такового как субъект с инфекцией HBV, или субъект с инфекцией и HBV, и HDV, и субъект с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена HBV, например, ассоциированным с HBV заболеванием.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает применения iRNA, например, dsRNA по настоящему изобретению для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена HBV и/или репликации HBV.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предлагает применения средства на основе iRNA по настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена HBV и/или репликации HBV, такового как ассоциированное с HBV заболевание.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на HBV, вводят субъекту с инфекцией HBV или инфекцией как HBV, так и HDV, и/или ассоциированным с HBV заболеванием, так, чтобы экспрессия одного или нескольких генов HBV, уровни cccDNA HBV, уровни антигена HBV, уровни вирусной нагрузки HBV, ALT и/или AST, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или жидкости субъекта, снижались по меньшей мере на приблизительно 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%,

66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или по меньшей мере на приблизительно 99% или больше, при введении субъекту средства на основе dsRNA.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на HBV, вводят субъекту с инфекцией HBV или инфекцией и HBV, и HDV, и/или ассоциированным с HBV заболеванием с тем, чтобы уровень антител к HBV, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или жидкости субъекта, повышался по меньшей мере на приблизительно 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или по меньшей мере на приблизительно 99% или больше, при введении субъекту средства на основе dsRNA.

Способы и применения по настоящему изобретению включают введение композиции, описанной в данном документе, так, что экспрессия целевого гена HBV понижается, как например на приблизительно 1, 2, 3, 4 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 или приблизительно 80 часов. В одном варианте осуществления экспрессия целевого гена HBV понижается на длительный срок, например, по меньшей мере на приблизительно два, три, четыре, пять, шесть, семь дней или дольше, например, на приблизительно одну неделю, две недели, три недели или на приблизительно четыре недели или дольше.

Введение dsRNA в соответствии со способами и применениями по настоящему изобретению может приводить в результате к снижению тяжести, ослаблению выраженности признаков, симптомов и/или маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента с инфекцией HBV или инфекцией и HBV, и HDV, и/или ассоциированным с HBV заболеванием. Под "снижением" в данном контексте

подразумевает статистически значимое снижение такого уровня. Снижение, например, может составлять по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или приблизительно 100%.

Эффективность лечения или предупреждения заболевания можно оценивать, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного препарата, необходимой для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, соответствующего данному заболеванию, лечение которого осуществляют или предупреждение которого предусматривают. Контролирование эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров находится в компетенции специалиста в данной области. Например, эффективность лечения СНВ можно оценить, например, с помощью периодического контроля вирусной нагрузки и уровней трансаминаз. При помощи сравнения последующих данных с исходными данными врач получает показатель того, является ли лечение эффективным. Контролирование эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров находится в компетенции специалиста в данной области. Применительно к введению iRNA, целенаправленно воздействующей на HBV, или фармацевтической композиции на ее основе, "эффективная в отношении" заболевания, ассоциированного с HBV, указывает на то, что введение клинически приемлемым способом приводит в результате к благоприятному действию по меньшей мере у статистически значимой доли пациентов, к такому как ослабление симптомов, излечение, снижение степени заболевания, продление продолжительности жизни, улучшение качества жизни или другой эффект, обычно считающийся положительным врачом, знакомым с лечением инфекции HBV и/или ассоциированного с HBV заболевания и подобными случаями.

Лечебный или предупредительный эффект является очевидным, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или

нескольких параметров болезненного состояния, или по отсутствию усугубления или развития симптомов в тех случаях, когда их, при иных обстоятельствах, прогнозировали. В качестве примера, благоприятное изменение измеряемого параметра заболевания по меньшей мере на 10% и предпочтительно по меньшей мере на 20%, на 30%, на 40%, на 50% или больше может служить показателем эффективного лечения. Об эффективности данного лекарственного средства на основе iRNA или состава с таким лекарственным средством можно также судить при помощи экспериментальной животной модели данного заболевания, которая известна в данной области. При использовании экспериментальной животной модели, эффективность лечения доказана, когда наблюдают статистически значимое снижение маркера или ослабление симптома.

Субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как например, приблизительно 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,35 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,45 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,55 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,65 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,75 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,85 мг/кг, 0,9 мг/кг, 0,95 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,3 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,6 мг/кг, 1,7 мг/кг, 1,8 мг/кг, 1,9 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,1 мг/кг, 2,2 мг/кг, 2,3 мг/кг, 2,4 мг/кг, 2,5 мг/кг dsRNA, 2,6 мг/кг dsRNA, 2,7 мг/кг dsRNA, 2,8 мг/кг dsRNA, 2,9 мг/кг dsRNA, 3,0 мг/кг dsRNA, 3,1 мг/кг dsRNA, 3,2 мг/кг dsRNA, 3,3 мг/кг dsRNA, 3,4 мг/кг dsRNA, 3,5 мг/кг dsRNA, 3,6 мг/кг dsRNA, 3,7 мг/кг dsRNA, 3,8 мг/кг dsRNA, 3,9 мг/кг dsRNA, 4,0 мг/кг dsRNA, 4,1 мг/кг dsRNA, 4,2 мг/кг dsRNA, 4,3 мг/кг dsRNA, 4,4 мг/кг dsRNA, 4,5 мг/кг dsRNA, 4,6 мг/кг dsRNA, 4,7 мг/кг dsRNA, 4,8 мг/кг dsRNA, 4,9 мг/кг dsRNA, 5,0 мг/кг dsRNA, 5,1 мг/кг dsRNA, 5,2 мг/кг dsRNA, 5,3 мг/кг dsRNA, 5,4 мг/кг dsRNA, 5,5 мг/кг dsRNA, 5,6 мг/кг dsRNA, 5,7 мг/кг dsRNA, 5,8 мг/кг dsRNA, 5,9 мг/кг dsRNA, 6,0 мг/кг dsRNA, 6,1 мг/кг dsRNA, 6,2 мг/кг dsRNA, 6,3 мг/кг dsRNA, 6,4 мг/кг dsRNA, 6,5 мг/кг dsRNA, 6,6 мг/кг dsRNA, 6,7 мг/кг dsRNA, 6,8 мг/кг dsRNA, 6,9 мг/кг dsRNA, 7,0 мг/кг dsRNA, 7,1 мг/кг dsRNA, 7,2 мг/кг dsRNA, 7,3 мг/кг dsRNA, 7,4 мг/кг dsRNA, 7,5 мг/кг dsRNA, 7,6 мг/кг dsRNA, 7,7 мг/кг dsRNA, 7,8 мг/кг

dsRNA, 7,9 мг/кг dsRNA, 8,0 мг/кг dsRNA, 8,1 мг/кг dsRNA, 8,2 мг/кг dsRNA, 8,3 мг/кг dsRNA, 8,4 мг/кг dsRNA, 8,5 мг/кг dsRNA, 8,6 мг/кг dsRNA, 8,7 мг/кг dsRNA, 8,8 мг/кг dsRNA, 8,9 мг/кг dsRNA, 9,0 мг/кг dsRNA, 9,1 мг/кг dsRNA, 9,2 мг/кг dsRNA, 9,3 мг/кг dsRNA, 9,4 мг/кг dsRNA, 9,5 мг/кг dsRNA, 9,6 мг/кг dsRNA, 9,7 мг/кг dsRNA, 9,8 мг/кг dsRNA, 9,9 мг/кг dsRNA, 9,0 мг/кг dsRNA, 10 мг/кг dsRNA, 15 мг/кг dsRNA, 20 мг/кг dsRNA, 25 мг/кг dsRNA, 30 мг/кг dsRNA, 35 мг/кг dsRNA, 40 мг/кг dsRNA, 45 мг/кг dsRNA или приблизительно 50 мг/кг dsRNA. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления, например, если композиция по настоящему изобретению содержит dsRNA, которая описана в данном документе, и липид, субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как например, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,4 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,4 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 2,5 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 3 мг/кг до

приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3,5 мг/кг до  
 приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 мг/кг до  
 приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4,5 мг/кг до  
 приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 4,5 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5,5 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 6 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 6,5 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 7 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 7,5 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 8 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 8,5 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 9 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 9,5 мг/кг до  
 приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по  
 отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как  
 часть настоящего изобретения.

Например, dsRNA можно вводить в дозе, составляющей  
 приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,  
 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3,  
 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6,  
 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9,  
 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2,  
 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5,  
 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8,  
 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или  
 приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по  
 отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как  
 часть настоящего изобретения.

В других вариантах осуществления, например, где композиция  
 по настоящему изобретению содержит dsRNA, которая описана в  
 данном документе, и N-ацетилгалактозамин, субъектам можно  
 вводить терапевтическое количество iRNA, как например, дозу,  
 составляющую от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/кг,  
 от приблизительно 0,25 до приблизительно 50 мг/кг, от

[illegible]

[illegible]

0,75 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг или от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг. В одном варианте осуществления, где композиция по настоящему изобретению содержит dsRNA, которая описана в данном документе, и N-ацетилгалактозамин, субъекту можно вводить терапевтическое количество, составляющее от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг dsRNA. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Например, субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, такое как приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, например, когда двухнитевое средство для RNAi

включает в себя модификацию (например, один или несколько мотивов из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов), включающую один такой мотив в сайте расщепления средства или рядом с ним, шесть фосфоротиоатных связей и лиганд, такое средство вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,04 до

приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,04 до  
 приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,04 до  
 приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,04 до  
 приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до  
 приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до  
 приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до  
 приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до  
 приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,05 до  
 приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,05 до  
 приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,05 до  
 приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,05 до  
 приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,05 до  
 приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до  
 приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до  
 приблизительно 0,08 мг/кг или от приблизительно 0,05 мг/кг до  
 приблизительно 0,07 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные  
 по отношению к вышеупомянутым значениям, также являются частью  
 настоящего изобретения, например, средство для RNAi можно  
 вводить субъекту в дозе, составляющей от приблизительно 0,015  
 мг/кг до приблизительно 0,45 мг/кг.

Например, средство для RNAi, например, средство для RNAi в  
 фармацевтической композиции, можно вводить в дозе, составляющей  
 приблизительно 0,01 мг/кг, 0,0125 мг/кг, 0,015 мг/кг, 0,0175  
 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,0225 мг/кг, 0,025 мг/кг, 0,0275 мг/кг, 0,03  
 мг/кг, 0,0325 мг/кг, 0,035 мг/кг, 0,0375 мг/кг, 0,04 мг/кг,  
 0,0425 мг/кг, 0,045 мг/кг, 0,0475 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,0525  
 мг/кг, 0,055 мг/кг, 0,0575 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,0625 мг/кг,  
 0,065 мг/кг, 0,0675 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,0725 мг/кг, 0,075  
 мг/кг, 0,0775 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,0825 мг/кг, 0,085 мг/кг,  
 0,0875 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,0925 мг/кг, 0,095 мг/кг, 0,0975  
 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,125 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,175 мг/кг, 0,2  
 мг/кг, 0,225 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,275 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,325  
 мг/кг, 0,35 мг/кг, 0,375 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,425 мг/кг, 0,45  
 мг/кг, 0,475 мг/кг или приблизительно 0,5 мг/кг. Значения,  
 промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также  
 являются частью настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 100 мг до приблизительно 900 мг, например, от приблизительно 100 мг до приблизительно 850 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 750 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 850 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 750 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 850 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 750 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 850 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 750 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 550 мг или от приблизительно 400 мг до приблизительно 500 мг.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 100 мг, приблизительно 125 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 175 мг, 200 мг, приблизительно 225 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 275 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 325 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 475 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 525 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 575 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 625 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 675 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 725 мг, приблизительно 750 мг, приблизительно 775 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 825 мг, приблизительно 850 мг, приблизительно 875 мг или приблизительно 900 мг.

iRNA может быть введена путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, например, в течение 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или примерно 25-минутного периода. Введение можно повторять, например, регулярно, как например, один раз в неделю, один раз в две недели (т. е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После проведения режима первичного лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Например, после введения один раз в неделю или один раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше.

Введение iRNA может уменьшить присутствие ссcDNA HBV в сыворотке крови и/или печени, присутствие антигена HBV в сыворотке крови и/или печени, например, HBsAg и/или HBeAg, уровни ALT и/или уровни AST, например, в клетке, ткани, крови, моче или другом компартменте пациента, по меньшей мере на приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%,

68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или по меньшей мере на приблизительно 99% или больше, например, ниже уровня детекции в анализе.

Введение iRNA может увеличить присутствие антител к HBV в сыворотке крови и/или печени, например, в клетке, ткани, крови, моче или других компартментах пациента по меньшей мере на приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на приблизительно 99% или больше.

Перед введением полной дозы iRNA пациентам можно вводить меньшую дозу, как например, 5% инфузию и наблюдать их в отношении отрицательного эффекта, как например, аллергических реакций. В другом примере пациента можно наблюдать в отношении нежелательных иммуностимулирующих эффектов, как например, повышенных уровней цитокина (например, TNF-альфа или INF-альфа).

Благодаря ингибиторным эффектам в отношении экспрессии HBV, композиция в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическая композиция, полученная из нее, могут повышать качество жизни.

iRNA по настоящему изобретению можно вводить в "голой" форме, где модифицированное или немодифицированное средство на основе iRNA суспендируют непосредственно в водном или подходящем буферном растворе, в виде "свободной iRNA." Свободную iRNA вводят в отсутствие фармацевтической композиции. Свободная iRNA может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Значение pH и осмолярность буферного раствора,

содержащего iRNA, можно корректировать с тем, чтобы он подходил для введения субъекту.

Альтернативно iRNA по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомный состав с dsRNA.

Субъекты, которые будут испытывать облегчение в результате снижения и/или ингибирования экспрессии гена HBV, представляют собой субъектов с инфекцией HBV и/или с ассоциированным с HBV заболеванием или нарушением, которые описаны в данном документе.

Лечение субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена HBV, включает лечение в терапевтических и профилактических целях.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает способы и применения средства на основе iRNA или фармацевтической композиции ее основе для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена HBV, например, субъекта с ассоциированным с HBV заболеванием, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими способами терапии, например, с помощью известных фармацевтических препаратов и/или известных способов терапии, таких как, например, применяемые в настоящее время для лечения данных нарушений.

Например, в определенных вариантах осуществления iRNA, целенаправленно воздействующую на один или несколько генов HBV, вводят в комбинации, например, со средством, подходящим для лечения ассоциированного с HBV заболевания, которое описано в другом месте данного документа. Например, дополнительные терапевтические средства и способы терапии, подходящие для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии HBV, например, субъекта с ассоциированным с HBV заболеванием, включают средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на другую часть генома HBV, противовирусное средство, ингибитор обратной транскриптазы (например, тенофовир дизопроксил фумарат (TDF), тенофовир алафенамид, ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин и AGX-1009), иммуностимулятор (например,

пегилированный интерферон альфа-2а (PEG-IFN- $\alpha$ 2а), интерферон альфа-2b, рекомбинантный человеческий интерлейкин-7 и агонист Toll-подобного рецептора 7 (TLR7)), терапевтическую вакцину (например, GS-4774, DV-601 и TG1050), ингибитор проникновения вируса (например, Myrcludex), олигонуклеотид, который ингибирует секрецию или высвобождение HbsAg (например, REP 9AC), ингибитор сборки капсида (например, Bay41-4109 и NVR-1221), ингибитор образования cccDNA (например, IHVR-25) или другие терапевтические средства и/или процедуры, например, трансплантацию печени, химиотерапию, для лечения ассоциированного с HBV заболевания, комбинацию любого из вышеперечисленных.

В определенных вариантах осуществления первое средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на один или несколько генов HBV, вводят в комбинации со вторым средством на основе iRNA, целенаправленно воздействующим на другую часть генома HBV. Например, первое средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на один или несколько структурных генов, можно вводить в комбинации со вторым средством для RNAi, целенаправленно воздействующим на ген X. Например, первое средство для RNAi содержит первую смысловую нить и первую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды указанной первой смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной первой антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где первая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; а второе средство для RNAi содержит вторую смысловую нить и вторую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где, по сути, все нуклеотиды второй смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды указанной второй антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где вторая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно

или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; где первая смысловая нить содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'-UCGUGGUGGACUUCUCUCA-3' (SEQ IDNO:5),

5'-GUGCACUUCGCUUCACCUCUA-3' (SEQ IDNO:7),

5'-CGUGGUGGACUUCUCUCAUU-3' (SEQ IDNO:9),

5'-CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU-3' (SEQ IDNO:37),

5'-GGUGGACUUCUCUCAUUUUUA-3' (SEQ IDNO:11), и

5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ IDNO:39) (или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине какой-либо из вышеуказанных нуклеотидных последовательностей), и где каждая из первой и второй антисмысловых нитей независимо содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'-UGAGAGAAGUCCACCACGAUU-3' (SEQ ID NO:6);

5'-UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU-3' (SEQ ID NO:8);

5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG-3' (SEQ ID NO:10);

5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU-3' (SEQ ID NO:38),

5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO:12), и

5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO:40) (или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична по всей своей длине какой-либо из вышеуказанных нуклеотидных последовательностей), за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды первой и второй смысловой нити и/или все нуклеотиды первой и второй антисмысловой нити имеют модификацию.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного

нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-аминомодифицированного 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 не встречающиеся в природе основания, 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 миметик 5'-фосфата.

В определенных вариантах осуществления первое средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на один или несколько генов HBV, вводят в комбинации со вторым средством на основе iRNA, целенаправленно воздействующим на ген, который отличается от одного или нескольких генов HBV. Например, средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на один или несколько генов HBV, можно вводить в комбинации со средством на основе iRNA, целенаправленно воздействующим на ген CD274/PD-L1. Примеры средств на основе iRNA, целенаправленно воздействующих на ген CD274/PD-L1, описаны в WO 2011/127180, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Первое средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на один или несколько генов HBV, и второе средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген, отличный от одного или нескольких генов HBV, например, ген CD274/PD-L1 и/или ген HDV, можно вводить как части одной фармацевтической композиции. Альтернативно первое средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на один или несколько генов HBV, и второе средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген, отличный от одного или нескольких генов HBV, например, ген CD274/PD-L1 и/или ген HDV, можно вводить как части различных фармацевтических композиций.

CD274 или PD-L1 представляет собой трансмембранный белок I типа из 290 аминокислот, кодируемый геном CD274 на 19-й хромосоме у мыши и 9-й хромосоме у человека. Экспрессия CD274/PD-L1 вовлечена в уклонение от иммунных ответов, сопровождающих хроническую инфекцию, например, вирусами (в том числе, например, HIV, HBV, HCV и HTLV среди прочих), бактериями (в том числе, например, *Helicobacter pylori* среди прочих) и паразитами (в том числе, например, *Schistosoma mansoni*).

PD-L1 может оказывать влияние на иммунные ответы путем задействования PD-1 или B7-1 (CD80) и модифицирования передачи сигналов от TCR или BCR, но также может доставлять сигналы в экспрессирующие PD-L1 клетки, т. е. путем обратной передачи сигналов через PD-L1. Исследования с помощью поверхностного плазмонного резонанса демонстрируют специфическое и уникальное взаимодействие между PD-L1 и B7-1 с аффинностью, составляющей 1,7 мкМ, и аффинностью, составляющей 0,5 мкМ, для взаимодействия между PD-L1 и PD-1. Результаты исследований химического сшивания свидетельствуют о том, что PD-L1 и B7-1, подобно PD-L1 и PD-1, также могут взаимодействовать посредством своих IgV-подобных доменов. Граница взаимодействия PD-L1:B7-1 по меньшей мере частично перекрывается с предполагаемой границей разграничения PD-L1:PD-1. Взаимодействия B7-1:PD-L1 могут индуцировать ингибиторный сигнал в Т-клетках. Лигирование PD-L1 на CD4 Т-клетках посредством B7-1 или лигирование B7-1 на CD4 Т-клетках посредством PD-L1 доставляет функционально значимый ингибиторный сигнал. Поскольку и PD-L1, и B7-1 экспрессируются на Т-клетках, В-клетках, DC и макрофагах, то на клетках таких типов существует возможность двунаправленного взаимодействия между B7-1 и PD-L1. Кроме того, PD-L1 на клетках, отличных от гематopoэтических, может взаимодействовать с B7-1, а также с PD-1 на Т-клетках, осуществляя регуляцию клеток (Keir ME et al., 2008. *Annu Rev Immunol.* 26:677-704).

При хронических вирусных инфекциях у людей у нескольких групп было показано, что экспрессия PD-1 является высокой на HIV-специфических (Petrovas C et al., 2006, *J. Exp. Med.* 203:2281-92; Day CL et al., 2006, *Nature* 443:350-54; Trautmann L

*et al.*, 2006, *Nat. Med.* 12: 1198-202), HBV-специфических (Boettler T *et al.*, 2006, *J. Virol.* 80:3532-40; Boni C *et al.* 2007, *J. Virol.* 81:4215-25) и HCV-специфических Т-клетках (Urbani S *et al.*, 2006, *J. Virol.* 80: 11398-403). Также осуществляется положительная регуляция PD-L1 на CD14+ моноцитах периферической крови и миелоидных DC у пациентов с хронической инфекцией HBV (Chen L *et al.*, 2007, *J. Immunol.* 178:6634-41; Ceng L *et al.*, 2006, *J. Viral Hepat.* 13:725-33), и на CD14+ клетках и Т клетках у пациентов с HIV (Trabattoni D *et al.*, 2003. *Blood* 101:2514-20). Блокировка *in vitro* взаимодействий PD-LPD-L устраняет истощение HIV-специфических, HBV-специфических (Boni C *et al.* 2007, *J. Virol.* 81:4215-25), HCV-специфических и SIV-специфических (Velu V *et al.*, 2007, *J. Virol.* 81:5819-28) CD8 и CD4 Т-клеток и восстанавливает пролиферацию и продуцирование цитокинов (Petrovas C *et al.*, 2006, *J. Exp. Med.* 203:2281-92; Day CL *et al.*, 2006, *Nature* 443:350-54; Trautmann L *et al.*, 2006, *Nat. Med.* 12: 1198-202; Urbani S *et al.*, 2006, *J. Virol.* 80: 11398-403). В недавней работе было показано, что кор HCV, нуклеокапсидный белок, может положительно регулировать экспрессию PD-1 и PD-L1 на здоровых донорных Т-клетках, и что положительная регуляция PD-1 опосредуется взаимодействием кора HCV с рецептором комплемента C1QBP (Yao ZQ *et al.*, 2007, *Viral Immunol.* 20:276-87).

Субъекту, которому вводили первое средство для RNAi или первое и второе средства для RNAi по настоящему изобретению, можно дополнительно вводить одно или несколько других терапевтических средств, которые функционируют по механизму, отличному от iRNA, и которые применимы в лечении инфекции HBV. В число иллюстративных терапевтических средств, которые можно применять в комбинированной терапии по настоящему изобретению, входят иммуномодуляторы, которые стимулируют иммунную систему, например, путем усиления хелперной активности Т-клеток, созревания В-лимфоцитов, ингибирования Т-клеточных супрессоров и усиления экспрессии HLA I типа. Подходящие иммуномодуляторы включают интерфероны, которые обладают рядом свойств, в число

которых входят противовирусные, иммуномодулирующие и антипролиферативные эффекты.

Например, существующее на данный момент лечение хронического гепатита В представляет собой терапию интерфероном, которую назначают пациентам, у которых имеется документально подтвержденная инфекция HBV в течение по меньшей мере шести месяцев, повышенные уровни ферментов печени (AST и ALT) и активно делирующийся вирус в их крови (положительные тесты на HBeAg и/или ДНК HBV). Терапия интерфероном- $\alpha$  приводит к длительной устойчивой ремиссии заболевания у приблизительно 35% пациентов с хроническим гепатитом В с нормализацией ферментов печени и исчезновением трех маркеров активной инфекции (HBeAg, ДНК HBV и HBsAg). Субъектов с острой инфекцией HBV, конечной стадией цирроза или другими серьезными медицинскими проблемами обычно не лечат интерфероном.

Кроме того, терапия интерфероном пациентов со связанным с HBV циррозом значительно снижает частоту возникновения гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), особенно у пациентов с большим количеством ДНК HBV в сыворотке крови. У пациентов с положительным по HBeAg компенсированным циррозом вирусная и биохимическая ремиссия после терапии интерфероном ассоциирована с увеличением продолжительности жизни. У пациентов с хронической инфекцией HBV клиренс HBeAg после лечения интерфероном- $\alpha$  ассоциирован с улучшением клинических результатов.

Стандартной продолжительностью терапии считается 16 недель. На пациентов с низким уровнем вирусной репликации в конце стандартного режима наибольшее благоприятное воздействие оказывает длительное лечение.

Другие иллюстративные терапевтические средства, которые можно применять в комбинированной терапии по настоящему изобретению, включают, например, противовирусное средство, аналог нуклеотидов, аналог нуклеозидов, ингибитор обратной транскриптазы (например, тенофовир дизопроксил фумарат (TDF), тенофовир алафенамид, ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин и AGX-1009, эмтрицитабин, клевудин, ритонавир,

дипивоксил, лобукавир, фамвир, FTC, N-ацетил-цистеин (NAC), PC1323, терадигм-HBV, тимозин-альфа и ганцикловир), иммуностимулятор (например, пегилированный интерферон альфа-2а (PEG-IFN- $\alpha$ 2а), интерферон альфа-2b, рекомбинантный человеческий интерлейкин-7 и агонист Toll-подобного рецептора 7 (TLR7)), терапевтическую вакцину (например, GS-4774, DV-601 и TG1050), ингибитор проникновения вируса (например, Myrcludex), олигонуклеотид, который ингибирует секрецию или высвобождение HbsAg (например, REP 9AC), ингибитор сборки капсида (например, Bay41-4109 и NVR-1221), ингибитор образования cccDNA (например, IHVR-25) или другие терапевтические средства и/или процедуры, например, трансплантацию печени, химиотерапию, для лечения ассоциированного с HBV заболевания, комбинацию любого из вышеперечисленных.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению включают введение ингибитора обратной транскриптазы субъекту с инфекцией HBV и/или ассоциированным с HBV заболеванием. В другом варианте осуществления способы по настоящему изобретению включают введение ингибитора обратной транскриптазы и иммуностимулятора субъекту с инфекцией HBV и/или ассоциированным с HBV заболеванием.

Средство(средства) на основе iRNA и дополнительное терапевтическое средство и/или препарат можно вводить одновременно и/или в одной комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции, или в разные моменты времени, и/или при помощи другого способа, известного в данной области или описанного в данном документе.

Настоящее изобретение также предлагает способы применения средства на основе iRNA по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство на основе iRNA по настоящему изобретению, для снижения и/или ингибирования экспрессии HBV в клетке. В других аспектах настоящее изобретение предлагает iRNA по настоящему изобретению и/или композицию, содержащую iRNA по настоящему изобретению, для применения в снижении и/или

ингибировании экспрессии гена HBV в клетке. В еще других аспектах предложено применение iRNA по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей iRNA по настоящему изобретению, для изготовления лекарственного препарата для снижения и/или ингибирования экспрессии гена HBV в клетке. В еще одном аспекте настоящее изобретение предлагает iRNA по настоящему изобретению и/или композицию, содержащую iRNA по настоящему изобретению, для применения в снижении и/или ингибировании репликации HBV в клетке. В еще других аспектах предложено применение iRNA по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей iRNA по настоящему изобретению, для изготовления лекарственного препарата для снижения и/или ингибирования репликации HBV в клетке. Способы и применения включают приведение клетки в контакт с iRNA, например, dsRNA, по настоящему изобретению и поддержание клетки в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена HBV, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена HBV в клетке или ингибирование репликации HBV в клетке.

Снижение экспрессии гена можно оценить при помощи каких-либо способов, известных в данной области. Например, снижение экспрессии HBV можно определить путем определения уровня экспрессии мРНК HBV с помощью способов, рутинных для специалиста в данной области, например, нозерн-блоттинга, qRT-PCR, путем определения уровня белка HBV с помощью способов, рутинных для специалиста в данной области, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические методики, способы проточной цитометрии, ELISA, и/или путем определения биологической активности HBV.

В способах и применениях по настоящему изобретению клетка может находиться в контакте *in vitro* или *in vivo*, т. е. клетка может находиться в субъекте.

Клеткой, подходящей для лечения с применением способов по настоящему изобретению, может быть любая клетка, которая экспрессирует ген HBV, например, инфицированная HBV клетка, или клетка, содержащая вектор экспрессии, содержащий геном HBV или часть гена HBV. Клетка, подходящая для применения в способах и применениях по настоящему изобретению, может представлять собой

клетку млекопитающего, например, клетку примата (такую как клетка человека или клетка отличного от человека примата, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), клетку отличного от примата животного (такую как клетка коровы, клетка свиньи, клетка верблюда, клетка ламы, клетка лошади, клетка козы, клетка кролика, клетка овцы, клетка хомячка, клетка морской свинки, клетка кота, клетка собаки, клетка крысы, клетка мыши, клетка льва, клетка тигра, клетка медведя или клетка буйвола), клетку птицы (например, клетку утки или клетку гуся) или клетку кита. В одном варианте осуществления клеткой является клетка человека, например, клетка печени человека.

Экспрессию гена HBV можно ингибировать в клетке по меньшей мере на приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или на приблизительно 100%, т. е. ниже уровня детекции в анализе.

Репликацию HBV можно ингибировать в клетке по меньшей мере на приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на приблизительно 100%, т. е. ниже уровня детекции в анализе.

*In vivo* способы и применения по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей iRNA, где iRNA включает в себя нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части РНК-транскрипта гена HBV млекопитающего, подлежащего лечению. В тех случаях,

когда организмом, подлежащим лечению является человек, тогда композицию можно вводить при помощи каких-либо способов, известных в данной области, в том числе без ограничения подкожным, внутривенным, пероральным, внутрибрюшинным или парентеральным путями, включая интракраниальное (например, интравентрикулярное, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутримышечное, трансдермальное, через верхние дыхательные пути (аэрозольное), назальное, ректальное и местное (в том числе трансбуккальное и сублингвальное) введение. В определенных вариантах осуществления композиции вводят при помощи подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят при помощи внутривенной инфузии или инъекции. В других вариантах осуществления композиции вводят при помощи внутримышечной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют *посредством* инъекции депо-препарата. Благодаря инъекции депо-препарата iRNA может постоянно высвобождаться в течение длительного периода времени. Таким образом инъекция депо-препарата может снижать частоту введения доз, необходимых для получения требуемого эффекта, например, требуемого ингибирования HBV, или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо-препарата может также обеспечивать более устойчивые концентрации в сыворотке крови. Инъекции депо-препарата могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция депо-препарата является подкожной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют *посредством* насоса. Насос может быть внешним насосом или насосом, имплантируемым хирургическим путем. В определенных вариантах осуществления насос является подкожно имплантируемым осмотическим насосом. В других вариантах осуществления насос является инфузионным насосом. Инфузионный насос можно применять для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос является подкожным инфузионным насосом. В других вариантах осуществления насос является насосом, имплантируемым

хирургическим путем, который доставляет средство на основе iRNA в печень.

Способ введения можно выбрать, исходя из того, необходимо местное или системное лечение, и исходя из области, которая подлежит лечению. Путь и место введения можно выбрать для усиления целенаправленного воздействия.

В одном аспекте настоящее изобретение также предлагает способы ингибирования экспрессии гена HBV у млекопитающего, например, у человека. Настоящее изобретение также предлагает композицию, содержащую iRNA, например, dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген HBV в клетке млекопитающего, для применения в ингибировании экспрессии гена HBV у млекопитающего. В другом аспекте настоящее изобретение предлагает применение iRNA, например, dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген HBV в клетке млекопитающего, в изготовлении лекарственного препарата для ингибирования экспрессии гена HBV у млекопитающего.

Способы и применения включают введение млекопитающему, например, человеку, композиции, содержащей iRNA, например, dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген HBV в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена HBV, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена HBV у млекопитающего.

Снижение экспрессии гена можно оценивать в образце периферической крови субъекта, которому вводят iRNA, с помощью каких-либо способов, известных в данной области, например, qRT-PCR, описанной в данном документе. Снижение продуцирования белка можно оценивать с помощью каких-либо способов, известных в данной области, и с помощью способов, например, ELISA или вестерн-блоттинга, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления полученный путем пункции биоптат печени служит в качестве тканевого материала для контроля снижения экспрессии гена HBV и/или белка. В другом варианте осуществления образец крови служит в качестве тканевого материала для контроля снижения экспрессии гена HBV и/или белка.

В одном варианте осуществления подтверждение RISC-опосредованного расщепления мишени *in vivo* после введения средства на основе iRNA осуществляют путем проведения 5'-RACE или модификаций согласно протоколу, известному в данной области (Lasham A *et al.*, (2010) *Nucleic Acid Res.*, 38 (3) p-e19) (Zimmermann *et al.* (2006) *Nature* 441: 111-4).

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как ограничивающие. Полное содержание всех источников, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в данной заявке, а также фигур и перечня последовательностей таким образом включено в данный документ посредством ссылки.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Синтез iRNA**

#### *Источники получения реагентов*

Если источник получения реагента конкретно не приведен в данном документе, такой реагент можно получать от любого поставщика реагентов для использования в молекулярной биологии со стандартными качеством/чистотой для применения в молекулярной биологии.

#### *Транскрипты*

#### *Конструирование siRNA*

Выбор конструкций siRNA, целенаправленно воздействующих на HBV, определялся двумя основными факторами: а) активностью и б) необходимостью использовать siRNA с практически идеальными совпадениями с более чем 90% долей охвата большого количества общедоступных последовательностей HBV всех известных серотипов (А-Н). Координаты для выбора siRNA определяли относительно эталонной последовательности генома HBV в NCBI под номером NC\_003977.1 (номер доступа в GenBank GI:21326584 (SEQ ID NO: 1)). Конструировали, синтезировали и подвергали скринингу *in vitro* первый набор siRNA, содержащих влияющие на активность структурные модификации, включая различные паттерны с заместителями 2'-О-метил и 2'-фтор, размещенные в центре относительно двух смежных участков генома HBV, кодирующих поверхностный антиген (HbSAg) и полимеразу HBV. Конструировали,

синтезировали и подвергали скринингу второй набор siRNA, целенаправленно воздействующих на дополнительные целевые участки с особым вниманием к положениям 1581-1599 в SEQ ID NO:1, которые кодируют, помимо HbSAg и полимеразы, ген X.

Подробный перечень немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей HBV показан в таблице 3.

Подробный перечень модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей HBV показан в таблице 4.

#### *Синтез siRNA*

Последовательности siRNA HBV синтезировали в масштабе 1 мкмоль на синтезаторе Mermade 192 (BioAutomation) с использованием твердой подложки, опосредующей особенности фосфорамидатной химии. Твердая подложка представляла собой стеклянную подложку с заданным размером пор (500 Å), нагруженную созданным по индивидуальному заказу лигандом GalNAc, или универсальную твердую подложку (AM biochemical). Вспомогательные реагенты для синтеза, 2'-F- и 2'-O-метил-РНК и дезоксо-фосфорамидиты, получали от Thermo-Fisher (Милуоки, Висконсин) и HONGGENE (Китай). 2'-F, 2'-O-метил, GNA (гликоль-нуклеиновые кислоты), 5'-фосфат и модификации с удалением азотистого основания вводили с использованием соответствующих фосфорамидитов. Синтез отдельных нитей, конъюгированных с GalNAc по 3'-концу, выполняли на модифицированной GalNAc CPG подложке. Сделанную по индивидуальному заказу универсальную твердую CPG подложку использовали для синтеза антисмысловых отдельных нитей. Время связывания для всех фосфорамидитов (100 мМ в ацетонитриле) составляло 5 минут при использовании 5-этилтио-1Н-тетразола (ETT) в качестве активатора (0,6 М в ацетонитриле). Фосфоротиоатные связи получали с использованием 50 мМ раствора 3-((диметиламино-метилен)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT, получали от Chemgenes (Уилмингтон, Массачусетс, США)) в безводном ацетонитриле/пиридине (1:1 объем/объем). Время окисления составляло 3 минуты. Все последовательности синтезировали с удалением в конечном итоге группы DMT ("без DMT").

По завершении твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды отщепляли от твердой подложки и с них снимали защитную группу в запечатанных планшетах с 96 глубокими лунками с использованием 200 мкл реагента в виде водного метиламина при 60°C в течение 20 минут. В конце стадии отщепления и снятия защитной группы планшету для синтеза позволяли нагреться до комнатной температуры и содержимое осаждали добавлением 1 мл смеси ацетонитрил:этанол (9:1). Планшеты охлаждали при -80°C в течение 2 часов и супернатант аккуратно удаляли при помощи многоканальной пипетки. Осадок с олигонуклеотидами ресуспендировали в 20 мМ буфера NaOAc и обессоливали с использованием 5 мл колонки для эксклюзионной хроматографии HiTrap (GE Healthcare) на "AKTA Purifier System", оснащенной устройством автоматической подачи образцов A905 и коллектором фракций Frac 950. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты. Образцы из каждой последовательности анализировали при помощи LC-MS для подтверждения идентичности, УФ (260 нм) для количественного определения, а выбранный набор образцов анализировали при помощи IEX-хроматографии для определения чистоты.

Гибридизацию отдельных нитей HBV проводили на автоматическом устройстве Tecan для манипуляции с жидкостями. Эквимольную смесь смысловых и антисмысловых отдельных нитей объединяли и гибридизовали в 96-луночных планшетах. После объединения комплементарных отдельных нитей 96-луночный планшет плотно запечатывали и нагревали в печи при 100°C в течение 10 минут, и позволяли медленно достичь комнатной температуры в течение периода 2-3 часов. Концентрацию каждого дуплекса нормализовали до 10 мкМ в 1X PBS.

## **Пример 2. Скрининг siRNA-дуплексов *in vitro***

### *Культура клеток и трансфекции*

Клетки Cos7 (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до конfluence при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в DMEM (ATCC), дополненной 10% FBS, до отделения от планшета путем трипсинизации. Конструкциями люциферазы Dual-Glo<sup>®</sup>, созданными в

плазмиде psiCHECK2, содержащей примерно 1,1 т. п. о. геномных последовательностей HBV, трансфицировали примерно  $15 \times 10^4$  клеток с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, кат. № 11668-019). В каждой лунке 96-луночного планшета добавляли 0,2 мкл липофектамина к 10 нг плазмидного вектора в 14,8 мкл Opti-MEM и оставляли для образования комплексов при комнатной температуре на 15 минут. Затем смесь добавляли к клеткам, которые ресуспендировали в 80 мкл свежей полной среды. Спустя примерно 24 часа среды удаляли и клетки повторно трансфицировали с использованием siRNA. Каждой siRNA трансфицировали клетки, которые предварительно были трансфицированы вектором psiCHECK2-HBV, идеально совпадавшим с siRNA. Трансфекцию с использованием siRNA осуществляли путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM с 0,2 мкл липофектамина RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, кат. № 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку в 96-луночном планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем смесь добавляли к клеткам, предварительно трансфицированным плазмидой psiCHECK2-HBV, которая идеально совпадала с последовательностью siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед измерением активности люциферазы.

Эксперименты в отношении разовой дозы проводили при конечной концентрации дуплекса в 10 нМ и 0,01 нМ.

#### *Анализ с использованием люциферазной системы Dual-Glo®*

Через двадцать четыре часа после трансфекции с использованием siRNA измеряли активность люциферазы светлячка (контроль трансфекции) и Renilla (слитой с целевой последовательностью HBV). Сначала отделяли клетки от среды. Затем измеряли активность люциферазы светлячка, добавляя в каждую лунку 75 мкл реагента люциферазы Dual-Glo®, что равно объему культуральной среды, и перемешивали. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут перед измерением люминесценции (500 нм) на Spectramax (Molecular Devices) для детекции сигнала от люциферазы светлячка. Активность люциферазы Renilla измеряли, добавляя 75 мкл при комнатной температуры, при

этом в каждую лунку добавляли реагент Dual-Glo® Stop & Glo® и планшеты инкубировали в течение 10-15 минут перед повторным измерением люминесценции для определения сигнала люциферазы Renilla. Реагент Dual-Glo® Stop & Glo® гасит сигнал люциферазы светлячка и поддерживает люминесценцию реакции люциферазы Renilla. Активность siRNA определяли путем нормализации в каждой лунке сигнала от Renilla (HBV) к сигналу от люциферазы светлячка (контроль). Затем оценивали величину активности siRNA относительно клеток, которые трансфицировали одним и тем же вектором, но их не обрабатывали siRNA или обрабатывали siRNA, не оказывающей целенаправленного воздействия. Все реакции трансфекции проводили в количестве n=2 или больше.

В таблице 5 приведены результаты скрининга в отношении разовой дозы в клетках Cos7, трансфицированных указанными iRNA HBV. Данные выражены в виде процента остаточной мРНК в сравнении с отрицательным контролем.

**Таблица 2.** Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты. Следует понимать, что если не указано иное, эти мономеры, если они присутствуют в олигонуклеотиде, связаны между собой 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

| Сокращени<br>е | Нуклеотид (ы)                   |
|----------------|---------------------------------|
| A              | Аденозин-3'-фосфат              |
| Af             | 2'-Фторадеозин-3'-фосфат        |
| Afs            | 2'-Фторадеозин-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                                                                |
| ts    | 2'-О-Метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат                                                          |
| u     | 2'-О-Метилуридин-3'-фосфат                                                                        |
| us    | 2'-О-Метилуридин-3'-фосфоротиоат                                                                  |
| s     | Фосфоротиоатная связь                                                                             |
| L96   | N-[трис (GalNAc-алкил)-амидодеканойл]-4-гидроксипролинол-Нур-(GalNAc-алкил)3                      |
| (dT)  | 2'-Дезокситимидин-3'-фосфат                                                                       |
| Y34   | 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (лишенная азотистого основания 2'-ОМе-фураноза) |
| Y44   | 2-Гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат                                                           |
| (Agn) | Аденозин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA)                                                        |
| (Tgn) | Тимидин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA), S-изомер                                               |
| (Cgn) | Цитидин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA)                                                         |
| P     | Фосфат                                                                                            |
| VP    | Винилфосфат                                                                                       |

Таблица 3. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA HBV

| 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-61522.2        | A-123463.2                          | AGUUUAUUGGAUGAUGUGGUA                | 47        | A-123464.2                              | UACCACAUCAUCCAUAUAACUGA                  | 263       | 731_753                 |
| AD-61547.2        | A-123487.2                          | GGAUGUGUCUGCGGCGUUUUA                | 48        | A-123488.2                              | UAAAACGCCGCAGACACAUCAG                   | 264       | 373_395                 |
| AD-63938.2        | A-127896.1                          | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 49        | A-127897.1                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 265       | 250_272                 |
| AD-63939.2        | A-127909.1                          | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 50        | A-127906.3                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 266       | 250_272                 |
| AD-63940.2        | A-127917.1                          | ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA                | 51        | A-127906.11                             | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 267       | 250_272                 |
| AD-63941.2        | A-127905.8                          | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 52        | A-127925.1                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 268       | 250_272                 |
| AD-63942.2        | A-127933.1                          | UCGUGGUGGACUUCUCUCA                  | 53        | A-127934.1                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGU                    | 269       | 252_274                 |
| AD-63943.2        | A-127944.2                          | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 54        | A-127942.2                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 270       | 250_272                 |
| AD-63945.2        | A-127910.1                          | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 55        | A-127906.4                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 271       | 250_272                 |
| AD-63946.2        | A-127918.1                          | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 56        | A-127906.12                             | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 272       | 250_272                 |
| AD-63947.2        | A-127905.9                          | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 57        | A-127926.1                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 273       | 250_272                 |
| AD-63948.2        | A-127935.1                          | GUGGUGGACUUCUCUCA                    | 58        | A-127936.1                              | UGAGAGAAGUCCACCACGA                      | 274       | 254_276                 |
| AD-63949.2        | A-127944.3                          | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 59        | A-127906.14                             | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 275       | 250_272                 |
| AD-63950.2        | A-127900.1                          | UCGUGGUGGACUUCUCUCAUU                | 60        | A-127901.1                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU                    | 276       | 252_274                 |
| AD-63951.2        | A-127911.1                          | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 61        | A-127906.5                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 277       | 250_272                 |
| AD-63952.2        | A-127905.2                          | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 62        | A-127919.1                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 278       | 250_272                 |
| AD-63953.2        | A-127905.10                         | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 63        | A-127927.1                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 279       | 250_272                 |
| AD-               | A-127945.1                          | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 64        | A-127940.3                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 280       | 250_272                 |

|            |             |                       |    |             |                         |     |         |
|------------|-------------|-----------------------|----|-------------|-------------------------|-----|---------|
| 63955.2    |             |                       |    |             |                         |     |         |
| AD-63956.2 | A-127902.1  | UCUGUGGUGGACUUCUCUCA  | 65 | A-127903.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU   | 281 | 252_274 |
| AD-63957.2 | A-127912.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 66 | A-127906.6  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 282 | 250_272 |
| AD-63958.2 | A-127905.3  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 67 | A-127920.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 283 | 250_272 |
| AD-63959.2 | A-127905.11 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 68 | A-127928.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 284 | 250_272 |
| AD-63960.2 | A-126619.2  | UAUUUCCUAGGGUACAA     | 69 | A-127938.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGA     | 285 | 254_276 |
| AD-63961.2 | A-127945.2  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 70 | A-127942.3  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 286 | 250_272 |
| AD-63962.2 | A-127902.2  | UCUGUGGUGGACUUCUCUCA  | 71 | A-127904.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU   | 287 | 252_274 |
| AD-63963.2 | A-127913.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 72 | A-127906.7  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 288 | 250_272 |
| AD-63964.2 | A-127905.4  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 73 | A-127921.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 289 | 250_272 |
| AD-63965.2 | A-127905.12 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 74 | A-127929.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 290 | 250_272 |
| AD-63966.2 | A-127939.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 75 | A-127940.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 291 | 250_272 |
| AD-63967.2 | A-127945.3  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 76 | A-127906.15 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 292 | 250_272 |
| AD-63968.2 | A-127905.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 77 | A-127906.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 293 | 250_272 |
| AD-63968.4 | A-127905.15 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 78 | A-127906.17 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 294 | 250_272 |
| AD-63968.5 | A-127905.17 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 79 | A-127906.18 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 295 | 250_272 |
| AD-63969.2 | A-127914.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 80 | A-127906.8  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 296 | 250_272 |
| AD-63970.2 | A-127905.5  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 81 | A-127922.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 297 | 250_272 |
| AD-63971.2 | A-127905.13 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 82 | A-127930.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 298 | 250_272 |
| AD-63972.2 | A-127941.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 83 | A-127942.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 299 | 250_272 |
| AD-63973.2 | A-127946.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 84 | A-127947.1  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 300 | 250_272 |

|            |             |                       |     |             |                         |     |         |
|------------|-------------|-----------------------|-----|-------------|-------------------------|-----|---------|
| AD-63975.2 | A-127915.1  | ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA | 85  | A-127906.9  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 301 | 250_272 |
| AD-63976.2 | A-127905.6  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 86  | A-127923.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 302 | 250_272 |
| AD-63977.2 | A-127917.2  | ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA | 87  | A-127931.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 303 | 250_272 |
| AD-63978.2 | A-127943.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 88  | A-127906.13 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 304 | 250_272 |
| AD-63979.2 | A-127908.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 89  | A-127906.2  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 305 | 250_272 |
| AD-63980.2 | A-127916.1  | ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA | 90  | A-127906.10 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 306 | 250_272 |
| AD-63981.2 | A-127905.7  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 91  | A-127924.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 307 | 250_272 |
| AD-63982.2 | A-127917.3  | ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA | 92  | A-127932.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 308 | 250_272 |
| AD-63983.2 | A-127944.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 93  | A-127940.2  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 309 | 250_272 |
| AD-63985.2 | A-127961.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU  | 94  | A-127956.4  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 310 | 254_276 |
| AD-63986.2 | A-127969.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU  | 95  | A-127956.12 | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 311 | 254_276 |
| AD-63987.2 | A-127955.9  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU  | 96  | A-127977.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 312 | 254_276 |
| AD-63988.2 | A-127986.1  | UGGACUUCUCUCAUUU      | 97  | A-127987.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACC     | 313 | 258_280 |
| AD-63989.2 | A-127996.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU  | 98  | A-127992.2  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 314 | 254_276 |
| AD-63990.2 | A-127950.1  | GGUGGACUUCUCUCAUUUUU  | 99  | A-127951.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCUU   | 315 | 256_278 |
| AD-63991.2 | A-127962.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU  | 100 | A-127956.5  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 316 | 254_276 |
| AD-63992.2 | A-127955.2  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU  | 101 | A-127970.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 317 | 254_276 |
| AD-63993.2 | A-127955.10 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU  | 102 | A-127978.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 318 | 254_276 |
| AD-63994.2 | A-127984.2  | GGUGGACUUCUCUCAUUU    | 103 | A-127988.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCAC   | 319 | 256_278 |
| AD-63995.2 | A-127996.2  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU  | 104 | A-127993.2  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 320 | 254_276 |
| AD-        | A-127952.1  | GGUGGACUUCUCUCAUUU    | 105 | A-127953.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCUU   | 321 | 256_278 |

|            |             |                      |     |             |                         |     |         |
|------------|-------------|----------------------|-----|-------------|-------------------------|-----|---------|
| 63996.2    |             |                      |     |             |                         |     |         |
| AD-63997.2 | A-127963.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 106 | A-127956.6  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 322 | 254_276 |
| AD-63999.2 | A-127955.11 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 107 | A-127979.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 323 | 254_276 |
| AD-64000.2 | A-127986.2  | UGGACUUCUCUCAUUU     | 108 | A-127989.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACC     | 324 | 258_280 |
| AD-64001.2 | A-127996.3  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 109 | A-127994.2  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 325 | 254_276 |
| AD-64002.2 | A-127952.2  | GGUGGACUUCUCUCAUUU   | 110 | A-127954.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCUU   | 326 | 256_278 |
| AD-64003.2 | A-127964.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 111 | A-127956.7  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 327 | 254_276 |
| AD-64004.2 | A-127955.4  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 112 | A-127972.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 328 | 254_276 |
| AD-64005.2 | A-127955.12 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 113 | A-127980.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 329 | 254_276 |
| AD-64006.2 | A-127990.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 114 | A-127991.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 330 | 254_276 |
| AD-64007.2 | A-127996.4  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 115 | A-127995.2  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 331 | 254_276 |
| AD-64008.2 | A-127955.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 116 | A-127956.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 332 | 254_276 |
| AD-64008.4 | A-127955.15 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 117 | A-127956.14 | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 333 | 254_276 |
| AD-64009.2 | A-127965.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 118 | A-127956.8  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 334 | 254_276 |
| AD-64010.2 | A-127955.5  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 119 | A-127973.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 335 | 254_276 |
| AD-64011.2 | A-127955.13 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 120 | A-127981.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 336 | 254_276 |
| AD-64012.2 | A-127990.2  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 121 | A-127992.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 337 | 254_276 |
| AD-64013.2 | A-127997.1  | GUGGUGGACTTCUCUCAUUU | 122 | A-127998.1  | AAAUUGAGAGAAGTCCACCACGA | 338 | 254_276 |
| AD-64014.2 | A-127957.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 123 | A-127958.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 339 | 254_276 |
| AD-64015.2 | A-127966.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 124 | A-127956.9  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 340 | 254_276 |
| AD-64016.2 | A-127955.6  | GUGGUGGACUUCUCUCAUUU | 125 | A-127974.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 341 | 254_276 |

|            |            |                       |     |             |                         |     |           |
|------------|------------|-----------------------|-----|-------------|-------------------------|-----|-----------|
| AD-64017.2 | A-127968.2 | GUGGUGGACUTCUCUCAUUUU | 126 | A-127982.1  | AAAUUGAGAGAAGTCCACCACGA | 342 | 254_276   |
| AD-64018.2 | A-127990.3 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU | 127 | A-127993.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 343 | 254_276   |
| AD-64019.2 | A-127959.1 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU | 128 | A-127956.2  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 344 | 254_276   |
| AD-64020.2 | A-127967.1 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU | 129 | A-127956.10 | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 345 | 254_276   |
| AD-64021.2 | A-127955.7 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU | 130 | A-127975.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 346 | 254_276   |
| AD-64022.2 | A-127968.3 | GUGGUGGACUTCUCUCAUUUU | 131 | A-127983.1  | AAAUUGAGAGAAGTCCACCACGA | 347 | 254_276   |
| AD-64023.2 | A-127990.4 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU | 132 | A-127994.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 348 | 254_276   |
| AD-64024.2 | A-127960.1 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU | 133 | A-127956.3  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 349 | 254_276   |
| AD-64025.2 | A-127968.1 | GUGGUGGACUTCUCUCAUUUU | 134 | A-127956.11 | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 350 | 254_276   |
| AD-64026.2 | A-127955.8 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU | 135 | A-127976.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 351 | 254_276   |
| AD-64027.2 | A-127984.1 | GGUGGACUUCUCUCAUUUU   | 136 | A-127985.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCAC   | 352 | 256_278   |
| AD-64028.2 | A-127990.5 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU | 137 | A-127995.1  | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 353 | 254_276   |
| AD-64272.2 | A-128001.2 | GUGCACUUCGCUUCCACUCUG | 138 | A-128002.2  | CAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC | 354 | 1577_1599 |
| AD-64274.1 | A-128363.1 | GUUGACAAAAUCCUCACAAU  | 139 | A-128364.1  | AUUGUGAGGAUUUUUGUCAACAA | 355 | 215_237   |
| AD-64275.1 | A-128377.1 | UGUUGACAAAAUCCUCACAA  | 140 | A-128378.1  | UUGUGAGGAUUUUUGUCAACAAG | 356 | 214_236   |
| AD-64276.1 | A-128393.1 | GGUGGACUUCUCUCAUUUUUA | 141 | A-128394.1  | UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC | 357 | 256_278   |
| AD-64277.1 | A-128407.1 | UCUUUUGGAGUGUGGAUUCGA | 142 | A-128408.1  | UCGAAUCCACACUCCAAAAGACA | 358 | 2259_2281 |
| AD-64277.1 | A-128407.1 | UCUUUUGGAGUGUGGAUUCGA | 143 | A-128408.1  | UCGAAUCCACACUCCAAAAGACA | 359 | 2259_2281 |
| AD-64278.1 | A-128423.1 | ACUGUUCAAGCCUCCAAGCUA | 144 | A-128424.1  | UAGCUUGGAGGCUUGAACAAGAC | 360 | 1857_1879 |
| AD-64279.1 | A-128435.1 | UCUGCCGAUCCAUAUGCGGGA | 145 | A-128436.1  | UCCGCAGUAUGGAUCGGCAGAGG | 361 | 1255_1277 |
| AD-        | A-128379.1 | AUGUGUCUGCGGCGUUUUAVA | 146 | A-128380.1  | UAUAAAACGCCGCAGACACAUC  | 362 | 375_397   |

|            |            |                        |     |            |                         |     |               |
|------------|------------|------------------------|-----|------------|-------------------------|-----|---------------|
| 64280.1    |            |                        |     |            |                         |     |               |
| AD-64281.1 | A-128395.1 | CCCCGUCUGUGCCUUCUCAUA  | 147 | A-128396.1 | UAUGAGAAGGCACAGACGGGGAG | 363 | 1545_156<br>7 |
| AD-64282.1 | A-128409.1 | GCCUAAUCAUCUCUUGUUCAU  | 148 | A-128410.1 | AUGAACAAGAGAUGAUUAGCGAG | 364 | 1831_185<br>3 |
| AD-64283.1 | A-128425.1 | UCUAGACUCGUGGUGGACUUC  | 149 | A-128426.1 | GAAGUCCACCACGAGUCUAGACU | 365 | 245_267       |
| AD-64284.1 | A-128437.1 | CUGCCGAUCCAUACUGCGGAA  | 150 | A-128438.1 | UUCCGCAGUAUGGAUCGGCAGAG | 366 | 1256_127<br>8 |
| AD-64285.1 | A-128365.1 | UUUUUCUUGUUGACAAAAUA   | 151 | A-128366.1 | UAUUUUUGUCAACAAGAAAAACC | 367 | 207_229       |
| AD-64286.1 | A-128381.1 | AUCUUCUUGUUGGUUCUUCUA  | 152 | A-128382.1 | UAGAAGAACCAACAAGAAGAUGA | 368 | 426_448       |
| AD-64289.1 | A-128367.1 | GUUUUUCUUGUUGACAAAAU   | 153 | A-128368.1 | AUUUUUGUCAACAAGAAAAACCC | 369 | 206_228       |
| AD-64290.1 | A-128383.1 | CUGCCUAAUCAUCUCUUGUUA  | 154 | A-128384.1 | UAACAAGAGAUGAUUAGGCAGAG | 370 | 1829_185<br>1 |
| AD-64291.1 | A-128399.1 | UCCUCACAAUACCACAGAGUA  | 155 | A-128400.1 | UACUCUGUGGUUUGUGAGGAUU  | 371 | 226_248       |
| AD-64292.1 | A-128413.1 | CUUGUUGACAAAAUCCUCA    | 156 | A-128414.1 | UUGAGGAUUUUUGUCAACAAGAA | 372 | 212_234       |
| AD-64293.1 | A-128439.1 | GCAACUUUUUACCUCUGCCU   | 157 | A-128440.1 | AGGCAGAGGUGAAAAAGUUGCAU | 373 | 1814_183<br>6 |
| AD-64294.1 | A-128369.1 | GGGAACAAGAGCUACAGCAUA  | 158 | A-128370.1 | UAUGCUGUAGCUCUUGUCCCAA  | 374 | 2828_285<br>0 |
| AD-64295.1 | A-128385.1 | CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU  | 159 | A-128386.1 | AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG | 375 | 253_275       |
| AD-64297.1 | A-128415.1 | CUGCUGCUAUGCCUCAUCUUA  | 160 | A-128416.1 | UAAGAUGAGGCAUAGCAGCAGGA | 376 | 411_433       |
| AD-64298.1 | A-128427.1 | GUUGGAUGUGUCUGCGGCGUU  | 161 | A-128428.1 | AACGCCGCAGACACAUCCAACGA | 377 | 370_392       |
| AD-64299.1 | A-128441.1 | UUCAUCCUGCUGCUAUGCCUA  | 162 | A-128442.1 | UAGGCAUAGCAGCAGGAUGAAGA | 378 | 405_427       |
| AD-64300.1 | A-128371.1 | UUCUUGUUGACAAAAUCCUA   | 163 | A-128372.1 | UAGGAUUUUUGUCAACAAGAAAA | 379 | 210_232       |
| AD-64302.1 | A-128417.1 | UAUAUGGAUGAUGUGGUUAUUA | 164 | A-128418.1 | UAAUACCACAUCAUCCAUAUAAC | 380 | 734_756       |
| AD-64303.1 | A-128429.1 | UUCAUCCUGCUGCUAUGCCUC  | 165 | A-128430.1 | GAGGCAUAGCAGCAGGAUGAAGA | 381 | 405_427       |
| AD-64304.1 | A-128443.1 | GUGCACUUCGCUUCACCUCUA  | 166 | A-128444.1 | UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC | 382 | 1577_159<br>9 |

|            |            |                        |     |            |                          |     |           |
|------------|------------|------------------------|-----|------------|--------------------------|-----|-----------|
| AD-64305.1 | A-128373.1 | UUGACAAAAUCCUCACAAUA   | 167 | A-128374.1 | UAUUGUGAGGAUUUUUGUCAACA  | 383 | 216_238   |
| AD-64307.1 | A-128403.1 | AAGCCUCCAAGCUGUGCCUUA  | 168 | A-128404.1 | UAAGGCACAGCUUGGAGGCUUGA  | 384 | 1864_1886 |
| AD-64308.1 | A-128419.1 | CCUCUUCAUCCUGCUGCUAUA  | 169 | A-128420.1 | UAUAGCAGCAGGAUGAAGAGGAA  | 385 | 401_423   |
| AD-64309.1 | A-128431.1 | CCUGCUGCUAUGCCUCAUCUU  | 170 | A-128432.1 | AAGAUGAGGCAUAGCAGCAGGAU  | 386 | 410_432   |
| AD-64310.1 | A-128375.1 | CAUCUUCUUGUUGGUUCUUCU  | 171 | A-128376.1 | AGAAGAACCAACAAGAAGAUAGAG | 387 | 425_447   |
| AD-64311.1 | A-128391.1 | CCGUCUGUGCCUUCUCAUCUA  | 172 | A-128392.1 | UAGAUGAGAAGGCACAGACGGGG  | 388 | 1547_1569 |
| AD-64312.1 | A-128405.1 | CCUCAUCUUCUUGUUGGUUCU  | 173 | A-128406.1 | AGAACCAACAAGAAGAUAGAGGCA | 389 | 422_444   |
| AD-64313.1 | A-128421.1 | CCACCAAUGCCCCUAUCUUA   | 174 | A-128422.1 | UAAGAUAGGGGCAUUUGGUGGUC  | 390 | 2298_2320 |
| AD-64314.1 | A-128433.1 | GCUCCUCUGCCGAUCCAUAUCU | 175 | A-128434.1 | AGUAUGGAUCGGCAGAGGAGCCA  | 391 | 1250_1272 |
| AD-64315.1 | A-128363.2 | GUUGACAAAAUCCUCACAAU   | 176 | A-128445.1 | AUUGUGAGGAUUUUUGUCAACAA  | 392 | 215_237   |
| AD-64316.1 | A-128377.2 | UGUUGACAAAAUCCUCACAA   | 177 | A-128453.1 | UUGUGAGGAUUUUUGUCAACAAG  | 393 | 214_236   |
| AD-64317.1 | A-128393.2 | GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA  | 178 | A-128461.1 | UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC  | 394 | 256_278   |
| AD-64318.1 | A-128407.2 | UCUUUUGGAGUGUGGAUUCGA  | 179 | A-128469.1 | UCGAAUCCACACUCCAAAAGACA  | 395 | 2259_2281 |
| AD-64318.1 | A-128407.2 | UCUUUUGGAGUGUGGAUUCGA  | 180 | A-128469.1 | UCGAAUCCACACUCCAAAAGACA  | 396 | 2259_2281 |
| AD-64319.1 | A-128423.2 | ACUGUUCAAGCCUCCAAGCUA  | 181 | A-128477.1 | UAGCUUGGAGGCUUGAACAAAGAC | 397 | 1857_1879 |
| AD-64320.1 | A-128435.2 | UCUGCCGAUCCAUAUCGCGGA  | 182 | A-128483.1 | UCCGCAGUAUGGAUCGGCAGAGG  | 398 | 1255_1277 |
| AD-64321.1 | A-123463.3 | AGUUUAUUGGAUGAUGUGGUA  | 183 | A-128446.1 | UACCACAUCAUCCAUAUAACUGA  | 399 | 731_753   |
| AD-64322.1 | A-128379.2 | AUGUGUCUGCGGCGUUUUUAUA | 184 | A-128454.1 | UAUAAAACGCCGCAGACACAUC   | 400 | 375_397   |
| AD-64323.1 | A-128395.2 | CCCCGUCUGUGCCUUCUCAUA  | 185 | A-128462.1 | UAUGAGAAGGCACAGACGGGGAG  | 401 | 1545_1567 |
| AD-64324.1 | A-128409.2 | GCCUAAUCAUCUCUUGUUCAU  | 186 | A-128470.1 | AUGAACAAGAGAUGAUUAGCGAG  | 402 | 1831_1853 |
| AD-        | A-128425.2 | UCUAGACUCGUGGUGGACUUC  | 187 | A-128478.1 | GAAGUCCACCACGAGUCUAGACU  | 403 | 245_267   |

|            |             |                        |     |            |                         |     |           |
|------------|-------------|------------------------|-----|------------|-------------------------|-----|-----------|
| 64325.1    |             |                        |     |            |                         |     |           |
| AD-64326.1 | A-128437.2  | CUGCCGAUCCAUACUGCGGAA  | 188 | A-128484.1 | UUCCGCAGUAUGGAUCGGCAGAG | 404 | 1256_1278 |
| AD-64328.1 | A-128381.2  | AUCUUCUUGUUGGUUCUUCUA  | 189 | A-128455.1 | UAGAAGAACCAACAAGAAGAUGA | 405 | 426_448   |
| AD-64330.1 | A-128411.2  | UUCUCUCAAUUUUCUAGGGGA  | 190 | A-128471.1 | UCCCCUAGAAAAUUGAGAGAAGU | 406 | 263_285   |
| AD-64331.1 | A-127905.16 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA  | 191 | A-127907.2 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 407 | 250_272   |
| AD-64332.1 | A-128001.3  | GUGCACUUCGCUUCACCUCUG  | 192 | A-128485.1 | CAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC | 408 | 1577_1599 |
| AD-64333.1 | A-128367.2  | GUUUUUCUUGUUGACAAAAAU  | 193 | A-128448.1 | AUUUUUGUCAACAAGAAAAACCC | 409 | 206_228   |
| AD-64334.1 | A-128383.2  | CUGCCUAAUCAUCUCUUGUUA  | 194 | A-128456.1 | UAACAAGAGAUGAUUAGGCAGAG | 410 | 1829_1851 |
| AD-64335.1 | A-128399.2  | UCCUCACAAUACCACAGAGUA  | 195 | A-128464.1 | UACUCUGUGGUUUGUGAGGAUU  | 411 | 226_248   |
| AD-64336.1 | A-128413.2  | CUUGUUGACAAAAUCCUCAA   | 196 | A-128472.1 | UUGAGGAUUUUUGUCAACAAGAA | 412 | 212_234   |
| AD-64337.1 | A-127955.16 | GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU  | 197 | A-127958.2 | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA | 413 | 254_276   |
| AD-64338.1 | A-128439.2  | GCAACUUUUUCACCUCUGCCU  | 198 | A-128486.1 | AGGCAGAGGUGAAAAAGUUGCAU | 414 | 1814_1836 |
| AD-64339.1 | A-128369.2  | GGGAACAAGAGCUACAGCAUA  | 199 | A-128449.1 | UAUGCUGUAGCUCUUGUUCCTAA | 415 | 2828_2850 |
| AD-64341.1 | A-128401.2  | UCAUCUUCUUGUUGGUUCUUA  | 200 | A-128465.1 | UAAGAACCAACAAGAAGAUGAGG | 416 | 424_446   |
| AD-64342.1 | A-128415.2  | CUGCUGCUAUGCCUCAUCUUA  | 201 | A-128473.1 | UAAGAUGAGGCAUAGCAGCAGGA | 417 | 411_433   |
| AD-64343.1 | A-128427.2  | GUUGGAUGUGUCUGCGGCGUU  | 202 | A-128479.1 | AACGCCGCAGACACAUCCAACGA | 418 | 370_392   |
| AD-64344.1 | A-128441.2  | UUCAUCCUGCUGCUAUGCCUA  | 203 | A-128487.1 | UAGGCAUAGCAGCAGGAUGAAGA | 419 | 405_427   |
| AD-64345.1 | A-128371.2  | UUCUUGUUGACAAAAUCCUA   | 204 | A-128450.1 | UAGGAUUUUUGUCAACAAGAAAA | 420 | 210_232   |
| AD-64347.1 | A-123487.3  | GGAUGUGUCUGCGGCGUUUUA  | 205 | A-128466.1 | UAAAACGCCGCAGACACAUCCAG | 421 | 373_395   |
| AD-64348.1 | A-128417.2  | UAUAUGGAUGAUGUGGUUAUUA | 206 | A-128474.1 | UAAUACCACAUCAUCCAUAUAAC | 422 | 734_756   |
| AD-64349.1 | A-128429.2  | UUCAUCCUGCUGCUAUGCCUC  | 207 | A-128480.1 | GAGGCAUAGCAGCAGGAUGAAGA | 423 | 405_427   |

|            |             |                        |     |             |                          |     |               |
|------------|-------------|------------------------|-----|-------------|--------------------------|-----|---------------|
| AD-64350.1 | A-128443.2  | GUGCACUUCGCUUCACCUCUA  | 208 | A-128488.1  | UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC  | 424 | 1577_159<br>9 |
| AD-64351.1 | A-128373.2  | UUGACAAAAUCCUCACAAUA   | 209 | A-128451.1  | UAUUGUGAGGAUUUUUGUCAACA  | 425 | 216_238       |
| AD-64352.1 | A-128389.2  | CCAAGUGUUUGCUGACGCAAA  | 210 | A-128459.1  | UUUGCGUCAGCAAACACUUGGCA  | 426 | 1174_119<br>6 |
| AD-64352.1 | A-128389.2  | CCAAGUGUUUGCUGACGCAAA  | 211 | A-128459.1  | UUUGCGUCAGCAAACACUUGGCA  | 427 | 1174_119<br>6 |
| AD-64353.1 | A-128403.2  | AAGCCUCCAAGCUGUGCCUUA  | 212 | A-128467.1  | UAAGGCACAGCUUGGAGGCUUGA  | 428 | 1864_188<br>6 |
| AD-64354.1 | A-128419.2  | CCUCUUCAUCCUGCUGCUAUA  | 213 | A-128475.1  | UAUAGCAGCAGGAUGAAGAGGAA  | 429 | 401_423       |
| AD-64355.1 | A-128431.2  | CCUGCUGCUAUGCCUCAUCUU  | 214 | A-128481.1  | AAGAUGAGGCAUAGCAGCAGGAU  | 430 | 410_432       |
| AD-64356.1 | A-128375.2  | CAUCUUCUUGUUGGUUCUUCU  | 215 | A-128452.1  | AGAAGAACCAACAAGAAGAUAGAG | 431 | 425_447       |
| AD-64357.1 | A-128391.2  | CCGUCUGUGCCUUCUCAUCUA  | 216 | A-128460.1  | UAGAUGAGAAGGCACAGACGGGG  | 432 | 1547_156<br>9 |
| AD-64358.1 | A-128405.2  | CCUCAUCUUCUUGUUGGUUCU  | 217 | A-128468.1  | AGAACCAACAAGAAGAUAGAGGCA | 433 | 422_444       |
| AD-64359.1 | A-128421.2  | CCACCAAUGCCCCUAUCUUA   | 218 | A-128476.1  | UAAGAUAGGGGCAUUUGGUGGUC  | 434 | 2298_232<br>0 |
| AD-64360.1 | A-128433.2  | GCUCCUCUGCCGAUCCAUAACU | 219 | A-128482.1  | AGUAUGGAUCGGCAGAGGAGCCA  | 435 | 1250_127<br>2 |
| AD-64700.1 | A-129379.1  | ACUCGUGGUGTACUUCUCUCA  | 220 | A-127906.26 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU  | 436 | 250_272       |
| AD-64701.1 | A-127905.20 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA  | 221 | A-129387.1  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU  | 437 | 250_272       |
| AD-64702.1 | A-127905.28 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA  | 222 | A-129395.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU  | 438 | 250_272       |
| AD-64703.1 | A-129376.2  | ACUCGUGGUGGACUUCACUCA  | 223 | A-129385.5  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU  | 439 | 250_272       |
| AD-64704.1 | A-129381.3  | ACUCGUGGTGTACUUCACUCA  | 224 | A-129389.6  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU  | 440 | 250_272       |
| AD-64705.1 | A-129380.1  | ACUCGUGGUGTACUUCACUCA  | 225 | A-127906.27 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU  | 441 | 250_272       |
| AD-64706.1 | A-127905.21 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA  | 226 | A-129388.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU  | 442 | 250_272       |
| AD-64707.1 | A-127905.29 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA  | 227 | A-129396.1  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU  | 443 | 250_272       |
| AD-        | A-129382.2  | ACUCGUGGTGGACUUCTCUCA  | 228 | A-129385.6  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU  | 444 | 250_272       |

|            |             |                       |     |             |                         |     |         |
|------------|-------------|-----------------------|-----|-------------|-------------------------|-----|---------|
| 64708.1    |             |                       |     |             |                         |     |         |
| AD-64709.1 | A-129373.4  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 229 | A-129391.2  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 445 | 250_272 |
| AD-64710.1 | A-129373.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 230 | A-127906.20 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 446 | 250_272 |
| AD-64711.1 | A-129381.1  | ACUCGUGGTGTACUUCACUCA | 231 | A-127906.28 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 447 | 250_272 |
| AD-64712.1 | A-127905.22 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 232 | A-129389.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 448 | 250_272 |
| AD-64713.1 | A-127905.30 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 233 | A-129397.1  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 449 | 250_272 |
| AD-64714.1 | A-129384.2  | ACUCGUGGTGGACUUCACUCA | 234 | A-129385.7  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 450 | 250_272 |
| AD-64715.1 | A-129376.4  | ACUCGUGGUGGACUUCACUCA | 235 | A-129391.3  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 451 | 250_272 |
| AD-64716.1 | A-129374.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 236 | A-127906.21 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 452 | 250_272 |
| AD-64717.1 | A-129382.1  | ACUCGUGGTGGACUUCTCUCA | 237 | A-127906.29 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 453 | 250_272 |
| AD-64718.1 | A-127905.23 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 238 | A-129390.1  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 454 | 250_272 |
| AD-64719.1 | A-127917.5  | ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA | 239 | A-129385.2  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 455 | 250_272 |
| AD-64720.1 | A-129381.2  | ACUCGUGGTGTACUUCACUCA | 240 | A-129385.8  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 456 | 250_272 |
| AD-64721.1 | A-129382.4  | ACUCGUGGTGGACUUCTCUCA | 241 | A-129391.4  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 457 | 250_272 |
| AD-64722.1 | A-129375.1  | ACUCGUGGUGGACUUCCUCA  | 242 | A-127906.22 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 458 | 250_272 |
| AD-64723.1 | A-129383.1  | ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA | 243 | A-127906.30 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 459 | 250_272 |
| AD-64725.1 | A-127917.6  | ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA | 244 | A-129398.1  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 460 | 250_272 |
| AD-64726.1 | A-129373.3  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 245 | A-129389.2  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 461 | 250_272 |
| AD-64727.1 | A-129384.4  | ACUCGUGGTGGACUUCACUCA | 246 | A-129391.5  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 462 | 250_272 |
| AD-64728.1 | A-129376.1  | ACUCGUGGUGGACUUCACUCA | 247 | A-127906.23 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 463 | 250_272 |
| AD-64729.1 | A-129384.1  | ACUCGUGGTGGACUUCACUCA | 248 | A-127906.31 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 464 | 250_272 |

|            |             |                       |     |             |                         |     |         |
|------------|-------------|-----------------------|-----|-------------|-------------------------|-----|---------|
| AD-64730.1 | A-127905.25 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 249 | A-129392.1  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 465 | 250_272 |
| AD-64731.1 | A-129399.1  | ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA | 250 | A-129385.3  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 466 | 250_272 |
| AD-64732.1 | A-129376.3  | ACUCGUGGUGGACUUCACUCA | 251 | A-129389.3  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 467 | 250_272 |
| AD-64733.1 | A-129381.4  | ACUCGUGGTGTACUUCACUCA | 252 | A-129391.6  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 468 | 250_272 |
| AD-64734.1 | A-129377.1  | ACUCGUGGUGGACUUCCCUCA | 253 | A-127906.24 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 469 | 250_272 |
| AD-64735.1 | A-127905.18 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 254 | A-129385.1  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 470 | 250_272 |
| AD-64736.1 | A-127905.26 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 255 | A-129393.1  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 471 | 250_272 |
| AD-64737.1 | A-129399.2  | ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA | 256 | A-129398.2  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 472 | 250_272 |
| AD-64738.1 | A-129382.3  | ACUCGUGGTGGACUUCTCUCA | 257 | A-129389.4  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 473 | 250_272 |
| AD-64739.1 | A-129378.1  | ACUCGUGGUGGACUUCGCUCA | 258 | A-127906.25 | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 474 | 250_272 |
| AD-64740.1 | A-127905.19 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 259 | A-129386.1  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 475 | 250_272 |
| AD-64741.1 | A-127905.27 | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 260 | A-129394.1  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 476 | 250_272 |
| AD-64742.1 | A-129373.2  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA | 261 | A-129385.4  | UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU | 477 | 250_272 |
| AD-64743.1 | A-129384.3  | ACUCGUGGTGGACUUCACUCA | 262 | A-129389.5  | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU | 478 | 250_272 |

Таблица 4. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA HBV

| Название дуплекса | Название смыслового олигонуклеотида | Смысловая последовательность (5'-3')    | SEQ ID NO: | Название антисмыслового олигонуклеотида | Антисмысловая последовательность (5'-3') | SEQ ID NO: |
|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------|
| AD-61522.2        | A-123463.2                          | AfsgsUfuAfuAfuGfGfAfuGfaUfgUfgGfuA fL96 | 479        | A-123464.2                              | usAfscCfaCfaUfcAfuccAfuAfuA faCfusgsa    | 694        |
| AD-61547.2        | A-123487.2                          | GfsgsAfuGfuGfuCfUfGfcGfgCfgUfuUfuA fL96 | 480        | A-123488.2                              | usAfsaAfaCfgCfcGfcagAfcAfcA fuCfcsasg    | 695        |
| AD-63938.2        | A-127896.1                          | Y44ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 481        | A-127897.1                              | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 696        |
| AD-               | A-127909.1                          | ascsucGfuGfgUfGfGfaCfuucUfcucaL96       | 482        | A-127906.3                              | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcG              | 697        |

|            |             |                                        |     |             |                                        |     |
|------------|-------------|----------------------------------------|-----|-------------|----------------------------------------|-----|
| 63939.2    |             |                                        |     |             | faGfuscsu                              |     |
| AD-63940.2 | A-127917.1  | ascsucguggugdGacuuc (Tgn) cucaL96      | 483 | A-127906.11 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu   | 698 |
| AD-63941.2 | A-127905.8  | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 484 | A-127925.1  | usGfsaGfagaAfguccacfcAfcgaGfuscsu      | 699 |
| AD-63942.2 | A-127933.1  | uscsGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96     | 485 | A-127934.1  | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfasgsu      | 700 |
| AD-63943.2 | A-127944.2  | ascsucGfuGfgUfGfGfaCfuucucucaL96       | 486 | A-127942.2  | usGfsAfgaGfaAfgUfccacfcAfcGfaguscsu    | 701 |
| AD-63945.2 | A-127910.1  | ascsucguGfgUfGfGfaCfuucUfcucaL96       | 487 | A-127906.4  | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu   | 702 |
| AD-63946.2 | A-127918.1  | ascsucguGfgUfGfGfacuUfcucucaL96        | 488 | A-127906.12 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu   | 703 |
| AD-63947.2 | A-127905.9  | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 489 | A-127926.1  | usGfsaGfagaagUfccacfcAfcgaGfuscsu      | 704 |
| AD-63948.2 | A-127935.1  | gsusGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96        | 490 | A-127936.1  | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcsgsa         | 705 |
| AD-63949.2 | A-127944.3  | ascsucGfuGfgUfGfGfaCfuucucucaL96       | 491 | A-127906.14 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu   | 706 |
| AD-63950.2 | A-127900.1  | Y44UfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfusuY44 | 492 | A-127901.1  | usGfsasGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfausu     | 707 |
| AD-63951.2 | A-127911.1  | ascsucguGfgUfGfGfaCfuucucucaL96        | 493 | A-127906.5  | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu   | 708 |
| AD-63952.2 | A-127905.2  | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 494 | A-127919.1  | usGfsaGfaGfaagUfccacfcAfcGfaGfuscsu    | 709 |
| AD-63953.2 | A-127905.10 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 495 | A-127927.1  | usGfsagagaAfgUfccacfcAfcgaguscsu       | 710 |
| AD-63955.2 | A-127945.1  | ascsucgugguGfGfacuucucucaL96           | 496 | A-127940.3  | usGfsAfgAfgAfaGfuccaCfcCfaCf gAfguscsu | 711 |
| AD-63956.2 | A-127902.1  | Y44uscsGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfY44   | 497 | A-127903.1  | usGfsaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfasusu     | 712 |
| AD-63957.2 | A-127912.1  | ascsucguGfgUfGfGfacuucucucaL96         | 498 | A-127906.6  | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu   | 713 |
| AD-63958.2 | A-127905.3  | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 499 | A-127920.1  | usGfsagaGfaAfgUfccacfcAfcgaGfuscsu     | 714 |
| AD-63959.2 | A-127905.11 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 500 | A-127928.1  | usGfsaGfagaAfguccacfcAfcgaguscsu       | 715 |
| AD-63960.2 | A-126619.2  | usasUfuUfcCfcfuAfgGfgUfaCfaAfL96       | 501 | A-127938.1  | PusGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcsgsa        | 716 |
| AD-63961.2 | A-127945.2  | ascsucgugguGfGfacuucucucaL96           | 502 | A-127942.3  | usGfsAfgaGfaAfgUfccacfcAfcGfaguscsu    | 717 |

|            |             |                                       |     |             |                                       |     |
|------------|-------------|---------------------------------------|-----|-------------|---------------------------------------|-----|
| AD-63962.2 | A-127902.2  | Y44uscsGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfY44  | 503 | A-127904.1  | PusGfsaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfCgfasusu   | 718 |
| AD-63963.2 | A-127913.1  | ascsucguggUfgGfacuucucucaL96          | 504 | A-127906.7  | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu  | 719 |
| AD-63964.2 | A-127905.4  | AfscsUfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 505 | A-127921.1  | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcgaguscsu    | 720 |
| AD-63965.2 | A-127905.12 | AfscsUfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 506 | A-127929.1  | usGfsagaGfaaGfuccaCfcAfcgaguscsu      | 721 |
| AD-63966.2 | A-127939.1  | ascsUfcGfugguGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96   | 507 | A-127940.1  | usGfsAfgAfgAfaGfuccaCfcCfaCfGafguscsu | 722 |
| AD-63967.2 | A-127945.3  | ascsucgugguGfGfacuucucucaL96          | 508 | A-127906.15 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu  | 723 |
| AD-63968.2 | A-127905.1  | AfscsUfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 509 | A-127906.1  | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu  | 724 |
| AD-63968.4 | A-127905.15 | AfscsUfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 510 | A-127906.17 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu  | 725 |
| AD-63968.5 | A-127905.17 | AfscsUfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 511 | A-127906.18 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu  | 726 |
| AD-63969.2 | A-127914.1  | ascsucguggugGfacuucucucaL96           | 512 | A-127906.8  | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu  | 727 |
| AD-63970.2 | A-127905.5  | AfscsUfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 513 | A-127922.1  | usGfsagaGfaagUfccacfcAfcgaGfuscsu     | 728 |
| AD-63971.2 | A-127905.13 | AfscsUfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 514 | A-127930.1  | usGfsagaGfaaguccaCfcAfcgaguscsu       | 729 |
| AD-63972.2 | A-127941.1  | ascsUfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96  | 515 | A-127942.1  | usGfsAfgaGfaAfgUfccacfcAfcGfaguscsu   | 730 |
| AD-63973.2 | A-127946.1  | ascsucguggudGdGacuucucucaL96          | 516 | A-127947.1  | usdGsaGfaGfaAfgdTccadCcAfcGfaguscsu   | 731 |
| AD-63975.2 | A-127915.1  | ascsucguggUfgGfacuuc (Tgn) cucaL96    | 517 | A-127906.9  | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu  | 732 |
| AD-63976.2 | A-127905.6  | AfscsUfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 518 | A-127923.1  | usGfsagaGfaAfgUfccacfcAfcgaguscsu     | 733 |
| AD-63977.2 | A-127917.2  | ascsucguggudGacuuc (Tgn) cucaL96      | 519 | A-127931.1  | usdGsagagaaguccadCcacgaguscsu         | 734 |
| AD-63978.2 | A-127943.1  | ascsUfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96  | 520 | A-127906.13 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu  | 735 |
| AD-63979.2 | A-127908.1  | ascsucGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96   | 521 | A-127906.2  | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu  | 736 |
| AD-63980.2 | A-127916.1  | ascsucguggugGfacuuc (Tgn) cucaL96     | 522 | A-127906.10 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu  | 737 |
| AD-        | A-127905.7  | AfscsUfcGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 523 | A-127924.1  | usGfsaGfagaAfgUfccacfcAfcga           | 738 |

|            |             |                                         |     |             |                                        |     |
|------------|-------------|-----------------------------------------|-----|-------------|----------------------------------------|-----|
| 63981.2    |             | fL96                                    |     |             | Gfuscsu                                |     |
| AD-63982.2 | A-127917.3  | ascsucguggugdGacuuc (Tgn) cucaL96       | 524 | A-127932.1  | PusdGsagagaaguccadCcacgagus csu        | 739 |
| AD-63983.2 | A-127944.1  | ascsucGfuGfguGfGfaCfuucucucaL96         | 525 | A-127940.2  | usGfsAfgAfgAfaGfuccaCfCfaCf gAfguscsu  | 740 |
| AD-63985.2 | A-127961.1  | gsusggugGfaCfUfUfcUfcucAfauuuL96        | 526 | A-127956.4  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcAfcsgsa  | 741 |
| AD-63986.2 | A-127969.1  | gsusggugGfaCfUfUfcucuCfaauuuL96         | 527 | A-127956.12 | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcAfcsgsa  | 742 |
| AD-63987.2 | A-127955.9  | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuU fL96 | 528 | A-127977.1  | asAfsaUfugagaGfaagUfcCfaccA fcsgsa     | 743 |
| AD-63988.2 | A-127986.1  | usgsGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96         | 529 | A-127987.1  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfas csc        | 744 |
| AD-63989.2 | A-127996.1  | gsusgguggacUfUfcucucaauuuL96            | 530 | A-127992.2  | asAfsAfUfuGfaGfaGfaagUfcCfa Cfcacsgsa  | 745 |
| AD-63990.2 | A-127950.1  | Y44GfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfaUfuUfus uY44 | 531 | A-127951.1  | asAfsasUfuGfaGfaGfaAfgUfcCf aCfcusu    | 746 |
| AD-63991.2 | A-127962.1  | gsusggugGfaCfUfUfcUfcucaauuuL96         | 532 | A-127956.5  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcAfcsgsa  | 747 |
| AD-63992.2 | A-127955.2  | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuU fL96 | 533 | A-127970.1  | asAfsaUfuGfagaGfaagUfcCfaCf cAfcsgsa   | 748 |
| AD-63993.2 | A-127955.10 | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuU fL96 | 534 | A-127978.1  | asAfsauugaGfaGfaagUfcCfacc a csgsa     | 749 |
| AD-63994.2 | A-127984.2  | gsgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96       | 535 | A-127988.1  | PasAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfa Cfcscasc   | 750 |
| AD-63995.2 | A-127996.2  | gsusgguggacUfUfcucucaauuuL96            | 536 | A-127993.2  | asAfsAfuuGfaGfaGfaagUfcCfcaC fcacsgsa  | 751 |
| AD-63996.2 | A-127952.1  | Y44gsgsUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfaUfuUfY 44   | 537 | A-127953.1  | asAfsaUfuGfaGfaGfaAfgUfcCfa Cfcusu     | 752 |
| AD-63997.2 | A-127963.1  | gsusggugGfaCfUfUfcucucaauuuL96          | 538 | A-127956.6  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcAfcsgsa  | 753 |
| AD-63999.2 | A-127955.11 | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuU fL96 | 539 | A-127979.1  | asAfsaUfugaGfagaagUfcCfacc a csgsa     | 754 |
| AD-64000.2 | A-127986.2  | usgsGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96         | 540 | A-127989.1  | PasAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfa scsc       | 755 |
| AD-64001.2 | A-127996.3  | gsusgguggacUfUfcucucaauuuL96            | 541 | A-127994.2  | asAfsAfUfuGfaGfaGfaagUfcCfca Cfcacsgsa | 756 |
| AD-64002.2 | A-127952.2  | Y44gsgsUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfaUfuUfY 44   | 542 | A-127954.1  | PasAfsaUfuGfaGfaGfaAfgUfcCf aCfcusu    | 757 |
| AD-64003.2 | A-127964.1  | gsusgguggaCfuUfcucucaauuuL96            | 543 | A-127956.7  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcAfcsgsa  | 758 |

|            |             |                                           |     |             |                                        |     |
|------------|-------------|-------------------------------------------|-----|-------------|----------------------------------------|-----|
| AD-64004.2 | A-127955.4  | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96    | 544 | A-127972.1  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfac cacs gsa   | 759 |
| AD-64005.2 | A-127955.12 | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96    | 545 | A-127980.1  | asAfsauuGfagAfgaagUfcCfacc a csgsa     | 760 |
| AD-64006.2 | A-127990.1  | gsusGfgugGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuL96        | 546 | A-127991.1  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcacs gsa  | 761 |
| AD-64007.2 | A-127996.4  | gsusgguggacUfUfcucucauuuL96               | 547 | A-127995.2  | asAfsAfUfugaGfaGfaagUfCfcaC fcacs gsa  | 762 |
| AD-64008.2 | A-127955.1  | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96    | 548 | A-127956.1  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcAfcsgsa  | 763 |
| AD-64008.4 | A-127955.15 | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96    | 549 | A-127956.14 | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcAfcsgsa  | 764 |
| AD-64009.2 | A-127965.1  | gsusgguggacuUfcucucauuuL96                | 550 | A-127956.8  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcAfcsgsa  | 765 |
| AD-64010.2 | A-127955.5  | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96    | 551 | A-127973.1  | asAfsauuGfagaGfaagUfcCfaccA fcsgsa     | 766 |
| AD-64011.2 | A-127955.13 | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96    | 552 | A-127981.1  | asAfsauuGfagagaagUfcCfaccac sgsa       | 767 |
| AD-64012.2 | A-127990.2  | gsusGfgugGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuL96        | 553 | A-127992.1  | asAfsAfUfuGfaGfaGfaagUfcCfa Cfcacs gsa | 768 |
| AD-64013.2 | A-127997.1  | gsusgguggacdTdTcucucauuuL96               | 554 | A-127998.1  | asdAsAfuugaGfaGfaagdTdCcaCf cacs gsa   | 769 |
| AD-64014.2 | A-127957.1  | Y44GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96 | 555 | A-127958.1  | PasAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfa CfcAfcsgsa | 770 |
| AD-64015.2 | A-127966.1  | gsusgguggaCfuUfcucuc (Agn) auuuL96        | 556 | A-127956.9  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcAfcsgsa  | 771 |
| AD-64016.2 | A-127955.6  | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96    | 557 | A-127974.1  | asAfsauuGfaGfaGfaagUfcCfacc acsgsa     | 772 |
| AD-64017.2 | A-127968.2  | gsusgguggacudTcucuc (Agn) auuuL96         | 558 | A-127982.1  | asdAsauugagagaagdTccaccacs gsa         | 773 |
| AD-64018.2 | A-127990.3  | gsusGfgugGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuL96        | 559 | A-127993.1  | asAfsAfuuGfaGfaGfaagUfcCfcaC fcacs gsa | 774 |
| AD-64019.2 | A-127959.1  | gsusggUfgGfaCfUfUfcUfcucAfaUfuL96         | 560 | A-127956.2  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcAfcsgsa  | 775 |
| AD-64020.2 | A-127967.1  | gsusgguggacuUfcucuc (Agn) auuuL96         | 561 | A-127956.10 | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaC fcAfcsgsa  | 776 |
| AD-64021.2 | A-127955.7  | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96    | 562 | A-127975.1  | asAfsaUfugaGfaGfaagUfcCfacc Afcsgsa    | 777 |
| AD-64022.2 | A-127968.3  | gsusgguggacudTcucuc (Agn) auuuL96         | 563 | A-127983.1  | PasdAsauugagagaagdTccaccacs gsa        | 778 |
| AD-        | A-127990.4  | gsusGfgugGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuL96        | 564 | A-127994.1  | asAfsAfUfuGfaGfaGfaagUfCfca            | 779 |

|            |            |                                        |     |             |                                       |     |
|------------|------------|----------------------------------------|-----|-------------|---------------------------------------|-----|
| 64023.2    |            | 6                                      |     |             | Cfcacsgsa                             |     |
| AD-64024.2 | A-127960.1 | gsusggUfgGfaCfUfUfcUfcucAfaauuL96      | 565 | A-127956.3  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgsa  | 780 |
| AD-64025.2 | A-127968.1 | gsusgguggacudTcucuc (Agn) auuuL96      | 566 | A-127956.11 | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgsa  | 781 |
| AD-64026.2 | A-127955.8 | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96 | 567 | A-127976.1  | asAfsaUfugaGfagaagUfcCfaccAfcsgsa     | 782 |
| AD-64027.2 | A-127984.1 | gsgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96      | 568 | A-127985.1  | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcsasc     | 783 |
| AD-64028.2 | A-127990.5 | gsusGfgugGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuL96     | 569 | A-127995.1  | asAfsAfUfugaGfaGfaagUfcCfaCfcacsgsa   | 784 |
| AD-64272.2 | A-128001.2 | GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuGfL96 | 570 | A-128002.2  | csAfsGfGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfcscasc   | 785 |
| AD-64274.1 | A-128363.1 | GfsusUfgAfcAfaAfAfAfUfcUfcAfcAfaUfL96  | 571 | A-128364.1  | asUfsuGfuGfaGfgAfuuuUfuGfuCfaAfcscasa | 786 |
| AD-64275.1 | A-128377.1 | UfsgsUfuGfaCfaAfAfAfaUfcCfuCfaCfaAfL96 | 572 | A-128378.1  | usUfsgUfgAfgGfaUfuuuUfgUfcAfaCfasasg  | 787 |
| AD-64276.1 | A-128393.1 | GfsgsUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfaUfuUfuAfL96  | 573 | A-128394.1  | usAfsaAfaUfuGfaGfagaAfgUfcCfaCfcscasc | 788 |
| AD-64277.1 | A-128407.1 | UfscsUfuUfuGfgAfGfUfgUfgGfaUfuCfgAfL96 | 574 | A-128408.1  | usCfsgAfaUfcCfaCfacuCfcAfaAfaGfascsa  | 789 |
| AD-64277.1 | A-128407.1 | UfscsUfuUfuGfgAfGfUfgUfgGfaUfuCfgAfL96 | 575 | A-128408.1  | usCfsgAfaUfcCfaCfacuCfcAfaAfaGfascsa  | 790 |
| AD-64278.1 | A-128423.1 | AfscsUfgUfuCfaAfGfCfcUfcCfaAfgCfuAfL96 | 576 | A-128424.1  | usAfsGfUfgGfaGfgcuUfgAfaCfaAfgscasc   | 791 |
| AD-64279.1 | A-128435.1 | UfscsUfgCfcGfaUfcCfaUfaCfuGfcGfgAfL96  | 577 | A-128436.1  | usCfscGfcAfgUfaUfggaUfcGfgCfaGfasgsg  | 792 |
| AD-64280.1 | A-128379.1 | AfsusGfuGfuCfuGfCfGfgCfgUfuUfuAfuAfL96 | 578 | A-128380.1  | usAfsuAfaAfaCfgCfcgcAfgAfcAfaAfuscsc  | 793 |
| AD-64281.1 | A-128395.1 | CfscsCfcGfuCfuGfUfGfcCfuUfcUfcAfuAfL96 | 579 | A-128396.1  | usAfsuGfaGfaAfgGfcacAfgAfcGfgGfgsasg  | 794 |
| AD-64282.1 | A-128409.1 | GfscsCfuAfaUfcAfUfCfuCfuUfgUfuCfaUfL96 | 580 | A-128410.1  | asUfsgAfaCfaAfgAfgauGfaUfuAfgCfgsasg  | 795 |
| AD-64283.1 | A-128425.1 | UfscsUfaGfaCfuCfGfUfgGfuGfgAfcUfuCfL96 | 581 | A-128426.1  | gsAfsaGfuCfcAfcCfacgAfgUfcUfaGfascsu  | 796 |
| AD-64284.1 | A-128437.1 | CfsusGfcCfgAfuCfCfAfuAfcUfgCfgGfaAfL96 | 582 | A-128438.1  | usUfscCfgCfaGfuAfuggAfuCfgGfcAfgsasg  | 797 |
| AD-64285.1 | A-128365.1 | UfsusUfuUfcUfuGfUfUfgAfcAfaAfaAfuAfL96 | 583 | A-128366.1  | usAfsuUfuUfuGfuCfaacAfaGfaAfaAfasccsc | 798 |
| AD-64286.1 | A-128381.1 | AfsusCfuUfcUfuGfUfUfgGfuUfcUfuCfuAfL96 | 584 | A-128382.1  | usAfsGfaGfaAfcCfaacAfaGfaAfgAfusgsa   | 799 |

|            |            |                                         |     |            |                                       |     |
|------------|------------|-----------------------------------------|-----|------------|---------------------------------------|-----|
| AD-64289.1 | A-128367.1 | GfsusUfuUfuCfuUfGfUfuGfaCfaAfaAfaUfL96  | 585 | A-128368.1 | asUfsuUfuUfgUfcAfacaAfgAfaAfaAfcscsc  | 800 |
| AD-64290.1 | A-128383.1 | CfsusGfcCfuAfaUfCfAfuCfuCfuUfgUfuAfl96  | 586 | A-128384.1 | usAfsaCfaAfgAfgAfugaUfuAfgGfcAfgsasg  | 801 |
| AD-64291.1 | A-128399.1 | UfscsCfuCfaCfaAfUfAfcCfaCfaGfaGfuAfl96  | 587 | A-128400.1 | usAfscUfcUfgUfgGfuauUfgUfgAfgGfasusu  | 802 |
| AD-64292.1 | A-128413.1 | CfsusUfgUfuGfaCfAfAfaAfaUfcCfuCfaAfl96  | 588 | A-128414.1 | usUfsgAfgGfaUfuUfuugUfcAfaCfaAfgsasa  | 803 |
| AD-64293.1 | A-128439.1 | GfscsAfaCfuUfuUfUfCfaCfcUfcUfgCfcUfL96  | 589 | A-128440.1 | asGfsgCfaGfaGfgUfgaaAfaAfgUfuGfcsasu  | 804 |
| AD-64294.1 | A-128369.1 | GfsgsGfaAfcAfaGfAfGfcUfaCfaGfcAfuAfl96  | 590 | A-128370.1 | usAfsuGfcUfgUfaGfcucUfuGfuUfcCfcsasa  | 805 |
| AD-64295.1 | A-128385.1 | CfsgsUfgGfuGfgAfCfUfuCfuCfuCfaAfuUfL96  | 591 | A-128386.1 | asAfsuUfgAfgAfgAfaguCfcAfcCfaGfcsasg  | 806 |
| AD-64297.1 | A-128415.1 | CfsusGfcUfgCfuAfUfGfcCfuCfaUfcUfuAfl96  | 592 | A-128416.1 | usAfsaGfaUfgAfgGfcuAfgCfaGfcAfgsgsa   | 807 |
| AD-64298.1 | A-128427.1 | GfsusUfgGfaUfgUfGfUfcUfgCfGfGfcGfuUfL96 | 593 | A-128428.1 | asAfcGfcCfGcCfaGfacaCfaUfcCfaAfcsgsa  | 808 |
| AD-64299.1 | A-128441.1 | UfsusCfaUfcCfuGfCfUfgCfuAfuGfcCfuAfl96  | 594 | A-128442.1 | usAfgGfcAfuAfgCfagcAfgGfaUfgAfasgsa   | 809 |
| AD-64300.1 | A-128371.1 | UfsusCfuUfgUfuGfAfCfaAfaAfaUfcCfuAfl96  | 595 | A-128372.1 | usAfgGfaUfuUfuUfgucAfaCfaAfgAfasasa   | 810 |
| AD-64302.1 | A-128417.1 | UfsasUfaUfgGfaUfGfAfuGfuGfgUfaUfuAfl96  | 596 | A-128418.1 | usAfsaUfaCfcAfcAfucaUfcCfaUfaUfasasc  | 811 |
| AD-64303.1 | A-128429.1 | UfsusCfaUfcCfuGfCfUfgCfuAfuGfcCfuCfl96  | 597 | A-128430.1 | gsAfgGfcAfuAfgCfagcAfgGfaUfgAfasgsa   | 812 |
| AD-64304.1 | A-128443.1 | GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuAfl96  | 598 | A-128444.1 | usAfgAfgGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfcscasc  | 813 |
| AD-64305.1 | A-128373.1 | UfsusGfaCfaAfaAfAfUfcCfuCfaCfaAfuAfl96  | 599 | A-128374.1 | usAfsuUfgUfgAfgGfauuUfuUfgUfcAfascsa  | 814 |
| AD-64307.1 | A-128403.1 | AfsasGfcCfuCfcAfAfGfcUfgUfgCfcUfuAfl96  | 600 | A-128404.1 | usAfsaGfgCfaCfaGfcuuGfgAfgGfcUfusgsa  | 815 |
| AD-64308.1 | A-128419.1 | CfscsUfcUfuCfaUfCfCfuGfcUfgCfuAfuAfl96  | 601 | A-128420.1 | usAfsuAfgCfaGfcAfggaUfgAfaGfaGfgsasa  | 816 |
| AD-64309.1 | A-128431.1 | CfscsUfgCfuGfcUfAfUfgCfcUfcAfuCfuUfL96  | 602 | A-128432.1 | asAfgAfuGfaGfgCfauaGfcAfgCfaGfgsasusu | 817 |
| AD-64310.1 | A-128375.1 | CfsasUfcUfuCfuUfGfUfuGfgUfuCfuUfcUfL96  | 603 | A-128376.1 | asGfssaAfgAfaCfcAfacaAfgAfaGfaUfgsasg | 818 |
| AD-64311.1 | A-128391.1 | CfscsGfuCfuGfuGfCfCfuUfcUfcAfuCfuAfl96  | 604 | A-128392.1 | usAfgAfuGfaGfaAfggcAfcAfgAfcGfgsgsg   | 819 |
| AD-        | A-128405.1 | CfscsUfcAfuCfuUfCfUfuGfuUfgGfuUfcU      | 605 | A-128406.1 | asGfssaAfcCfaAfcAfagaAfgAfuG          | 820 |

|            |             |                                             |     |            |                                           |     |
|------------|-------------|---------------------------------------------|-----|------------|-------------------------------------------|-----|
| 64312.1    |             | fL96                                        |     |            | faGfgscsa                                 |     |
| AD-64313.1 | A-128421.1  | CfscsAfcCfaAfaUfGfCfcCfcUfaUfcUfuA<br>fL96  | 606 | A-128422.1 | usAfsaGfaUfaGfgGfgcaUfuUfgG<br>fuGfgsusc  | 821 |
| AD-64314.1 | A-128433.1  | GfscsUfcCfuCfuGfCfcGfgAfuCfcAfuAfcU<br>fL96 | 607 | A-128434.1 | asGfsuAfuGfgAfuCfggcAfgAfgG<br>faGfcsca   | 822 |
| AD-64315.1 | A-128363.2  | GfsusUfgAfcAfaAfAfAfuCfcUfcAfcAfaU<br>fL96  | 608 | A-128445.1 | PasUfsuGfuGfaGfgAfuuuUfuGfu<br>CfaAfcsasa | 823 |
| AD-64316.1 | A-128377.2  | UfsgsUfuGfaCfaAfAfAfaUfcCfuCfaCfaA<br>fL96  | 609 | A-128453.1 | PusUfsgUfgAfgGfaUfuuuUfgUfc<br>AfaCfasasg | 824 |
| AD-64317.1 | A-128393.2  | GfsgsUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfaUfuUfuA<br>fL96   | 610 | A-128461.1 | PusAfsaAfaUfuGfaGfagaAfgUfc<br>CfaCfcsasc | 825 |
| AD-64318.1 | A-128407.2  | UfscsUfuUfuGfgAfGfUfgUfgGfaUfuCfgA<br>fL96  | 611 | A-128469.1 | PusCfsgAfaUfcCfaCfacuCfcAfa<br>AfaGfasca  | 826 |
| AD-64319.1 | A-128423.2  | AfscsUfgUfuCfaAfGfCfcUfcCfaAfgCfuA<br>fL96  | 612 | A-128477.1 | PusAfsGcfuUfgGfaGfgcuUfgAfa<br>CfaAfgsasc | 827 |
| AD-64320.1 | A-128435.2  | UfscsUfgCfcGfaUfcCfaUfaCfuGfcGfgA<br>fL96   | 613 | A-128483.1 | PusCfscGfcAfgUfaUfggaUfcGfg<br>CfaGfasgsg | 828 |
| AD-64321.1 | A-123463.3  | AfsgsUfuAfuAfuGfGfAfuGfaUfgUfgGfuA<br>fL96  | 614 | A-128446.1 | PusAfsCfaCfaUfcAfuccAfuAfu<br>AfaCfusgsa  | 829 |
| AD-64322.1 | A-128379.2  | AfsusGfuGfuCfuGfCfGfgCfgUfuUfuAfuA<br>fL96  | 615 | A-128454.1 | PusAfsuAfaAfaCfgCfcgcAfgAfc<br>AfcAfuscsc | 830 |
| AD-64323.1 | A-128395.2  | CfscsCfcGfuCfuGfUfGfcCfuUfcUfcAfuA<br>fL96  | 616 | A-128462.1 | PusAfsuGfaGfaAfgGfcaAfgAfc<br>GfgGfgsasg  | 831 |
| AD-64324.1 | A-128409.2  | GfscsCfuAfaUfcAfUfcCfuCfuUfgUfuCfaU<br>fL96 | 617 | A-128470.1 | PasUfsgAfaCfaAfgAfgauGfaUfu<br>AfgCfsgasg | 832 |
| AD-64325.1 | A-128425.2  | UfscsUfaGfaCfuCfGfUfgGfuGfgAfcUfuC<br>fL96  | 618 | A-128478.1 | PgsAfsaGfuCfcAfcCfacgAfgUfc<br>UfaGfascsu | 833 |
| AD-64326.1 | A-128437.2  | CfsusGfcCfgAfuCfCfAfuAfcUfgCfgGfaA<br>fL96  | 619 | A-128484.1 | PusUfscCfgCfaGfuAfuggAfuCfg<br>GfcAfgsasg | 834 |
| AD-64328.1 | A-128381.2  | AfsusCfuUfcUfuGfUfUfgGfuUfcUfuCfuA<br>fL96  | 620 | A-128455.1 | PusAfsGfaGfaAfcCfaacAfaGfa<br>AfgAfusgsa  | 835 |
| AD-64330.1 | A-128411.2  | UfsusCfuCfuCfaAfUfUfuUfcUfaGfgGfgA<br>fL96  | 621 | A-128471.1 | PusCfscCfcUfaGfaAfaauUfgAfg<br>AfgAfasgsu | 836 |
| AD-64331.1 | A-127905.16 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA<br>fL96  | 622 | A-127907.2 | PusGfsaGfaGfaAfgUfccCfcAfc<br>GfaGfuscsu  | 837 |
| AD-64332.1 | A-128001.3  | GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuG<br>fL96  | 623 | A-128485.1 | PcsAfsGfgGfuGfaAfgcgAfaGfu<br>GfcAfcsasc  | 838 |
| AD-64333.1 | A-128367.2  | GfsusUfuUfuCfuUfGfUfuGfaCfaAfaAfaU<br>fL96  | 624 | A-128448.1 | PasUfsuUfuUfgUfcAfacaAfgAfa<br>AfaAfcsasc | 839 |
| AD-64334.1 | A-128383.2  | CfsusGfcCfuAfaUfcCfAfuCfuCfuUfgUfuA<br>fL96 | 625 | A-128456.1 | PusAfsaCfaAfgAfgAfugaUfuAfg<br>GfcAfgsasg | 840 |

|            |             |                                             |     |            |                                             |     |
|------------|-------------|---------------------------------------------|-----|------------|---------------------------------------------|-----|
| AD-64335.1 | A-128399.2  | UfscsCfuCfaCfaAfUfAfcCfaCfaGfaGfuA<br>fL96  | 626 | A-128464.1 | PusAfscUfcUfgUfgGfuauUfgUfg<br>AfgGfasusu   | 841 |
| AD-64336.1 | A-128413.2  | CfsusUfgUfuGfaCfAfAfaAfaUfcCfuCfaA<br>fL96  | 627 | A-128472.1 | PusUfsgAfgGfaUfuUfuugUfcAfa<br>CfaAfgsasa   | 842 |
| AD-64337.1 | A-127955.16 | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuU<br>fL96  | 628 | A-127958.2 | PasAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfa<br>CfcAfcsgsa   | 843 |
| AD-64338.1 | A-128439.2  | GfscsAfaCfuUfuUfUfCfaCfcUfcUfgCfcU<br>fL96  | 629 | A-128486.1 | PasGfsgCfaGfaGfgUfgaaAfaAfg<br>UfuGfcsasu   | 844 |
| AD-64339.1 | A-128369.2  | GfsgsGfaAfcAfaGfAfGfcUfaCfaGfcAfuA<br>fL96  | 630 | A-128449.1 | PusAfsuGfcUfgUfaGfcucUfuGfu<br>UfcCfcsasa   | 845 |
| AD-64341.1 | A-128401.2  | UfscsAfuCfuUfcUfUfGfuUfgGfuUfcUfuA<br>fL96  | 631 | A-128465.1 | PusAfsaGfaAfcCfaAfcaaGfaAfg<br>AfuGfasgsg   | 846 |
| AD-64342.1 | A-128415.2  | CfsusGfcUfgCfuAfUfGfcCfuCfaUfcUfuA<br>fL96  | 632 | A-128473.1 | PusAfsaGfaUfgAfgGfcuAfgCfa<br>GfcAfgsgsa    | 847 |
| AD-64343.1 | A-128427.2  | GfsusUfgGfaUfgUfGfUfcUfgCfGfcGfuU<br>fL96   | 633 | A-128479.1 | PasAfscGfcCfGcfaGfacaCfaUfc<br>CfaAfcsgsa   | 848 |
| AD-64344.1 | A-128441.2  | UfsusCfaUfcCfuGfcUfgCfuAfuGfcCfuA<br>fL96   | 634 | A-128487.1 | PusAfsgGfcAfuAfgCfagcAfgGfa<br>UfgAfasgsa   | 849 |
| AD-64345.1 | A-128371.2  | UfsusCfuUfgUfuGfAfCfaAfaAfaUfcCfuA<br>fL96  | 635 | A-128450.1 | PusAfsgGfaUfuUfuUfgucAfaCfa<br>AfgAfasasa   | 850 |
| AD-64347.1 | A-123487.3  | GfsgsAfuGfuGfuCfUfGfcGfgCfGfuUfuA<br>fL96   | 636 | A-128466.1 | PusAfsaAfaCfGcCfcGfcagAfcAfc<br>AfuCfcsasg  | 851 |
| AD-64348.1 | A-128417.2  | UfsasUfaUfgGfaUfGfAfuGfuGfgUfaUfuA<br>fL96  | 637 | A-128474.1 | PusAfsaUfaCfcAfcAfucaUfcCfa<br>UfaUfasasc   | 852 |
| AD-64349.1 | A-128429.2  | UfsusCfaUfcCfuGfcUfgCfuAfuGfcCfuC<br>fL96   | 638 | A-128480.1 | PgsAfsgGfcAfuAfgCfagcAfgGfa<br>UfgAfasgsa   | 853 |
| AD-64350.1 | A-128443.2  | GfsusGfcAfcUfuCfGfcCfuUfcAfcCfuCfuA<br>fL96 | 639 | A-128488.1 | PusAfsgAfgGfuGfaAfgcgAfaGfu<br>GfcAfcscasc  | 854 |
| AD-64351.1 | A-128373.2  | UfsusGfaCfaAfaAfAfUfcCfuCfaCfaAfuA<br>fL96  | 640 | A-128451.1 | PusAfsuUfgUfgAfgGfauuUfuUfg<br>UfcAfascsa   | 855 |
| AD-64352.1 | A-128389.2  | CfscsAfaGfuGfuUfUfGfcUfgAfcGfcAfaA<br>fL96  | 641 | A-128459.1 | PusUfsuGfcGfuCfaGfcaaAfcAfc<br>UfuGfgscsa   | 856 |
| AD-64352.1 | A-128389.2  | CfscsAfaGfuGfuUfUfGfcUfgAfcGfcAfaA<br>fL96  | 642 | A-128459.1 | PusUfsuGfcGfuCfaGfcaaAfcAfc<br>UfuGfgscsa   | 857 |
| AD-64353.1 | A-128403.2  | AfsasGfcCfuCfcAfAfGfcUfgUfgCfcUfuA<br>fL96  | 643 | A-128467.1 | PusAfsaGfgCfaCfaGfcuuGfgAfg<br>GfcUfusgsa   | 858 |
| AD-64354.1 | A-128419.2  | CfscsUfcUfuCfaUfCfCfuGfcUfgCfuAfuA<br>fL96  | 644 | A-128475.1 | PusAfsuAfgCfaGfcAfggaUfgAfa<br>GfaGfgsasa   | 859 |
| AD-64355.1 | A-128431.2  | CfscsUfgCfuGfcUfAfUfgCfcUfcAfuCfuU<br>fL96  | 645 | A-128481.1 | PasAfsgAfuGfaGfgCfauaGfcAfg<br>CfaGfgsasusu | 860 |
| AD-        | A-128375.2  | CfsasUfcUfuCfuUfGfUfuGfgUfuCfuUfcU          | 646 | A-128452.1 | PasGfsaAfgAfaCfcAfacaAfgAfa                 | 861 |

|            |             |                                            |     |             |                                            |     |
|------------|-------------|--------------------------------------------|-----|-------------|--------------------------------------------|-----|
| 64356.1    |             | fL96                                       |     |             | GfaUfgsasg                                 |     |
| AD-64357.1 | A-128391.2  | CfscsGfuCfuGfuGfCfCfuUfcUfcAfuCfuA<br>fL96 | 647 | A-128460.1  | PusAfsGfuAfuGfaGfaAfggCfcAfg<br>AfcGfgsgsg | 862 |
| AD-64358.1 | A-128405.2  | CfscsUfcAfuCfuUfcUfuGfuUfgGfuUfcU<br>fL96  | 648 | A-128468.1  | PasGfsaAfcCfaAfcAfagaAfgAfu<br>GfaGfgscsa  | 863 |
| AD-64359.1 | A-128421.2  | CfscsAfcCfaAfaUfGfCfcCfcUfaUfcUfuA<br>fL96 | 649 | A-128476.1  | PusAfsaGfaUfaGfgGfgcaUfuUfg<br>GfuGfgsusc  | 864 |
| AD-64360.1 | A-128433.2  | GfscsUfcCfuCfuGfCfCfGafuCfcAfuAfcU<br>fL96 | 650 | A-128482.1  | PasGfsuAfuGfgAfuCfggcAfgAfg<br>GfaGfscsa   | 865 |
| AD-64700.1 | A-129379.1  | ascsucguggugdTacuu (Cgn) ucucal96          | 651 | A-127906.26 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcG<br>faGfuscsu   | 866 |
| AD-64701.1 | A-127905.20 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA<br>fL96 | 652 | A-129387.1  | PusgsagagaagdTccadCcacgagus<br>csu         | 867 |
| AD-64702.1 | A-127905.28 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA<br>fL96 | 653 | A-129395.1  | usGsagadGaagucaCcacgaguscs<br>u            | 868 |
| AD-64703.1 | A-129376.2  | ascsucguggugdGacuucdAcucal96               | 654 | A-129385.5  | usdGsagagaagdTccadCcacgagus<br>csu         | 869 |
| AD-64704.1 | A-129381.3  | ascsucguggdTgdTacuucdAcucal96              | 655 | A-129389.6  | usdGsagadGaaguccadCcacgagus<br>csu         | 870 |
| AD-64705.1 | A-129380.1  | ascsucguggugdTacuucdAcucal96               | 656 | A-127906.27 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcG<br>faGfuscsu   | 871 |
| AD-64706.1 | A-127905.21 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA<br>fL96 | 657 | A-129388.1  | usdGsadGagaaguccadCcacgagus<br>csu         | 872 |
| AD-64707.1 | A-127905.29 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA<br>fL96 | 658 | A-129396.1  | usgsagadGaagdTccadCcacgagus<br>csu         | 873 |
| AD-64708.1 | A-129382.2  | ascsucguggdTgdGacuuc (Tgn) cucaL96         | 659 | A-129385.6  | usdGsagagaagdTccadCcacgagus<br>csu         | 874 |
| AD-64709.1 | A-129373.4  | ascsucguggugdGacuu (Cgn) ucucal96          | 660 | A-129391.2  | usdGsagadGaagdTccadCcacgagu<br>scsu        | 875 |
| AD-64710.1 | A-129373.1  | ascsucguggugdGacuu (Cgn) ucucal96          | 661 | A-127906.20 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcG<br>faGfuscsu   | 876 |
| AD-64711.1 | A-129381.1  | ascsucguggdTgdTacuucdAcucal96              | 662 | A-127906.28 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcG<br>faGfuscsu   | 877 |
| AD-64712.1 | A-127905.22 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA<br>fL96 | 663 | A-129389.1  | usdGsagadGaaguccadCcacgagus<br>csu         | 878 |
| AD-64713.1 | A-127905.30 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA<br>fL96 | 664 | A-129397.1  | PusgsagadGaagdTccadCcacgagu<br>scsu        | 879 |
| AD-64714.1 | A-129384.2  | ascsucguggdTgdGacuucdAcucal96              | 665 | A-129385.7  | usdGsagagaagdTccadCcacgagus<br>csu         | 880 |
| AD-64715.1 | A-129376.4  | ascsucguggugdGacuucdAcucal96               | 666 | A-129391.3  | usdGsagadGaagdTccadCcacgagu<br>scsu        | 881 |

|            |             |                                         |     |             |                                      |     |
|------------|-------------|-----------------------------------------|-----|-------------|--------------------------------------|-----|
| AD-64716.1 | A-129374.1  | ascsucguggugdGacuucu (Cgn) ucaL96       | 667 | A-127906.21 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu | 882 |
| AD-64717.1 | A-129382.1  | ascsucguggdTgdGacuuc (Tgn) cucaL96      | 668 | A-127906.29 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu | 883 |
| AD-64718.1 | A-127905.23 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA fL96 | 669 | A-129390.1  | usdGsagagadAguccadCcacgaguscsu       | 884 |
| AD-64719.1 | A-127917.5  | ascsucguggugdGacuuc (Tgn) cucaL96       | 670 | A-129385.2  | usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu       | 885 |
| AD-64720.1 | A-129381.2  | ascsucguggdTgdTacuucdAcucaL96           | 671 | A-129385.8  | usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu       | 886 |
| AD-64721.1 | A-129382.4  | ascsucguggdTgdGacuuc (Tgn) cucaL96      | 672 | A-129391.4  | usdGsagadGaagdTccadCcacgaguscsu      | 887 |
| AD-64722.1 | A-129375.1  | ascsucguggugdGacuucY34cucaL96           | 673 | A-127906.22 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu | 888 |
| AD-64723.1 | A-129383.1  | ascsucguggugdGdAcuuc (Tgn) cucaL96      | 674 | A-127906.30 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu | 889 |
| AD-64725.1 | A-127917.6  | ascsucguggugdGacuuc (Tgn) cucaL96       | 675 | A-129398.1  | PusdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu      | 890 |
| AD-64726.1 | A-129373.3  | ascsucguggugdGacuu (Cgn) ucucaL96       | 676 | A-129389.2  | usdGsagadGaaguccadCcacgaguscsu       | 891 |
| AD-64727.1 | A-129384.4  | ascsucguggdTgdGacuucdAcucaL96           | 677 | A-129391.5  | usdGsagadGaagdTccadCcacgaguscsu      | 892 |
| AD-64728.1 | A-129376.1  | ascsucguggugdGacuucdAcucaL96            | 678 | A-127906.23 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu | 893 |
| AD-64729.1 | A-129384.1  | ascsucguggdTgdGacuucdAcucaL96           | 679 | A-127906.31 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu | 894 |
| AD-64730.1 | A-127905.25 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA fL96 | 680 | A-129392.1  | usGsagagaagdTccadCcacgaguscsu        | 895 |
| AD-64731.1 | A-129399.1  | Y34ascsucguggugdGacuuc (Tgn) cucaL96    | 681 | A-129385.3  | usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu       | 896 |
| AD-64732.1 | A-129376.3  | ascsucguggugdGacuucdAcucaL96            | 682 | A-129389.3  | usdGsagadGaaguccadCcacgaguscsu       | 897 |
| AD-64733.1 | A-129381.4  | ascsucguggdTgdTacuucdAcucaL96           | 683 | A-129391.6  | usdGsagadGaagdTccadCcacgaguscsu      | 898 |
| AD-64734.1 | A-129377.1  | ascsucguggugdGacuucdCcucaL96            | 684 | A-127906.24 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu | 899 |
| AD-64735.1 | A-127905.18 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA fL96 | 685 | A-129385.1  | usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu       | 900 |
| AD-64736.1 | A-127905.26 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA fL96 | 686 | A-129393.1  | usdGsagagaagdTccaCcacgaguscsu        | 901 |
| AD-        | A-129399.2  | Y34ascsucguggugdGacuuc (Tgn) cucaL96    | 687 | A-129398.2  | PusdGsagagaagdTccadCcacgagus         | 902 |

|                |             |                                            |     |             |                                          |     |
|----------------|-------------|--------------------------------------------|-----|-------------|------------------------------------------|-----|
| 64737.1        |             |                                            |     |             | scsu                                     |     |
| AD-<br>64738.1 | A-129382.3  | ascsucguggdTgdGacuuc (Tgn) cucaL96         | 688 | A-129389.4  | usdGsagadGaaguccadCcacgagus<br>csu       | 903 |
| AD-<br>64739.1 | A-129378.1  | ascsucguggugdGacuucdGcucaL96               | 689 | A-127906.25 | usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcG<br>faGfuscsu | 904 |
| AD-<br>64740.1 | A-127905.19 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA<br>fL96 | 690 | A-129386.1  | usgsagagaagdTccadCcacgagus<br>csu        | 905 |
| AD-<br>64741.1 | A-127905.27 | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcA<br>fL96 | 691 | A-129394.1  | usGsagagaagdTccaCcacgagus<br>csu         | 906 |
| AD-<br>64742.1 | A-129373.2  | ascsucguggugdGacuu (Cgn) ucucaL96          | 692 | A-129385.4  | usdGsagagaagdTccadCcacgagus<br>csu       | 907 |
| AD-<br>64743.1 | A-129384.3  | ascsucguggdTgdGacuucdAcucaL96              | 693 | A-129389.5  | usdGsagadGaaguccadCcacgagus<br>csu       | 908 |

**Таблица 5. Скрининг в отношении разовой дозы HBV с помощью анализа с использованием системы Dual-Glo Luciferase®**

| ID дуплекса | 10 нМ, средн. | 0,1 нМ, средн. | 10 нМ, SD | 0,1 нМ, SD |
|-------------|---------------|----------------|-----------|------------|
| AD-63938.2  | 0,12          | ND             | 0,01      | ND         |
| AD-63950.2  | 0,38          | ND             | 0,04      | ND         |
| AD-63956.2  | 0,31          | ND             | 0,02      | ND         |
| AD-63962.2  | 0,16          | ND             | 0,03      | ND         |
| AD-63968.2  | 0,56          | ND             | 0,10      | ND         |
| AD-63968.2  | 0,79          | ND             | 0,09      | ND         |
| AD-63979.2  | 0,54          | ND             | 0,02      | ND         |
| AD-63939.2  | 0,51          | ND             | 0,01      | ND         |
| AD-63945.2  | 0,54          | ND             | 0,08      | ND         |
| AD-63951.2  | 0,60          | ND             | 0,03      | ND         |
| AD-63957.2  | 0,57          | ND             | 0,02      | ND         |
| AD-63963.2  | 0,91          | ND             | 0,06      | ND         |
| AD-63969.2  | 0,92          | ND             | 0,02      | ND         |
| AD-63975.2  | 0,83          | ND             | 0,01      | ND         |
| AD-63980.2  | 0,77          | ND             | 0,01      | ND         |
| AD-63940.2  | 0,77          | ND             | 0,06      | ND         |
| AD-63946.2  | 0,60          | ND             | 0,10      | ND         |
| AD-63952.2  | 0,48          | ND             | 0,04      | ND         |
| AD-63958.2  | 0,51          | ND             | 0,01      | ND         |
| AD-63964.2  | 0,58          | ND             | 0,04      | ND         |
| AD-63970.2  | 0,69          | ND             | 0,07      | ND         |
| AD-63976.2  | 0,63          | ND             | 0,04      | ND         |
| AD-63981.2  | 0,60          | ND             | 0,04      | ND         |
| AD-63941.2  | 0,56          | ND             | 0,09      | ND         |
| AD-63947.2  | 0,55          | ND             | 0,08      | ND         |
| AD-63953.2  | 0,56          | ND             | 0,06      | ND         |
| AD-63959.2  | 0,51          | ND             | 0,03      | ND         |
| AD-63965.2  | 0,55          | ND             | 0,03      | ND         |
| AD-63971.2  | 0,65          | ND             | 0,02      | ND         |
| AD-63977.2  | 0,88          | ND             | 0,01      | ND         |
| AD-63982.2  | 0,73          | ND             | 0,07      | ND         |
| AD-63942.2  | 0,32          | ND             | 0,09      | ND         |
| AD-63948.2  | 0,57          | ND             | 0,09      | ND         |
| AD-63960.2  | 0,92          | ND             | 0,05      | ND         |
| AD-63966.2  | 0,85          | ND             | 0,06      | ND         |
| AD-63972.2  | 0,82          | ND             | 0,06      | ND         |
| AD-63978.2  | 0,83          | ND             | 0,02      | ND         |
| AD-63983.2  | 0,89          | ND             | 0,02      | ND         |
| AD-63943.2  | 0,86          | ND             | 0,04      | ND         |
| AD-63949.2  | 0,76          | ND             | 0,02      | ND         |
| AD-63955.2  | 0,82          | ND             | 0,02      | ND         |
| AD-63961.2  | 0,83          | ND             | 0,07      | ND         |

|            |      |    |      |    |
|------------|------|----|------|----|
| AD-63967.2 | 0,86 | ND | 0,03 | ND |
| AD-63973.2 | 0,86 | ND | 0,03 | ND |
| AD-63990.2 | 0,27 | ND | 0,07 | ND |
| AD-63996.2 | 0,29 | ND | 0,06 | ND |
| AD-64002.2 | 0,30 | ND | 0,11 | ND |
| AD-64008.2 | 0,28 | ND | 0,05 | ND |
| AD-64008.2 | 0,34 | ND | 0,07 | ND |
| AD-64014.2 | 0,30 | ND | 0,03 | ND |
| AD-64019.2 | 0,36 | ND | 0,04 | ND |
| AD-64024.2 | 0,27 | ND | 0,03 | ND |
| AD-63985.2 | 0,28 | ND | 0,06 | ND |
| AD-63991.2 | 0,33 | ND | 0,02 | ND |
| AD-63997.2 | 0,47 | ND | 0,07 | ND |
| AD-64003.2 | 0,69 | ND | 0,06 | ND |
| AD-64009.2 | 0,91 | ND | 0,03 | ND |
| AD-64015.2 | 0,69 | ND | 0,09 | ND |
| AD-64020.2 | 0,81 | ND | 0,06 | ND |
| AD-64025.2 | 0,77 | ND | 0,06 | ND |
| AD-63986.2 | 0,28 | ND | 0,05 | ND |
| AD-63992.2 | 0,44 | ND | 0,04 | ND |
| AD-64004.2 | 0,45 | ND | 0,04 | ND |
| AD-64010.2 | 0,37 | ND | 0,05 | ND |
| AD-64016.2 | 0,48 | ND | 0,05 | ND |
| AD-64021.2 | 0,39 | ND | 0,03 | ND |
| AD-64026.2 | 0,30 | ND | 0,02 | ND |
| AD-63987.2 | 0,20 | ND | 0,02 | ND |
| AD-63993.2 | 0,33 | ND | 0,02 | ND |
| AD-63999.2 | 0,36 | ND | 0,05 | ND |
| AD-64005.2 | 0,45 | ND | 0,11 | ND |
| AD-64011.2 | 0,39 | ND | 0,08 | ND |
| AD-64017.2 | 0,84 | ND | 0,06 | ND |
| AD-64022.2 | 0,81 | ND | 0,03 | ND |
| AD-64027.2 | 0,38 | ND | 0,05 | ND |
| AD-63988.2 | 0,37 | ND | 0,04 | ND |
| AD-63994.2 | 0,23 | ND | 0,01 | ND |
| AD-64000.2 | 0,29 | ND | 0,00 | ND |
| AD-64006.2 | 0,40 | ND | 0,04 | ND |
| AD-64012.2 | 0,45 | ND | 0,17 | ND |
| AD-64018.2 | 0,65 | ND | 0,07 | ND |
| AD-64023.2 | 0,53 | ND | 0,07 | ND |
| AD-64028.2 | 0,52 | ND | 0,07 | ND |
| AD-63989.2 | 0,47 | ND | 0,04 | ND |
| AD-63995.2 | 0,81 | ND | 0,03 | ND |
| AD-64001.2 | 0,83 | ND | 0,04 | ND |
| AD-64007.2 | 0,87 | ND | 0,04 | ND |
| AD-64013.2 | 0,88 | ND | 0,03 | ND |

|            |       |    |       |    |
|------------|-------|----|-------|----|
| AD-64289.1 | 0,276 | ND | 0,009 | ND |
| AD-64333.1 | 0,208 | ND | 0,015 | ND |
| AD-64285.1 | 0,324 | ND | 0,034 | ND |
| AD-64300.1 | 0,225 | ND | 0,005 | ND |
| AD-64345.1 | 0,102 | ND | 0,090 | ND |
| AD-64292.1 | 0,288 | ND | 0,232 | ND |
| AD-64336.1 | 0,199 | ND | 0,056 | ND |
| AD-64275.1 | 0,287 | ND | 0,185 | ND |
| AD-64316.1 | 0,297 | ND | 0,024 | ND |
| AD-64274.1 | 0,209 | ND | 0,033 | ND |
| AD-64315.1 | 0,199 | ND | 0,002 | ND |
| AD-64305.1 | 0,360 | ND | 0,035 | ND |
| AD-64351.1 | 0,281 | ND | 0,014 | ND |
| AD-64291.1 | 0,725 | ND | 0,005 | ND |
| AD-64335.1 | 0,478 | ND | 0,020 | ND |
| AD-64283.1 | 0,917 | ND | 0,018 | ND |
| AD-64304.1 | 0,937 | ND | 0,050 | ND |
| AD-64325.1 | 0,446 | ND | 0,223 | ND |
| AD-64350.1 | 0,934 | ND | 0,055 | ND |
| AD-63968.4 | 0,748 | ND | 0,008 | ND |
| AD-64331.1 | 0,294 | ND | 0,038 | ND |
| AD-64008.4 | 0,416 | ND | 0,028 | ND |
| AD-64337.1 | 0,318 | ND | 0,049 | ND |
| AD-64295.1 | 0,415 | ND | 0,034 | ND |
| AD-64276.1 | 0,453 | ND | 0,073 | ND |
| AD-64317.1 | 0,203 | ND | 0,040 | ND |
| AD-64330.1 | 0,313 | ND | 0,030 | ND |
| AD-64298.1 | 0,797 | ND | 0,007 | ND |
| AD-64343.1 | 0,667 | ND | 0,020 | ND |
| AD-61547.2 | 0,637 | ND | 0,019 | ND |
| AD-64347.1 | 0,418 | ND | 0,066 | ND |
| AD-64280.1 | 0,754 | ND | 0,092 | ND |
| AD-64322.1 | 0,407 | ND | 0,013 | ND |
| AD-64308.1 | 0,720 | ND | 0,055 | ND |
| AD-64354.1 | 0,315 | ND | 0,034 | ND |
| AD-64303.1 | 0,815 | ND | 0,150 | ND |
| AD-64349.1 | 0,447 | ND | 0,030 | ND |
| AD-64299.1 | 0,831 | ND | 0,007 | ND |
| AD-64344.1 | 0,404 | ND | 0,009 | ND |
| AD-64309.1 | 0,856 | ND | 0,005 | ND |
| AD-64355.1 | 0,498 | ND | 0,040 | ND |
| AD-64297.1 | 0,895 | ND | 0,024 | ND |
| AD-64342.1 | 0,508 | ND | 0,006 | ND |
| AD-64312.1 | 0,590 | ND | 0,034 | ND |
| AD-64358.1 | 0,425 | ND | 0,044 | ND |
| AD-64341.1 | 0,223 | ND | 0,119 | ND |

|            |       |      |       |      |
|------------|-------|------|-------|------|
| AD-64310.1 | 0,301 | ND   | 0,064 | ND   |
| AD-64356.1 | 0,336 | ND   | 0,024 | ND   |
| AD-64286.1 | 0,611 | ND   | 0,012 | ND   |
| AD-64328.1 | 0,317 | ND   | 0,043 | ND   |
| AD-61522.2 | 0,447 | ND   | 0,008 | ND   |
| AD-64321.1 | 0,237 | ND   | 0,009 | ND   |
| AD-64302.1 | 0,523 | ND   | 0,020 | ND   |
| AD-64348.1 | 0,208 | ND   | 0,003 | ND   |
| AD-64352.1 | 0,343 | ND   | 0,224 | ND   |
| AD-64352.1 | 0,567 | ND   | 0,015 | ND   |
| AD-64314.1 | 0,920 | ND   | 0,044 | ND   |
| AD-64360.1 | 0,778 | ND   | 0,029 | ND   |
| AD-64279.1 | 0,882 | ND   | 0,034 | ND   |
| AD-64320.1 | 0,589 | ND   | 0,017 | ND   |
| AD-64284.1 | 0,696 | ND   | 0,119 | ND   |
| AD-64326.1 | 0,552 | ND   | 0,009 | ND   |
| AD-64281.1 | 0,921 | ND   | 0,019 | ND   |
| AD-64323.1 | 0,715 | ND   | 0,097 | ND   |
| AD-64311.1 | 0,815 | ND   | 0,030 | ND   |
| AD-64357.1 | 0,549 | ND   | 0,001 | ND   |
| AD-64272.2 | 0,965 | ND   | 0,024 | ND   |
| AD-64332.1 | 0,548 | ND   | 0,013 | ND   |
| AD-64293.1 | 0,837 | ND   | 0,013 | ND   |
| AD-64338.1 | 0,597 | ND   | 0,031 | ND   |
| AD-64290.1 | 0,489 | ND   | 0,026 | ND   |
| AD-64334.1 | 0,368 | ND   | 0,003 | ND   |
| AD-64282.1 | 0,767 | ND   | 0,009 | ND   |
| AD-64324.1 | 0,726 | ND   | 0,077 | ND   |
| AD-64278.1 | 0,951 | ND   | 0,077 | ND   |
| AD-64319.1 | 0,895 | ND   | 0,029 | ND   |
| AD-64307.1 | 0,890 | ND   | 0,065 | ND   |
| AD-64353.1 | 0,567 | ND   | 0,500 | ND   |
| AD-64277.1 | 0,416 | ND   | 0,019 | ND   |
| AD-64277.1 | 0,839 | ND   | 0,058 | ND   |
| AD-64318.1 | 0,613 | ND   | 0,042 | ND   |
| AD-64318.1 | 0,768 | ND   | 0,042 | ND   |
| AD-64313.1 | 0,698 | ND   | 0,062 | ND   |
| AD-64359.1 | 0,441 | ND   | 0,081 | ND   |
| AD-64294.1 | 0,563 | ND   | 0,066 | ND   |
| AD-64339.1 | 0,486 | ND   | 0,044 | ND   |
| AD-63968.5 | 0,57  | 0,72 | 0,07  | 0,03 |
| AD-63940.3 | 0,81  | 0,83 | 0,11  | 0,03 |
| AD-64710.1 | 0,79  | 0,85 | 0,12  | 0,04 |
| AD-64716.1 | 0,73  | 0,85 | 0,08  | 0,01 |
| AD-64722.1 | 0,67  | 0,80 | 0,06  | 0,02 |
| AD-64728.1 | 0,74  | 0,87 | 0,06  | 0,05 |

|            |      |      |      |      |
|------------|------|------|------|------|
| AD-64734.1 | 0,78 | 0,83 | 0,08 | 0,05 |
| AD-64739.1 | 0,73 | 0,85 | 0,07 | 0,02 |
| AD-64700.1 | 0,54 | 0,75 | 0,13 | 0,02 |
| AD-64705.1 | 0,67 | 0,79 | 0,15 | 0,04 |
| AD-64711.1 | 0,57 | 0,83 | 0,13 | 0,04 |
| AD-64717.1 | 0,72 | 0,83 | 0,13 | 0,02 |
| AD-64723.1 | 0,83 | 0,87 | 0,12 | 0,01 |
| AD-64729.1 | 0,74 | 0,87 | 0,08 | 0,07 |
| AD-64735.1 | 0,73 | 0,89 | 0,05 | 0,04 |
| AD-64740.1 | 0,89 | 0,88 | 0,05 | 0,07 |
| AD-64701.1 | 0,88 | 0,84 | 0,07 | 0,05 |
| AD-64706.1 | 0,71 | 0,88 | 0,12 | 0,05 |
| AD-64712.1 | 0,81 | 0,86 | 0,13 | 0,07 |
| AD-64718.1 | 0,84 | 0,89 | 0,16 | 0,01 |
| AD-64730.1 | 0,88 | 0,89 | 0,02 | 0,04 |
| AD-64736.1 | 0,80 | 0,88 | 0,10 | 0,05 |
| AD-64741.1 | 0,85 | 0,83 | 0,06 | 0,05 |
| AD-64702.1 | 0,87 | 0,93 | 0,02 | 0,06 |
| AD-64707.1 | 0,95 | 0,88 | 0,05 | 0,08 |
| AD-64713.1 | 0,90 | 0,85 | 0,08 | 0,03 |
| AD-64719.1 | 0,80 | 0,89 | 0,09 | 0,09 |
| AD-64725.1 | 0,70 | 0,84 | 0,09 | 0,03 |
| AD-64731.1 | 0,82 | 0,87 | 0,04 | 0,08 |
| AD-64737.1 | 0,76 | 0,84 | 0,09 | 0,08 |
| AD-64742.1 | 0,76 | 0,85 | 0,09 | 0,03 |
| AD-64703.1 | 0,79 | 0,88 | 0,05 | 0,02 |
| AD-64708.1 | 0,83 | 0,82 | 0,08 | 0,06 |
| AD-64714.1 | 0,75 | 0,85 | 0,12 | 0,03 |
| AD-64720.1 | 0,61 | 0,81 | 0,17 | 0,04 |
| AD-64726.1 | 0,75 | 0,83 | 0,07 | 0,02 |
| AD-64732.1 | 0,86 | 0,84 | 0,14 | 0,10 |
| AD-64738.1 | 0,80 | 0,90 | 0,04 | 0,02 |
| AD-64743.1 | 0,75 | 0,85 | 0,12 | 0,04 |
| AD-64704.1 | 0,67 | 0,78 | 0,16 | 0,02 |
| AD-64709.1 | 0,83 | 0,86 | 0,16 | 0,03 |
| AD-64715.1 | 0,87 | 0,88 | 0,09 | 0,04 |
| AD-64721.1 | 0,77 | 0,82 | 0,12 | 0,06 |
| AD-64727.1 | 0,75 | 0,85 | 0,14 | 0,02 |
| AD-64733.1 | 0,67 | 0,81 | 0,14 | 0,03 |

**Пример 3. Проведение синтеза и *in vitro* скрининга дополнительных дуплексов siRNA**

Дополнительные молекулы iRNA, целенаправленно воздействующие на геном HBV, синтезировали, как описано выше. Подробный перечень дополнительных немодифицированных последовательностей смысловых и антисмысловых нитей HBV показан в таблице 6, а подробный перечень модифицированных последовательностей смысловых и антисмысловых нитей HBV показан в таблице 7.

Таблица 6. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA HBV

| ID дуплекса | Смысловая последовательность (5'-3') | SEQ ID NO: | Антисмысловая последовательность (5'-3') | SEQ ID NO: |
|-------------|--------------------------------------|------------|------------------------------------------|------------|
| AD-65369.1  | UCGUGGUGGACUUCUCUCA                  | 909        | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU                    | 938        |
| AD-65381.1  | UCGUGGUGGACUUCUCUCA                  | 910        | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU                    | 939        |
| AD-63962.1  | UCGUGGUGGACUUCUCUCA                  | 911        | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU                    | 940        |
| AD-63938.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 912        | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 941        |
| AD-65561.1  | UCGUGGUGGACUUCUCUCA                  | 913        | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU                    | 942        |
| AD-65566.1  | UCGUGGUGGACUUCUCUCA                  | 914        | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU                    | 943        |
| AD-63944.1  | UCGUGGUGGACUUCUCUCAUU                | 915        | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU                    | 944        |
| AD-63968.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 916        | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 945        |
| AD-65406.1  | UCGUGGUGGACUUCUCUCA                  | 917        | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU                    | 946        |
| AD-65396.1  | ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA                | 918        | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUUU                  | 947        |
| AD-65427.1  | GUGCACUUCGCUUACCUCUA                 | 919        | UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU                  | 948        |
| AD-65573.1  | GUGCACUUCGCUUACCUCUA                 | 920        | UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC                  | 949        |
| AD-65432.1  | GCACUUCGCUUACCUCUA                   | 921        | UAGAGGUGAAGCGAAGUGCAC                    | 950        |
| AD-64332.1  | GUGCACUUCGCUUACCUCUG                 | 922        | CAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC                  | 951        |
| AD-64322.1  | AUGUGUCUGCGGCGUUUUAUA                | 923        | UAUAAAACGCCGACACAUCC                     | 952        |
| AD-64272.1  | GUGCACUUCGCUUACCUCUG                 | 924        | CAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC                  | 953        |
| AD-65583.1  | GCACUUCGCUUACCUCUA                   | 925        | UAGAGGUGAAGCGAAGUGC UU                   | 954        |
| AD-63994.1  | GGUGGACUUCUCUCAAUUU                  | 926        | AAAUUGAGAGAAGUCCACCAC                    | 955        |
| AD-65370.1  | CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU                | 927        | AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG                  | 956        |
| AD-65265.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAAUUU                | 928        | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA                  | 957        |
| AD-65407.1  | CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU                | 929        | AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG                  | 958        |
| AD-64027.1  | GGUGGACUUCUCUCAAUUU                  | 930        | AAAUUGAGAGAAGUCCACCAC                    | 959        |
| AD-65266.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAAUUU                | 931        | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA                  | 960        |
| AD-65389.1  | UGGUGGUCTUCUCUAAA UU                 | 932        | AAUUGAGAGAAGUCCACCAUU                    | 961        |
| AD-64008.1  | GUGGUGGACUUCUCUCAAUUU                | 933        | AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA                  | 962        |
| AD-65377.1  | CGUGGUGGUCTUCUCUAAA UU               | 934        | AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU                  | 963        |
| AD-65409.2  | GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA                | 935        | UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC                  | 964        |
| AD-65403.1  | GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA                | 936        | UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC                  | 965        |

|            |                    |     |                       |     |
|------------|--------------------|-----|-----------------------|-----|
| AD-65385.1 | UGGACUACTCUCAAUUUA | 937 | UAAAAUUGAGAGAAGUCCAUU | 966 |
|------------|--------------------|-----|-----------------------|-----|

Таблица 7. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA HBV

| ID дуплекса | Смысловая последовательность (5'-3')   | SEQ ID NO: | Антисмысловая последовательность (5'-3') | SEQ ID NO: |
|-------------|----------------------------------------|------------|------------------------------------------|------------|
| AD-65369    | uscsguGfgUfGfGfacuuCfUfcucaL96         | 967        | PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu         | 996        |
| AD-65381    | uscsguGfgUfGfGfacuucucucaL96           | 968        | PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu         | 997        |
| AD-63962    | Y44uscsgfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcAfy44      | 969        | PusGfsaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfasusu      | 998        |
| AD-63938    | Y44ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA               | 970        | UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU                  | 999        |
| AD-65561    | uscsguGfgUfGfGfacuuCfUfcucaL96         | 971        | UfsGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu         | 1000       |
| AD-65566    | uscsguGfgUfGfGfacuucucucaL96           | 972        | UfsGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu         | 1001       |
| AD-63944    | Y44ucGuGGuGGAcuucucucAusuY44           | 973        | UfGfagAfgAfaAGUfccacCfAfcgAusu           | 1002       |
| AD-63968    | AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96 | 974        | usGfsaGfaGfaAfgUfccacCfcAfcGfaGfuscsu    | 1003       |
| AD-65406    | uscsguGfgUfGfGfacuuCfUfcucaL96         | 975        | usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu          | 1004       |
| AD-65396    | ascsucguGfgUfGfGfacuucucucaL96         | 976        | usGfsagaGfaaguccaCfcAfcgagususu          | 1005       |
| AD-65427    | gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucuaL96         | 977        | PusAfsagagGfugaagcgAfaGfugcacsusu        | 1006       |
| AD-65573    | gsusgcacUfuCfGfCfuucaCfcCfucuaL96      | 978        | UfsAfsagagGfuGfAfaagcgAfaGfugcacsasc     | 1007       |
| AD-65432    | gscsacUfucGfCfuucacCfucuaL96           | 979        | PusAfsagagGfuGfAfaagcgAfaGfugcsasc       | 1008       |
| AD-64332    | GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuGfL96 | 980        | PcsAfsagAfgGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfcscasc  | 1009       |
| AD-64322    | AfsusGfuGfuCfuGfCfGfgCfgUfuUfuAfuAfL96 | 981        | PusAfsuAfaAfaCfcGfcgAfgAfcAfcAfuscsc     | 1010       |
| AD-64272    | GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuGfL96 | 982        | csAfsagAfgGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfcscasc   | 1011       |
| AD-65583    | gscsacuucgdCuucac (Cgn) ucuaL96        | 983        | usdAsgagdGugaagcgdaagugcsusu             | 1012       |
| AD-63994    | gsgsUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfaUfuUfL96      | 984        | PasAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcscasc      | 1013       |
| AD-65370    | csgsugguGfgAfCfUfucucUfcfaauuL96       | 985        | asAfsuugAfgAfGfaaguCfcAfccagcsasg        | 1014       |
| AD-65265    | gsusggugGfaCfuUfcUfcucauuuuL96         | 986        | asAfsaUfugagaGfaagUfcCfaccAfcsgsa        | 1015       |
| AD-65407    | csgsugguGfgAfCfUfucucUfcfaauuL96       | 987        | asAfsuugAfgAfgAfaaguCfcAfccagcsasg       | 1016       |
| AD-64027    | gsgsUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfaUfuUfL96      | 988        | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcscasc       | 1017       |
| AD-65266    | gsusggugGfaCfuUfcucucUfcfaauuuL96      | 989        | asAfsaUfugagaGfaagUfcCfaccAfcsgsa        | 1018       |

|          |                                            |     |                                      |      |
|----------|--------------------------------------------|-----|--------------------------------------|------|
| AD-65389 | usgsgudGgucdTucucuaaaauL96                 | 990 | asdAsuugagagdAagudCcaccasusu         | 1019 |
| AD-64008 | GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUf<br>uUfL96 | 991 | asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgsa | 1020 |
| AD-65377 | csgsuggudGgucdTucucuaaaauL96               | 992 | asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu       | 1021 |
| AD-65409 | gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuaL96            | 993 | PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc   | 1022 |
| AD-65403 | gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuaL96            | 994 | usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc    | 1023 |
| AD-65385 | usgsgacuacdTcucaaaauuaL96                  | 995 | usdAsaaaugadGagadAguccasusu          | 1024 |

Скрининг в отношении разовой дозы данных дуплексов проводили в двух параллелях путем трансфекции дуплексами клеток HepG2.215 и Hep3В и измерения вирусной РНК HBV с использованием пар праймер/зонд для детекции РНК с открытой рамкой считывания Р (ORF) HBV (PORF-1\_A и PORF-1\_B) и/или наборов праймеров для детекции РНК ORF S HBV (SORF-2\_A и SORF-2\_B). Результаты анализов на клетках HepG2.2.15 показаны в таблице 8, а результаты анализов на клетках Hep3В представлены в таблице 9.

**Таблица 8. Скрининг в отношении разовой дозы для HBV на клетках HepG2.2.15**

| ID дуплекса | Набор праймер/зонд PORF-1<br>Эксперимент А | Набор праймер/зонд PORF-1<br>Дублирующий эксперимент В | Набор праймер/зонд SORF-2<br>Эксперимент А | Набор праймер/зонд SORF-2<br>Дублирующий эксперимент В |
|-------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| AD-65369    | 0,1875                                     | 0,042                                                  | 0,0446                                     | 0,3018                                                 |
| AD-65381    | 0,086                                      | 0,249                                                  | 0,1008                                     | 0,553                                                  |
| AD-63962    | 0,4838                                     | 0,3475                                                 | 0,2237                                     | 0,5258                                                 |
| AD-63938    | 0,3587                                     | 2,1213                                                 | 0,0501                                     | 1,1434                                                 |
| AD-65561    | 0,1076                                     | 0,3801                                                 | 0,0718                                     | 0,6897                                                 |
| AD-65566    | 0,4127                                     | 0,3211                                                 | 0,185                                      | 11,1161                                                |
| AD-63944    | 0,9489                                     | 0,7098                                                 | 0,393                                      | 0,2771                                                 |
| AD-63968    | IC50<br>отсутствует                        | IC50<br>отсутствует                                    | 1,8788                                     | IC50<br>отсутствует                                    |
| AD-65406    | 3,3749                                     | 18,8396                                                | 3,8204                                     | 2,2662                                                 |
| AD-65396    | IC50<br>отсутствует                        | 6,8758                                                 | 3,7382                                     | 4,2157                                                 |
| AD-65427    | 0,0089                                     | 0,0181                                                 | 0,0066                                     | 0,015                                                  |
| AD-65573    | 0,0174                                     | 0,0332                                                 | 0,0029                                     | 0,0227                                                 |
| AD-65432    | 0,0211                                     | 0,0593                                                 | 0,0112                                     | 0,0366                                                 |
| AD-64332    | 0,0268                                     | 0,0329                                                 | 0,0624                                     | 0,0217                                                 |
| AD-64322    | 0,0963                                     | 0,1077                                                 | 0,0992                                     | 0,0963                                                 |
| AD-64272    | 0,0773                                     | 0,1199                                                 | 0,0763                                     | 0,093                                                  |
| AD-65583    | 0,1624                                     | 0,2228                                                 | 0,1568                                     | 0,1496                                                 |
| AD-63994    | 0,7019                                     | 0,1467                                                 | 0,0832                                     | 0,0385                                                 |
| AD-65370    | 0,2404                                     | 0,7916                                                 | 0,3952                                     | 0,1964                                                 |
| AD-65265    | 0,2255                                     | 0,5008                                                 | 0,2893                                     | 0,318                                                  |
| AD-65407    | 0,9533                                     | 0,261                                                  | 0,4254                                     | 0,1121                                                 |
| AD-64027    | 0,7692                                     | 0,5887                                                 | 0,5208                                     | 0,5697                                                 |
| AD-65266    | 3,4109                                     | 0,5055                                                 | 0,8532                                     | 0,3658                                                 |
| AD-65389    | 0,9172                                     | 0,6514                                                 | 0,4915                                     | 0,2872                                                 |
| AD-64008    | 1,2738                                     | 0,7865                                                 | 1,9519                                     | 0,808                                                  |
| AD-65377    | 0,6052                                     | 1,6                                                    | 24,9403                                    | 0,6065                                                 |

|          |                     |                     |                     |                     |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| AD-65409 | 1,8304              | 1,6479              | 0,104               | 0,0557              |
| AD-65403 | 12,1516             | 0,667               | 1,006               | 0,233               |
| AD-65385 | IC50<br>отсутствует | IC50<br>отсутствует | IC50<br>отсутствует | IC50<br>отсутствует |

Таблица 9. Скрининг в отношении разовой дозы для HBV в клетках НерЗВ

| ID дуплекса | Набор праймер/зонд PORF-1<br>Эксперимент А | Набор праймер/зонд PORF-1<br>Эксперимент В |
|-------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| AD-65369    | 0,0982                                     | 0,0508                                     |
| AD-65381    | 0,2392                                     | 0,1097                                     |
| AD-63962    | 0,0769                                     | 0,0706                                     |
| AD-63938    | 0,039                                      | 0,0111                                     |
| AD-65561    | 0,6316                                     | 0,6931                                     |
| AD-65566    | 0,2747                                     | 0,5331                                     |
| AD-63944    | 0,1317                                     | 0,0566                                     |
| AD-63968    | 0,4374                                     | 0,8811                                     |
| AD-65406    | 1,4961                                     | 1,2573                                     |
| AD-65396    | 1,9971                                     | 0,9952                                     |
| AD-65427    | 0,0234                                     | 0,006                                      |
| AD-65573    | 0,0346                                     | 0,0334                                     |
| AD-65432    | 0,0352                                     | 0,2664                                     |
| AD-64332    | 0,0221                                     | 0,4541                                     |
| AD-64322    | 0,1743                                     | 0,1616                                     |
| AD-64272    | 0,1885                                     | 0,6699                                     |
| AD-65583    | 0,1241                                     | 8,1611                                     |
| AD-63994    | 3,3623                                     | 5,2897                                     |
| AD-65370    | 0,2281                                     | IC50 отсутствует                           |
| AD-65265    | IC50 отсутствует                           | 7,3426                                     |
| AD-65407    | 0,1404                                     | 1,3833                                     |
| AD-64027    | 27,1417                                    | 1,1832                                     |
| AD-65266    | IC50 отсутствует                           | IC50 отсутствует                           |
| AD-65389    | IC50 отсутствует                           | IC50 отсутствует                           |
| AD-64008    | IC50 отсутствует                           | IC50 отсутствует                           |
| AD-65377    | IC50 отсутствует                           | IC50 отсутствует                           |
| AD-65409    | 1,8065                                     | 3,436                                      |
| AD-65403    | 0,5113                                     | 18,0359                                    |
| AD-65385    | IC50 отсутствует                           | IC50 отсутствует                           |

Подмножество таких дуплексов также анализировали в отношении метаболической стабильности *in vitro* с помощью двух анализов: анализа стабильности в тритосомах и анализа стабильности в цитозоле.

Для анализа стабильности в тритосомах, тритосомам печени крысы (продукт PR14044, созданный по заказу в Xenotech) давали оттаять до комнатной температуры и разводили до 0,5 ед./мл кислой фосфатазы в буфере с 20 мМ цитрата натрия, pH 5,0. Суточные образцы готовили путем смешивания 100 мкл тритосом с кислой фосфатазой в концентрации 0,5 единиц/мл с 25 мкл образца siRNA в концентрации 0,4 мг/мл в микроцентрифужной пробирке и инкубирования в течение двадцати четырех часов в устройстве Thermomixer для пробирок эппендорф, установленном на 37°C и 300 об./мин. После двадцати четырех часов инкубации в каждую лунку вносили 300 мкл рабочего буфера для лизиса Phenomenex (кат. № ALO-8498) и 12,5 мкл 0,4 мг/мл внутреннего стандарта siRNA. Образцы в момент времени 0 часов готовили путем смешивания 100 мкл тритосом с кислой фосфатазой в концентрации 0,5 ед./мл с 25 мкл образца siRNA в концентрации 0,4 мг/мл, 300 мкл рабочего буфера для лизиса Phenomenex и 12,5 мкл внутреннего стандарта siRNA в концентрации 0,4 мг/мл. siRNA экстрагировали из суточных образцов и образцов момента времени 0 часов с использованием набора Phenomenex Clarity OTX Starter Kit (кат. № KSO-8494). После экстракции образцов их переносили в микроцентрифужную пробирку и сушили с помощью концентратора Labconco CentriVar (кат. № 7810010). Затем образцы ресуспендировали с использованием 500 мкл воды, которая не содержала нуклеаз. Пятьдесят мкл каждого образца прогоняли на колонке Agilent Technologies 1260 Infinity Binary LC в системе Agilent Technologies 6130 Quadrupole LC/MS. Прогон осуществляли с помощью способа, предусматривающего использование насоса для нагнетания четырехкомпонентных смесей, в течение 12,20 мин. со скоростью 0,400 мл/мин. по следующему графику:

| Функция времени | Параметр                                                          |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------|
| 0,20            | 5% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 95% буфера В (100% метанол) |
| 2,50            | 5% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 95% буфера В (100% метанол) |
| 3,00            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                            |

Прогон осуществляли с помощью способа, предусматривающего использование насоса для нагнетания двухкомпонентных смесей, в

течение 12,20 мин. со скоростью 0,700 мл/мин. по следующему графику:

| Функция времени | Параметр                                                       |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|
| 0,00            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 0,40            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 10,00           | 60% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 40% буфера В (100% ACN) |
| 10,10           | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 12,20           | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |

И для левой, и для правой колонки выставляли температуру 75,00°C. УФ-сигнал измеряли при длине волны 260 нм. Процент остатка каждой нити рассчитывали с использованием следующего уравнения:

$$\% \text{ остаточной нити} = 100 * (\text{площадь пика}_{\text{нити 24 ч.}} / \text{площадь пика}_{\text{нити 0 ч.}} * (\text{площадь пика}_{\text{стандарта 24 ч.}} / \text{площадь пика}_{\text{стандарта 0 ч.}}))$$

Для анализа стабильности в цитозоле, цитозоль печени самки крысы (Xenotech, кат. № R1500.C) давали оттаять до комнатной температуры и разводили до 1 мг/мл в 50 мМ Tris-буфере: HCl, pH 7,4, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Образцы момента времени 24 часов готовили путем смешивания 100 мкл цитозоля в концентрации 1 мг/мл с 25 мкл образца siRNA в концентрации 0,4 мг/мл в микроцентрифужной пробирке и инкубирования в течение 24 часов в устройстве Thermomixer для пробирок эппендорфа, установленном на 37°C и 300 об./мин. После 24 часов инкубации в каждую лунку вносили 300 мкл рабочего буфера для лизиса Phenomenex (кат. № ALO-8498) и 12,5 мкл 0,4 мг/мл внутреннего стандарта siRNA. Образцы момента времени 0 часов готовили путем смешивания 100 мкл цитозоля в концентрации 1 мг/мл с 25 мкл образца siRNA в концентрации 0,4 мг/мл, 300 мкл рабочего буфера для лизиса Phenomenex и 12,5 мкл внутреннего стандарта siRNA в концентрации 0,4 мг/мл. Экстрагировали siRNA из 24-часовых образцов и образцов момента времени 0 часов с использованием набора Phenomenex Clarity OTX Starter Kit (кат. № KSO-8494). После экстракции образцов их переносили в микроцентрифужную пробирку и сушили с помощью концентратора Labconco CentriVar (кат. № 7810010). Затем образцы ресуспендировали с использованием 500 мкл воды, которая не содержала нуклеаз. 50 мкл каждого образца прогоняли на колонке

Agilent Technologies 1260 Infinity Binary LC в системе Agilent Technologies 6130 Quadrupole LC/MS. Прогон осуществляли с помощью способа, предусматривающего использование насоса для нагнетания четырехкомпонентных смесей, в течение 12,20 мин. со скоростью 0,400 мл/мин. по следующему графику:

| Функция времени | Параметр                                                          |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------|
| 0,20            | 5% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 95% буфера В (100% метанол) |
| 2,50            | 5% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 95% буфера В (100% метанол) |
| 3,00            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                            |

Прогон осуществляли с помощью способа, предусматривающего использование насоса для нагнетания двухкомпонентных смесей, в течение 12,20 мин. со скоростью 0,700 мл/мин. по следующему графику:

Функция времени Параметр

| Функция времени | Параметр                                                       |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|
| 0,00            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 0,40            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 10,00           | 60% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 40% буфера В (100% ACN) |
| 10,10           | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 12,20           | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |

И для левой, и для правой колонки выставляли температуру 75,00°C. УФ-сигнал измеряли при длине волны 260 нм. Процент остатка каждой нити рассчитывали с использованием следующего уравнения:

$\% \text{ остаточной нити} = 100 * (\text{площадь пика}_{\text{нити 24 ч}} / \text{площадь пика}_{\text{нити 0 ч}} * (\text{площадь пика}_{\text{стандарта 24 ч}} / \text{площадь пика}_{\text{стандарта 0 ч}}))$ .

Результаты анализов стабильности в течение двадцати четырех часов в тритосоме представлены в таблице 10, а результаты анализов стабильности в течение двадцати четырех часов в цитозоле представлены в таблице 11.

**Таблица 10. Анализы стабильности в течение двадцати четырех часов в тритосоме**

| % остаточной антисмысловой нити | % остаточной смысловой нити | ID дуплекса |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------|
| 87,59                           | 72,43                       | AD-65381    |
| 67,59                           | 82,48                       | AD-65566    |
| 30,52                           | 34,98                       | AD-63968    |

|        |        |          |
|--------|--------|----------|
| 115,17 | 79,61  | AD-65427 |
| 43,00  | 76,84  | AD-65573 |
| 129,69 | 128,59 | AD-64272 |
| 100,30 | 119,85 | AD-65407 |
| 94,06  | 110,90 | AD-64008 |
| 98,63  | 127,48 | AD-65377 |
| 105,06 | 119,88 | AD-65409 |
| 117,55 | 104,30 | AD-65403 |

**Таблица 11. Анализы стабильности в течение двадцати четырех часов в цитозоле**

| % остаточной антисмысловой нити | % остаточной смысловой нити | ID дуплекса |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------|
| 67,78                           | 22,42                       | AD-65381    |
| 55,89                           | 15,26                       | AD-65566    |
| 88,39                           | 46,94                       | AD-63968    |
| 89,50                           | 66,35                       | AD-65427    |
| 69,01                           | 41,47                       | AD-65573    |
| 96,77                           | 78,00                       | AD-64272    |
| 64,46                           | 24,10                       | AD-65407    |
| 35,39                           | 26,39                       | AD-64008    |
| 79,98                           | 66,50                       | AD-65377    |
| 86,24                           | 74,25                       | AD-65409    |
| 60,45                           | 62,41                       | AD-65403    |

**Пример 4. Синтез и проведение скрининга дополнительных дуплексов siRNA**

Дополнительные молекулы iRNA, целенаправленно воздействующие на геном HBV, конструировали и синтезировали, как описано выше. Подробный перечень дополнительных немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей HBV показан в таблице 12, а подробный перечень модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей HBV показан в таблице 13.

Таблица 12. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA HBV

| ID дуплекса | ID смысловой нити | Смысловая последовательность, немодифицированная (5'-3') | SEQ ID NO: | ID антисмысловой нити | Антисмысловая последовательность, немодифицированная (5'-3') | SEQ ID NO: |
|-------------|-------------------|----------------------------------------------------------|------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------|------------|
| AD-65381    | A-130366.9        | UCGUGGUGGACUUCUCUCA                                      | 1025       | A-131904.1            | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU                                        | 1036       |
| AD-66019    | A-130366.9        | UCGUGGUGGACUUCUCUCA                                      | 1026       | A-131904.1            | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU                                        | 1037       |
| AD-65375    | A-130366.9        | UCGUGGUGGACUUCUCUCA                                      | 1027       | A-130364.7            | UGAGAGAAGUCCACCACGAUU                                        | 1038       |
| AD-65427    | A-130441.7        | GUGCACUUCGCUUCACCUCU<br>A                                | 1028       | A-131905.1            | UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU                                      | 1039       |
| AD-66110    | A-130441.7        | GUGCACUUCGCUUCACCUCU<br>A                                | 1029       | A-131905.1            | UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU                                      | 1040       |
| AD-65421    | A-130441.7        | GUGCACUUCGCUUCACCUCU<br>A                                | 1030       | A-130442.6            | UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU                                      | 1041       |
| AD-65407    | A-130371.12       | CGUGGUGGACUUCUCUCAU<br>U                                 | 1031       | A-130372.5            | AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG                                      | 1042       |
| AD-65377    | A-130384.4        | CGUGGUGGUCTUCUCUAAAU<br>U                                | 1032       | A-130748.3            | AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU                                      | 1043       |
| AD-65409    | A-130388.15       | GGUGGACUUCUCUCAUUUUU<br>A                                | 1033       | A-131906.1            | UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC                                      | 1044       |
| AD-66111    | A-130388.15       | GGUGGACUUCUCUCAUUUUU<br>A                                | 1034       | A-131906.1            | UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC                                      | 1045       |
| AD-65403    | A-130388.15       | GGUGGACUUCUCUCAUUUUU<br>A                                | 1035       | A-130389.4            | UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC                                      | 1046       |

Таблица 13. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA HBV

| ID дуплекса | ID смысловой нити | Смысловая последовательность (5'-3') | SEQ ID NO: | ID антисмысловой нити | Антисмысловая последовательность (5'-3')      | SEQ ID NO: |
|-------------|-------------------|--------------------------------------|------------|-----------------------|-----------------------------------------------|------------|
| AD-65381    | A-130366.9        | uscsguGfgUfGfGfacuucuc<br>ucaL96     | 1047       | A-131904.1            | <u>P</u> usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcga<br>susu  | 1058       |
| AD-66019    | A-130366.9        | uscsguGfgUfGfGfacuucuc<br>ucaL96     | 1048       | A-131904.1            | <u>VP</u> usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcg<br>asusu | 1059       |

|          |              |                                      |      |            |                                                 |      |
|----------|--------------|--------------------------------------|------|------------|-------------------------------------------------|------|
| AD-65375 | A-130366.9   | uscsguGfgUfGfGfacuucuc<br>ucaL96     | 1049 | A-130364.7 | usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgas<br>usu             | 1060 |
| AD-65427 | A-130441.7   | gsusgcacUfuCfGfCfuucac<br>cucuaL96   | 1050 | A-131905.1 | <b>P</b> usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcac<br>susu    | 1061 |
| AD-66110 | A-130441.7   | gsusgcacUfuCfGfCfuucac<br>cucuaL96   | 1051 | A-131905.1 | <b>VP</b> usAfsgagGfugaagcgAfaGfugca<br>csusu   | 1062 |
| AD-65421 | A-130441.7   | gsusgcacUfuCfGfCfuucac<br>cucuaL96   | 1052 | A-130442.6 | usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacs<br>usu             | 1063 |
| AD-65407 | A-130371.12  | csgsugguGfgAfCfUfucucU<br>fCfaauuL96 | 1053 | A-130372.5 | asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccag<br>csasg           | 1064 |
| AD-65377 | A-130384.4   | csgsuggudGgucdTucucuaa<br>auuL96     | 1054 | A-130748.3 | asdAsuugagagdAagudCcaccagcsu<br>su              | 1065 |
| AD-65409 | A-130388.15  | gsgsuggaCfuUfCfUfcucaA<br>fUfuuuuL96 | 1055 | A-131906.1 | <b>P</b> usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfcca<br>ccsasc  | 1066 |
| AD-66111 | A-130388.15  | gsgsuggaCfuUfCfUfcucaA<br>fUfuuuuL96 | 1056 | A-131906.1 | <b>VP</b> usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfcc<br>accsasc | 1067 |
| AD-65403 | A-130 388.15 | gsgsuggaCfuUfCfUfcucaA<br>fUfuuuuL96 | 1057 | A-130389.4 | usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccac<br>csasc           | 1068 |

Первичный скрининг в отношении разовой дозы данных дуплексов iRNA проводили с помощью анализа с использованием люциферазы Dual-Glo®, который описан выше. Результаты этого скрининга на клетках Cos7, трансфицированных указанными iRNA HBV, показаны в таблице 14. Данные выражены в виде процента остаточной мРНК в сравнении с отрицательным контролем через 24 часа.

**Таблица 14. Первичный скрининг в отношении разовой дозы HBV на клетках Cos7 с использованием анализа Dual-Glo Luciferase®**

| Первичный скрининг с использованием двойной люциферазы |           |                        |          |                        |                    |
|--------------------------------------------------------|-----------|------------------------|----------|------------------------|--------------------|
| % остаточной матричной РНК через 24 часа               |           |                        |          |                        | DRC ED50           |
| ID дуплекса                                            | При 50 нМ | Стандартное отклонение | При 1 нМ | Стандартное отклонение | (нМ)               |
| AD-65381                                               | 9,3       | 0,24                   | 15,6     | 0,77                   | 0,019              |
| AD-66019                                               | ND        | ND                     | ND       | ND                     | ND                 |
| AD-65375                                               | 24,2      | 0,36                   | 71,4     | 0,69                   | ED50 отсутствовала |
| AD-65427                                               | 28,8      | 1,60                   | 41,0     | 1,73                   | 0,117              |
| AD-66110                                               | ND        | ND                     | ND       | ND                     | ND                 |
| AD-65421                                               | 47,6      | 3,49                   | 85,5     | 4,76                   | ED50 отсутствовала |
| AD-65407                                               | 14,3      | 0,52                   | 25,3     | 2,11                   | 0,038              |
| AD-65377                                               | 21,8      | 0,31                   | 37,9     | 1,12                   | 0,130              |
| AD-65409                                               | 9,5       | 0,41                   | 13,2     | 0,71                   | 0,013              |
| AD-66111                                               | ND        | ND                     | ND       | ND                     | ND                 |
| AD-65403                                               | 12,6      | 0,50                   | 37,2     | 2,31                   | 0,069              |

ND – не определено

Эти дуплексы также анализировали в отношении дозозависимого эффекта в отношении сайленсинга вирусной РНК с использованием анализа с люциферазой Dual-Glo®, как описано выше. Дозы

дуплексов, использованных для этих анализов, составляли 50 нМ, 8,333333333 нМ, 1,388888889 нМ, 0,231481481 нМ, 0,038580247 нМ, 0,006430041 нМ, 0,001071674 нМ, 0,000178612 нМ,  $2,97687 \times 10^{-5}$  нМ,  $4,96145 \times 10^{-6}$  нМ,  $8,26909 \times 10^{-7}$  нМ и  $1,37818 \times 10^{-7}$  нМ, которые представляли собой разведение дуплексов 1 к 6, начиная с 50 нМ, для 12 доз. Результаты этого скрининга на клетках Cos7, трансфицированных указанными iRNA HBV, показаны в таблице 15. Данные выражены в виде процента остаточной мРНК в сравнении с отрицательным контролем через 24 часа.

**Таблица 15.** Скрининг в отношении дозозависимого эффекта на клетках Cos7 с использованием анализа Dual-Glo Luciferase®

| Клетки, инфицированные HBV, для анализа с использованием двух репортерных генов люциферазы |          |          |          |          |          |          |          |                               |                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------------------------|------------------------|
| IC50 (нМ) в 24 ч                                                                           |          |          |          |          |          |          |          |                               |                        |
| Дуплекс ID                                                                                 | Анализ 1 | Анализ 2 | Анализ 3 | Анализ 4 | Анализ 5 | Анализ 6 | Анализ 7 | Среднее значение <sup>1</sup> | Стандартное отклонение |
| AD-65381                                                                                   | 0,019    | ND       | ND       | ND       | ND       | ND       | ND       | 0,019                         |                        |
| AD-66019                                                                                   | ND       | 0,021    | 0,021    | 0,016    | 0,026    | 0,019    | 0,031    | 0,022                         | 0,005                  |
| AD-65375                                                                                   | UD       | 0,215    | 0,149    | 0,081    | 0,246    | 0,138    | 0,276    | 0,184                         | 0,074                  |
| AD-65407                                                                                   | 0,038    | 0,045    | 0,051    | 0,021    | 0,050    | 0,056    | 0,068    | 0,047                         | 0,015                  |
| AD-65377                                                                                   | 0,130    | 0,029    | 0,046    | 0,087    | 0,096    | 0,146    | 0,090    | 0,089                         | 0,042                  |
| AD-65409                                                                                   | 0,013    | ND       | ND       | ND       | ND       | ND       | ND       | 0,013                         |                        |
| AD-66111                                                                                   | ND       | 0,018    | 0,013    | 0,012    | 0,018    | 0,021    | 0,033    | 0,019                         | 0,007                  |
| AD-65403                                                                                   | 0,069    | 0,044    | 0,033    | 0,039    | 0,042    | 0,046    | 0,062    | 0,048                         | 0,013                  |
| AD-65427                                                                                   | 0,017    | ND       | ND       | ND       | ND       | ND       | ND       | 0,117                         |                        |
| AD-66110                                                                                   | ND       | 0,238    | 0,296    | 0,145    | 0,157    | 0,161    | ND       | 0,199                         | 0,065                  |
| AD-65421                                                                                   | UD       | 1,219    | 1,385    | 2,254    | 0,799    | 2,906    | ND       | 1,713                         | 0,852                  |

<sup>1</sup>Средние значения от 5–7 биологических повторов в трех параллелях

ND – не определено

Также анализировали эффективность и активность *in vitro* этих дуплексов. В частности, определяли дозозависимый эффект дуплексов в отношении сайленсинга вирусной РНК в лизатах трансфицированных клеток HepG2.2.15 и Hep3В и в отношении сайленсинга HBsAg в супернатантах клеток HepG2.2.15. Клетки

трансфицировали 12 отдельными дозами дуплексов в диапазоне от 50 нМ до  $1 \times 10^{-7}$  нМ, и через два семьдесят часа после трансфекции определяли уровень вирусной РНК с использованием пар праймер/зонд для детекции ORF P и/или ORF S. Уровень HBsAg определяли с помощью анализа ELISA.

Результаты сайленсинга вирусной ORF P РНК на клетках HepG2.2.15 с использованием указанных дуплексов приведены в таблице 16. Результаты сайленсинга вирусной ORF P РНК на клетках HepG2.2.15 с использованием указанных дуплексов приведены в таблице 17. Результаты сайленсинга HBsAg в клетках HepG2.2.15 представлены в таблице 18.

Результаты сайленсинга вирусной ORF P РНК на клетках Hep3B с использованием указанных дуплексов приведены в таблице 19.

**Таблица 16. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта в клетках HepG2.2.15**

| Сайленсинг вирусной РНК в клетках HepG2.2.15 |                    |       |       |       |                         |          |          |
|----------------------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------------------------|----------|----------|
| Набор праймер/зонд P-ORF                     |                    |       |       |       |                         |          |          |
| IC50 (нМ) в 72 ч                             |                    |       |       |       |                         |          |          |
| Дуплекс ID                                   | Разработка анализа |       |       |       | Оптимизированный анализ |          |          |
|                                              |                    |       |       |       | Анализ 1                | Анализ 2 | Анализ 3 |
| AD-65381                                     | 0,079              | 0,208 | ND    | ND    | ND                      | ND       | ND       |
| AD-66019                                     | ND                 | ND    | 0,265 | 0,010 | 0,022                   | 0,032    | 0,023    |
| AD-65375                                     | 12,3               | UD    | UD    | UD    | 0,172                   | 0,257    | 0,672    |
| AD-65407                                     | 0,247              | 1,0   | 0,365 | 0,109 | 0,069                   | 0,103    | 0,095    |
| AD-65377                                     | 1,3                | UD    | 4,9   | UD    | 0,842                   | 0,838    | 0,615    |
| AD-65409                                     | 0,436              | 1,0   | ND    | ND    | ND                      | ND       | ND       |
| AD-66111                                     | ND                 | ND    | 0,456 | 0,030 | 50                      | 0,294    | ND       |
| AD-65403                                     | 9,2                | 10,4  | 3,4   | UD    | 0,114                   | 0,384    | 1,0      |
| AD-65427                                     | 0,007              | 0,018 | ND    | ND    | ND                      | ND       | ND       |
| AD-66110                                     | ND                 | ND    | 0,012 | 0,053 | 0,016                   | 0,010    | 0,021    |
| AD-65421                                     | 0,069              | 0,091 | 0,034 | 0,006 | 0,002                   | 0,003    | 0,007    |

ND – не определено

**Таблица 17. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта в клетках HepG2.2.15**

|                                              |
|----------------------------------------------|
| Сайленсинг вирусной РНК в клетках HepG2.2.15 |
| Набор праймер/зонд S-ORF                     |

| IC50 (нМ) в 72 ч |                    |       |       |       |                         |          |          |  |
|------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------------------------|----------|----------|--|
| Дуплекс ID       | Разработка анализа |       |       |       | Оптимизированный анализ |          |          |  |
|                  |                    |       |       |       | Анализ 1                | Анализ 2 | Анализ 3 |  |
| AD-65381         | 0,252              | 0,215 | ND    | ND    | ND                      | ND       | ND       |  |
| AD-66019         | ND                 | ND    | 0,245 | 0,011 | 0,009                   | 0,016    | 0,005    |  |
| AD-65375         | 45                 | UD    | UD    | UD    | 0,124                   | 0,048    | 0,056    |  |
| AD-65407         | 0,232              | 0,645 | 0,577 | 0,015 | 0,021                   | 0,023    | 0,016    |  |
| AD-65377         | 1,4                | 8,6   | UD    | UD    | 0,575                   | 0,483    | 0,117    |  |
| AD-65409         | 0,433              | 0,242 | ND    | ND    | ND                      | ND       | ND       |  |
| AD-66111         | ND                 | ND    | 2,1   | 0,455 | ND                      | 0,416    | ND       |  |
| AD-65403         | 0,997              | 0,670 | 0,668 | UD    | 0,074                   | 0,270    | 1,1      |  |
| AD-65427         | 0,008              | 0,018 | ND    | ND    | ND                      | ND       | ND       |  |
| AD-66110         | ND                 | ND    | 0,022 | 0,050 | 0,035                   | 0,038    | 0,020    |  |
| AD-65421         | 0,083              | 0,097 | 0,046 | 0,003 | 0,003                   | 0,005    | 0,001    |  |

ND – не определено

Таблица 18. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта в клетках HepG2.2.15

| ELISA HBsAg IC50 (нМ) |          |
|-----------------------|----------|
| Дуплекс ID            | Анализ 1 |
| AD-65381              | ND       |
| AD-66019              | 0,105    |
| AD-65375              | 1,2      |
| AD-65407              | 0,102    |
| AD-65377              | 2,9      |
| AD-65409              | ND       |
| AD-66111              | 0,018    |
| AD-65403              | 0,064    |
| AD-65427              | ND       |
| AD-66110              | 0,002    |
| AD-65421              | 0,008    |

ND – не определено

Таблица 19. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта в клетках Hep3В

|             | Скрининг клеток Нер3В                |                       |                    |
|-------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------|
|             | ED50 DRC<br>Набор праймер/зонд P-ORF |                       |                    |
| ID дуплекса | P-ORF<br>Цикл 1                      | P-ORF<br>Цикл 2       | Комбинированный    |
| AD-65381    | 0,239                                | 0,110                 | 0,194              |
| AD-66019    | ND                                   | ND                    | ND                 |
| AD-65375    | ND                                   | ND                    | ND                 |
| AD-65427    | 0,023                                | 0,006                 | 0,018              |
| AD-66110    | ND                                   | ND                    | ND                 |
| AD-65421    | ND                                   | ND                    | ND                 |
| AD-65407    | 0,140                                | 1,383                 | 0,527              |
| AD-65377    | ED50<br>отсутствовала                | ED50<br>отсутствовала | ED50 отсутствовала |
| AD-65409    | 1,807                                | 3,436                 | 2,905              |
| AD-66111    | ND                                   | ND                    | ND                 |
| AD-65403    | 0,511                                | 18,036                | 5,013              |

ND – не определено

Такие дуплексы также анализировали в отношении стабильности *in vitro* с помощью двух анализов: анализа стабильности в тритосомах и анализа стабильности в цитозоле, как описано выше. Результаты этих анализов представлены в таблице 20.

**Таблица 20. Анализы на стабильность в течение двадцати четырех часов в цитозоле и тритосоме**

| Дуплекс<br>ID | Метаболическая стабильность <i>in vitro</i><br>% исходной, оставшейся после 24 часов инкубации |      |          |      |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|------|
|               | Эндолизосома                                                                                   |      | Цитозоль |      |
|               | % AS                                                                                           | % SS | % AS     | % SS |
| AD-65381      | 88                                                                                             | 72   | 68       | 22   |
| AD-66019      | ND                                                                                             | ND   | ND       | ND   |
| AD-65375      | ND                                                                                             | ND   | ND       | ND   |

|          |     |     |    |    |
|----------|-----|-----|----|----|
| AD-65407 | 100 | 120 | 64 | 24 |
| AD-65377 | 99  | 127 | 80 | 67 |
| AD-65409 | 105 | 120 | 86 | 74 |
| AD-66111 | ND  | ND  | ND | ND |
| AD-65403 | ND  | ND  | ND | ND |
| AD-65427 | 115 | 80  | 89 | 66 |
| AD-66110 | ND  | ND  | ND | ND |
| AD-65421 | ND  | ND  | ND | ND |

Также проводили скрининг в отношении дозозависимого эффекта различных комбинаций на клетках HepG2.215. Дозы дуплексов, использованных для этих анализов, составляли 50 нМ, 8,333333333 нМ, 1,388888889 нМ, 0,231481481 нМ, 0,038580247 нМ, 0,006430041 нМ, 0,001071674 нМ, 0,000178612 нМ,  $2,97687 \times 10^{-5}$  нМ,  $4,96145 \times 10^{-6}$  нМ,  $8,26909 \times 10^{-7}$  нМ и  $1,37818 \times 10^{-7}$  нМ, которые представляют собой разведение дуплексов 1 к 6, начиная с 50 нМ, для 12 доз. Через семьдесят два часа после трансфекции этих дуплексов определяли уровень вирусной РНК (ORF Р и ORF S) и уровень секретируемого HBsAg, как описано выше. Результаты этих анализов представлены в таблице 21.

Таблица 21. Скрининг в отношении разовой дозы для HBV через семьдесят два часа на клетках HepG2.2.15

| ID дуплекса       | IC50_A<br>S-ORF2<br>(нМ) | IC50_B<br>S-ORF2<br>(нМ) | IC50_комбинированн<br>ая S-ORF2 (нМ) | IC50_A<br>P-ORF1<br>(нМ) | IC50_B P-<br>ORF1 (нМ) | IC50_комбинированн<br>ая P-ORF1 (нМ) | ED50 по<br>ELISA Ag<br>с S (нМ) |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| AD-66019/AD-66110 | 0,0091                   | 0,0017                   | 0,0038                               | 0,0213                   | 0,002                  | 0,0076                               | 0,007482                        |
| AD-66019/AD-65421 | 0,0438                   | 0,2371                   | 0,0131                               | 0,0367                   | 0,0106                 | 0,0204                               | 0,026398                        |
| AD-65375/AD-66110 | 0,0832                   | 1,0896                   | 0,193                                | 0,0377                   | 0,2348                 | 0,2022                               | 0,004174                        |
| AD-65375/AD-65421 | 0,084                    | 0,0475                   | 0,0708                               | 0,0566                   | 0,0388                 | 0,0371                               | 0,030822                        |
| AD-65407/AD-66110 | 0,0387                   | 0,001                    | 0,0083                               | 0,0402                   | 0,0018                 | 0,0116                               | 0,010172                        |
| AD-65407/AD-65421 | 0,0686                   | 0,0062                   | 0,0225                               | 0,0711                   | 0,0177                 | 0,0396                               | 0,066556                        |
| AD-65377/AD-66110 | 0,0634                   | 0,8267                   | 0,6269                               | 0,0477                   | 0,073                  | 0,0618                               | 0,01435                         |
| AD-65377/AD-65421 | 0,1461                   | 0,0468                   | 0,1372                               | 0,1207                   | 0,0088                 | 0,0451                               | 0,03419                         |
| AD-66111/AD-66110 | 0,0382                   | 0,0094                   | 0,0161                               | 0,0292                   | 0,0027                 | 0,0088                               | 0,013155                        |
| AD-66111/AD-65421 | 0,1628                   | 0,0919                   | 0,1579                               | 0,1297                   | 0,0396                 | 0,0722                               | 0,026889                        |
| AD-65403/AD-66110 | 0,0499                   | 0,0094                   | 0,0444                               | 0,0383                   | 0,0164                 | 0,0348                               | 0,003783                        |
| AD-65403/AD-65421 | 0,1011                   | 0,0007                   | 0,0208                               | 0,1118                   | 0,0031                 | 0,0297                               | 0,014569                        |

**Пример 5. Синтез и проведение *in vitro* скрининга дополнительных дуплексов siRNA**

Дополнительные молекулы iRNA, целенаправленно воздействующие на ORF X генома HBV, конструировали и синтезировали, как описано выше. Подробный перечень дополнительных немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей HBV показан в таблице 22. Подробный перечень дополнительных модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей HBV показан в таблице 23.

Таблица 22. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA HBV

| ID<br>дуплекса | Название<br>смыслового<br>олигонуклеотида | Смысловая<br>последовательность (5'-3') | SEQ<br>ID<br>NO: | Название<br>олигонуклеотида<br>антисмысловой нити | Антисмысловая<br>последовательность (5'-3') | SEQ<br>ID<br>NO: |
|----------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------|
| AD-65776       | A-131859.1                                | UGUGCACUUCGCUUACCUCU                    | 1069             | A-131860.1                                        | AGAGGUGAAGCGAAGUGCACACG                     | 1115             |
| AD-65782       | A-131877.1                                | UGCACUUCGCUUACCUCUGA                    | 1070             | A-131878.1                                        | UCAGAGGUGAAGCGAAGUGCACA                     | 1116             |
| AD-65792       | A-131865.1                                | GUGUGCACUUCGCUUACCUA                    | 1071             | A-131866.1                                        | UAGGUGAAGCGAAGUGCACACGG                     | 1117             |
| AD-65781       | A-131861.1                                | CGUGUGCACUUCGCUUACCUCU                  | 1072             | A-131862.1                                        | AGGUGAAGCGAAGUGCACACGGU                     | 1118             |
| AD-64304       | A-128443.6                                | GUGCACUUCGCUUACCUCUA                    | 1073             | A-128444.5                                        | UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC                     | 1119             |
| AD-65771       | A-131857.1                                | CCGUGUGCACUUCGCUUCACA                   | 1074             | A-131858.1                                        | UGUGAAGCGAAGUGCACACGGUC                     | 1120             |
| AD-65758       | A-131867.1                                | CACUUCGCUUACCUCUGCAA                    | 1075             | A-131868.1                                        | UUGCAGAGGUGAAGCGAAGUGCA                     | 1121             |
| AD-65777       | A-131875.1                                | ACUUCGCUUACCUCUGCACA                    | 1076             | A-131876.1                                        | UGUGCAGAGGUGAAGCGAAGUGC                     | 1122             |
| AD-61567       | A-123525.2                                | GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA                   | 1077             | A-123526.2                                        | UACCAAUUUUAGCCUACAGCCUC                     | 1123             |
| AD-65772       | A-131873.1                                | UUCGCUUACCUCUGCACGUA                    | 1078             | A-131874.1                                        | UACGUGCAGAGGUGAAGCGAAGU                     | 1124             |
| AD-65767       | A-131871.1                                | UCGCUUACCUCUGCACGUCA                    | 1079             | A-131872.1                                        | UGACGUGCAGAGGUGAAGCGAAG                     | 1125             |
| AD-65763       | A-131869.1                                | CUUCGCUUACCUCUGCACGU                    | 1080             | A-131870.1                                        | ACGUGCAGAGGUGAAGCGAAGUG                     | 1126             |
| AD-64281       | A-128395.3                                | CCCCGUCUGUGCCUUCUCAUA                   | 1081             | A-128396.2                                        | UAUGAGAAGGCACAGACGGGGAG                     | 1127             |
| AD-64311       | A-128391.3                                | CCGUCUGUGCCUUCUCAUCUA                   | 1082             | A-128392.2                                        | UAGAUGAGAAGGCACAGACGGGG                     | 1128             |
| AD-65790       | A-131837.1                                | CCAGCACCAUGCAACUUUUUA                   | 1083             | A-131838.1                                        | UAAAAAGUUGCAUGGUGCUGGUG                     | 1129             |
| AD-            | A-131841.1                                | CACCAGCACCAUGCAACUUUU                   | 108              | A-131842.1                                        | AAAAGUUGCAUGGUGCUGGUGCG                     | 113              |

|          |            |                       |      |            |                         |      |
|----------|------------|-----------------------|------|------------|-------------------------|------|
| 65761    |            |                       | 4    |            |                         | 0    |
| AD-65786 | A-131849.1 | CACCAUGCAACUUUUUACCCU | 1085 | A-131850.1 | AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGCU | 1131 |
| AD-65785 | A-131835.1 | CAAUGUCAACGACCGACCUUA | 1086 | A-131836.1 | UAAGGUCGGUCGUUGACAUUGCA | 1132 |
| AD-65787 | A-131863.1 | CGCUUACCUCUGCACGUCGA  | 1087 | A-131864.1 | UCGACGUGCAGAGGUGAAGCGAA | 1133 |
| AD-65770 | A-131845.1 | ACCUUGAGGCAUACUCAAAG  | 1088 | A-131846.1 | CUUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCG | 1134 |
| AD-65766 | A-131843.1 | CCGACCUUGAGGCAUACUUA  | 1089 | A-131844.1 | UGAAGUAUGCCUCAAGGUCGGUC | 1135 |
| AD-61555 | A-123521.2 | GACCUUGAGGCAUACUCAA   | 1090 | A-123522.2 | UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG | 1136 |
| AD-65762 | A-131855.1 | ACCGACCUUGAGGCAUACUUA | 1091 | A-131856.1 | UAAGUAUGCCUCAAGGUCGGUCG | 1137 |
| AD-65755 | A-131827.1 | UCGCAUGGAGACCACCGUGAA | 1092 | A-131828.1 | UUCACGGUGGUCUCCAUGCGACG | 1138 |
| AD-65788 | A-131811.1 | UUACAUAAGAGGACUCUUGGA | 1093 | A-131812.1 | UCCAAGAGUCCUCUUAUGUAAGA | 1139 |
| AD-65768 | A-131803.1 | UCUUACAUAAGAGGACUCUUA | 1094 | A-131804.1 | UAAGAGUCCUCUUAUGUAAGACC | 1140 |
| AD-61561 | A-123523.2 | ACUUCAAGACUGUUUGUUUA  | 1095 | A-123524.2 | UAAACAAACAGUCUUUGAAGUAU | 1141 |
| AD-65764 | A-131801.1 | UACUUCAAGACUGUUUGUUU  | 1096 | A-131802.1 | AAACAAACAGUCUUUGAAGUAUG | 1142 |
| AD-65753 | A-131799.1 | AUACUUCAAGACUGUUUGUU  | 1097 | A-131800.1 | AACAAACAGUCUUUGAAGUAUGC | 1143 |
| AD-65765 | A-131817.1 | UUGUUUAAAGACUGGGAGGAA | 1098 | A-131818.1 | UUCCUCCAGUCUUUAAACAAAC  | 1144 |
| AD-65769 | A-131819.1 | GCAUACUUCAAGACUGUUUA  | 1099 | A-131820.1 | UAAACAGUCUUUGAAGUAUGCCU | 1145 |
| AD-65759 | A-131815.1 | CAAAGACUGUUUGUUUAAAGA | 1100 | A-131816.1 | UCUUUAAACAAACAGUCUUUGAA | 1146 |
| AD-65774 | A-131831.1 | AGACUGUUUGUUUAAAGACUA | 1101 | A-131832.1 | UAGUCUUUAAACAAACAGUCUUU | 1147 |
| AD-65778 | A-131807.1 | GUUUGUUUAAAGACUGGGAGA | 1102 | A-131808.1 | UCUCCAGUCUUUAAACAAACAG  | 1148 |

|          |            |                       |      |            |                         |      |
|----------|------------|-----------------------|------|------------|-------------------------|------|
| AD-65773 | A-131805.1 | GGGGGAGGAGAUUAGAUUAAA | 1103 | A-131806.1 | UUUAAUCUAAUCUCCUCCCCCAA | 1149 |
| AD-65789 | A-131825.1 | GGGGAGGAGAUUAGAUUAAAG | 1104 | A-131826.1 | CUUUAAUCUAAUCUCCUCCCCCA | 1150 |
| AD-65783 | A-131809.1 | GUUGGGGGAGGAGAUUAGAUU | 1105 | A-131810.1 | AAUCUAAUCUCCUCCCCCAACUC | 1151 |
| AD-65754 | A-131813.1 | UUGGGGGAGGAGAUUAGAUUA | 1106 | A-131814.1 | UAAUCUAAUCUCCUCCCCCAACU | 1152 |
| AD-65779 | A-131821.1 | GGGAGGAGAUUAGAUUAAAGA | 1107 | A-131822.1 | UCUUUAAUCUAAUCUCCUCCCCC | 1153 |
| AD-65791 | A-131851.1 | UUAGAUUAAAGGUCUUUGUAA | 1108 | A-131852.1 | UUACAAAGACCUUUAAUCUAAUC | 1154 |
| AD-65760 | A-131829.1 | UAGAUUAAAGGUCUUUGUACU | 1109 | A-131830.1 | AGUACAAAGACCUUUAAUCUAAU | 1155 |
| AD-65784 | A-131823.1 | AUUAGAUUAAAGGUCUUUGUA | 1110 | A-131824.1 | UACAAAGACCUUUAAUCUAAUCU | 1156 |
| AD-65757 | A-131853.1 | GAGGAGAUUAGAUUAAAGGUA | 1111 | A-131854.1 | UACCUUUAAUCUAAUCUCCUCCC | 1157 |
| AD-65775 | A-131847.1 | GGACUCUUGGACUCUCUGCAA | 1112 | A-131848.1 | UUGCAGAGAGUCCAAGAGUCCUC | 1158 |
| AD-65780 | A-131833.1 | ACUCUUGGACUCUCUGCAAUA | 1113 | A-131834.1 | UAUUGCAGAGAGUCCAAGAGUCC | 1159 |
| AD-65756 | A-131839.1 | AGAUUAAAGGUCUUUGUACUA | 1114 | A-131840.1 | UAGUACAAAGACCUUUAAUCUAA | 1160 |

**Таблица 23. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA HBV**

| ID дуплекса | Название смыслового олигонуклеотида | Смысловая последовательность (5'-3')    | SEQ ID NO: | Название антисмыслового олигонуклеотида | Антисмысловая последовательность (5'-3') | SEQ ID NO: |
|-------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------|
| AD-65776    | A-131859.1                          | UfsgsUfgCfaCfuUfCfGfcUfuCfaCfcUfcUfL96  | 1161       | A-131860.1                              | asGfsaGfgUfgAfaGfcgaAfgUfgCfaCfascsg     | 1207       |
| AD-65782    | A-131877.1                          | UfsgsCfaCfuUfcGfCfUfuCfaCfcUfcUfgAfL96  | 1162       | A-131878.1                              | usCfsaGfaGfgUfgAfagcGfaAfgUfgCfascsa     | 1208       |
| AD-65792    | A-131865.1                          | GfsusGfuGfcAfcUfUfCfGfCfuUfcAfcCfuAfL96 | 1163       | A-131866.1                              | usAfsGfuGfaAfgCfGaaGfuGfcAfcAfcsgsg      | 1209       |
| AD-         | A-131861.1                          | CfsgsUfgUfgCfaCfuUfCfGfcUfuCfaCf        | 116        | A-131862.1                              | asGfsgUfgAfaGfcGfaagUfgCfaCfa            | 121        |

|          |            |                                             |      |            |                                        |      |
|----------|------------|---------------------------------------------|------|------------|----------------------------------------|------|
| 65781    |            | cUfL96                                      | 4    |            | Cfgsgsu                                | 0    |
| AD-64304 | A-128443.6 | GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuAfl96      | 1165 | A-128444.5 | usAfsGfGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfcsc       | 1211 |
| AD-65771 | A-131857.1 | CfscsGfuGfuGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcAfl96      | 1166 | A-131858.1 | usGfsuGfaAfgCfGfAfaGfuGfcAfcAfcGfgsusc | 1212 |
| AD-65758 | A-131867.1 | CfsasCfuUfcGfcUfuCfAfcCfuUfcUfgCfaAfl96     | 1167 | A-131868.1 | usUfsgCfaGfaGfgUfgaaGfcGfaAfgUfgscsa   | 1213 |
| AD-65777 | A-131875.1 | AfscsUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuGfcAfcAfl96      | 1168 | A-131876.1 | usGfsuGfcAfgAfgGfugaAfgCfGfAfaGfusgsc  | 1214 |
| AD-61567 | A-123525.2 | GfsgsCfuGfuAfgGfcCfaAfaAfuUfgGfuAfl96       | 1169 | A-123526.2 | usAfsCfaAfuUfuAfugcCfuAfcAfgCfcsusc    | 1215 |
| AD-65772 | A-131873.1 | UfsusCfGfCfuUfcAfcCfuCfuGfcAfcGfuAfl96      | 1170 | A-131874.1 | usAfsCfuGfcAfgAfgguGfaAfgCfGfAfasgsu   | 1216 |
| AD-65767 | A-131871.1 | UfscsGfcUfuCfaCfcUfuCfGfCfaCfGfuAfl96       | 1171 | A-131872.1 | usGfsaCfGfUfgCfaGfaggUfgAfaGfcGfasasg  | 1217 |
| AD-65763 | A-131869.1 | CfsusUfcGfcUfuCfaAfcCfcUfuCfGfCfaCfGfuAfl96 | 1172 | A-131870.1 | asCfsgUfgCfaGfaGfgugAfaGfcGfaAfgsusg   | 1218 |
| AD-64281 | A-128395.3 | CfscsCfcGfuCfuGfuUfgGfcCfuUfcUfcAfuAfl96    | 1173 | A-128396.2 | usAfsuGfaGfaAfgGfcacAfgAfcGfgGfgsasg   | 1219 |
| AD-64311 | A-128391.3 | CfscsGfuCfuGfuGfcCfcCfuUfcUfcAfuCfuAfl96    | 1174 | A-128392.2 | usAfsGfuGfaGfaAfggcAfcAfgAfcGfgsgsg    | 1220 |
| AD-65790 | A-131837.1 | CfscsAfgCfaCfcAfuUfgGfcAfaCfuUfuUfuAfl96    | 1175 | A-131838.1 | usAfsaAfaAfgUfuGfcAfaGfgUfgCfuGfgsusg  | 1221 |
| AD-65761 | A-131841.1 | CfsasCfcAfgCfaCfcAfuGfcAfaCfuUfuUfuAfl96    | 1176 | A-131842.1 | asAfsaAfgUfuGfcAfaGfgUfgCfuGfgUfgscsg  | 1222 |
| AD-65786 | A-131849.1 | CfsasCfcAfuGfcAfaAfcCfuUfuUfuCfaCfcUfuAfl96 | 1177 | A-131850.1 | asGfsgUfgAfaAfaAfguuGfcAfuGfgUfgscsu   | 1223 |
| AD-65785 | A-131835.1 | CfsasAfuGfuCfaAfcGfGfaCfcGfaCfcUfuAfl96     | 1178 | A-131836.1 | usAfsaGfgUfcGfgUfcguUfgAfcAfuUfgscsa   | 1224 |
| AD-65787 | A-131863.1 | CfsgsCfuUfcAfcCfuUfcCfuGfcAfcGfuCfGfuAfl96  | 1179 | A-131864.1 | usCfsgAfcGfuGfcAfgagGfuGfaAfgCfsgasa   | 1225 |
| AD-65770 | A-131845.1 | AfscsCfuUfgAfgGfcCfaAfuAfcUfuCfaAfaGfuAfl96 | 1180 | A-131846.1 | csUfsuUfgAfaGfuAfugcCfuCfaAfgGfuscsG   | 1226 |
| AD-65766 | A-131843.1 | CfscsGfaCfcUfuGfaGfgGfCfaUfaCfuUfuAfl96     | 1181 | A-131844.1 | usGfsaAfgUfaUfgCfcucAfaGfgUfcGfgsusc   | 1227 |
| AD-61555 | A-123521.2 | GfsasCfcUfuGfaGfGfCfaUfaCfuUfcAfaAfl96      | 1182 | A-123522.2 | usUfsuGfaAfgUfaUfgccUfcAfaGfgUfcsgsg   | 1228 |

|          |            |                                        |      |            |                                       |      |
|----------|------------|----------------------------------------|------|------------|---------------------------------------|------|
| AD-65762 | A-131855.1 | AfscsCfgAfcCfuUfGfAfgGfcAfuAfcUfuAfL96 | 1183 | A-131856.1 | usAfsaGfuAfuGfcCfucaAfgGfuCfgGfuscsg  | 1229 |
| AD-65755 | A-131827.1 | UfscsGfcAfuGfgAfGfAfcCfaCfcGfuGfaAfL96 | 1184 | A-131828.1 | usUfscAfcGfgUfgGfucuCfcAfuGfcGfascsg  | 1230 |
| AD-65788 | A-131811.1 | UfsusAfcAfuAfaGfAfGfgAfcUfcUfuGfgAfL96 | 1185 | A-131812.1 | usCfscAfaGfaGfuCfcucUfuAfuGfuAfasgsa  | 1231 |
| AD-65768 | A-131803.1 | UfscsUfuAfcAfuAfAfGfaGfgAfcUfcUfuAfL96 | 1186 | A-131804.1 | usAfsaGfaGfuCfcUfcuuAfuGfuAfaGfascsc  | 1232 |
| AD-61561 | A-123523.2 | AfscsUfuCfaAfaGfAfCfuGfuUfuGfuUfuAfL96 | 1187 | A-123524.2 | usAfsaAfcAfaAfcAfgucUfuUfgAfaGfusasu  | 1233 |
| AD-65764 | A-131801.1 | UfsasCfuUfcAfaAfGfAfcUfgUfuUfgUfuUfL96 | 1188 | A-131802.1 | asAfsaCfaAfaCfaGfucuUfuGfaAfgUfasusg  | 1234 |
| AD-65753 | A-131799.1 | AfsusAfcUfuCfaAfAfGfaCfuGfuUfuGfuUfL96 | 1189 | A-131800.1 | asAfscAfaAfcAfgUfcuuUfgAfaGfuAfusgsc  | 1235 |
| AD-65765 | A-131817.1 | UfsusGfuUfuAfaAfGfAfcUfgGfgAfgGfaAfL96 | 1190 | A-131818.1 | usUfscCfuCfcCfaGfucuUfuAfaAfcAfasasc  | 1236 |
| AD-65769 | A-131819.1 | GfscsAfuAfcUfuCfaAfaGfaCfuGfuUfuAfL96  | 1191 | A-131820.1 | usAfsaAfcAfgUfcUfuugAfaGfuAfuGfcscsu  | 1237 |
| AD-65759 | A-131815.1 | CfsasAfaGfaCfuGfUfUfuGfuUfuAfaAfgAfL96 | 1192 | A-131816.1 | usCfsuUfuAfaAfcAfaacAfgUfcUfuUfgsasa  | 1238 |
| AD-65774 | A-131831.1 | AfsgsAfcUfgUfuUfGfUfuUfaAfaGfaCfuAfL96 | 1193 | A-131832.1 | usAfgsUfcUfuUfaAfacaAfaCfaGfuCfususu  | 1239 |
| AD-65778 | A-131807.1 | GfsusUfuGfuUfuAfAfAfgAfcUfgGfgAfgAfL96 | 1194 | A-131808.1 | usCfsuCfcCfaGfuCfuuuAfaAfcAfaAfcasg   | 1240 |
| AD-65773 | A-131805.1 | GfsgsGfgGfaGfgAfGfAfuUfaGfaUfuAfaAfL96 | 1195 | A-131806.1 | usUfsuAfaUfcUfaAfucuCfcUfcCfcCfcsasa  | 1241 |
| AD-65789 | A-131825.1 | GfsgsGfgAfgGfaGfAfUfuAfgAfuUfaAfaGfL96 | 1196 | A-131826.1 | csUfsuUfaAfuCfuAfaucUfcCfuCfcCfcscsa  | 1242 |
| AD-65783 | A-131809.1 | GfsusUfgGfgGfgAfGfGfaGfaUfuAfgAfuUfL96 | 1197 | A-131810.1 | asAfsuCfuAfaUfcUfccuCfcCfcCfaAfcusc   | 1243 |
| AD-65754 | A-131813.1 | UfsusGfgGfgGfaGfGfAfgAfuUfaGfaUfuAfL96 | 1198 | A-131814.1 | usAfsaUfcUfaAfuCfuuccUfcCfcCfcAfascsu | 1244 |
| AD-65779 | A-131821.1 | GfsgsGfaGfgAfgAfUfUfaGfaUfuAfaAfgAfL96 | 1199 | A-131822.1 | usCfsuUfuAfaUfcUfaauCfuCfcUfcCfcscsc  | 1245 |
| AD-65791 | A-131851.1 | UfsusAfgAfuUfaAfAfGfgUfcUfuUfgUfuAfL96 | 1200 | A-131852.1 | usUfsaCfaAfaGfaCfcuuUfaAfuCfuAfasusc  | 1246 |
| AD-65760 | A-131829.1 | UfsasGfaUfuAfaAfGfGfuCfuUfuGfuAfcUfL96 | 120  | A-131830.1 | asGfsuAfcAfaAfgAfccuUfuAfaUfcUfasasu  | 124  |

|          |            |                                        |      |            |                                      |      |
|----------|------------|----------------------------------------|------|------------|--------------------------------------|------|
|          |            |                                        | 1    |            |                                      | 7    |
| AD-65784 | A-131823.1 | AfsusUfaGfaUfuAfAfAfgGfuCfuUfuGfuAfL96 | 1202 | A-131824.1 | usAfscAfaAfgAfcCfuuuAfaUfcUfaAfuscsu | 1248 |
| AD-65757 | A-131853.1 | GfsasGfgAfgAfuUfAfGfaUfuAfaAfgGfuAfL96 | 1203 | A-131854.1 | usAfscCfuUfuAfaUfcuaAfuCfuCfcUfcscsc | 1249 |
| AD-65775 | A-131847.1 | GfsgsAfcUfcUfuGfGfAfcUfcUfcUfgCfaAfL96 | 1204 | A-131848.1 | usUfsgCfaGfaGfaGfuccAfaGfaGfuCfcsusc | 1250 |
| AD-65780 | A-131833.1 | AfscsUfcUfuGfgAfCfUfcUfcUfgCfaAfL96    | 1205 | A-131834.1 | usAfsuUfgCfaGfaGfaguCfcAfaGfaGfuscsc | 1251 |
| AD-65756 | A-131839.1 | AfsgsAfuUfaAfaGfGfUfcUfuUfgUfaCfuAfL96 | 1206 | A-131840.1 | usAfsgUfaCfaAfaGfaccUfuUfaAfuCfusasa | 1252 |

Скрининг в отношении разовой дозы данных дуплексов проводили на клетках Cos7 в концентрации 1 нМ и 50 нМ с помощью анализа с использованием люциферазы Dual-Glo®, который описан выше. Результаты анализов представлены в таблице 24.

**Таблица 24. Скрининг в отношении разовой дозы HBV с помощью анализа с использованием системы Dual-Glo Luciferase®**

| ID дуплекса | 50 нМ | Стандартное отклонение | 1 нМ  | Стандартное отклонение |
|-------------|-------|------------------------|-------|------------------------|
| AD-65776    | 20,11 | 4,21                   | 40,79 | 1,89                   |
| AD-65782    | 26,31 | 3,10                   | 61,07 | 9,16                   |
| AD-65792    | 43,31 | 5,24                   | 61,09 | 6,02                   |
| AD-65781    | 25,77 | 3,66                   | 39,63 | 2,87                   |
| AD-64304    | 18,87 | 1,26                   | 29,72 | 3,37                   |
| AD-65771    | 17,16 | 1,78                   | 37,55 | 2,20                   |
| AD-65758    | 31,74 | 8,26                   | 65,77 | 11,05                  |
| AD-65777    | 59,76 | 11,15                  | 77,63 | 5,14                   |
| AD-61567    | 17,69 | 5,29                   | 26,45 | 5,66                   |
| AD-65772    | 58,07 | 9,67                   | 75,66 | 4,92                   |
| AD-65767    | 29,65 | 1,60                   | 39,64 | 4,36                   |
| AD-65763    | 25,10 | 5,77                   | 47,78 | 9,99                   |
| AD-64281    | 39,07 | 6,80                   | 51,46 | 4,19                   |
| AD-64311    | 20,51 | 1,96                   | 37,80 | 3,53                   |
| AD-65790    | 50,41 | 7,00                   | 70,30 | 1,95                   |
| AD-65761    | 13,30 | 4,38                   | 21,14 | 3,49                   |
| AD-65786    | 12,45 | 3,51                   | 22,62 | 0,33                   |
| AD-65785    | 36,87 | 6,04                   | 51,49 | 4,18                   |
| AD-65787    | 27,97 | 5,73                   | 48,18 | 7,65                   |
| AD-65770    | 22,67 | 5,39                   | 41,48 | 8,52                   |
| AD-65766    | 31,44 | 3,35                   | 50,25 | 0,45                   |
| AD-61555    | 18,4  | 10,83                  | 22,61 | 0,57                   |

|          |            |       |            |       |
|----------|------------|-------|------------|-------|
|          | 3          |       |            |       |
| AD-65762 | 18,8<br>7  | 4,86  | 34,94      | 4,81  |
| AD-65755 | 47,0<br>3  | 9,38  | 83,19      | 9,68  |
| AD-65788 | 35,8<br>5  | 10,13 | 58,07      | 4,78  |
| AD-65768 | 24,0<br>2  | 2,49  | 28,55      | 2,53  |
| AD-61561 | 8,11       | 1,29  | 14,26      | 2,27  |
| AD-65764 | 16,8<br>9  | 3,99  | 29,10      | 1,03  |
| AD-65753 | 19,1<br>0  | 2,87  | 29,79      | 5,26  |
| AD-65765 | 55,4<br>0  | 10,72 | 76,93      | 8,79  |
| AD-65769 | 19,2<br>4  | 4,47  | 23,18      | 2,54  |
| AD-65759 | 48,8<br>6  | 4,81  | 87,31      | 13,75 |
| AD-65774 | 102,<br>27 | 12,33 | 100,7<br>9 | 3,24  |
| AD-65778 | 64,3<br>9  | 2,60  | 80,67      | 2,59  |
| AD-65773 | 72,6<br>4  | 7,87  | 80,80      | 4,83  |
| AD-65789 | 73,5<br>9  | 4,35  | 94,72      | 3,32  |
| AD-65783 | 54,4<br>1  | 7,15  | 84,46      | 4,32  |
| AD-65754 | 62,5<br>1  | 4,12  | 102,6<br>3 | 21,42 |
| AD-65779 | 47,4<br>0  | 7,51  | 76,20      | 2,05  |
| AD-65791 | 12,0<br>9  | 0,70  | 19,19      | 3,46  |
| AD-65760 | 13,5<br>0  | 4,84  | 25,37      | 2,09  |
| AD-65784 | 19,8<br>4  | 1,27  | 31,04      | 3,49  |
| AD-65757 | 22,6<br>6  | 3,97  | 24,50      | 5,81  |
| AD-65775 | 47,7<br>8  | 3,30  | 58,81      | 3,05  |
| AD-65780 | 29,1<br>0  | 2,87  | 42,85      | 2,73  |
| AD-65756 | 10,4<br>9  | 1,62  | 19,95      | 2,58  |

Исходя из результатов этих анализов, для основной оптимизации отбирали средства для RNAi, целенаправленной воздействующие на пять сайтов в ORF X HBV (нуклеотиды 1551, 1577, 1580, 1806 и 1812 в последовательности под номером доступа GenBank NC\_003977.1) и конструировали и синтезировали

дополнительные средства. Такие дополнительные средства оценивали в анализах *in vitro*, как описано выше. Подробный перечень дополнительных немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нити, целенаправленно воздействующих на ORF X HBV, показан в таблице 25. Подробный перечень дополнительных модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нити, целенаправленно воздействующих на ORF X HBV, показан в таблице 26.

Такие средства на основе iRNA также оценивали в отношении эффективности *in vivo* с использованием мышинной модели AAV-HBV (см., например, Yang, et al. (2014) *Cell and Mol Immunol* 11:71). Данная мышинная модель характеризуется устойчивой виремией HBV после инфицирования рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (AAV), несущим реплицируемый геном HBV. Экспрессия гена HBV в печени у этих мышей имитирует инфекцию HBV у людей, и у таких мышей проявляется значительное воспаление печени и повреждение печени, что проявляется в виде повышенных уровней ALT, фиброза и стеатоза.

Данным мышам AAV-HBV подкожно вводили разовую дозу в 3 мг/кг AD-66808, AD-66809, AD-66810, AD-66811, AD-66812, AD-66813, AD-66814, AD-66815, AD-66816 и AD-66817 и определяли уровень HBsAg в сыворотке крови животных до введения дозы и в дни 14/15 после введения дозы. Результаты этих экспериментов представлены на фигуре 2 и в таблице 27 и они демонстрируют, что уровни HBsAg в сыворотке крови снижались после однократного введения таких средств. В таблице 27 также представлены результаты скрининга в отношении разовой дозы на клетках Cos7, трансфицированных указанными iRNA HBV, с помощью анализа с использованием люциферазы Dual-Glo®, как описано выше, для тех же самых средств для RNAi. Данные выражены в виде процента остаточной мРНК в сравнении с отрицательным контролем через 24 часа.

Таблица 25. Немодифицированные антисмысловые и смысловые последовательности ORF X HBV

| ID<br>дуплекса | Смысловая последовательность,<br>немодифицированная (5'-3') | SEQ ID<br>NO: | Антисмысловая<br>последовательность,<br>немодифицированная (5'-3') | SEQ ID<br>NO: |
|----------------|-------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------|---------------|
| AD-66808       | GUCUGUGCCUUCUCAUCUA                                         | 1207          | UAGAUGAGAAGGCACAGACUU                                              | 1263          |
| AD-66809       | GUCUGUGCCUUCUCAUCUA                                         | 1208          | UAGAUGAGAAGGCACAGACUU                                              | 1264          |
| AD-66810       | GUGUGCACUUCGCUUCACA                                         | 1209          | UGUGAAGCGAAGUGCACACUU                                              | 1265          |
| AD-66811       | GUGUGCACUUCGCUUCACA                                         | 1210          | UGUGAAGCGAAGUGCACACUU                                              | 1266          |
| AD-66812       | UGUGCACUUCGCUUCACCUCU                                       | 1211          | AGAGGUGAAGCGAAGUGCACAUU                                            | 1267          |
| AD-66813       | UGUGCACUUCGCUUCACCUCU                                       | 1212          | AGAGGUGAAGCGAAGUGCACAUU                                            | 1268          |
| AD-66814       | CACCAGCACCAUGCAACUUUU                                       | 1213          | AAAAGUUGCAUGGUGCUGGUGUU                                            | 1269          |
| AD-66815       | CACCAGCACCAUGCAACUUUU                                       | 1214          | AAAAGUUGCAUGGUGCUGGUGUU                                            | 1270          |
| AD-66816       | CACCAUGCAACUUUUUCACCU                                       | 1215          | AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU                                            | 1271          |
| AD-66817       | CACCAUGCAACUUUUUCACCU                                       | 1216          | AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU                                            | 1272          |

Таблица 26. Модифицированные антисмысловые и смысловые последовательности ORF X HBV

| ID<br>дуплекса | Смысловая последовательность,<br>модифицированная (5'-3') | SEQ ID<br>NO: | Антисмысловая последовательность,<br>модифицированная (5'-3') | SEQ ID<br>NO: |
|----------------|-----------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------|---------------|
| AD-66808       | gsuscuGfuGfCfCfuucucaucuaL96                              | 1273          | usAfsgauGfaGfAfagggAfcAfgacsusu                               | 1283          |
| AD-66809       | gsuscuGfuGfCfCfuucucaucuaL96                              | 1274          | UfsAfsgauGfaGfAfagggAfcAfgacsusu                              | 1284          |
| AD-66810       | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96                              | 1275          | usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu                               | 1285          |
| AD-66811       | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96                              | 1276          | UfsGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu                              | 1286          |
| AD-66812       | usgsugcaCfuUfCfGfcuucaccucuL96                            | 1277          | asGfsaggUfgAfAfgcgaAfgUfgcacasusu                             | 1287          |
| AD-66813       | usgsugcaCfuUfCfGfcuucaccucuL96                            | 1278          | AfsGfsaggUfgAfAfgcgaAfgUfgcacasusu                            | 1288          |
| AD-66814       | csasccagCfaCfCfAfugcaacuuuuL96                            | 1279          | asAfsaagUfuGfCfauggUfgCfuggugsusu                             | 1289          |
| AD-66815       | csasccagCfaCfCfAfugcaacuuuuL96                            | 1280          | AfsAfsaagUfuGfCfauggUfgCfuggugsusu                            | 1290          |

|          |                                |      |                                    |      |
|----------|--------------------------------|------|------------------------------------|------|
| AD-66816 | csasccauGfcAfAfCfuuuuucaccuL96 | 1281 | asGfsgugAfaAfAfaguuGfcAfuggugsusu  | 1291 |
| AD-66817 | csasccauGfcAfAfCfuuuuucaccuL96 | 1282 | AfsGfsgugAfaAfAfaguuGfcAfuggugsusu | 1292 |

Таблица 27

| Сайт<br>(число<br>vRNA <sup>1</sup> ) | ID дуплекса | IC <sub>50</sub> in vitro<br>люц. HBV (нМ) | KD log <sub>10</sub> HBsAg<br>In vivo при 3<br>мг/кг |
|---------------------------------------|-------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 1551<br>(4)                           | AD-66808    | <b>0,187</b>                               | <b>2,4</b>                                           |
|                                       | AD-66809    | <b>0,014</b>                               | <b>1,46</b>                                          |
| 1577<br>(4)                           | AD-66810    | <b>0,290</b>                               | <b>1,7</b>                                           |
|                                       | AD-66811    | <b>0,029</b>                               | <b>1,3</b>                                           |
| 1580<br>(4)                           | AD-66812    | <b>0,795</b>                               | <b>2,19</b>                                          |
|                                       | AD-66813    | <b>0,074</b>                               | <b>&gt;&gt;1,14</b>                                  |
| 1806<br>(4)                           | AD-66814    | <b>0,0002</b>                              | <b>1,5</b>                                           |
|                                       | AD-66815    | <b>0,0001</b>                              | <b>&gt;&gt;1,56</b>                                  |
| 1812<br>(4)                           | AD-66816    | <b>0,047</b>                               | <b>1,61</b>                                          |
|                                       | AD-66817    | <b>0,0001</b>                              | <b>1,60</b>                                          |

<sup>1</sup>Количество подвергнутых сайленсингу вирусных РНК

### Пример 6. Скрининг siRNA-дуплексов *in vivo*

Подмножество основных средств на основе iRNA оценивали в отношении эффективности *in vivo* с использованием описанной выше мышинной модели AAV-HBV. Мышам AAV-HBV вводили разовую дозу в 3 мг/кг AD-66019, AD-65375, AD-65047, AD-65377, AD-66111, AD-65421 или AD-66110, и определяли уровень HBsAg в сыворотке крови животных до введения дозы и в дни 5 и 10 после введения дозы. В качестве контроля мышам AAV-HBV вводили дозу dsRNA в 3 мг/кг, целенаправленно воздействующей на мышинный/крысиный транстиретин (mrTTR). Результаты этих экспериментов изображены на фигуре 3 и они демонстрируют, что уровни HBsAg в сыворотке крови снижались после однократного введения таких средств.

На фигуре 4 представлен график, на котором изображены результаты определения процента HBsAg до введения дозы, также определяли процент HBsAg, который сохранялся в дни 5 и 10 у этих животных после введения разовой дозы в 3 мг/кг. Результаты этих экспериментов изображены на фигуре 4. На фигуре 4 также изображен процент HBsAg, который остается в день 10 после введения дозы, относительно процента HBsAg, который остается в день 10 после введения дозы, у животного, которому вводили 3 мг/кг контрольной dsRNA, целенаправленно воздействующий на мышинный/крысиный транстиретин (mrTTR).

По меньшей мере частично исходя из результатов описанных выше анализов *in vitro* и *in vivo*, AD-65403, который подавляет 3 РНК HBV, и AD-66810, который подавляет ген X, были отобраны в качестве кандидатных лекарственных средств (DC) для применения в монотерапии или в комбинированной терапии.

На фигуре 5 продемонстрировано, что в мышинной модели AAV-HBV инфекции HBV разовая доза AD-65403 в 3 мг/кг приводит к сильному и специфическому нокдауну HBsAg. В частности, однократная подкожная доза AD-65403 в 3 мг/кг приводит к 3,9  $\log_{10}$  снижению уровней HBsAg со средним снижением HBsAg 1,8  $\log_{10}$  через 5-10 дней после введения однократной дозы.

На фигурах 6А и 6В продемонстрировано, что в мышинной модели AAV-HBV инфекции HBV разовая подкожная доза AD-66810 в 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 9 мг/кг приводит к сильному и

специфическому нокдауну HBsAg, особенно в более высоких дозах AD-66810. Процент снижения HBsAg в сыворотке крови показан на стандартной шкале на фигуре 6А и на шкале  $\log_{10}$  на фигуре 6В. На фигуре 7 продемонстрировано, что в мышинной модели AAV-HBV инфекции HBV AD-66810, который вводили в трех еженедельных подкожных дозах в 3 мг/кг, приводил к сильному и специфическому нокдауну HBsAg в течение периода, превышающего 4 месяца.

**Пример 7. Лечение инфекции HBV при помощи комбинации средств, целенаправленно воздействующих на HBV**

Подмножество средств на основе iRNA по настоящему изобретению оценивали в отношении эффективности *in vivo* с использованием описанной выше мышинной модели AAV-HBV. Мышам AAV-HBV вводили одну или несколько доз AD-65403 и AD-66810, или отдельно, или в комбинации друг с другом. Иллюстративные режимы дозирования включали разовую суммарную дозу в 3 мг/кг средства на основе iRNA, представлявшего собой AD-65403, AD-66810 или комбинацию AD-65403 и AD-66810 (т. е. 1,5 мг/кг каждого средства на основе iRNA, а в целом 3 мг/кг средства на основе iRNA, вводимого в виде смеси или в виде двух отдельных доз); или разовую дозу в 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 9 мг/кг общей дозы средства на основе iRNA, представляющего собой AD-65403, AD-66810 или комбинацию AD-65403 и AD-66810. Иллюстративные многодозовые режимы включают, например, три еженедельные дозы, один раз в неделю, с использованием каких-либо уровней дозировки, представленных в иллюстративных режимах для разовой дозы. Также в качестве контроля вводили соответствующее контрольное средство на основе iRNA, что является обычным в данной области.

Уровень HBsAg определяли в сыворотке крови животных до введения дозы и через определенные интервалы времени после введения дозы, например, каждые пять дней после введения дозы до тех пор, пока уровень HBsAg не вернется к исходному уровню у всех животных. Введение AD-65403, AD-66810 или комбинации AD-65403 и AD-66810 приводит к устойчивому и специфическому нокдауну HBsAg в сыворотке крови.

**Пример 8. Лечение инфекции HDV с помощью средств на основе iRNA, целенаправленно воздействующих на вирус гепатита В**

Вирус дельта-гепатита (HDV) представляет собой дефектный РНК-вирус, которому необходима помощь HBV для его репликации и сборки новых вирионов. Поэтому HDV становится инфицирующим только в присутствии активной инфекции HBV. Геном HDV содержит только одну активно транскрибируемую открытую рамку считывания, которая кодирует две изоформы дельта-антигена гепатита. Пост-трансляционные модификации малых и больших дельта-антигенов (S-HDAg и L-HDAg), в том числе фосфорилирование и изопренилирование соответственно, наделяют этих антигенов специфическими свойствами. Эффективное лечение HBV будет также ослаблять тяжесть инфекции HDV.

Известна модель HDV на шимпанзе. Подмножество средств на основе iRNA по настоящему изобретению оценивали в отношении эффективности *in vivo* с использованием модели HDV на шимпанзе или другой подходящей модели HDV. Инфицированным HDV шимпанзе вводили одну или несколько доз AD-65403 и AD-66810, или отдельно, или в комбинации друг с другом. Иллюстративные режимы дозирования включали разовую 3 мг/кг суммарную дозу средства на основе iRNA, представляющего собой AD-65403, AD-66810 или комбинацию AD-65403 и AD-66810 (т. е. 1,5 мг/кг каждого средства на основе iRNA, а суммарно 3 мг/кг средства на основе iRNA, вводимого в виде смеси или в виде двух отдельных доз); или разовую дозу в 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 9 мг/кг суммарной дозы средства на основе iRNA, представляющего собой AD-65403, AD-66810 или комбинацию AD-65403 и AD-66810. Иллюстративные многодозовые режимы включают, например, три еженедельные дозы, один раз в неделю, с использованием каких-либо уровней дозировки, представленных в иллюстративных режимах для разовой дозы. Также в качестве контроля вводили соответствующую контрольную iRNA, что является обычным в данной области.

Уровень одного или нескольких из S-HDAg, L-HDAg и РНК HDV, необязательно в комбинации с HBsAg, определяли в сыворотке крови животных до введения дозы и через определенные интервалы времени после введения дозы, например, каждые пять дней для мониторинга

уровней антигена или РНК. Введение AD-65403, AD-66810 или комбинации AD-65403 и AD-66810 приводило к устойчивому и специфическому нокдауну HBsAg в сыворотке крови, приводящему в результате к ослаблению тяжести HDV, что было продемонстрировано, например, по статистически значимому снижению одного или нескольких из S-HDAg, L-HDAg и HDV РНК. Эти результаты демонстрируют, что введение одного или и AD-65403, и AD-66810 является эффективным в лечении HDV.

#### **ЭКВИВАЛЕНТЫ**

Специалисты в данной области распознают или смогут определить, используя лишь стандартный экспериментальный подход, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления и способов, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены объемом следующей формулы изобретения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухцепочечный РНКи агент для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке, где двухцепочечный РНКи агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где смысловая цепь содержит 5'-GGUGGACUUCUCUCAUUUUUA -3' (SEQ ID NO: 11) и антисмысловая цепь содержит 5'-UAAAAUUGAGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO: 12),

где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами,

где смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и

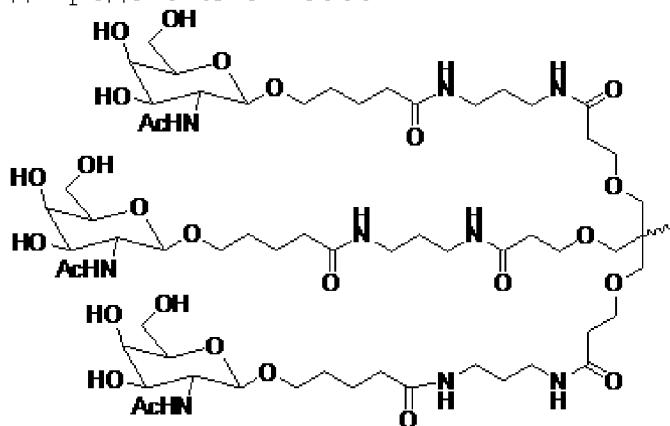
где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

2. Двухцепочечный РНКи агент по п.1, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего не встречающиеся в природе основания, 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 миметик 5'-фосфата.

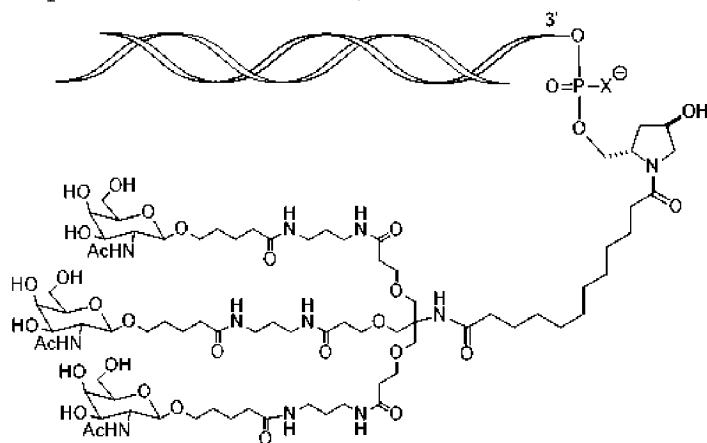
3. Двухцепочечный РНКи агент по п.1, где смысловая цепь содержит 5'-gsgsuggaCfuUfCfuCfcaAfUfuua -3' (SEQ ID NO: 25) и антисмысловая цепь содержит 5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc -3' (SEQ ID NO: 26), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, 2'-ОМе G, 2'-ОМе

С и 2'-ОМе U, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор А, 2'-фтор С, 2'-фтор G и 2'-фтор U, соответственно; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

4. Двухцепочечный РНКи агент по любому из пп.1-3, где лиганд представляет собой



5. Двухцепочечной РНКи агент по п.4, где РНКи агент конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме



где X представляет собой O или S.

6. Двухцепочечный РНКи агент по п.1, где смысловая цепь содержит 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuaaL96 -3' (SEQ ID NO: 994) и антисмысловая цепь содержит 5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc -3' (SEQ ID NO: 1023), где a, g, с и u представляют собой 2'-O-метил (2'-ОМе) А, 2'-ОМе G, 2'-ОМе С и 2'-ОМе U, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор А, 2'-фтор С, 2'-фтор G и 2'-фтор U, соответственно; и s представляет собой N-[трис (GalNAc-алкил)-амидодеканойл]-4-гидроксипролинол.

7. Композиция для ингибирования экспрессии вируса гепатита В (HBV) в клетке, содержащая:

(а) первый двухцепочечный РНКи агент, содержащий первую смысловую цепь и первую антисмысловую цепь, образующую первую

двухцепочечную область,

где первая смысловая цепь содержит 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ ID NO: 11) и первая антисмысловая цепь содержит 5'-UAAAAUUGAGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO: 12),

где все нуклеотиды первой смысловой цепи и все нуклеотиды первой антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами,

где первая смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и

где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер; и

(b) второй двухцепочечный РНК-агент, содержащий вторую смысловую цепь и вторую антисмысловую цепь, образующую вторую двухцепочечную область,

где вторая смысловая цепь включает 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ ID NO: 39) и вторая антисмысловая цепь включает 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACACUU -3' (SEQ ID NO: 40),

где все нуклеотиды второй смысловой цепи и все нуклеотиды второй антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами,

где вторая смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и

где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

8. Композиция по п.7, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов представляет собой дезоксинуклеотид, 3'-концевой дезокситиминовый (dT) нуклеотид, 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-дезокси-модифицированный нуклеотид, запертый нуклеотид, незапертый нуклеотид, конформационно ограниченный нуклеотид, конформационно затрудненный этилом нуклеотид, нуклеотид с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированный нуклеотид, 2'-О-аллил-модифицированный нуклеотид, 2'-С-алкил-модифицированный нуклеотид, 2'-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолино-нуклеотид, фосфорамидат, нуклеотид, содержащий не встречающиеся в природе основания, тетрагидропиран-модифицированный нуклеотид, 1,5-ангидрогекситол-

модифицированный нуклеотид, циклогексенил-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий фосфоротиоатную группу, нуклеотид, содержащий метилфосфонатную группу, нуклеотид, содержащий 5'-фосфат, и нуклеотид, содержащий миметик 5'-фосфата.

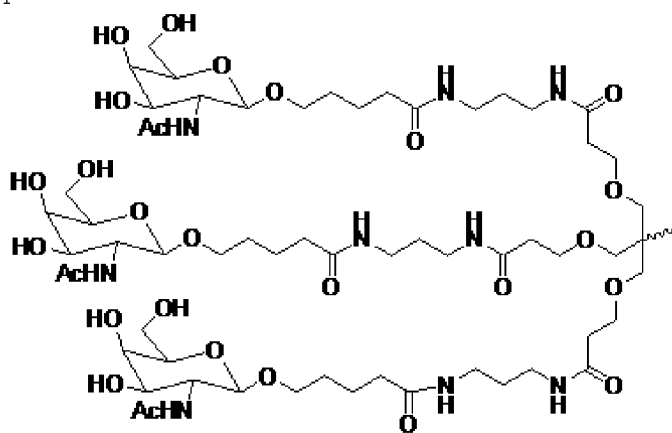
9. Композиция по п.7, где

(a) первая смысловая цепь содержит 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuaa -3' (SEQ ID NO: 25) и первая антисмысловая цепь содержит 5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc -3' (SEQ ID NO: 26); и

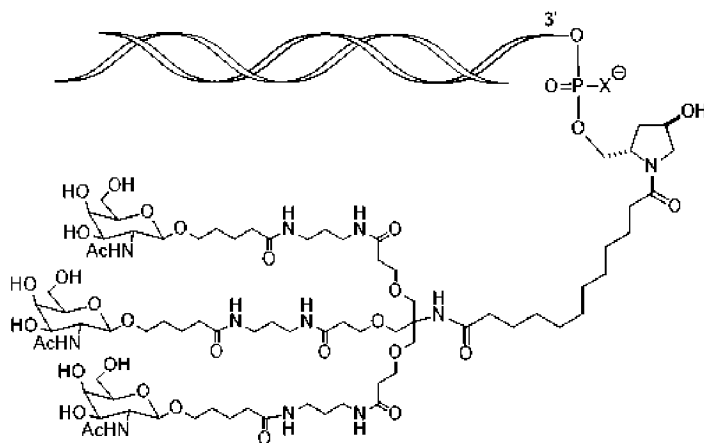
(b) вторая смысловая цепь содержит 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO: 41) и вторая антисмысловая цепь содержит 5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO: 42);

где а, г, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, 2'-ОМе G, 2'-ОМе С и 2'-ОМе U, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор А, 2'-фтор С, 2'-фтор G и 2'-фтор U, соответственно; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

10. Композиция по любому из пп.7-9, где лиганд представляет собой



11. Композиция по п.10, где РНКи агент конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме



где X представляет собой O или S.

12. Композиция по п.7, где

(a) первая смысловая цепь содержит 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuuL96 -3' (SEQ ID NO: 994) и первая антисмысловая цепь содержит 5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc -3' (SEQ ID NO: 1023); и

(b) вторая смысловая цепь содержит 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96 -3' (SEQ ID NO: 1275) и вторая антисмысловая цепь содержит 5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO: 1285);

где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, 2'-ОМе G, 2'-ОМе С и 2'-ОМе U, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор А, 2'-фтор С, 2'-фтор G и 2'-фтор U, соответственно; s представляет собой фосфоротиаонатную связь; и L96 представляет собой N-[трис (GalNAc-алкил) амидодеканойл]-4-гидроксипролинол.

13. Клетка, содержащая двухцепочечный РНКи агент по любому из пп. 1-6.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая

- (a) (i) двухцепочечный РНКи агент по любому из пп. 1-6, или
- (ii) композицию по любому из пп. 7-12; и
- (b) безбуферный раствор или буферный раствор.

15. Способ снижения вирусной нагрузки вируса гепатита В (HBV) у индивида, инфицированного HBV, включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества двухцепочечного РНКи агента по любому из пп.1-6, композиции по любому из пп.7-12 или фармацевтической композиции по п.14.

16. Способ лечения индивида с инфекцией вируса гепатита В (HBV), включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества двухцепочечного РНКи агента по любому из пп.1-6,

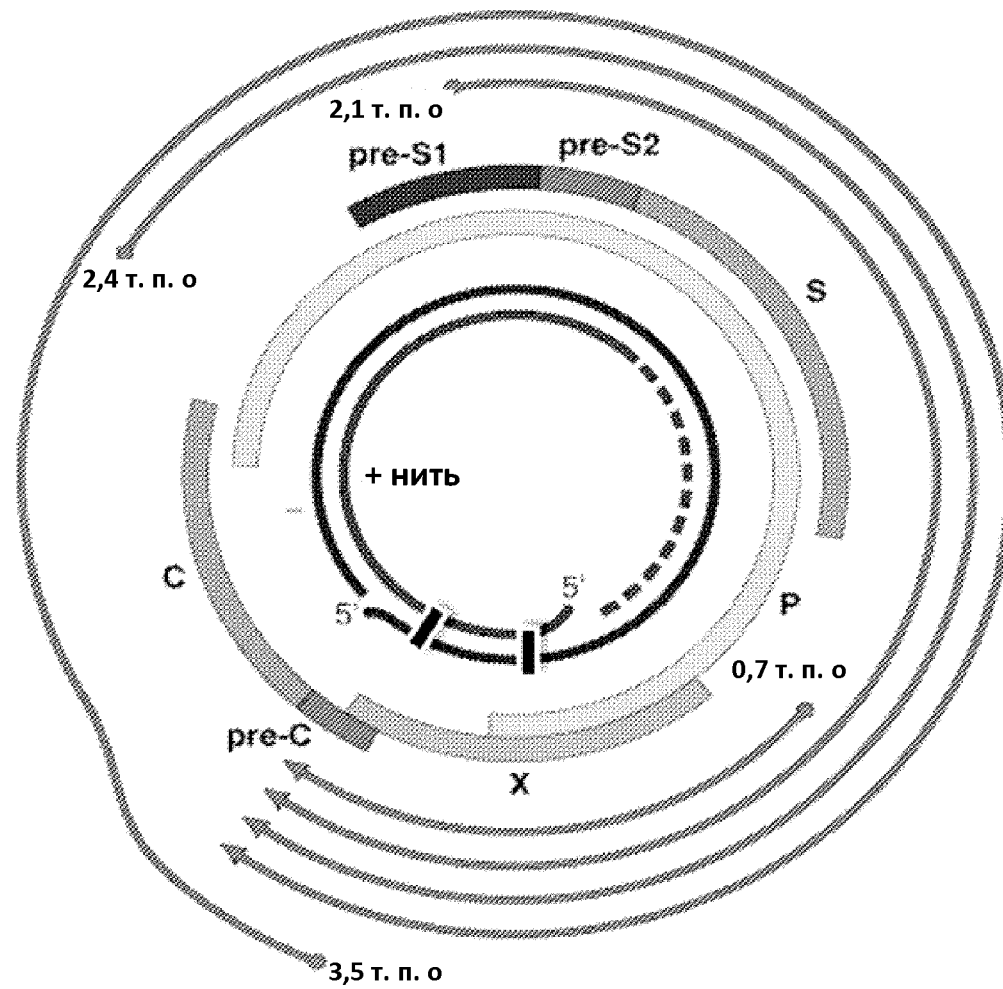
композиции по любому из пп.7-12 или фармацевтической композиции по п.14.

17. Способ по п. 15 или п. 16, где двухцепочечный РНКи агент вводят индивиду в зависящей от массы дозы, равной от примерно 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг или от примерно 0,5 мг/кг до примерно 50 мг/кг; в зависящей от массы дозы, равной от примерно 10 мг/кг до примерно 30 мг/кг; в зависящей от массы дозы, равной от примерно 3 мг/кг; в зависящей от массы дозы, равной от примерно 10 мг/кг; или в фиксированной дозе примерно от 50 мг до 200 мг.

18. Способ по любому из пп.15-17, где двухцепочечный РНКи агент вводят подкожно или внутривенно.

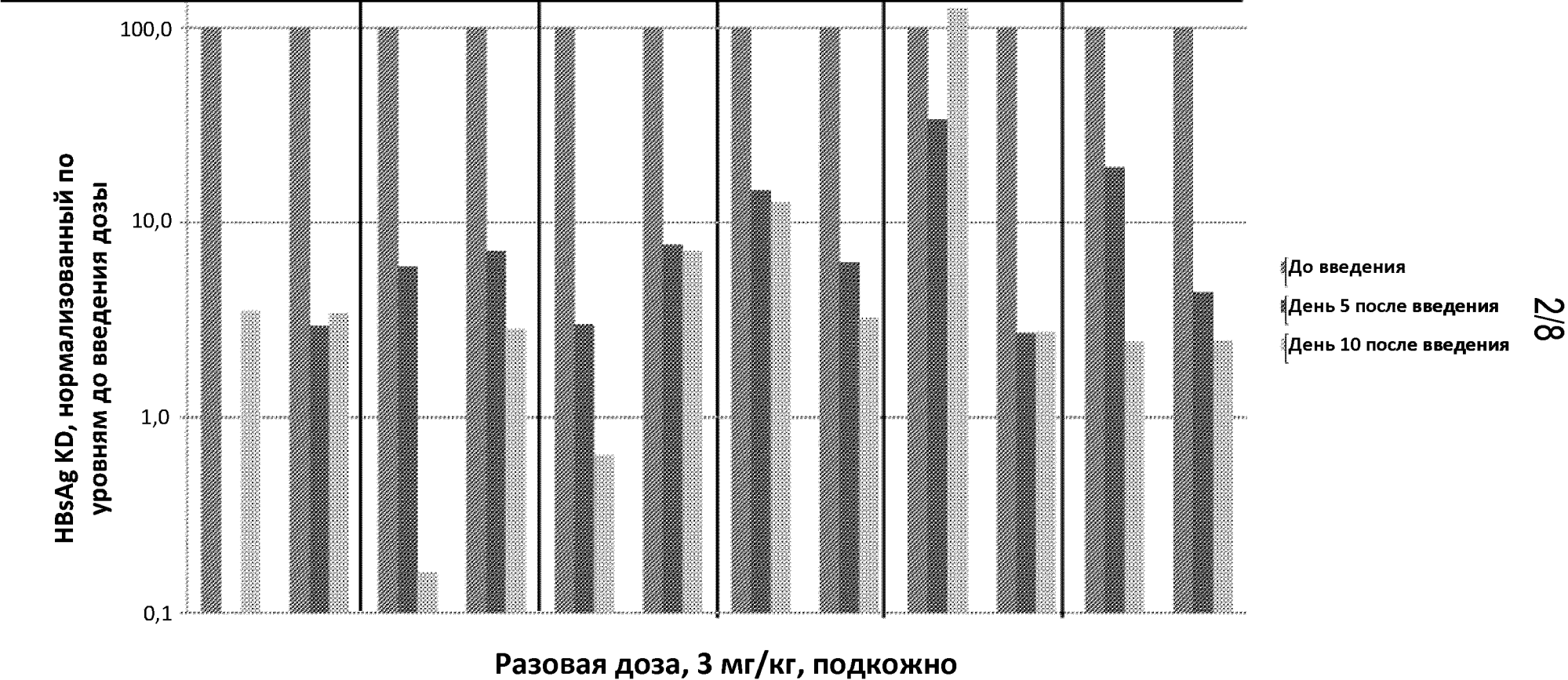
19. Способ по любому из пп.15-18, где двухцепочечный РНКи агент вводят с дополнительным терапевтическим агентом, где дополнительный терапевтический агент представляет собой противовирусный агент, ингибитор обратной транскриптазы (например, Тенофовир дизопроксил фумарат (TDF), Тенофовир алафенамид, Ламивудин, Адефовир дипивоксил, Энтекавир (ETV), Телбивудин или AGX-1009), иммуностимулятор (например, пегилированный интерферон альфа 2а (PEG-IFN- $\alpha$ 2а), интерферон альфа-2b, рекомбинантный интерлейкин-7 человека и агонист Toll-подобного рецептора 7 (TLR7)), терапевтическую вакцину, ингибитор проникновения вируса, олигонуклеотид, который ингибирует секрецию или высвобождение HbsAg, ингибитор капсида, ингибитор образования ковалентно замкнутой кольцевой (ССС) ДНК HBV и любую комбинацию из вышеперечисленного.

По доверенности



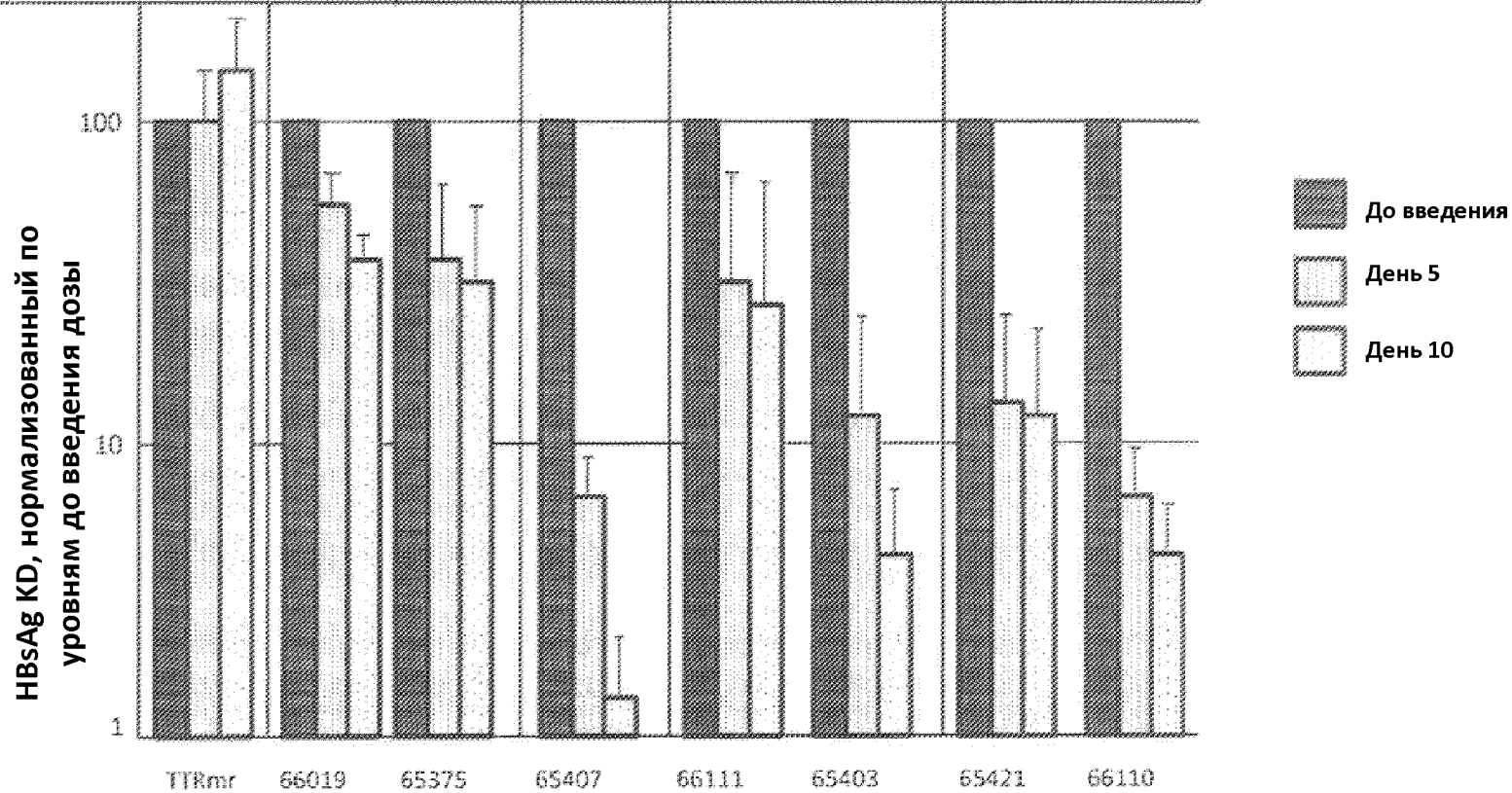
Фигура 1

|                          | 1551  |       | 1577  |       | 1580  |       | 1581  |       | 1806   |       | 1812  |       |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| AD-                      | 66808 | 66809 | 66810 | 66811 | 66812 | 66813 | 65421 | 66110 | 66814  | 66815 | 66816 | 66817 |
| ↓HBsAg Log <sub>10</sub> | 1,453 | 1,464 | 2,794 | 1,547 | 2,194 | 1,143 | 0,90  | 1,49  | -0,101 | 1,560 | 1,612 | 1,603 |



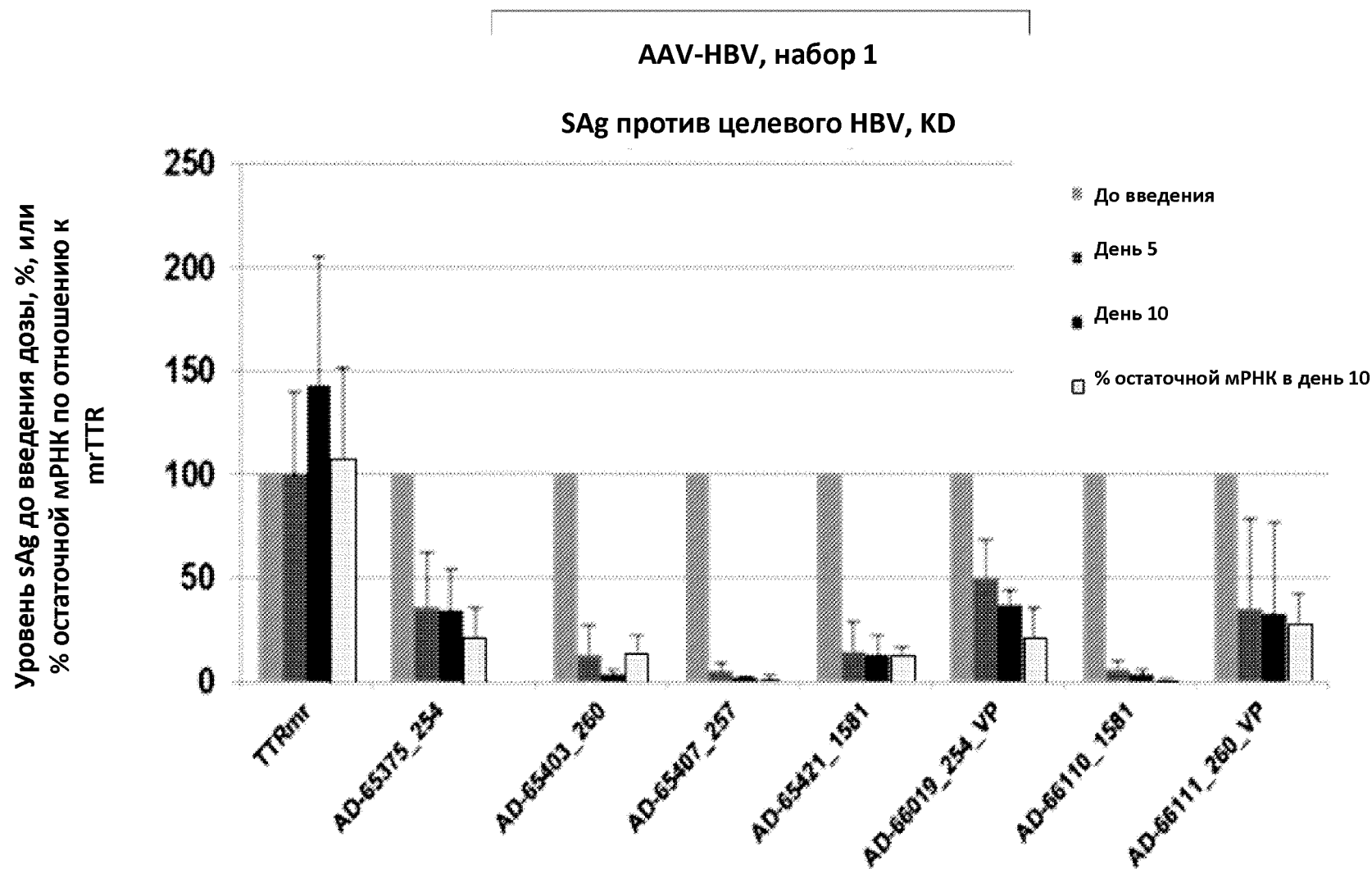
Фигура 2

|                          | mrTTR | 254   |       | 257   | 260   |       | 2581  |       |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| AD-                      |       | 66019 | 65375 | 65407 | 66111 | 65403 | 65421 | 66110 |
| ↓HBsAg Log <sub>10</sub> | 0     | 0,43  | 0,47  | 1,90  | 0,48  | 1,7   | 0,90  | 1,49  |

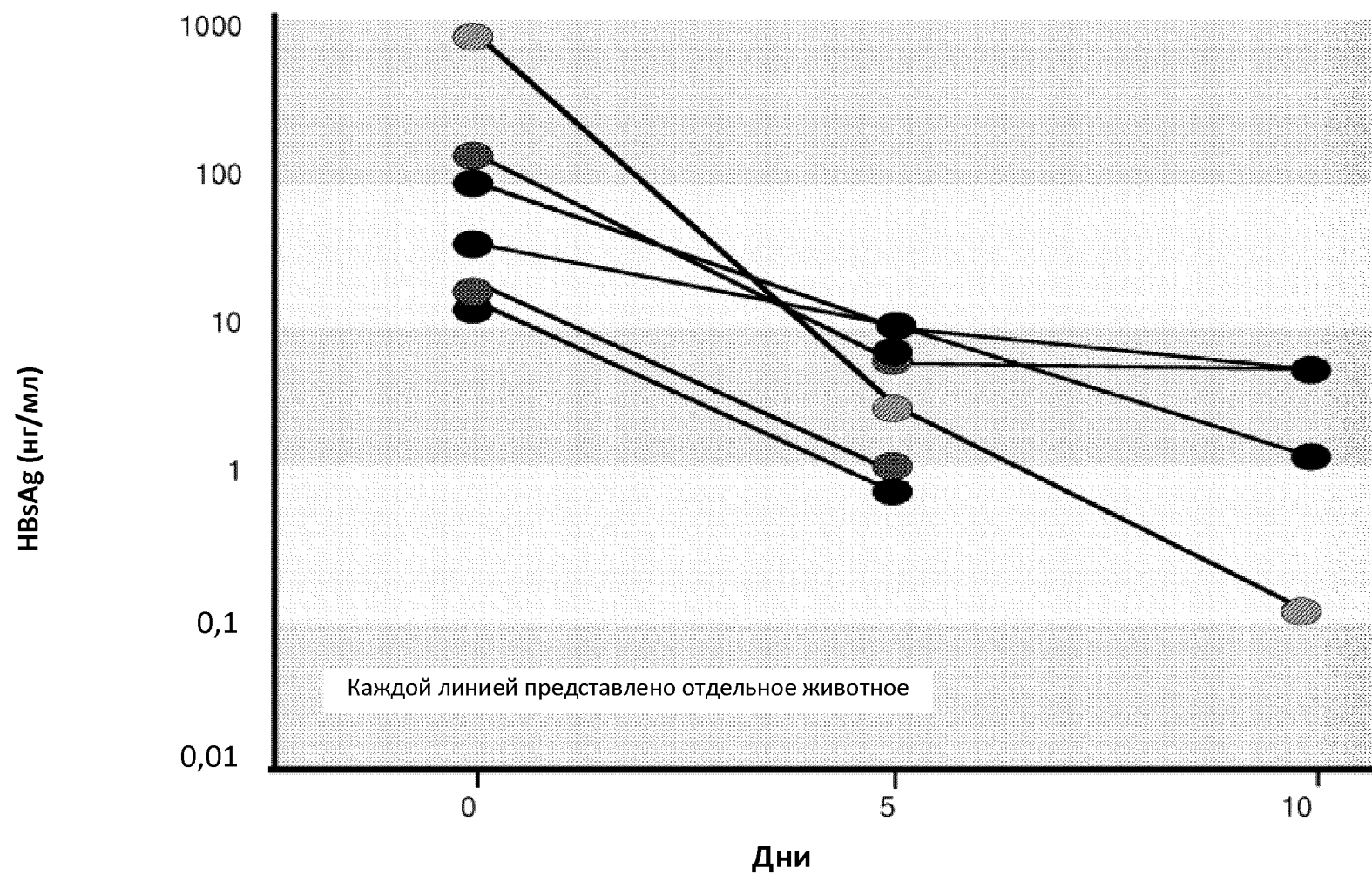


Разовая доза, 3 мг/кг, подкожно

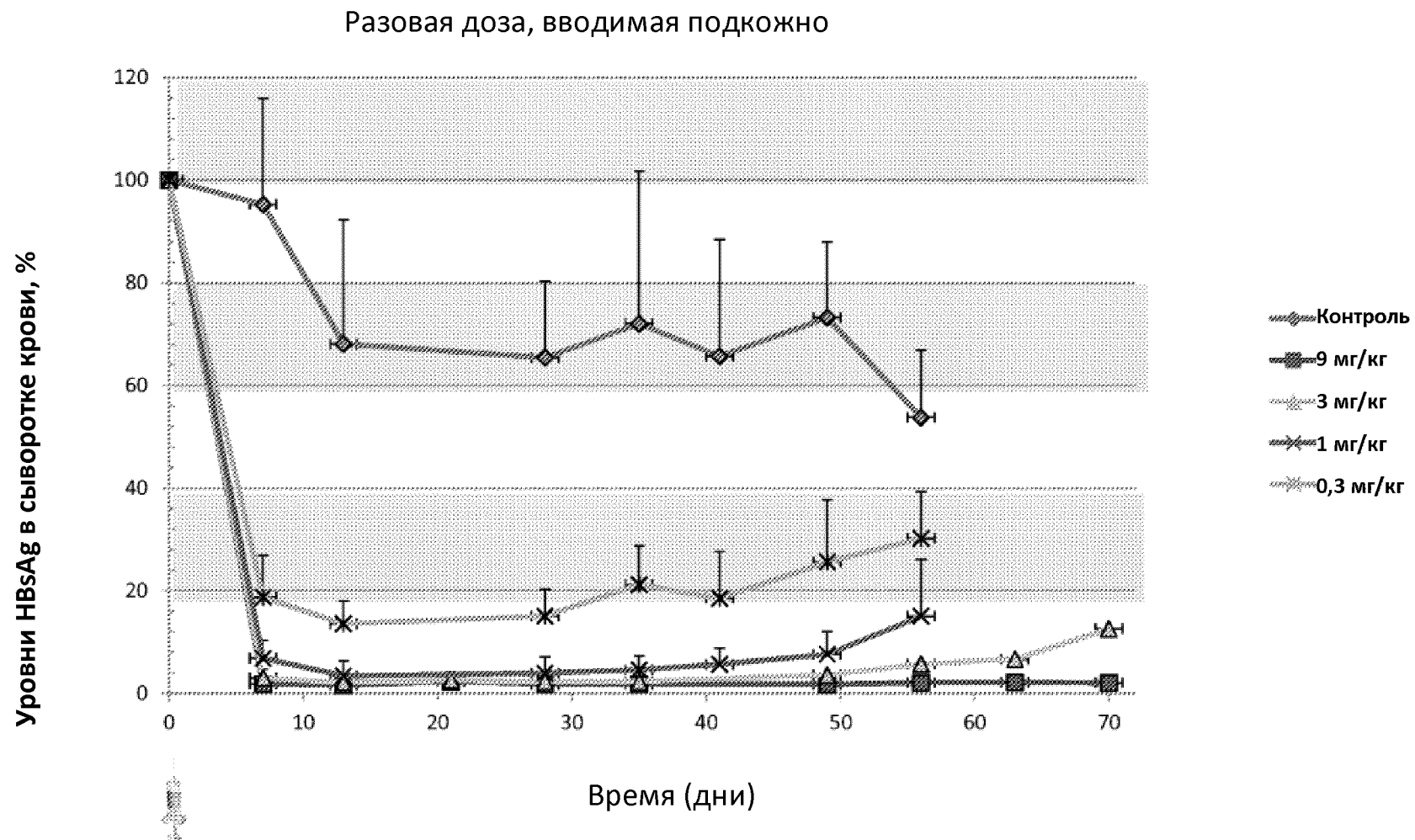
Фигура 3



Фигура 4

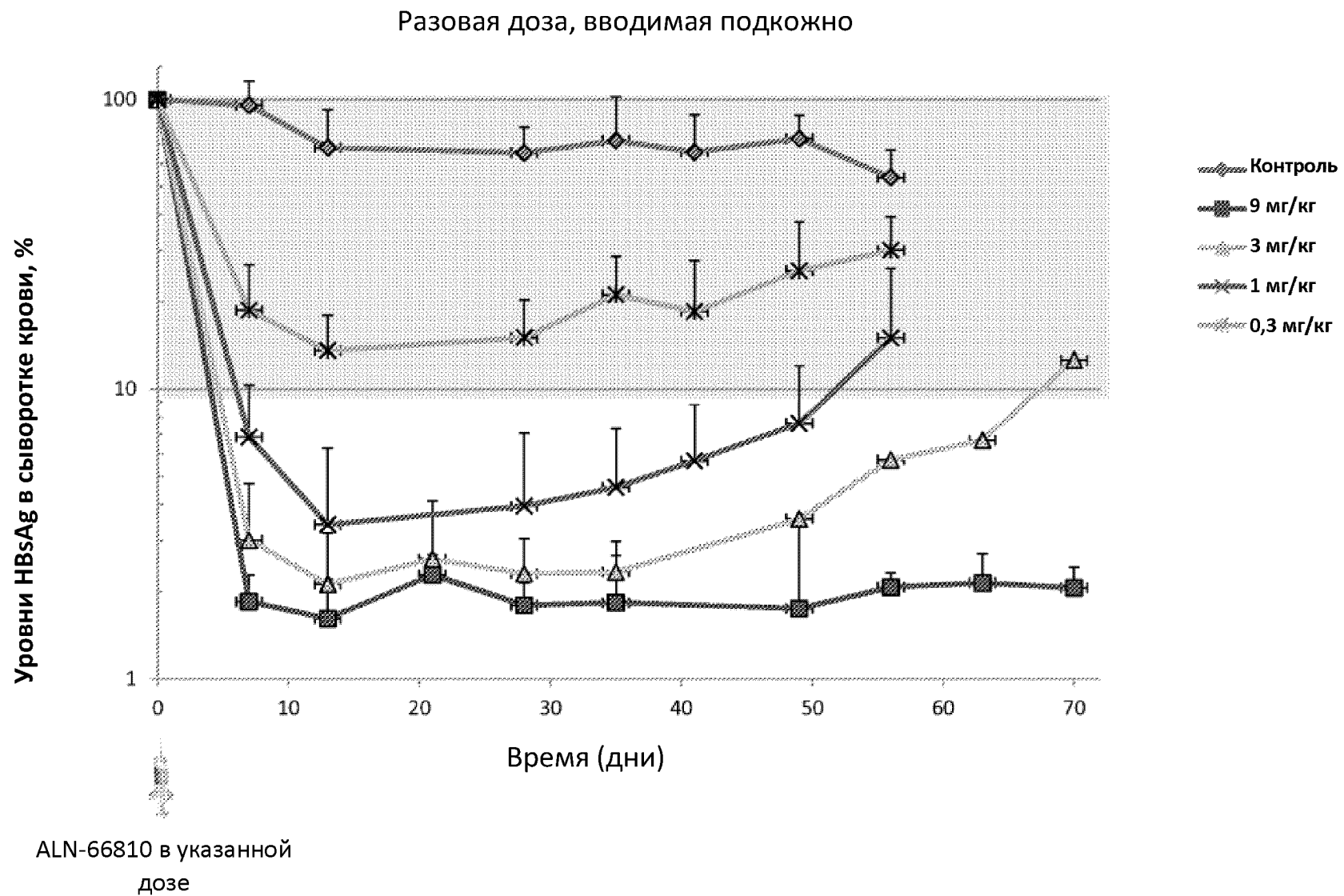


Фигура 5



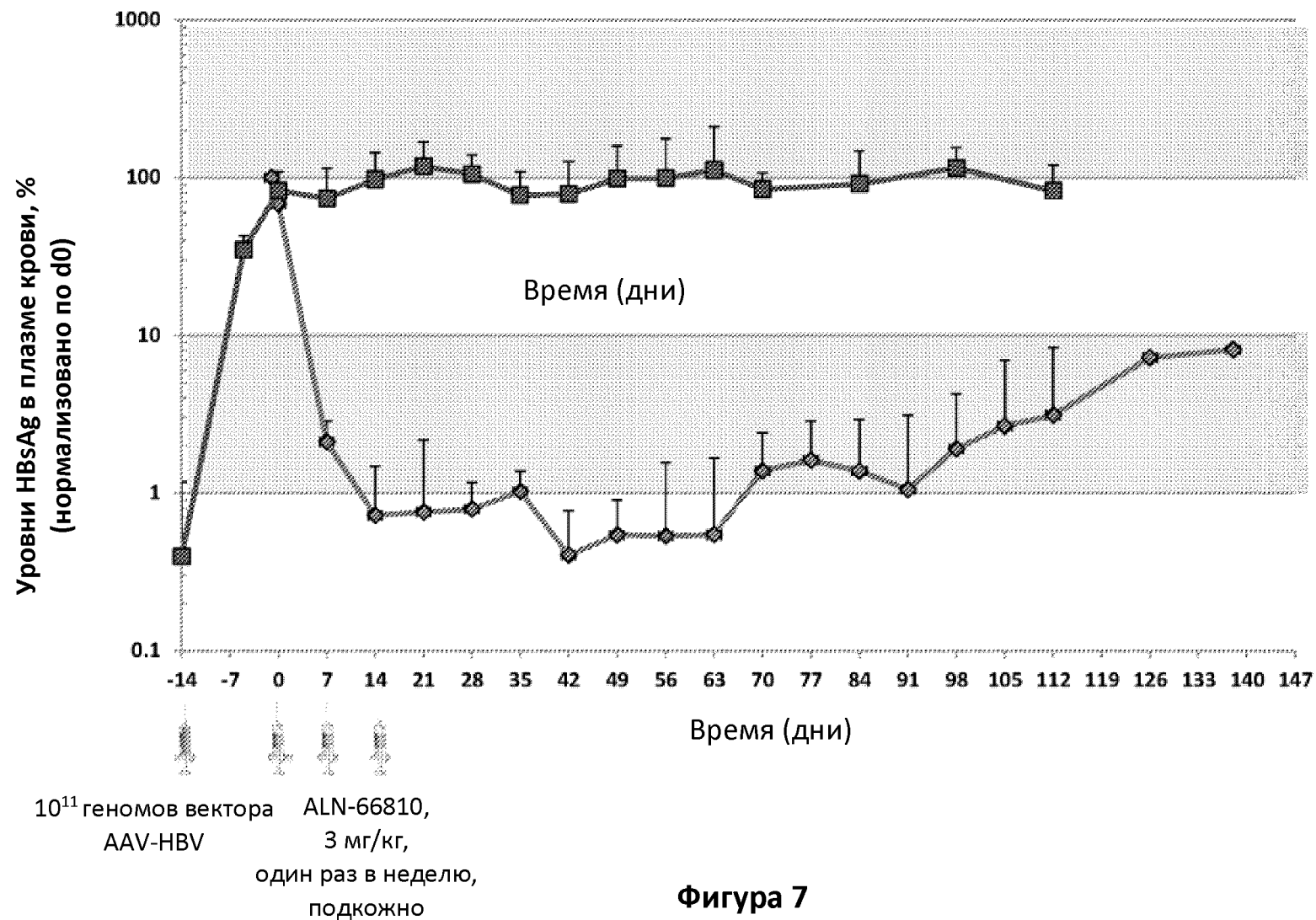
ALN-66810 в указанной  
дозе

Фигура 6А



Фигура 6В

3 дозы, составляющие 3 мг/кг, вводимые подкожно, один раз в  
неделю,



Фигура 7

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202191771****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

**C12N 15/113 (2010.01)**      **A61P 31/20 (2006.01)**  
**A61K 31/713 (2006.01)**      **C12N 5/10(2006.01)**  
**A61K 47/26 (2006.01)**

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C12N 15/113, A61K 31/713, A61K 47/26, A61P 31/20, C12N 5/10

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)  
DB WIPO (Patentscope), DB Espacenet, PatFT & AppFT USPTO, EAPATIS, RUPAT, J-PlatPat, KIPRIS, K-PION, PSS(CNIPA); PubMed Central, EMBASE, РИНЦ (e-Library); Reaxys, NCBI Blast (blastn: nr, pat), EBI Fasta (ENA, patent), PatSeq

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

| Категория* | Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей                                                                                                                                                     | Относится к пункту № |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| X          | WO 2012024170 A2 (MERCK SHARP & DOHME CORP.), 2012-02-23<br>абз.0014, 0024, 0025, 0031, 0066, 0121, 0211, 0238, 0241, 0259, 0290, 0292; SEQ ID NO: 2, 7, 505; Табл.1a, 1b; формула                                        | 1-3, 13-19           |
| Y          | —//—                                                                                                                                                                                                                      | 4-12                 |
| Y          | WO 2005019453 A2 (SIRNA THERAPEUTICS INC), 2005-03-03<br>SEQ ID NO: 834, Табл.1 на стр.323, фиг.70, формула                                                                                                               | 4-12                 |
| Y          | US 8450467 B2 (MANOHARAN MUTHIAH et al.), 2013-05-28<br>кол.4 строки 31-34, фиг.13, 14, 34, формула                                                                                                                       | 4-6, 10-12           |
| A          | CHEN YONG et al., "RNAi for treating hepatitis B viral infection."<br>PHARMACEUTICAL RESEARCH, 2008, 25(1): 72-86<br>реферат, фиг.6A                                                                                      | 1-19                 |
| A          | WOODDELL C.I. et al. "Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection." MOLECULAR THERAPY, 2013, 21(5): 973-985<br>реферат, Табл.1                                         | 1-19                 |
| A          | PENG JINLIANG et al. "Inhibition of hepatitis B virus replication by various RNAi constructs and their pharmacodynamic properties." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, 2005, 86(12): 3227-3234<br>реферат, стр.3228-3229, фиг.1 | 1-19                 |
| A          | KIM YOUNG HA et al. "RNAi-based knockdown of HBx mRNA in HBx-transformed and HBV-producing human liver cells." DNA AND CELL BIOLOGY, 2006, 25(7): 412-417<br>реферат, стр.413, фиг.1                                      | 1-19                 |

☐ последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **08/12/2021**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины

  
А.В. Чебан