

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290072 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.13

(51) Int. Cl. A61P 31/20 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.06.18

(54) КОМБИНАЦИЯ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV) И РНКи,
НАЦЕЛЕННОЙ НА HBV

(31) 62/862,754

(72) Изобретатель:
Хортон Хелен, Де Крес Ан Мартин М,
Берк Ян Мартин (BE)

(32) 2019.06.18

(33) US

(86) PCT/IB2020/055696

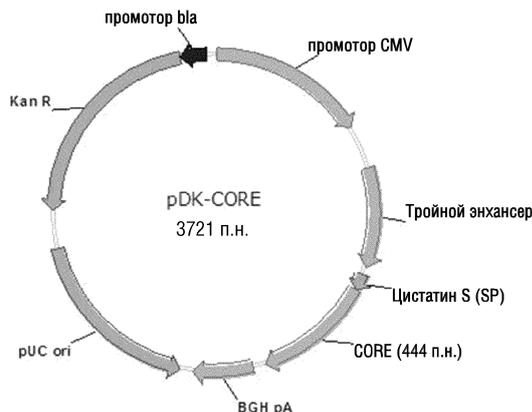
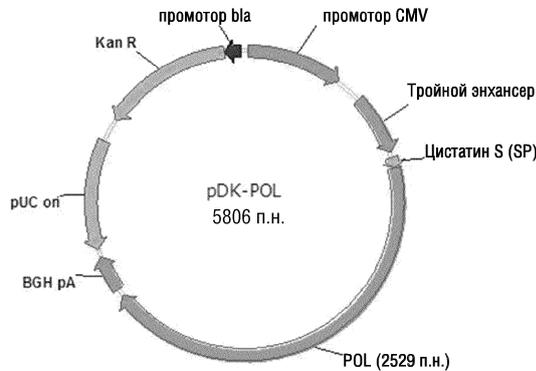
(87) WO 2020/255007 2020.12.24

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

(71) Заявитель:

ЯНССЕН САЙЕНСИЗ АЙРЛЭНД
АНЛИМИТЕД КОМПАНИ (IE)

(57) Описаны терапевтические комбинации вакцин против вируса гепатита В (HBV) и РНКи-агента для ингибирования экспрессии гена HBV. Также описаны способы индукции иммунного ответа против HBV или способы лечения заболевания, вызванного HBV, в частности, у лиц, страдающих хронической инфекцией HBV, с использованием раскрытых терапевтических комбинаций.



202290072

A1

A1

202290072

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572726EA/032

КОМБИНАЦИЯ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV) И РНКи, НАЦЕЛЕННОЙ НА HBV

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПРИВЕДЕНА В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Эта заявка содержит список последовательностей, который отправляется в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с именем файла «065814_12WO1_Sequence_Listing» и датой создания 15 июня 2020 г. и размером 47 КБ. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки США № 62/862754, поданной 18 июня 2019 г., описание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирус гепатита В (HBV) представляет собой небольшой гепатотропный ДНК-вирус размером 3,2 т.п.н., который кодирует четыре открытые рамки считывания и семь белков. Приблизительно 240 миллионов человек имеют хроническую инфекцию гепатита В (хронический HBV), характеризующуюся персистенцией вирусных и субвирусных частиц в крови более 6 месяцев (Cohen et al. *J. Viral Hepat.* (2011) 18(6), 377-83). Персистирующая инфекция HBV приводит к истощению Т-клеток в циркулирующих и внутрипеченочных HBV-специфических CD4+ и CD8+ Т-клетках посредством хронической стимуляции HBV-специфических Т-клеточных рецепторов вирусными пептидами и циркулирующими антигенами. В результате снижается полифункциональность Т-клеток (т. е. снижается уровень IL-2, фактора некроза опухоли (TNF)- α , IFN- γ и отсутствует пролиферация).

Безопасная и эффективная профилактическая вакцина против инфекции HBV доступна с 1980-х годов и является основой профилактики гепатита В (Всемирная организация здравоохранения, Гепатит В: информационный бюллетень № 204 [Интернет], март 2015 г.). Всемирная организация здравоохранения рекомендует вакцинировать всех детей грудного возраста, а в странах с низкой или средней эндемичностью по гепатиту В - всех детей и подростков (младше 18 лет), а также лиц из определенных категорий населения, подверженных риску. Благодаря вакцинации уровень заболеваемости во всем мире резко снизился. Однако профилактические вакцины не излечивают выявленную инфекцию HBV.

Хронический HBV в настоящее время лечат интерфероном- α и аналогами нуклеозидов или нуклеотидов, но окончательного излечения не существует из-за сохранения в инфицированных гепатоцитах промежуточного продукта внутриклеточной репликации вируса, называемого ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК), которая играет фундаментальную роль в качестве матрицы для вирусных РНК и, таким

образом, новых вирионов. Считается, что индуцированные вирус-специфические Т- и В-клеточные ответы могут эффективно устранять гепатоциты, несущие кзкДНК. Современные терапии, нацеленные на полимеразу HBV, подавляют виремию, но оказывают ограниченное влияние на кзкДНК, которая находится в ядре, и связанную с этим продукцию циркулирующего антигена. Наиболее строгой формой лечения может быть элиминация кзкДНК HBV из организма, что не наблюдалось ни как естественное явление, ни как результат какого-либо терапевтического вмешательства. Однако потеря поверхностных антигенов HBV (HBsAg) является клинически достоверным эквивалентом излечения, поскольку рецидив заболевания может произойти только в случаях тяжелой иммуносупрессии, которую затем можно предотвратить с помощью профилактического лечения. Таким образом, по меньшей мере с клинической точки зрения, потеря HBsAg связана с наиболее строгой формой восстановления иммунитета против HBV.

Например, иммуномодуляция с помощью пегилированного интерферона (pegIFN)- α оказалась лучше по сравнению с терапией нуклеозидами или нуклеотидами с точки зрения устойчивого ответа без лечения с ограниченным курсом лечения. Сообщается, что помимо прямого противовирусного эффекта, IFN- α оказывает эпигенетическое подавление кзкДНК в культуре клеток и у гуманизированных мышей, что приводит к снижению продуктивности вирионов и транскриптов (Belloni et al. *J. Clin. Invest.* (2012) 122(2), 529-537). Однако эта терапия по-прежнему сопряжена с побочными эффектами, и общий ответ довольно низок, отчасти потому, что IFN- α оказывает лишь слабое модулирующее влияние на HBV-специфические Т-клетки. В частности, показатели излечения низкие ($< 10\%$), а токсичность высока. Аналогичным образом противовирусные препараты прямого действия против HBV, а именно ингибиторы полимеразы HBV энтекавир и тенофовир, эффективны в качестве монотерапии для индукции подавления вируса с высоким генетическим барьером для появления лекарственно-устойчивых мутантов и последовательного предотвращения прогрессирования заболевания печени. Однако излечение хронического гепатита В, определяемое по потере HBsAg или сероконверсии, редко достигается с помощью таких ингибиторов полимеразы HBV. Следовательно, эти противовирусные препараты теоретически необходимо принимать в течение неопределенного срока, чтобы предотвратить рецидив заболевания печени, аналогично антиретровирусной терапии вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

Терапевтическая вакцинация может элиминировать HBV у хронически инфицированных пациентов (Michel et al. *J. Hepatol.* (2011) 54(6), 1286-1296). Были изучены многие стратегии, но на сегодняшний день терапевтическая вакцинация не доказала свою эффективность.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Соответственно, существует неудовлетворенная медицинская потребность в способе лечения вируса гепатита В (HBV), особенно хронического HBV, с конечным хорошо переносимым лечением с более высокой степенью излечения. Изобретение удовлетворяет эту потребность путем разработки терапевтических комбинаций или

композиций и способов индукции иммунного ответа против инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Иммуногенные композиции/комбинации и способы по изобретению можно использовать для обеспечения терапевтического иммунитета у пациента, такого как пациент, страдающий хронической инфекцией HBV.

В общем аспекте заявка относится к терапевтическим комбинациям или композициям, содержащим один или более антигенов HBV или один или более полинуклеотидов, кодирующих антигены HBV, и РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, для применения в лечении инфекции HBV у пациента.

В одном варианте осуществления терапевтическая комбинация содержит:

i) по меньшей мере одно из следующего:

a) укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентична SEQ ID NO: 2,

b) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV;

c) антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H, и

d) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV; и

ii) РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, такой как те, что описаны в настоящем изобретении.

В одном варианте осуществления укороченный коровый антиген HBV состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, а антиген полимеразы HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления терапевтическая комбинация содержит по меньшей мере один компонент из числа антигена полимеразы HBV и укороченного корового антигена HBV. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая комбинация содержит антиген полимеразы HBV и укороченный коровый антиген HBV.

В одном варианте осуществления терапевтическая комбинация содержит по меньшей мере одну молекулу из числа первой молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащей первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, и второй молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащей вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы вируса гепатита В. В некоторых вариантах осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты

неприродного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом укороченного корового антигена HBV, а вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом антигена полимеразы HBV, предпочтительно, сигнальная последовательность независимо содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15, более предпочтительно, сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, как например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, как например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, используемый по изобретению, а также соответствующая информация, такая как его структура, продукция, биологическая активность, терапевтическое применение, введение или доставка и т. д., описаны в US 20130005793, WO 2013003520 или WO 2018027106, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В одном варианте осуществления терапевтическая комбинация содержит:

а) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентична SEQ ID NO: 2;

б) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H; и

с) РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, выбранный из группы, состоящей из:

- 1) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, представленные в Таблице 2;
- 2) РНКи-агента, имеющего последовательность смысловой цепи и последовательность антисмысловой цепи, представленные в Таблице 3;
- 3) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, представленные в Таблице 4, предпочтительно РНКи имеет модифицированную последовательность смысловой цепи и модифицированную последовательность антисмысловой цепи, представленные в Таблице 4;
- 4) РНКи-агента, нацеленного на последовательность-мишень, представленную в Таблице 5;
- 5) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, представленные в Таблице 6;
- 6) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность антисмысловой цепи, представленную в Таблице 7, и коровую последовательность смысловой цепи, представленную в Таблице 8, предпочтительно РНКи имеет модифицированную последовательность смысловой цепи, представленную в Таблице 7, и модифицированную последовательность антисмысловой цепи, представленную в Таблице 8; и
- 7) РНКи-агента, имеющего дуплекс антисмысловой цепи и смысловой цепи, представленный в Таблице 9, предпочтительно РНКи-агент содержит дуплекс, представленный в Таблице 9.

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент доставляется пациенту с помощью липидной композиции или липидной наночастицы. В другом варианте осуществления РНКи доставляется пациенту путем конъюгации с нацеливающим лигандом, таким как нацеливающий лиганд, содержащий N-ацетилгалактозамин. Предпочтительно РНКи доставляют пациенту путем конъюгации с нацеливающим лигандом, описанным в настоящем изобретении, таким как нацеливающий лиганд, содержащий N-ацетилгалактозамин.

Предпочтительно терапевтическая комбинация содержит а) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; б) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и (с) РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, описанный в настоящем изобретении. Предпочтительно РНКи-агент содержит дуплекс, представленный в Таблице 9. Каждый из дуплексов предпочтительно конъюгирован с нацеливающим лигандом, предпочтительно нацеливающим лигандом, содержащим N-ацетилгалактозамин, более предпочтительно нацеливающим лигандом, имеющим структуру, представленную в Таблице 10.

Предпочтительно терапевтическая комбинация содержит первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Более предпочтительно, терапевтическая комбинация содержит а) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3; б) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или 6; и с) РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, описанный в настоящем изобретении.

В одном варианте осуществления каждая из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения представляет собой молекулу ДНК, предпочтительно, молекула ДНК присутствует в плазмидном или вирусном векторе.

В другом варианте осуществления каждая из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения представляет собой молекулу РНК, предпочтительно мРНК или самореплицирующуюся молекулу РНК.

В некоторых вариантах осуществления каждая из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения независимо включена в состав вместе с липидной наночастицей (LNP).

В другом общем аспекте заявка относится к набору, включающему терапевтическую комбинацию согласно заявке.

Заявка также относится к терапевтической комбинации или набору для применения для индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (HBV); и к применению терапевтической комбинации, композиции или набора для применения в получении лекарственного средства для индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (HBV). Применение может дополнительно включать комбинацию с другим иммуногенным или терапевтическим агентом, предпочтительно с другим антигеном HBV или с другой терапией HBV. Предпочтительно пациент страдает хронической инфекцией HBV.

Заявка также относится к терапевтической комбинации или набору согласно заявке для применения в лечении HBV-индуцированного заболевания у пациента; и к применению терапевтической комбинации или набора для применения в получении лекарственного средства для лечения HBV-индуцированного заболевания у пациента. Применение может дополнительно включать комбинацию с другим терапевтическим агентом, предпочтительно с другим антигеном против HBV. Предпочтительно пациент страдает хронической инфекцией HBV, и HBV-индуцированное заболевание выбрано из

группы, состоящей из выраженного фиброза, цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (НСС).

Заявка также относится к способу индукции иммунного ответа против HBV или к способу лечения HBV-инфекции или HBV-индуцированного заболевания, включающему введение пациенту терапевтической комбинации в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Другие аспекты, признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего описания, включая подробное описание изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления, а также прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Приведенная выше сущность изобретения, а также последующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будут лучше понятны при чтении вместе с прилагаемыми чертежами. Однако следует понимать, что применение не ограничивается точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На ФИГ. 1А и ФИГ. 1В показаны схематические изображения ДНК-плазмид согласно вариантам осуществления заявки; На ФИГ. 1А показана ДНК-плазида, кодирующая коровый антиген HBV, в соответствии с вариантом осуществления заявки; На ФИГ. 1В показана ДНК-плазида, кодирующая антиген полимеразы HBV (pol) в соответствии с вариантом осуществления заявки; коровый и pol-антиген HBV экспрессируются под контролем промотора CMV с N-концевым сигнальным пептидом цистатина S, который отщепляется от экспрессированного антигена при секреции из клетки; транскрипционные регуляторные элементы плазмиды включают энхансерную последовательность, расположенную между промотором CMV и полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген HBV, и последовательность полиаденилирования bGH, расположенную ниже по ходу транскрипции полинуклеотидной последовательности, кодирующей антиген HBV; вторая экспрессирующая кассета включена в плазмиду в обратной ориентации, включая ген устойчивости к канамицину под контролем промотора Amp^r(bla); последовательность точки начала репликации (pUC) также включена в обратной ориентации;

На ФИГ. 2А и ФИГ. 2В. показаны схематические изображения экспрессирующих кассет в аденовирусных векторах согласно вариантам осуществления заявки; На ФИГ. 2А показана экспрессирующая кассета для укороченного корового антигена HBV, которая содержит промотор CMV, интрон (фрагмент, полученный из гена ApoA1 человека - номер доступа GenBank X01038, пары оснований 295-523, содержащий второй интрон ApoA1), сигнал секреции иммуноглобулина человека, за которым следует кодирующая последовательность для укороченного корового антигена HBV и сигнал полиаденилирования SV40; На ФИГ. 2В показана экспрессирующая кассета для слитого белка укороченного корового антигена HBV, функционально связанного с антигеном полимеразы HBV, которая во всем остальном идентична экспрессирующей кассете для

укороченного корового антигена HBV, за исключением антигена HBV;

На ФИГ. 3 показаны ответы ELISPOT мышей Balb/c, иммунизированных различными ДНК-плазмидами, экспрессирующими коровый антиген HBV или антиген pol HBV, как описано в Примере 3; пулы пептидов, используемые для стимуляции спленцитов, выделенных из различных групп вакцинированных животных, показаны серым цветом; количество отвечающих Т-клеток указано на оси у, выраженное в виде пятнообразующих клеток (SFC) на 10^6 спленцитов;

На ФИГ. 4 показаны коровые последовательности РНКи-агента, нацеленного на гены HBV, применяемые по изобретению, более подробно описанные в US 20130005793;

На ФИГ. 5 показаны модифицированные последовательности РНКи-агентов, нацеленных на гены HBV, применяемых по изобретению, более подробно описанные в US 20130005793;

На ФИГ. 6 показаны основные последовательности РНКи-агентов, нацеленных на гены HBV, и их модифицированные аналоги, пригодные для изобретения, более подробно описанные в US 20130005793;

На ФИГ. 7 показан пример 19-мерных последовательностей-мишеней кДНК HBV для РНКи-агентов HBV, применяемых по изобретению, взятых из HBV подтипа ADW2, генотипа А, полный геном GenBank AM282986.1, более подробно описанных в WO2018027106;

На ФИГ. 8 показаны последовательности коровых фрагментов антисмысловой и смысловой цепи РНКи-агента HBV, применяемого по изобретению, более подробно описанные в WO 2018027106;

На ФИГ. 9 показаны антисмысловые последовательности РНКи-агента HBV, применяемого по изобретению, более подробно описанные в WO 2018027106;

На ФИГ. 10 показаны смысловые последовательности РНКи-агента HBV, применяемого по изобретению, более подробно описанные в WO 2018027106;

На ФИГ. 11 показаны примеры дуплексов РНКи-агентов HBV, применяемых по изобретению, более подробно описанных в WO 2018027106; и

На ФИГ. 12 показаны примеры нацеливающего лиганда, применяемого по изобретению, более подробно описанного в WO2018027106.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Различные публикации, статьи и патенты, процитированы или описаны в уровне техники и по всему описанию; каждая из этих ссылок включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей и т. п., которые были включены в настоящее описание, проводится с целью обеспечения контекста изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все эти вопросы составляют часть предшествующего уровня техники в отношении любых раскрытых или заявленных изобретений.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в настоящем изобретении, имеют тот же смысл, который вкладывается в них обычным

специалистом области, к которой относится настоящее изобретение. В остальном некоторые используемые в настоящем описании термины имеют значение, указанное в описании. Все патенты, опубликованные патентные заявки и публикации, цитируемые здесь, включены в качестве ссылки, как если бы они были изложены здесь полностью.

Следует отметить, что используемые здесь и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если контекст явно не указывает иное.

Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалисту в данной области понятно или он способен выявить с использованием не более чем обычного эксперимента много эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанного в настоящем изобретении. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены изобретением.

Во всем этом описании и в последующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово «содержать» и варианты, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. Используемый в настоящем описании термин «содержащий» может быть заменен термином «включающий» или иногда термином «имеющий».

Используемый в настоящем описании термин «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в элементе формулы изобретения. Используемый в настоящем описании термин «состоящий по существу из» не исключает материалов или стадий, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики формулы изобретения. Любой из вышеупомянутых терминов «содержащий», «включающий» и «имеющий», всякий раз, когда он используется в настоящем изобретении в контексте аспекта или варианта осуществления заявки, может быть заменен термином «состоящий из» или «состоящий по существу из», чтобы изменить объем описания.

Используемый в настоящем описании соединительный термин «и/или» между несколькими указанными элементами понимают как охватывающий как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, когда два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к совместному применению первого и второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов подпадает под это значение и, следовательно, удовлетворяет требованию термина «и/или», используемого в настоящем описании. Одновременное применение более чем одного из вариантов также понимают как подпадающее под это значение и, следовательно, удовлетворяющее требованию термина «и/или».

Если не указано иное, любое численное значение, такое как концентрация или

диапазон концентраций, описанные в настоящем изобретении, следует понимать как измененное во всех случаях термином «приблизительно». Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогично, диапазон концентраций от 1 мг/мл до 10 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 11 мг/мл. Используемый в настоящем описании термин «числовой диапазон» явно включает все возможные субдиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в таких диапазонах и доли значений, если в контексте явно не указано иное.

Выражения «процент (%) идентичности последовательности» или «% идентичности» или «на % идентичный с» при использовании в отношении аминокислотной последовательности описывают количество совпадений («соответствий») идентичных аминокислот двух или более выровненных аминокислотных последовательностей по сравнению с количеством аминокислотных остатков, составляющих общую длину аминокислотных последовательностей. Другими словами, при использовании выравнивания для двух или более последовательностей процент одинаковых аминокислотных остатков (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность по всей длине аминокислотных последовательностей) можно определить, когда последовательности сравнивают и выравнивают для максимального соответствия, измеренного с использованием алгоритма сравнения последовательностей, известного в данной области, или при ручном выравнивании и визуальной оценке. Таким образом, последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательностей, могут различаться заменой(заменами), вставкой(вставками) или делецией(делециями) аминокислот. Подходящие программы для выравнивания белковых последовательностей известны специалисту в данной области. Процентную идентичность белковых последовательностей можно, например, определить с помощью таких программ, как CLUSTALW, Clustal Omega, FASTA или BLAST, например, с использованием алгоритма NCBI BLAST (Altschul SF, et al (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402).

Используемые в настоящем описании термины и выражения «в комбинации», «в комбинации с», «совместная доставка» и «вводится вместе с» в контексте введения двух или более видов терапии или компонентов пациенту относятся к одновременному введению или последовательному введению двух или более видов терапии или компонентов, таких как два вектора, например, ДНК-плазмиды, пептиды или терапевтическая комбинация и адъювант. «Одновременное введение» может представлять собой введение двух или более видов терапии или компонентов по меньшей мере в течение одного и того же дня. Когда два компонента «вводят вместе с» или «вводят в комбинации с», их можно вводить в виде отдельных композиций последовательно в течение короткого периода времени, такого как 24, 20, 16, 12, 8 или 4 часа, или в течение 1 часа, или их можно вводить в виде одной композиции одновременно. «Последовательное введение» может представлять собой введение двух или более видов терапии или

компонентов в один и тот же день или в разные дни. Использование термина «в комбинации с» не ограничивает порядок, в котором пациенту вводят терапевтические средства или компоненты. Например, первую терапию или компонент (например, первую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген HBV) можно вводить до (например, с интервалом от 5 минут до одного часа), вместе или одновременно или после (например, с интервалом от 5 минут до часа) введения второй терапии или компонента (например, второй плазмиды ДНК, кодирующей антиген HBV) и/или третьей терапии или компонента (например, РНКи-агента для ингибирования экспрессии гена HBV). В некоторых вариантах осуществления первую терапию или компонент (например, первую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген HBV), вторую терапию или компонент (например, вторую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген HBV) и третью терапию или компонент (например, РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV) вводят в одной и той же композиции. В других вариантах осуществления первую терапию или компонент (например, первую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген HBV), вторую терапию или компонент (например, вторую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген HBV) и третью терапию или компонент (например, РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV) вводят в виде отдельных композиций, таких как две или три отдельные композиции.

Используемый в настоящем описании термин нуклеиновая кислота или полипептид «неприродного происхождения» относится к нуклеиновой кислоте или полипептиду, не встречающемуся в природе. Нуклеиновая кислота или полипептид «неприродного происхождения» могут быть синтезированы, обработаны, изготовлены и/или обработаны иным образом в лабораторных и/или производственных условиях. В некоторых случаях нуклеиновая кислота или полипептид неприродного происхождения может включать встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту или полипептид, которые обрабатывают, процессируют или подвергают манипуляциям для проявления свойств, отсутствовавших у природной нуклеиновой кислоты или полипептида до обработки. Используемый в настоящем описании термин нуклеиновая кислота или полипептид «неприродного происхождения» может быть нуклеиновой кислотой или полипептидом, выделенным или отделенным из природного источника, в котором он был обнаружен, и в нем отсутствуют ковалентные связи с последовательностями, с которыми он был связан в природном источнике. Нуклеиновая кислота или полипептид «неприродного происхождения» могут быть получены рекомбинантно или с помощью других способов, таких как химический синтез.

Используемый в настоящем описании термин «пациент» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, которого будут лечить или лечили способом согласно варианту осуществления заявки. Термин «млекопитающее», используемый в настоящем описании, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, приматов (NHP), не относящихся к человеку, таких как марышки или человекообразные обезьяны,

человека и т. д., более предпочтительно человека.

Используемый в настоящем описании термин «функционально связанный» относится к связи или соединению, в котором описанные таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предполагаемым образом. Например, регуляторная последовательность, функционально связанная с представляющей интерес последовательностью нуклеиновой кислоты, способна направлять транскрипцию представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты, или сигнальная последовательность, функционально связанная с представляющей интерес аминокислотной последовательностью, способна секретировать или перемещать представляющую интерес аминокислотную последовательность через мембрану.

В попытке помочь читателю заявки описание было разделено на различные абзацы или разделы, или оно относится к различным вариантам осуществления заявки. Эти разделения не следует рассматривать как отделение существа абзаца или раздела или вариантов осуществления от существа другого абзаца или раздела или вариантов осуществления. Наоборот, специалист в данной области поймет, что описание имеет широкое применение и охватывает все комбинации различных разделов, абзацев и предложений, которые можно рассматривать. Обсуждение любого варианта осуществления предназначено только для примера и не предполагает, что объем описания, включая формулу изобретения, ограничен этими примерами. Например, хотя варианты осуществления векторов HBV согласно заявке (например, плазмидная ДНК или вирусные векторы), описанные в настоящем изобретении, могут содержать определенные компоненты, включающие, помимо прочего, определенные промоторные последовательности, энхансерные или регуляторные последовательности, сигнальные пептиды, кодирующую последовательность антигена HBV, сигнальные последовательности полиаденилирования и т. д., расположенные в определенном порядке, специалисты в данной области поймут, что концепции, раскрытые в настоящем описании, могут в равной степени применяться к другим компонентам, расположенным в другом порядке, которые можно использовать в векторах HBV согласно заявке. Заявка предполагает использование любого из применимых компонентов в любой комбинации, имеющей любую последовательность, которая может быть использована в векторах HBV согласно заявке, независимо от того, описана ли четко конкретная комбинация или нет. Изобретение в основном относится к терапевтической комбинации, содержащей один или более антигенов HBV и по меньшей мере один РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV.

Вирус гепатита В (HBV)

Используемый в настоящем описании термин «вирус гепатита В» или «HBV» относится к вирусу семейства *hepadnaviridae*. HBV представляет собой небольшой (например, 3,2 т.п.н.) гепатотропный ДНК-вирус, который кодирует четыре открытые рамки считывания и семь белков. Семь белков, кодируемых HBV, включают малый (S),

средний (M) и большой (L) поверхностный антиген (HBsAg) или белки оболочки (Env), белок pre-Core, коровый белок, вирусную полимеразу (Pol) и HBx. белок. HBV экспрессирует три поверхностных антигена, или оболочечных белка, L, M и S, причем S является наименьшим, а L - наибольшим. Дополнительные домены в белках M и L называются Pre-S2 и Pre-S1, соответственно. Коровый белок является субъединицей вирусного нуклеокапсида. Pol необходим для синтеза вирусной ДНК (обратная транскриптаза, РНКазы H и праймер), который находится в нуклеокапсидах, локализованных в цитоплазме инфицированных гепатоцитов. PreCore является коровым белком с N-концевым сигнальным пептидом и протеолитически процессируется на его N- и C-концах перед секрецией из инфицированных клеток в виде так называемого e-антигена гепатита В (HBeAg). Белок HBx необходим для эффективной транскрипции ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК). HBx не является вирусным структурным белком. Все вирусные белки HBV имеют свою собственную мРНК, за исключением коровых и полимеразы, которые имеют общую мРНК. За исключением белка pre-Core, ни один из вирусных белков HBV не подвергается посттрансляционному протеолитическому процессингу.

Вирион HBV содержит вирусную оболочку, нуклеокапсид и единственную копию генома частично двухцепочечной ДНК. Нуклеокапсид состоит из 120 димеров корового белка и покрыт капсидной мембраной, встроенной в S, M и L вирусную оболочку или поверхностные антигенные белки. После проникновения в клетку вирус освобождается от оболочки, и содержащая капсид релаксированная кольцевая ДНК (ркДНК) с ковалентно связанной вирусной полимеразой мигрирует в ядро. Во время этого процесса фосфорилирование корового белка вызывает структурные изменения, экспонируя сигнал ядерной локализации, позволяющий взаимодействовать капсиду с так называемыми импортинами. Эти импортины опосредуют связывание корового белка с комплексами ядерных пор, после чего капсид деструктурируется и комплекс полимеразы/кДНК высвобождается в ядро. Внутри ядра ркДНК депротеинизируется (удаление полимеразы) и преобразуется механизмом репарации ДНК хозяина в геном ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК), из которого перекрывающиеся транскрипты кодируют HBeAg, HBsAg, коровый белок, вирусную полимеразу и белок HBx. Коровой белок, вирусная полимеразы и прегеномная РНК (пгРНК) связываются в цитоплазме и самособираются в незрелые пгРНК-содержащие капсидные частицы, которые затем превращаются в зрелые ркДНК-капсиды и функционируют как общий промежуточный продукт, который либо покрывается оболочкой, либо секретируется в виде инфекционных вирусных частиц или транспортируются обратно в ядро для пополнения и поддержания стабильного пула кзкДНК.

На сегодняшний день HBV подразделяется на четыре серотипа (adr, adw, ayg, ayw) на основе антигенных эпитопов, присутствующих на белках оболочки, и на восемь генотипов (A, B, C, D, E, F, G и H) на основе последовательности вирусного генома. Генотипы HBV распределены по разным географическим регионам. Например, наиболее

распространенными генотипами в Азии являются генотипы В и С. Генотип D доминирует в Африке, на Ближнем Востоке и в Индии, тогда как генотип А широко распространен в Северной Европе, странах Африки к югу от Сахары и Западной Африке.

Антигены HBV

Используемые в настоящем описании термины «антиген HBV», «антигенный полипептид HBV», «HBV антигенный полипептид», «антигенный белок HBV», «иммуногенный полипептид HBV» и «иммуноген HBV» относятся к полипептиду, способному индуцировать иммунный ответ, например, гуморальный и/или клеточно-опосредованный ответ против HBV у пациента. Антиген HBV может представлять собой полипептид HBV, его фрагмент или эпитоп или комбинацию более полипептидов HBV, их частей или производных. Антиген HBV способен вызывать у хозяина защитный иммунный ответ, например, индуцировать иммунный ответ против вирусного заболевания или инфекции, и/или продуцировать иммунитет (т. е. вакцинировать) у пациента против вирусного заболевания или инфекции, что защищает пациента от вирусного заболевания или инфекции. Например, антиген HBV может содержать полипептид или его иммуногенный(иммуногенные) фрагмент(фрагменты) из любого белка HBV, такого как HBeAg, белок pre-core, HBsAg (белки S, М или L), коровый белок, вирусную полимеразу или белок HBx, полученный из любого генотипа HBV, например, генотипа А, В, С, D, Е, F, G и/или H, или их комбинации.

(1) Коровый антиген HBV

Используемый в настоящем описании каждый из терминов «коровый антиген HBV», «HBc» и «коровый антиген» относится к антигену HBV, способному индуцировать иммунный ответ, например, гуморальный и/или клеточно-опосредованный ответ, против корового белка HBV у пациента. Каждый из терминов «коровый», «коровый полипептид» и «коровый белок» относится к коровому белку вируса HBV. Полноразмерный коровый антиген обычно имеет длину 183 аминокислоты и включает домен сборки (аминокислоты от 1 до 149) и домен связывания нуклеиновой кислоты (аминокислоты от 150 до 183). Домен связывания нуклеиновой кислоты из 34 остатков необходим для инкапсуляции прегеномной РНК. Этот домен также функционирует как сигнал ядерного импорта. Он состоит из 17 остатков аргинина и является сильно основным, что соответствует его функции. Коровый белок HBV является димерным в растворе, при этом димеры самособираются в икосаэдрические капсиды. Каждый димер корового белка имеет четыре пучка α -спиралей, окруженных доменом α -спирали с каждой стороны. Укороченные коровые белки HBV, лишенные домена связывания нуклеиновой кислоты, также способны образовывать капсиды.

В одном варианте осуществления заявки антиген HBV представляет собой укороченный коровый антиген HBV. Используемый в настоящем описании термин «укороченный коровый антиген HBV» относится к антигену HBV, который не содержит всей длины корового белка HBV, но способен индуцировать иммунный ответ против корового белка HBV у пациента. Например, коровый антиген HBV может быть

модифицирован для удаления одной или более аминокислот сильно положительно заряженного (богатого аргинином) С-концевого связывающего нуклеиновую кислоту домена корового антигена, который обычно содержит семнадцать остатков аргинина (R). Укороченный коровый антиген HBV согласно заявке предпочтительно представляет собой укороченный с С-конца коровый белок HBV, который не содержит сигнала ядерного импорта корового белка HBV, и/или укороченный коровый белок HBV, из которого удален С-концевой сигнал ядерного импорта. В одном варианте осуществления укороченный коровый антиген HBV содержит делецию в С-концевом домене связывания нуклеиновой кислоты, такую как делеция от 1 до 34 аминокислотных остатков в С-концевом домене связывания нуклеиновой кислоты, например, делеция 1, 2, 3, 4, 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 или 34 аминокислотных остатков, предпочтительно, делеция всех 34 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте осуществления укороченный коровый антиген HBV содержит делецию в С-концевом домене связывания нуклеиновой кислоты, предпочтительно делецию всех 34 аминокислотных остатков.

Коровый антиген HBV согласно заявке может представлять собой консенсусную последовательность, полученную из нескольких генотипов HBV (например, генотипов А, В, С, D, Е, F, G и H). Используемый в настоящем описании термин «консенсусная последовательность» означает искусственную последовательность аминокислот, полученную на основе выравнивания аминокислотных последовательностей гомологичных белков, например, как определено путем выравнивания (например, с использованием Clustal Omega) аминокислотных последовательностей гомологичных белков. Это может быть рассчитанный порядок наиболее часто встречающихся аминокислотных остатков, обнаруженных в каждом положении при выравнивании последовательностей, полученный на основе последовательностей антигенов HBV (например, core, pol и т. д.) по меньшей мере из 100 природных изолятов HBV. Консенсусная последовательность может быть неприродного происхождения и отличаться от нативных вирусных последовательностей. Консенсусные последовательности могут быть разработаны путем выравнивания нескольких последовательностей антигена HBV из разных источников с использованием инструмента выравнивания множества последовательностей и в различных положениях выравнивания путем выбора наиболее часто встречающейся аминокислоты. Предпочтительно консенсусная последовательность антигена HBV происходит от генотипов HBV В, С и D. Термин «консенсусный антиген» используется для обозначения антигена, имеющего консенсусную последовательность.

Типовой укороченный коровый антиген HBV в соответствии с заявкой не обладает функцией связывания нуклеиновой кислоты и способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего по меньшей мере против двух генотипов HBV. Предпочтительно, укороченный коровый антиген HBV способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего, по меньшей мере, против генотипов В, С и D HBV. Более предпочтительно, укороченный коровый антиген HBV способен индуцировать CD8 Т-

клеточный ответ у человека, по меньшей мере, против генотипов А, В, С и D HBV.

Предпочтительно коровый антиген HBV согласно заявке представляет собой консенсусный антиген, предпочтительно консенсусный антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV, более предпочтительно, укороченный консенсусный антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV. Типовой укороченный коровый консенсусный антиген HBV согласно заявке состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 представляют собой коровые консенсусные антигены, полученные из генотипов В, С и D HBV. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 содержит С-концевую делецию 34 аминокислот сильно положительно заряженного (богатого аргинином) домена связывания нуклеиновой кислоты нативного корового антигена.

В одном варианте осуществления заявки коровый антиген HBV представляет собой укороченный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления коровый антиген HBV представляет собой укороченный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. В другом варианте осуществления коровый антиген HBV дополнительно содержит сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом зрелой последовательности корового антигена HBV, такую как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15.

(2) Антиген Полимеразы HBV

Используемый в настоящем описании термин «антиген полимеразы HBV», «антиген Pol HBV» или «антиген pol HBV» относится к антигену HBV, способному индуцировать иммунный ответ, например, гуморальный и/или клеточно-опосредованный ответ, против полимеразы HBV у пациента. Каждый из терминов «полимераза», «полимеразный полипептид», «Pol» и «pol» относится к вирусной ДНК-полимеразе HBV. Вирусная ДНК-полимераза HBV имеет четыре домена, в том числе от N-конца до С-конца домен терминального белка (TP), который действует как праймер для синтеза минус-цепи ДНК; спейсер, который не является необходимым для функций полимеразы; домен обратной транскриптазы (RT) для транскрипции; и домен РНКазы Н.

В одном варианте осуществления заявки антиген HBV включает антиген Pol HBV или любой иммуногенный фрагмент или их комбинацию. Антиген Pol HBV может содержать дополнительные модификации для улучшения иммуногенности антигена, такие как введение мутаций в активные участки доменов полимеразы и/или РНКазы для снижения или по существу устранения определенных ферментативных активностей.

Предпочтительно антиген Pol HBV согласно заявке не обладает активностью

обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н и способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего по меньшей мере против двух генотипов HBV. Антиген Pol HBV предпочтительно способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего, по меньшей мере, против генотипов В, С и HBVD. Более предпочтительно, антиген Pol HBV способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у человека, по меньшей мере, против генотипов А, В, С и D HBV.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антиген Pol HBV представляет собой инактивированный антиген Pol. В одном варианте осуществления инактивированный антиген Pol HBV содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном сайте полимеразного домена. В другом варианте осуществления инактивированный антиген Pol HBV содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном сайте домена РНКазы Н. В предпочтительном варианте осуществления инактивированный антиген pol HBV содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном сайте как домена полимеразы, так и домена РНКазы Н. Например, мотив «YXDD» в домене полимеразы антигена pol HBV, который может потребоваться для связывания нуклеотида/иона металла, может быть мутирован, например, путем замены одного или более остатков аспартата (D) остатками аспарагина (N), устраняя или уменьшая координационную функцию металлов, тем самым уменьшая или по существу устраняя функцию обратной транскриптазы. В качестве альтернативы или в дополнение к мутации мотива «YXDD» мотив «DEDD» в домене РНКазы Н антигена pol HBV, необходимый для координации Mg²⁺, может быть мутирован, например, путем замены одного или более остатков аспартата (D) на остатки аспарагина (N) и/или путем замены остатка глутамата (E) на глутамин (Q), тем самым снижая или существенно устраняя функцию РНКазы Н. В конкретном варианте осуществления антиген pol HBV модифицируют путем (1) мутации остатков аспартата (D) на остатки аспарагина (N) в мотиве «YXDD» полимеразного домена; и путем (2) мутации первого остатка аспартата (D) на остаток аспарагина (N) и первого остатка глутамата (E) на остаток глутамина (N) в мотиве «DEDD» домена РНКазы Н, тем самым снижая или существенно устраняя функции обратной транскриптазы и РНКазы Н антигена pol.

В предпочтительном варианте осуществления заявка антиген pol HBV представляет собой консенсусный антиген, предпочтительно консенсусный антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV, более предпочтительно инактивированный консенсусный антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV. Типовой консенсусный антиген HBV pol согласно заявке содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 7. SEQ ID NO: 7 представляет собой

консенсусный антиген pol, полученный из генотипов В, С и D HBV, содержащий четыре мутации, расположенные в активных сайтах доменов полимеразы и РНКазы Н. В частности, четыре мутации включают мутацию остатков аспарагиновой кислоты (D) в остатки аспарагина (N) в мотиве «YXDD» полимеразного домена; и мутацию первого остатка аспартата (D) в остаток аспарагина (N) и мутацию остатка глутамата (E) в остаток глутамина (Q) в мотиве «DEDD» домена РНКазы Н.

В конкретном варианте осуществления заявки антиген pol HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В других вариантах применения антиген pol HBV состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления антиген pol HBV дополнительно содержит сигнальную последовательность, функционально связанную с зрелой последовательности N-конца pol-антигена HBV, такой как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 7. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15.

(3) Слияние корового антигена HBV и антигена полимеразы HBV

Используемый в настоящем описании термин «слитый белок» или «слияние» относится к одиночной полипептидной цепи, имеющей по меньшей мере два полипептидных домена, которые в норме не присутствуют в одном природном полипептиде.

В одном варианте осуществления заявки антиген HBV содержит слитый белок, содержащий укороченный коровый антиген HBV, функционально связанный с антигеном Pol HBV, или антиген Pol HBV, функционально связанный с укороченным коровым антигеном HBV, предпочтительно посредством линкера.

Например, в слитом белке, содержащем первый полипептид и второй гетерологичный полипептид, линкер служит главным образом в качестве спейсера между первым и вторым полипептидами. В одном варианте осуществления линкер состоит из аминокислот, связанных вместе пептидными связями, предпочтительно от 1 до 20 аминокислот, связанных пептидными связями, где аминокислоты выбраны из 20 природных аминокислот. В одном варианте осуществления от 1 до 20 аминокислот выбраны из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Предпочтительно, линкер состоит из большинства стерически не связанных аминокислот, таких как глицин и аланин. Примерами линкеров являются полиглицины, в частности (Gly)₅, (Gly)₈; поли(Gly-Ala) и полиаланины. Одним иллюстративным подходящим линкером, как показано в Примерах ниже, является (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5.

Предпочтительно, слитый белок согласно заявке способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против корового белка HBV и Pol HBV по меньшей мере двух генотипов HBV. Предпочтительно, слитый белок способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего, по меньшей мере, против генотипов В, С и D HBV. Более предпочтительно, слитый белок способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у человека, по меньшей мере, против генотипов А, В, С и D HBV.

В одном варианте осуществления заявки слитый белок содержит укороченный коровый антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или на 100% идентичную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, линкер и антиген Pol HBV, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100%, идентичную SEQ ID NO: 7.

В предпочтительном варианте осуществления заявки слитый белок содержит укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, линкер, содержащий (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5, и антиген Pol HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. Более предпочтительно, слитый белок согласно варианту осуществления заявки содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В одном варианте осуществления слитый белок дополнительно содержит сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом слитого белка. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15. В одном варианте осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

Дополнительные сведения о вакцинах против HBV, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, описаны в Заявке на патент США №: 16/223,251, поданной 18 декабря 2018 г., содержание заявки, более предпочтительно, примеры заявки настоящим полностью включены в качестве ссылки.

Полинуклеотиды и векторы

В другом общем аспекте заявка относится к молекуле нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, кодирующей антиген HBV, применяемый по изобретению, в соответствии с вариантами осуществления заявки, и к векторам, содержащим нуклеиновую кислоту неприродного происхождения. Первая или вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения может содержать любую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV, применяемый согласно заявке, которую можно получить с использованием способов, известных в данной области, в свете настоящего изобретения. Предпочтительно, первый или второй полинуклеотид кодирует по меньшей мере один из укороченного корового антигена HBV и антигена полимеразы HBV согласно заявке. Полинуклеотид может быть в форме РНК или в форме ДНК, полученной рекомбинантными методами (например, клонированием) или полученной синтетическим путем (например, химическим синтезом). ДНК может быть одноцепочечной или двухцепочечной или может содержать части как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательности. ДНК может, например, содержать геномную ДНК, кДНК или их комбинации. Полинуклеотид также может быть

гибридом ДНК/РНК. Полинуклеотиды и векторы согласно заявке могут быть использованы для получения рекомбинантного белка, экспрессии белка в клетке-хозяине или для производства вирусных частиц. Предпочтительно полинуклеотид представляет собой ДНК.

В одном варианте осуществления заявки первая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения содержит первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте осуществления заявки первая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения содержит первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

Примеры полинуклеотидных последовательностей согласно заявке, кодирующих укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, включают, но не ограничиваются этим, полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. Примеры молекул нуклеиновых кислот неприродного происхождения, кодирующих укороченный коровый антиген HBV, имеют полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3.

В другом варианте осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит кодирующую последовательность для сигнальной последовательности, которая функционально связана с N-концом последовательности корового антигена HBV. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15. Более предпочтительно кодирующая последовательность для сигнальной последовательности содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления заявки вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения содержит вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%,

98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 7. В конкретном варианте осуществления заявки вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения содержит вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

Примеры полинуклеотидных последовательностей согласно заявке, кодирующих антиген Pol HBV, содержащих аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, включают, но не ограничиваются этим, полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Примеры молекул нуклеиновых кислот неприродного происхождения, кодирующих антиген pol HBV, имеют полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или 6.

В другом варианте осуществления вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, которая функционально связана с N-концом последовательности антигена pol HBV, такой как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 7. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15. Более предпочтительно кодирующая последовательность для сигнальной последовательности содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

В другом варианте осуществления заявки молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения кодирует слитый белок антигена HBV, содержащий укороченный коровый антиген HBV, функционально связанный с антигеном Pol HBV, или антиген Pol HBV, функционально связанный с укороченным коровым антигеном HBV. В конкретном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения согласно заявке кодирует укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; линкер; и антиген полимеразы HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 7,

предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 7. В конкретном варианте осуществления заявки молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения кодирует слитый белок, содержащий укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, линкер, содержащий (AlaGly)_n, где n равно целому числу от 2 до 5; и антиген Pol HBV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В конкретном варианте осуществления заявки молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения кодирует слитый белок антигена HBV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

Примеры полинуклеотидных последовательностей согласно заявке, кодирующих слитый белок антигена HBV, включают, но не ограничиваются ими, полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, функционально связанную с последовательностью, кодирующей линкер, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 11, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 11, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 11, которая дополнительно функционально связана с полинуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления заявки молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, кодирующая слитый белок антигена HBV, содержит SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, функционально связанную с SEQ ID NO: 11, которая дополнительно функционально связана с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, кодирующая слитый HBV, дополнительно содержит последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, которая функционально связана с N-концом слитой последовательности HBV, такой как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 16. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15. Более предпочтительно кодирующая последовательность для сигнальной последовательности содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14. В одном варианте осуществления кодируемый слитый белок с сигнальной последовательностью

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

Заявка также относится к вектору, содержащему первую и/или вторую молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения. Используемый в настоящем описании термин «вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, используемую для переноса генетического материала в другую клетку, где он может реплицироваться и/или экспрессироваться. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области в связи с настоящим изобретением. Примеры векторов включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, вирусные векторы (бактериофаги, вирусы животных и вирусы растений), космиды и искусственные хромосомы (например, YAC). Предпочтительно вектор представляет собой ДНК-плазмиду. Вектор может быть ДНК-вектором или РНК-вектором. Специалист в данной области может сконструировать вектор согласно заявке с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК с учетом настоящего описания.

Вектор согласно заявке может быть экспрессирующим вектором. Используемый в настоящем описании термин «экспрессирующий вектор» относится к любому типу генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК, способную к транскрипции. Экспрессирующие векторы включают, но не ограничиваются ими, векторы для экспрессии рекомбинантного белка, такие как ДНК-плазида или вирусный вектор, и векторы для доставки нуклеиновой кислоты пациенту для экспрессии в ткани пациента, такие векторы как ДНК-плазида или вирусный вектор. Специалисту в данной области следует понимать, что конструирование экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор трансформируемой клетки-хозяина, желаемый уровень экспрессии белка и т. п.

Векторы согласно заявке могут содержать различные регуляторные последовательности. Используемый в настоящем описании термин «регуляторная последовательность» относится к любой последовательности, которая обеспечивает, способствует или модулирует функциональную регуляцию молекулы нуклеиновой кислоты, включая репликацию, дупликацию, транскрипцию, сплайсинг, трансляцию, стабильность и/или транспорт нуклеиновой кислоты или одного из ее производных (т. е. мРНК) в клетку-хозяин или организм. В контексте настоящего описания этот термин охватывает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования и элементы, влияющие на стабильность мРНК).

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой невирусный вектор. Примеры невирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, ДНК-плазмиды, бактериальные искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, бактериофаги и т. д. Примеры невирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, РНК-репликон, мРНК-репликон, модифицированный мРНК-репликон или самоамплифицирующуюся мРНК, замкнутую линейную дезоксирибонуклеиновую кислоту, например линейная ковалентно замкнутая ДНК, такая как линейная ковалентно замкнутая двухцепочечная молекула ДНК. Предпочтительно

невирусный вектор представляет собой ДНК-плазмиду. «ДНК-плазида», которая взаимозаменяемо используется с «ДНК-плазмидным вектором», «плазмидной ДНК» или «плазмидным ДНК-вектором», относится к двухцепочечной и обычно кольцевой последовательности ДНК, которая способна к автономной репликации в подходящей клетке-хозяине. ДНК-плазмиды, используемые для экспрессии кодируемого полинуклеотида, обычно содержат последовательность точки начала репликации, сайт множественного клонирования и маркер селекции, который, например, может представлять собой ген устойчивости к антибиотикам. Примеры подходящих ДНК-плазмид, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, имеющиеся в продаже экспрессирующие векторы для использования в хорошо известных системах экспрессии (включая как прокариотические, так и эукариотические системы), такие как pSE420 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), который можно использовать для продукции и/или экспрессии белка в *Escherichia coli*; pYES2 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), который можно использовать для продукции и/или экспрессии в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; Полная бакуловирусная экспрессионная система MAXBAC® (Thermo Fisher Scientific), которую можно использовать для продукции и/или экспрессии в клетках насекомых; pcDNATM или pcDNA3TM (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), которые можно использовать для конститутивной экспрессии белка на высоком уровне в клетках млекопитающих; и pVAX или pVAX-1 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), которые можно использовать для транзитной экспрессии интересующего белка на высоком уровне в большинстве клеток млекопитающих. Остов любой имеющейся в продаже ДНК-плазмиды можно модифицировать для оптимизации экспрессии белка в клетке-хозяине, например, для изменения ориентации определенных элементов (например, точки начала репликации и/или кассеты устойчивости к антибиотикам), замены промотора, эндогенного для плазмиды (например, промотор в кассете устойчивости к антибиотикам) и/или замены полинуклеотидной последовательности, кодирующей транскрибируемые белки (например, кодирующей последовательности гена устойчивости к антибиотикам), с использованием обычных методов и легкодоступных исходных материалов. (См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)).

Предпочтительно ДНК-плазида представляет собой экспрессирующий вектор, подходящий для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих. Экспрессирующие векторы, подходящие для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих, включают, но не ограничиваются ими, pcDNATM, pcDNA3TM, pVAX, pVAX-1, ADVAX, NTC8454 и т. д. Предпочтительно экспрессирующий вектор основан на pVAX-1, который может быть дополнительно модифицирован для оптимизации экспрессии белка в клетках млекопитающих. pVAX-1 является широко используемой плазмидой в ДНК-вакцинах и содержит сильный немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV-IE), за которым следует последовательность полиаденилирования (pA), полученная из бычьего гормона роста (bGH). pVAX-1 дополнительно содержит последовательность начала

репликации рUC и ген устойчивости к канамицину, управляемый небольшим прокариотическим промотором, который обеспечивает размножение бактериальной плазмиды.

Вектор согласно заявке также может быть вирусным вектором. Как правило, вирусные векторы представляют собой генетически сконструированные вирусы, несущие модифицированную вирусную ДНК или РНК, которые были обезврежены, но все еще содержат вирусные промоторы и трансгены, что позволяет осуществлять трансляцию трансгена через вирусный промотор. Поскольку в вирусных векторах часто отсутствуют инфекционные последовательности, им требуются вспомогательные вирусы или упаковочные линии для крупномасштабной трансфекции. Примеры вирусных векторов, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, векторы на основе вируса оспы, векторы на основе кишечного вируса, векторы на основе вируса венесуэльского лошадиного энцефалита, векторы на основе вируса леса Семлики, векторы на основе вируса табачной мозаики, лентивирусные векторы и т. д. Примеры вирусных векторов, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, аренавирусные вирусные векторы, репликационно-дефицитные аренавирусные вирусные векторы или репликационно-компетентные вирусные векторы аренавируса, двухсегментные или трехсегментные аренавирусные векторы, инфекционные аренавирусные вирусные векторы, нуклеиновые кислоты которые содержат геномный сегмент аренавируса, в котором одна открытая рамка считывания геномного сегмента deletирована или функционально инактивирована (и заменена нуклеиновой кислотой, кодирующей антиген HBV, как описано в настоящем изобретении), аренавирус, такой как вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), например, клон 13 штамм или штамм MP, и аренавирус, такой как вирус Junin, например, штамм Candid #1. Вектор также может быть невирусным вектором.

Предпочтительно вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор, например, рекомбинантный аденовирусный вектор. Рекомбинантный аденовирусный вектор может быть получен, например, из аденовируса человека (HAdV или AdHu) или аденовируса обезьян, такого как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV), или аденовируса макака-резуса (rhAd). Предпочтительно аденовирусный вектор представляет собой рекомбинантный вектор на основе аденовируса человека, например, рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26 или любой из рекомбинантных аденовирусов человека серотипа 5, 4, 35, 7, 48 и т. д. В других вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой вектор rhAd, например, rhAd51, rhAd52 или rhAd53.

Вектор также может быть вектором линейной ковалентно замкнутой двухцепочечной ДНК. Используемый в настоящем описании термин «линейный ковалентно замкнутый двухцепочечный ДНК-вектор» относится к замкнутой линейной дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК), которая структурно отличается от плазмидной

ДНК. Он обладает многими преимуществами плазмидной ДНК, а также минимальным размером кассеты, аналогичным стратегиям РНК. Например, это может быть векторная кассета, обычно содержащая кодируемую антигенную последовательность, промотор, последовательность полиаденилирования и теломерные концы. Бесплазмидная конструкция может быть синтезирована с помощью ферментативного процесса без необходимости использования бактериальных последовательностей. Примеры подходящих линейных ковалентно замкнутых ДНК-векторов включают, но не ограничиваются ими, имеющиеся в продаже экспрессирующие векторы, такие как «замкнутая линейная ДНК Doggybone™» (dbDNA™) (Touchlight Genetics Ltd.; Лондон, Англия). См., например, Scott et al., Hum Vaccin Immunother. 2015 aug; 11(8): 1972-1982, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки. Некоторые примеры линейных ковалентно замкнутых двухцепочечных ДНК-векторов, композиций и способов создания и применения таких векторов для доставки молекул ДНК, таких как активные молекулы по настоящему изобретению, описаны в US 2012/0282283, US 2013/0216562 и US 2018/0037943, соответствующее содержание каждого из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Рекомбинантный вектор, пригодный для заявки, может быть получен с использованием способов, известных в данной области техники, с учетом настоящего описания. Например, ввиду вырожденности генетического кода можно сконструировать несколько последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих один и тот же полипептид. Полинуклеотид, кодирующий антиген HBV согласно заявке, может быть необязательно оптимизирован по кодонам для обеспечения надлежащей экспрессии в клетке-хозяине (например, в бактериальных клетках или клетках млекопитающих). Кодон-оптимизация представляет собой технологию, широко применяемую в данной области, и способы получения кодон-оптимизированных полинуклеотидов будут хорошо известны специалистам в данной области с учетом настоящего описания.

Вектор согласно заявке, например ДНК-плазида, вирусный вектор (в частности, аденовирусный вектор), РНК-вектор (такой как самореплицирующийся РНК-репликон) или вектор линейной ковалентно замкнутой двухцепочечной ДНК, может содержать любые регуляторные элементы для установления обычной(ых) функции(й) вектора, включая, но не ограничиваясь этим, репликацию и экспрессию антигена(ов) HBV, кодируемого полинуклеотидной последовательностью вектора. Регуляторные элементы включают, но не ограничиваются ими, промотор, энхансер, сигнал полиаденилирования, стоп-кодон трансляции, элемент связывания рибосомы, терминатор транскрипции, маркеры селекции, начало репликации и т. д. Вектор может содержать одну или более экспрессирующих кассет. «Экспрессирующая кассета» является частью вектора, который управляет клеточным механизмом для производства РНК и белка. Экспрессирующая кассета обычно содержит три компонента: промоторную последовательность, открытую рамку считывания и 3'-нетранслируемую область (UTR), необязательно содержащую сигнал полиаденилирования. Открытая рамка считывания (ORF) представляет собой

рамку считывания, которая содержит кодирующую последовательность интересующего белка (например, антигена HBV) от старт-кодона до стоп-кодона. Регуляторные элементы экспрессирующей кассеты могут быть функционально связаны с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей интересующий антиген HBV. Используемый в настоящем описании термин «функционально связанный» следует понимать в его самом широком оправданном контексте, и он относится к связи полинуклеотидных элементов в функциональной взаимосвязи. Полинуклеотид является «функционально связанным», когда он находится в функциональной взаимосвязи с другим полинуклеотидом. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. Любые компоненты, подходящие для использования в описанной в настоящем изобретении экспрессирующей кассете, можно использовать в любой комбинации и в любом порядке для получения векторов согласно заявке.

Вектор может содержать промоторную последовательность, предпочтительно в экспрессирующей кассете, для контроля экспрессии интересующего антигена HBV. Термин «промотор» используется в его обычном смысле и относится к нуклеотидной последовательности, которая инициирует транскрипцию функционально связанной нуклеотидной последовательности. Промотор расположен на той же цепи рядом с нуклеотидной последовательностью, которую он транскрибирует. Промоторы могут быть конститутивными, индуцируемыми или репрессируемыми. Промоторы могут быть природными или синтетическими. Промотор может быть получен из источников, включая вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомых и животных. Промотор может быть гомологичным промотором (т. е. полученным из того же генетического источника, что и вектор) или гетерологичным промотором (т. е. полученным из другого вектора или генетического источника). Например, если используемый вектор представляет собой ДНК-плазмиду, промотор может быть эндогенным по отношению к плазмиде (гомологичным) или полученным из других источников (гетерологичным). Предпочтительно промотор расположен в 5'-области полинуклеотида, кодирующего антиген HBV, внутри экспрессирующей кассеты.

Примеры промоторов, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (HIV), такой как промотор длинного терминального повтора (LTR) вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), промотор вируса Молони, промотор вируса птичьего лейкоза (ALV), промотор цитомегаловируса (CMV), такой как немедленно-ранний промотор CMV (CMV-IE), промотор вируса Эпштейна-Барр (EBV) или промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор также может представлять собой промотор из гена человека, такого как актин человека, миозин человека, гемоглобин человека, креатин мышц человека или металлотионеин человека. Промотор также может быть тканеспецифическим промотором, таким как специфический для мышц или кожи

промотор, природный или синтетический.

Предпочтительно промотор представляет собой сильный эукариотический промотор, предпочтительно немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV-IE). Нуклеотидная последовательность иллюстративного промотора CMV-IE представлена в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

Вектор может содержать дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые стабилизируют экспрессируемый транскрипт, усиливают ядерный экспорт РНК-транскрипта и/или улучшают транскрипционно-трансляционное сцепление. Примеры таких последовательностей включают сигналы полиаденилирования и энхансерные последовательности. Сигнал полиаденилирования обычно расположен в 3'-области относительно кодирующей последовательности интересующего белка (например, антигена HBV) в экспрессирующей кассете вектора. Энхансерные последовательности представляют собой регуляторные последовательности ДНК, которые при связывании с факторами транскрипции усиливают транскрипцию ассоциированного гена. Последовательность энхансера предпочтительно расположена в 5'-области относительно последовательности полинуклеотидов, кодирующей антиген HBV, но в 3'-области относительно последовательности промотора внутри экспрессирующей кассеты вектора.

Можно использовать любой сигнал полиаденилирования, известный специалистам в данной области в связи с настоящим изобретением. Например, сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования SV40, сигнал полиаденилирования LTR, сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGH), сигнал полиаденилирования гормона роста человека (hGH) или сигнал полиаденилирования β -глобина человека. Предпочтительно сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH) или сигнал полиаденилирования SV40. Нуклеотидная последовательность иллюстративного сигнала полиаденилирования bGH представлена в SEQ ID NO: 20. Нуклеотидная последовательность иллюстративного сигнала полиаденилирования SV40 представлена в SEQ ID NO: 13.

Можно использовать любую энхансерную последовательность, известную специалистам в данной области в связи с настоящим изобретением. Например, энхансерная последовательность может представлять собой человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин или вирусный энхансер, такой как один из CMV, HA, RSV или EBV. Примеры конкретных энхансеров включают, помимо прочего, посттранскрипционный регуляторный элемент HBV сурка (WPRE), последовательность интрона/экзона, полученную из предшественника аполипопротеина A1 человека (ApoA1), нетранслируемый домен R-U5 длинного концевой повтора (LTR) вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (HTLV-1), энхансер сплайсинга, синтетический интрон β -глобина кролика или любую их комбинацию. Предпочтительно энхансерная последовательность представляет собой составную последовательность из трех последовательных элементов нетранслируемого

домена R-U5 LTR HTLV-1, интрона β -глобина кролика и энхансера сплайсинга, который упоминается в настоящем изобретении как «тройная энхансерная последовательность». Нуклеотидная последовательность иллюстративной тройной энхансерной последовательности представлена в SEQ ID NO: 10. Другой иллюстративной энхансерной последовательностью является фрагмент гена ApoA1, представленный в SEQ ID NO: 12.

Вектор может содержать полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида. Предпочтительно полинуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность сигнального пептида, расположена в 5'-области относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей антиген HBV. Сигнальные пептиды обычно направляют локализацию белка, облегчают секрецию белка из клетки, в которой он продуцируется, и/или улучшают экспрессию антигена и перекрестную презентацию антигенпрезентирующим клеткам. Сигнальный пептид может присутствовать на N-конце антигена HBV при экспрессии из вектора, но отщепляется сигнальной пептидазой, например, при секреции из клетки. Экспрессированный белок, в котором отщепляется сигнальный пептид, часто называют «зрелым белком». Можно использовать любой сигнальный пептид, известный в данной области техники в связи с настоящим изобретением. Например, сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид цистатина S; сигнал секреции иммуноглобулина (Ig), такой как сигнальный пептид SPIgG тяжелой цепи гамма Ig или сигнальный пептид SPIgE тяжелой цепи эписилон Ig.

Предпочтительно последовательность сигнального пептида представляет собой сигнальный пептид цистатина S. Иллюстративные последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности сигнального пептида цистатина S представлены в SEQ ID NO: 8 и 9, соответственно. Иллюстративные последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности сигнала секреции иммуноглобулина представлены в SEQ ID NO: 14 и 15, соответственно.

Вектор, такой как ДНК-плазида, может также включать бактериальную последовательность начала репликации и экспрессирующую кассету устойчивости к антибиотикам для селекции и поддержания плазмиды в бактериальных клетках, например, E.coli. Бактериальные последовательности начала репликации и кассеты устойчивости к антибиотикам могут быть расположены в векторе в той же ориентации, что и экспрессирующая кассета, кодирующая антиген HBV, или в противоположной (обратной) ориентации. Последовательность начала репликации (ORI) представляет собой последовательность, с которой инициируется репликация, что позволяет плазмиде воспроизводиться и выживать в клетках. Примеры ORI, пригодных для использования в заявке, включают, но не ограничиваются ими, ColE1, pMB1, pUC, pSC101, R6K и 15A, предпочтительно pUC. Иллюстративная нуклеотидная последовательность pUC ORI представлена в SEQ ID NO: 21.

Экспрессирующие кассеты для селекции и поддержания в бактериальных клетках обычно включают промоторную последовательность, функционально связанную с геном

устойчивости к антибиотикам. Предпочтительно промоторная последовательность, функционально связанная с геном устойчивости к антибиотикам, отличается от промоторной последовательности, функционально связанной с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей интересующий белок, например, антиген HBV. Ген устойчивости к антибиотикам может быть оптимизирован по кодонам, а состав последовательности гена устойчивости к антибиотикам обычно адаптирован к использованию кодонов бактериями, например *E. coli*. Можно использовать любой ген устойчивости к антибиотикам, известный специалистам в данной области в связи с настоящим изобретением, включая, помимо прочего, ген устойчивости к канамицину (Kanr), ген устойчивости к ампициллину (Amp^r) и ген устойчивости к тетрациклину (Tetr), а также гены, придающие устойчивость к хлорамфениколу, блеомицину, спектиномицину, карбенициллину и т. д.

Предпочтительно ген устойчивости к антибиотикам в экспрессирующей кассете вектора с антибиотиками представляет собой ген устойчивости к канамицину (Kanr). Последовательность гена Kanr представлена в SEQ ID NO: 22. Предпочтительно ген Kanr оптимизирован по кодонам. Типичная последовательность нуклеиновой кислоты гена Kanr с оптимизированными кодонами представлена в SEQ ID NO: 23. Kanr может быть функционально связан со своим нативным промотором, или ген Kanr может быть связан с гетерологичным промотором. В конкретном варианте осуществления ген Kanr функционально связан с промотором гена устойчивости к ампициллину (Amp^r), известным как промотор bla. Иллюстративная нуклеотидная последовательность промотора bla представлена в SEQ ID NO: 24.

В конкретном варианте осуществления вектор представляет собой ДНК-плазмиду, содержащую экспрессирующую кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один из антигенов HBV, выбранных из группы, состоящей из pol-антигенов HBV, содержащих аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, как например, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96, 97%, предпочтительно по меньшей мере 98%, например, по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100%, идентичную SEQ ID NO: 7, и укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95%, как например на 95%, 96, 97%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, например по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100%, идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; расположенную в 5'-области относительно последовательности, функционально связанной с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую от 5'-конца до 3'-конца промоторную последовательность, предпочтительно промоторную последовательность CMV SEQ ID NO: 18, энхансерную последовательность, предпочтительно тройную энхансерную последовательность SEQ ID NO: 10, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнальный пептид цистатина S, имеющий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 9; и 3'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования bGH SEQ ID NO: 20. Такой вектор дополнительно содержит экспрессирующую кассету устойчивости к антибиотикам, включающую полинуклеотид, кодирующий ген устойчивости к антибиотикам, предпочтительно ген Kanr, более предпочтительно кодон-оптимизированный ген Kanr, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 23, например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичный SEQ ID NO: 23, предпочтительно на 100% идентичный SEQ ID NO: 23, функционально связанный с промотором Ampr(bla) SEQ ID NO: 24, располагающимся в 5'-области и будучи функционально связанным с полинуклеотидом, кодирующим ген устойчивости к антибиотикам; и последовательность начала репликации, предпочтительно рUC ori SEQ ID NO: 21. Предпочтительно кассета устойчивости к антибиотикам и последовательность начала репликации присутствуют в плазмиде в обратной ориентации по отношению к экспрессирующей кассете антигена HBV.

В другом конкретном варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, предпочтительно аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35, содержащий экспрессирующую кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из антигена pol HBV, содержащего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, как например, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96, 97%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100%, идентичную SEQ ID NO: 7, и укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95%, например, на 95%, 96%, 97%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; 5'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую от 5'-конца до 3'-конца промоторную последовательность, предпочтительно промоторную последовательность CMV SEQ ID NO: 19, энхансерную последовательность, предпочтительно последовательность фрагмента гена AroAI из SEQ ID NO: 12 и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнал секреции иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и 3'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 13.

В одном варианте осуществления заявки вектор, такой как вектор плазмидной ДНК

или вирусный вектор (предпочтительно аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35), кодирует антиген Pol HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. Предпочтительно вектор содержит кодирующую последовательность антигена Pol HBV, которая по меньшей мере на 90% идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 или 6, как например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, на 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 5 или 6, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 5 или 6.

В одном варианте осуществления заявки вектор, такой как вектор плазмидной ДНК или вирусный вектор (предпочтительно аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35), кодирует укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Предпочтительно вектор содержит кодирующую последовательность укороченного корового антигена HBV, которая по меньшей мере на 90% идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, как например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Еще в одном варианте осуществления заявки вектор, такой как вектор плазмидной ДНК или вирусный вектор (предпочтительно аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35), кодирует слитый белок, содержащий антиген Pol HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 и укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. Предпочтительно вектор содержит кодирующую последовательность для слияния, которая содержит кодирующую последовательность укороченного корового антигена HBV, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, более предпочтительно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, функционально связанную с последовательностью, кодирующей антиген Pol HBV, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, более предпочтительно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Предпочтительно кодирующая последовательность укороченного корового антигена HBV функционально связана с кодирующей последовательностью антигена Pol HBV посредством кодирующей последовательности линкера, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO:11,

например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 11, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 11. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит кодирующую последовательность слияния, имеющую SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, функционально связанную с SEQ ID NO: 11, которая дополнительно функционально связана с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Полинуклеотиды и экспрессирующие векторы, кодирующие антигены HBV согласно заявке, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, с учетом настоящего описания. Например, полинуклеотид, кодирующий антиген HBV, может быть введен или «клонирован» в экспрессирующий вектор с использованием стандартных методов молекулярной биологии, например полимеразной цепной реакции (ПЦР) и т. д., которые хорошо известны специалистам в данной области.

Клетки, полипептиды и антитела

В заявке также предложены клетки, предпочтительно выделенные клетки, содержащие любой из полинуклеотидов и векторов, описанных в настоящем изобретении. Клетки можно, например, использовать для продукции рекомбинантного белка или для продукции вирусных частиц.

Таким образом, варианты осуществления заявки также относятся к способу получения антигена HBV заявки. Способ включает трансфекцию клетки-хозяина экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий антиген HBV данного применения, функционально связанный с промотором, выращивание трансфицированной клетки в условиях, подходящих для экспрессии антигена HBV, и, необязательно, очистку или выделение антигена HBV, экспрессируемого в клетке. Антиген HBV можно выделить или собрать из клетки любым способом, известным в данной области, включая аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию и т. д. Методы, используемые для экспрессии рекомбинантного белка, хорошо известны специалистам в данной области с учетом настоящего описания. Экспрессированные антигены HBV также можно исследовать без очистки или выделения экспрессированного белка, например, путем анализа супернатанта клеток, трансфицированных экспрессирующим вектором, кодирующим антиген HBV, и выращенных в условиях, подходящих для экспрессии антигена HBV.

Таким образом, также предложены полипептиды не природного происхождения или рекомбинантные полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 7. Как описано выше и ниже, в заявке также рассматриваются выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие эти последовательности, векторы, содержащие эти последовательности, функционально связанные с промотором, и композиции, содержащие полипептид, полинуклеотид или вектор.

В одном варианте осуществления заявки рекомбинантный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, как например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 2. Предпочтительно полипептид неприродного происхождения или рекомбинантный полипептид состоит из SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления заявки полипептид неприродного происхождения или рекомбинантный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, как например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 4. Предпочтительно полипептид неприродного происхождения или рекомбинантный полипептид содержит SEQ ID NO: 4.

В другом варианте осуществления заявки полипептид неприродного происхождения или рекомбинантный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, как например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 7. Предпочтительно полипептид неприродного происхождения или рекомбинантный полипептид состоит из SEQ ID NO: 7.

Также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с полипептидом неприродного происхождения заявки. В одном варианте осуществления заявки антитело, специфическое к антигену HBV неприродного происхождения согласно заявке, не связывается специфически с другим антигеном HBV. Например, антитело согласно заявке, которое специфически связывается с антигеном Pol HBV, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, не будет специфически связываться с антигеном Pol HBV, не имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

Используемый в настоящем описании термин «антитело» включает поликлональные, моноклональные, химерные, гуманизированные, Fv, Fab и F(ab')₂; бифункциональные гибридные (например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987), одноцепочечные (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; Bird et al., Science 242:423, 1988); и антитела с измененными константными областями (например, Пат. США № 5624821).

Используемый в настоящем описании термин «антитело, которое «специфически связывается» с антигеном» относится к антителу, которое связывается с антигеном с KD 1×10^{-7} М или меньше. Предпочтительно антитело, которое «специфически связывается» с

антигеном, связывается с антигеном с KD 1×10^{-8} М или меньше, более предпочтительно 5×10^{-9} М или меньше, 1×10^{-9} М или меньше, 5×10^{-10} М или меньше или 1×10^{-10} М или меньше. Термин « KD » относится к константе диссоциации, которую получают из отношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka) и выражают в виде молярной концентрации (М). Значения KD для антител могут быть определены с использованием способов, известных в данной области, с учетом настоящего изобретения. Например, KD антитела можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью биосенсорной системы, например, системы *Viascore*®, или с помощью технологии биослойной интерферометрии, такой как система *Octet RED96*.

Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с антигеном-мишенью.

РНКи-агенты

Заявка также относится к терапевтическим применениям РНКи-агентов для ингибирования экспрессии гена *HBV*, которые также упоминаются в настоящем изобретении как «молекулы РНКи *HBV*» или «РНКи-агенты *HBV*».

РНКи-агенты для ингибирования экспрессии гена *HBV* известны в данной области. Например, РНКи-агенты для ингибирования экспрессии гена *HBV* включают, но не ограничиваются ими, агенты, описанные в US 20130005793, WO 2013003520 и WO 2018027106, содержание каждого из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Каждый РНКи-агент *HBV* содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь. Смысловая цепь и антисмысловая цепь могут иметь длину от 16 до 30 нуклеотидов каждая. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи могут иметь длину от 17 до 26 нуклеотидов каждая. Смысловая и антисмысловая цепи могут быть как одинаковой длины, так и разной длины. В некоторых вариантах осуществления каждая смысловая и антисмысловая цепи независимо имеют длину от 17 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая смысловая и антисмысловая цепи независимо имеют длину 17-21 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая цепи имеют длину 21-26 нуклеотидов каждая. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи составляет приблизительно 19 нуклеотидов, тогда как длина антисмысловой цепи составляет приблизительно 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи составляет приблизительно 21 нуклеотид, тогда как длина антисмысловой цепи составляет приблизительно 23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая цепи имеют длину 26 нуклеотидов каждая. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи РНКи-агента независимо имеют длину 1, 7, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный РНКи-агент имеет длину дуплекса приблизительно 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида. Этот участок полной или существенной комплементарности между смысловой и антисмысловой цепями обычно имеет длину 15-25 (например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25)

нуклеотидов и находится на 5'-конце антисмысловой цепи или рядом с ним (например, эта область может быть отделена от 5'-конца антисмысловой цепи 0, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидами, которые не полностью или по существу не комплементарны).

Каждая из смысловых цепи и антисмысловых цепи содержит последовательность корового фрагмента длиной от 16 до 23 нуклеотидов. Последовательность корового фрагмента антисмысловых цепи на 100% (полностью) комплементарна или по меньшей мере приблизительно на 85% (по существу) комплементарна нуклеотидной последовательности (иногда называемой, например, последовательностью-мишенью), присутствующей в мРНК-мишени HBV. Последовательность корового фрагмента смысловых цепи на 100% (полностью) комплементарна или по меньшей мере приблизительно на 85% (по существу) комплементарна последовательности корового фрагмента в антисмысловых цепи, и, таким образом, последовательность корового фрагмента смысловых цепи полностью идентична или по меньшей мере приблизительно на 85% идентична нуклеотидной последовательности (последовательности-мишени), присутствующей в мРНК-мишени HBV. Последовательность корового фрагмента смысловых цепи может иметь ту же длину, что и соответствующая последовательность корового фрагмента антисмысловых цепи, или может иметь другую длину. В некоторых вариантах осуществления последовательность корового фрагмента антисмысловых цепи имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления последовательность корового фрагмента смысловых цепи имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида.

Используемые в настоящем описании термины «агент РНК интерференции», «РНКи-агент», «молекула РНК-интерференции» или «РНКи-молекула» означают композицию, содержащую молекулу РНК или РНК-подобную (например, химически модифицированную РНК) олигонуклеотида, которая способна к деградации или ингибированию трансляции транскриптов матричной РНК (мРНК) мРНК-мишени специфичным для последовательности образом. Используемые в настоящем описании РНКи-агенты могут действовать через механизм РНК-интерференции (т. е. индуцировать РНК-интерференцию посредством взаимодействия с механизмом пути РНК-интерференции (РНК-индуцированный комплекс сайленсинга или RISC) клеток млекопитающих) или с помощью любого альтернативного(альтернативных) механизма(механизмов) или пути(путей). Хотя считается, что РНКи-агенты, как этот термин используется в настоящем изобретении, действуют главным образом посредством механизма РНК-интерференции, раскрытые РНКи-агенты не связаны или не ограничены каким-либо конкретным путем или механизмом действия. РНКи-агенты, раскрытые в настоящем описании, состоят из смысловых цепи и антисмысловых цепи и включают, но не ограничиваются ими: короткие интерферирующие РНК (киРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микроРНК (миРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК) и субстраты для *dicer*. РНКи-агенты согласно заявке предпочтительно представляют собой дцРНК. Антисмысловая цепь РНКи-агентов, описанных в настоящем изобретении, по меньшей

мере частично комплементарна мРНК-мишени. РНКи-агенты могут содержать в себе модифицированные нуклеотиды и/или одну или более нефосфодиэфирных связей.

Термин «двухцепочечная РНК», «молекула дцРНК» или «дцРНК» в контексте настоящего описания относится к молекуле рибонуклеиновой кислоты или комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющей дуплексную структуру, состоящую из двух антипараллельных и по существу комплементарных цепей нуклеиновых кислот. Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут быть разными частями одной большей молекулы РНК или отдельными молекулами РНК. Если две цепи являются частью одной большей молекулы и, следовательно, связаны непрерывной цепочкой нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя дуплексную структуру, соединительная цепь РНК представляет собой так называемая «петля шпильки». Если две цепи соединены ковалентно другими способами, кроме непрерывной цепочки нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующей дуплексную структуру, соединительную структуру называют «линкером». Цепи РНК могут иметь одинаковое или разное количество нуклеотидов. В дополнение к дуплексной структуре дцРНК может содержать один или более выступающих нуклеотидов или может иметь тупые концы.

Используемые в настоящем описании термины «подвергать сайленсингу», «снижать», «ингибировать», «подавлять» или «подвергать нокдауну» применительно к экспрессии данного гена означают, что экспрессия гена, измеряемая на уровне РНК, транскрибируемой с гена, или на уровне полипептида, белка или белковой субъединицы, транслируемых с мРНК, в клетке, группе клеток, ткани, органе или у пациента, у которого транскрибируется ген, снижается, когда клетку, группу клеток, ткань, орган или пациента лечат олигомерными соединениями, такими как РНКи-агенты, описанные в настоящем изобретении, по сравнению со второй клеткой, группой клеток, тканью, органом или пациентом, которые не подвергались такому лечению.

Термин «ген вируса гепатита В», используемый в настоящем описании, относится к генам, необходимым для репликации и патогенеза вируса гепатита В, в частности к генам, которые кодируют коровый белок, вирусную полимеразу, поверхностный антиген, е-антиген и белок Х, а также гены, кодирующие функциональные фрагменты того же. Термин «ген/последовательность вируса гепатита В» относится не только к последовательности(ям) дикого типа, но также к мутациям и изменениям, которые могут содержаться в указанном гене/последовательности. Соответственно, настоящая заявка не ограничивается специфическими РНКи-агентами, представленными в настоящем изобретении. Заявка также относится к РНКи-агентам, которые содержат антисмысловую цепь, которая по меньшей мере на 85% комплементарна соответствующему нуклеотидному фрагменту РНК-транскрипта гена вируса гепатита В, который содержит такие мутации/изменения.

Используемый в настоящем описании термин «консенсусная последовательность» относится по меньшей мере к 13 непрерывно расположенным нуклеотидам,

предпочтительно, по меньшей мере, к 17 непрерывно расположенным нуклеотидам, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, к 19 непрерывно расположенным нуклеотидам, которые являются высококонсервативными среди геномных последовательностей вируса гепатита В генотипов А, В, С и D.

Используемый в настоящем описании термин «последовательность-мишень» относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена вируса гепатита В, включая мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции.

Используемый в настоящем описании термин «цепь, содержащая последовательность» относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описана последовательностью, на которую ссылаются, с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов. Однако, как подробно описано в настоящем изобретении, такая «цепь, содержащая последовательность», может также содержать модификации, такие как модифицированные нуклеотиды.

РНКи-агенты способны ингибировать экспрессию вируса гепатита В по меньшей мере приблизительно на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 80% в анализах *in vitro*, т. е. *in vitro*. Используемый в настоящем описании термин «*in vitro*» включает, но не ограничивается ими, анализы клеточных культур. Специалист в данной области может легко определить такую скорость ингибирования и связанные с ней эффекты, в частности, в свете представленных здесь анализов. Используемый в настоящем описании термин «нецелевой» относится ко всем нецелевым мРНК транскриптома, гибридизация которых с помощью методов *in silico* прогнозируется с описанными агентами РНКи на основе комплементарности последовательностей. РНКи-агенты согласно настоящей заявке предпочтительно специфически ингибируют экспрессию гена вируса гепатита В, т. е. не ингибируют экспрессию каких-либо нецелевых последовательностей.

РНКи-агенты могут содержать одно или более несоответствий с последовательностью-мишенью. В предпочтительном варианте РНКи-агенты заявки содержат не более 13 несоответствий. Если антисмысловая цепь РНКи-агента содержит несоответствия с последовательностью-мишенью, предпочтительно, чтобы область несоответствия не располагалась в пределах нуклеотидов 2-7 5'-конца антисмысловой цепи. В другом варианте осуществления предпочтительно, чтобы область несоответствия не располагалась в пределах нуклеотидов 2-9 5'-конца антисмысловой цепи.

Используемый в настоящем описании и если не указано иное, термин «комплементарный», используемый для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться и образовывать дуплексную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность. «Комплементарные»

последовательности, используемые в настоящем описании, могут также включать или полностью образовываться из пар оснований, отличных от пар по Уотсону-Крику, и/или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, в той мере, в какой выполняются вышеуказанные требования в отношении реализации их способности к гибридизации.

Термин «антисмысловая цепь» относится к цепи дцРНК, которая включает область, по существу комплементарную последовательности-мишени. Используемый в настоящем описании термин «область комплементарности» относится к области на антисмысловой цепи, который по существу комплементарен последовательности, например последовательности-мишени. Если область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени, несоответствия наиболее допустимы за пределами нуклеотидов 2-7 5'-конца антисмысловой цепи.

Термин «смысловая цепь», используемый в настоящем описании, относится к цепи дцРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи. «По существу комплементарный» означает, что предпочтительно по меньшей мере 85% перекрывающихся нуклеотидов в смысловой и антисмысловой цепях являются комплементарными.

Примеры нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей, используемых для получения РНКи-агентов HBV, представлены на ФИГ. 4-6 и 8-10, воспроизведенных из US 20130005793 и WO 2018027106, содержание которых включено в настоящее описание в полном объеме.

Смысловая и антисмысловая цепи РНКи-агента HBV отжигаются с образованием дуплекса. Смысловая цепь и антисмысловая цепь РНКи-агента HBV могут быть частично, по существу или полностью комплементарны друг другу. В комплементарной области дуплекса последовательность корового фрагмента смысловой цепи комплементарна по меньшей мере приблизительно на 85% или на 100% последовательности корового фрагмента антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления последовательность корового фрагмента смысловой цепи содержит последовательность из по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 21 нуклеотида, которая комплементарна по меньшей мере приблизительно на 85% или на 100% соответствующим 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотидам последовательности корового фрагмента антисмысловой цепи (т. е. последовательности корового фрагмента смысловой цепи РНКи-агента HBV имеют область из по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 21 нуклеотида, которые образуют по меньшей мере 85% пар оснований или 100% пар оснований).

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи-агента HBV, описанная в настоящем изобретении, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой от последовательностей антисмысловой цепи, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь РНКи-агента HBV, описанного в

настоящем изобретении, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей смысловой цепи, описанных в настоящем изобретении.

Длина описанных в настоящем изобретении смысловой и антисмысловой цепей РНК-агента HBV составляет независимо от 16 до 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи имеют длину независимо от 17 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи имеют длину 19-26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи описанного РНК-агента имеют длину независимо 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов. Смысловая и антисмысловая цепи могут быть как одинаковой длины, так и разной длины. В некоторых вариантах осуществления каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь имеет длину 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида, а антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь имеет длину 22 нуклеотида, а антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид, а антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь имеет длину 19 нуклеотида, а антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид.

Смысловая цепь и/или антисмысловая цепь необязательно и независимо может содержать дополнительные 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов (удлинение) на 3'-конце, 5'-конце или как на 3'-, так и на 5'-концах коровых последовательностей. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой цепи, если они присутствуют, могут быть как комплементарными соответствующей последовательности в мРНК HBV так и нет. Дополнительные нуклеотиды смысловой цепи, если они присутствуют, могут быть как идентичными соответствующей последовательности в мРНК HBV, так и не идентичными. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой цепи, если они присутствуют, могут быть как комплементарными дополнительным нуклеотидам соответствующей смысловой цепи, если они присутствуют, так и нет.

Используемое в настоящем описании удлинение содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов на 5'- и/или 3'-конце последовательности корового фрагмента смысловой цепи и/или последовательности корового фрагмента антисмысловой цепи. Нуклеотиды удлинения на смысловой цепи могут быть комплементарны или не комплементарны нуклеотидам, либо нуклеотидам последовательности корового фрагмента, либо нуклеотидам удлинения в соответствующей антисмысловой цепи. И наоборот, нуклеотиды удлинения на антисмысловой цепи могут быть комплементарны или не комплементарны нуклеотидам, либо нуклеотидам последовательности корового фрагмента, либо нуклеотидам удлинения в соответствующей смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая цепь РНК-агента содержат 3'- и 5'-удлинения. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов 3'-удлинения одной цепи образуют пару оснований с одним или более

нуклеотидами 5'-удлинения другой цепи. В других вариантах осуществления один или более нуклеотидов 3'-удлинения одной цепи не образуют пары оснований с одним или более нуклеотидами 5'-удлинения другой цепи. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV имеет антисмысловую цепь, имеющую 3'-удлинение, и смысловую цепь, имеющую 5'-удлинение. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV содержит антисмысловую цепь, имеющую 3'-удлинение длиной 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В других вариантах осуществления РНКи-агент HBV содержит антисмысловую цепь, имеющую 3'-удлинение длиной 1, 2 или 3 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов удлинения антисмысловой цепи содержат урациловые или тимидиновые нуклеотиды или нуклеотиды, комплементарные соответствующей последовательности мРНК HBV. В некоторых вариантах осуществления 3'-удлинение антисмысловой цепи включает или состоит из, но не ограничивается ими: AUA, UGCUU, CUG, UG, UGCC, CUGCC, CGU, CUU, UGCCUA, CUGCCU, UGCCU, UGAUU, GCCUAU, T, TT., U, UU (каждый указан в направлении от 5' к 3'). В некоторых вариантах осуществления 3'-конец антисмысловой цепи может включать дополнительные нуклеозиды, лишённые азотистых оснований, (Ab). В некоторых вариантах осуществления Ab или AbAb могут быть добавлены к 3'-концу антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV содержит антисмысловую цепь, имеющую 5'-удлинение длиной 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов. В других вариантах осуществления РНКи-агент HBV содержит антисмысловую цепь, имеющую 5'-удлинение длиной 1 или 2 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов удлинения антисмысловой цепи содержат урациловые или тимидиновые нуклеотиды или нуклеотиды, комплементарные соответствующей последовательности мРНК HBV. В некоторых вариантах осуществления 5'-удлинение антисмысловой цепи включает или состоит из, но не ограничивается ими, UA, TU, U, T, UU, TT, CUC (каждый из них указан от 5' к 3'). Антисмысловая цепь может иметь любое из 3'-удлинений, описанных выше, в комбинации с любым из описанных 5'-удлинений антисмысловой цепи, если они присутствуют.

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV содержит смысловую цепь, имеющую 3'-удлинение длиной 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов удлинения смысловой цепи содержат аденозиновые, урациловые или тимидиновые нуклеотиды, динуклеотид AT или нуклеотиды, которые соответствуют нуклеотидам в последовательности мРНК HBV. В некоторых вариантах осуществления 3'-удлинение смысловой цепи включает или состоит из, но не ограничивается ими: T, UT, TT, UU, UUT, TTT или TTTT (каждое из них указано от 5' к 3').

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой цепи может включать дополнительные нуклеозиды, лишённые азотистых оснований. В некоторых вариантах осуществления UUAb, UAb или Ab могут быть добавлены к 3'-концу смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов, лишённых азотистых

оснований, добавленных к 3'-концу смысловой цепи, могут быть инвертированы (invAb). В некоторых вариантах осуществления между нацеливающим лигандом и последовательностью нуклеозидов смысловой цепи РНК-агента могут быть вставлены один или более инвертированных нуклеозидов, лишенных азотистых оснований. В некоторых вариантах осуществления включение одного или более инвертированных нуклеозидов, лишенных азотистых оснований, на концевом участке или концевых участках смысловой цепи РНК-агента или вблизи них может обеспечить повышенную активность или другие желаемые свойства РНК-агента. В некоторых вариантах осуществления РНК-агент HBV содержит смысловую цепь, имеющую 5'-удлинение длиной 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов удлинения смысловой цепи содержат урациловые или аденозиновые нуклеотиды или нуклеотиды, которые соответствуют нуклеотидам в последовательности мРНК HBV. В некоторых вариантах осуществления 5'-удлинение смысловой цепи может представлять собой, но не ограничивается этим: CA, AUAGGC, AUAGG, AUAG, AUA, A, AA, AC, GCA, GGCA, GGC, UAUCA, UAUC, UCA, UAU, U, UU (каждый указан от 5' к 3'). Смысловая нить может иметь 3'-удлинение и/или 5'-удлинение.

В некоторых вариантах осуществления 5'-конец смысловой цепи может включать дополнительный нуклеозид, лишенный азотистых оснований, (Ab) или нуклеозиды, лишенные азотистых оснований, (AbAb). В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов, лишенных азотистых оснований, добавленных к 5'-концу смысловой цепи, могут быть инвертированы (invAb). В некоторых вариантах осуществления между нацеливающим лигандом и последовательностью нуклеозидов смысловой цепи РНК-агента могут быть вставлены один или более инвертированных нуклеозидов, лишенных азотистых оснований. В некоторых вариантах осуществления включение одного или более инвертированных нуклеозидов, лишенных азотистых оснований, на концевом участке или на концевых участках смысловой цепи РНК-агента или вблизи них может обеспечить повышенную активность или другие желаемые свойства РНК-агента.

Примеры нуклеотидных последовательностей, используемых для создания РНК-агентов HBV, представлены на ФИГ. 4-6 и 8-10, воспроизведены из US 20130005793 и WO 2018027106. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНК-агента HBV включает нуклеотидную последовательность любой из последовательностей на ФИГ. 4-6, 8 или 9. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНК-агента HBV включает последовательность нуклеотидов 1-17, 2-15, 2-17, 1-18, 2-18, 1-19, 2-19, 1-20, 2-20., 1-21, 2-21, 1-22, 2-22, 1-23, 2-23, 1-24, 2-24, 1-25, 2-25, 1-26 или 2-26 из любой из последовательностей на ФИГ. 4-6, 8 или 9. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь РНК-агента HBV включает нуклеотидную последовательность любой из последовательностей на ФИГ. 4-6, 8 или 10. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь РНК-агента HBV включает последовательность нуклеотидов 1-18, 1-19, 1-20, 1-21, 1-22, 1-23, 1-24, 1-25, 1-26., 2-19, 2-20, 2-21, 2-22, 2-23, 2-24, 2-25, 2-26, 3-20, 3-21, 3-22, 3-23, 3-24, 3-25, 3-26, 4-21, 4-22, 4-23,

4-24, 4-25, 4-26, 5-22, 5-23, 5-24, 5-25, 5-26, 6-23, 6-24, 6-25, 6-26, 7-24, 7-25, 7-25, 8-25, 8-26 любой из последовательностей на ФИГ. 4-6, 8 или 10. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи РНК-агентов, описанных в настоящем изобретении, содержат одинаковое количество нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи РНК-агентов, описанных в настоящем изобретении, содержат разное количество нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-конец смысловой цепи и 3'-конец антисмысловой цепи РНК-агента образуют тупой конец. В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой цепи и 5'-конец антисмысловой цепи РНК-агента образуют тупой конец. В некоторых вариантах осуществления оба конца РНК-агента образуют тупые концы. В некоторых вариантах осуществления ни один из концов РНК-агента не является тупым концом. Используемый в настоящем описании термин «тупой конец» относится к концу двухцепочечного РНК-агента, в котором концевые нуклеотиды двух гибридизованных цепей являются комплементарными (образуют комплементарную пару оснований). В некоторых вариантах осуществления 5'-конец смысловой цепи и 3'-конец антисмысловой цепи РНК-агента образуют разветвленный конец. В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой цепи и 5'-конец антисмысловой цепи РНК-агента образуют разветвленный конец. В некоторых вариантах осуществления оба конца РНК-агента образуют разветвленный конец. В некоторых вариантах осуществления ни один из концов РНК-агента не является разветвленным концом. Используемый в настоящем описании термин «разветвленный конец» относится к концу двухцепочечного РНК-агента, в котором концевые нуклеотиды двух гибридизованных цепей из пары отжигаются (т. е. не образуют выступ), но не комплементарны (т. е. образуют некомплементарную пару). Используемый в настоящем описании термин «выступ» представляет собой фрагмент из одного или более неспаренных нуклеотидов на конце одной цепи двухцепочечного РНК-агента. Неспаренные нуклеотиды могут находиться на смысловой или антисмысловой цепи, образуя либо 3'-, либо 5'-выступы. В некоторых вариантах осуществления РНК-агент содержит: тупой конец и разветвленный конец, тупой конец и 5'-выступающий конец, тупой конец и 3'-выступающий конец, разветвленный конец и 5'-выступающий конец, разветвленный конец и 3'-выступающий конец, два 5'-выступающих конца, два 3'-выступающих конца, 5'-выступающий конец и 3'-выступающий конец, два разветвленных конца или два тупых конца.

Нуклеотидное основание представляет собой гетероциклическое пиримидиновое или пуриновое соединение, которое входит в состав всех нуклеиновых кислот и включает аденин (А), гуанин (G), цитозин (С), тимин (Т) и урацил (У). Используемый в настоящем описании термин «нуклеотид» может включать модифицированный нуклеотид (такой как, например, миметик нуклеотида, участок с удаленными азотистыми основаниями (Ab) или суррогатный замещающий фрагмент). Модифицированные нуклеотиды при использовании в различных полинуклеотидных или олигонуклеотидных конструкциях могут сохранять активность соединения в клетках, в то же время повышая стабильность

этих соединений в сыворотке, а также могут минимизировать возможность активации активности интерферона у человека при введении полинуклеотидной или олигонуклеотидной конструкции.

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV получают или предоставляют в виде соли, смешанной соли или свободной кислоты. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV получают в виде натриевой соли. Такие формы входят в объем раскрытой в настоящем описании заявки.

«Введение в клетку», когда речь идет о РНКи-агентах, означает облегчение поглощения или абсорбции в клетку, как это понимают специалисты в данной области. Абсорбция или поглощение РНКи-агентов может происходить через диффузионные или активные клеточные процессы без посторонней помощи или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Значение этого термина не ограничивается клетками *in vitro*; РНКи-агенты также могут быть «введены в клетку», при этом клетка является частью живого организма. В таком случае введение в клетку будет включать доставку в организм. Например, для доставки *in vivo* РНКи-агенты можно вводить инъекцией в участок ткани или вводить системно. Например, предусмотрено, что РНКи-агенты согласно настоящей заявке вводят пациенту, нуждающемуся в медицинском вмешательстве. Такое введение может включать инъекцию РНКи-агентов, вектора или клетки согласно настоящей заявке в пораженный участок у указанного пациента, например, в ткань/клетки печени или в опухолевые ткани/клетки, такие как ткань рака печени. Кроме того, инъекция предпочтительно производится в непосредственной близости от предполагаемой пораженной ткани. Введение *in vitro* в клетку включает способы, известные в данной области техники, такие как электропорация и липофекция.

Используемый в настоящем описании термин «период полужизни» представляет собой меру стабильности соединения или молекулы и может быть оценен способами, известными специалисту в данной области, особенно в свете представленных здесь анализов. Используемый в настоящем описании термин «неиммуностимулирующий» относится к отсутствию какой-либо индукции иммунного ответа описанными РНКи-агентами. Способы определения иммунных ответов хорошо известны специалисту в данной области, например, путем оценки высвобождения цитокинов, как описано в разделе примеров.

Модифицированные нуклеотиды

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV содержит один или более модифицированных нуклеотидов. Нуклеиновые кислоты согласно заявке могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, хорошо известными в данной области. Используемый в настоящем описании термин «модифицированный нуклеотид» представляет собой нуклеотид, отличный от рибонуклеотида (2'-гидрокси-нуклеотид). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100%)

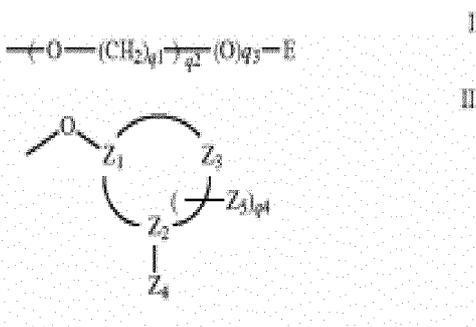
нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами. Используемые в настоящем описании термины «модифицированные нуклеотиды» включают, но не ограничиваются ими, дезоксирибонуклеотиды, имитаторы нуклеотидов, нуклеотиды, лишенные азотистых оснований (представленные здесь как Ab), 2'-модифицированные нуклеотиды. Связи 3'-3' (инвертированные) нуклеотиды (представленные здесь как invdN, invN, invn, invAb), нуклеотиды, содержащие неприродные основания, мостиковые нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК), имитаторы 2',3'-секонуклеотидов (аналоги незаблокированных азотистых оснований, представленные здесь как NUNA), заблокированные нуклеотиды (представлены здесь как NLNA), 3'-0-метокси (2'-межнуклеозидные связи) нуклеотиды (представлены здесь как 3'-OMen), 2'-F-арабинонуклеотиды (представлены здесь как NfANA), 5'-Me, 2'-фторнуклеотид (представлен здесь как 5Me-Nf), морфолинонуклеотиды, дезоксирибонуклеотид винилфосфонаты (представлены в настоящем изобретении как vpdN), нуклеотиды, содержащие винилфосфонат, и нуклеотиды, содержащие циклопропилфосфонат (cPrpN). 2'-модифицированные нуклеотиды (т. е. нуклеотид с группой, отличной от гидроксильной группы, в положении 2' пятичленного сахарного кольца) включают, но не ограничиваются ими, 2'-0-метилнуклеотиды (представленные здесь как строчная буква «n» в нуклеотидной последовательности), 2'-дезокси-2'-фторнуклеотиды (представленные здесь как Nf, также представленные здесь как 2'-фторнуклеотиды), 2'-дезокси-2'-фторнуклеотиды (представленные здесь как dN), 2'-метоксиэтил(2'-0-2-метоксиэтил)нуклеотиды (представленные здесь как NM или 2'-МОЕ), 2'-аминонуклеотиды и 2'-алкилнуклеотиды. Нет необходимости, чтобы все положения в данном соединении были модифицированы одинаково. И наоборот, более чем одна модификация может быть включена в один РНКи-агент HBV или даже в один его нуклеотид. Смысловые цепи и антисмысловые цепи РНКи-агента HBV могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, известными в данной области. Модификация одного нуклеотида не зависит от модификации другого нуклеотида.

Модифицированные нуклеотидные основания включают синтетические и природные нуклеотидные основания, такие как 5-замещенные пиримиды, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и 0-6 замещенные пурины (например, 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил или 5-пропинилцитозин), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-алкил (например, 6-метил, 6-этил, 6-изопропил или 6-n-бутил) производные аденина и гуанина, 2-алкил (например, 2-метил, 2-этил, 2-изопропил или 2-n-бутил) и другие алкилпроизводные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин, 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил, цитозин, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 6-азоурацил, 6-азоцитозин, 6-азотимин, -урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-сульфгидрил, 8-тиоалкил, 8-гидрокси и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген (например, 5-бром), 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин, 7-деазааденин, 3-деазагуанин и 3-деазааденин. В некоторых вариантах осуществления все или по существу все нуклеотиды

РНКи-агента представляют собой модифицированные нуклеотиды. Используемый в настоящем описании РНК-агент, в котором по существу все присутствующие нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой РНК-агент, содержащий четыре или менее (т. е. 0, 1, 2, 3 или 4) нуклеотида как в смысловой цепи, так и в антисмысловой цепи, являющиеся рибонуклеотидами. В контексте настоящего документа смысловая цепь, в которой по существу все присутствующие нуклеотиды представляют собой модифицированные нуклеотиды, представляет собой смысловую цепь, имеющую два или менее (т. е. 0, 1 или 2) нуклеотида в смысловой цепи, являющихся рибонуклеотидами. Используемые в настоящем описании антисмысловая смысловая цепь, в которой по существу все присутствующие нуклеотиды представляют собой модифицированные нуклеотиды, представляет собой антисмысловую цепь, имеющую два или менее (т. е. 0, 1 или 2) нуклеотида в смысловой цепи, являющихся рибонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов РНК-агента представляют собой рибонуклеотиды.

Используемый в настоящем описании термин «сахарозамещающая группа» или «2'-замещающая группа» включает группы, присоединенные к 2'-положению рибофуранозильного остатка с атомом кислорода или без него. Группы заместителей сахара включают, но не ограничиваются ими, фтор, О-алкил, О-алкиламино, О-алкилалкокси, защищенный О-алкиламино, О-алкиламиноалкил, О-алкилимидазол и простые полиэфиры формулы (О-алкил) m , где m равно от 1 до приблизительно 10. Среди этих простых полиэфиров предпочтительными являются линейные и циклические полиэтиленигликоли (ПЭГ) и (ПЭГ)-содержащие группы, такие как краун-эфиры и, среди прочего, такие, которые раскрыты Delgado et al. (*Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* (1992) 9:249). Дополнительные модификации сахара раскрыты Cook (*Anti-fibrosis Drug Design*, (1991) 6:585-607). Замещение фтором, О-алкилом, О-алкиламино, О-алкилимидазолом, О-алкиламиноалкилом и алкиламино описано в Патенте США 6166197, озаглавленный «*Oligomeric Compounds having Pyrimidinc Nucleotide(s) with 2' and 5' Substitutions*», настоящим включенном в качестве ссылки в полном объеме.

Дополнительные группы заместителей сахара, подходящие для применения, включают группы 2'-SR и 2'-NR₂, где каждый R независимо представляет собой водород, защитную группу или замещенный или незамещенный алкил, алкенил или алкинил. Нуклеозиды 2'-SR раскрыты в US 5670633, настоящим включенном в качестве ссылки в полном объеме. Включение мономерных синтонов 2'-SR раскрыто Hamm et al. (*J. Org. Chem.*, (1997) 62:3415-3420). Нуклеозиды 2'-NR раскрыты Thomson JB, *J. Org. Chem.*, (1996) 61:6273-6281; и Polushin et al., *Tetrahedron Lett.*, (1996) 37:3227-3230. Дополнительные репрезентативные 2'-заместители, подходящие для применения, включают группы, имеющие одну из формул I или II:



где

E представляет собой C₁-C₁₀-алкил, N(Q3)(Q4) или C(Q3)(Q4); каждый Q3 и Q4 независимо представляет собой H, C₁-C₁₀-алкил, диалкиламиноалкил, защитную группу для азота, связанную или несвязанную конъюгатную группу, линкер для твердой подложки; или Q3 и Q4 вместе образуют защитную группу азота или структуру кольца, необязательно включающую по меньшей мере один дополнительный гетероатом, выбранный из N и O;

q1 представляет собой целое число от 1 до 10;

q2 представляет собой целое число от 1 до 10;

q3 равно 0 или 1;

q4 равно 0, 1 или 2;

каждый Z1, Z2 и Z3 независимо представляет собой C₄-C₇-циклоалкил, C₅-C₁₄-арил или C₃-C₁₅-гетероциклил, где гетероатом в указанной гетероциклильной группе выбран из кислорода, азота и серы;

Z4 представляет собой OM1, SM1 или N(M1)₂; каждый M1 независимо представляет собой H, C₁-C₈-алкил, C₁-C₈-галогеналкил, C(=NH)N(H)M2, C(=O)N(H)M2 или OC(=O)N(H)M2; M2 представляет собой H или C₁-C₈-алкил; и

Z5 представляет собой C₁-C₁₀-алкил, C₁-C₀-галогеналкил, C₂-C₁₀-алкенил, C₂-C₁₀-алкинил, C₆-C₁₄-арил, N(Q3)(Q4), OQ3, галоген, SQ3 или CN.

Репрезентативные группы заместителей 2'-О-сахара формулы I раскрыты в US 6172209, озаглавленном «Capped 2'-Oxyethoxy Oligonucleotides», настоящим включенном в качестве ссылки в полном объеме. Репрезентативные циклические группы заместителей 2'-О-сахара формулы II раскрыты в US 6271358, озаглавленном «RNA Targeted 2'-Modified Oligonucleotides that are Conformationally Preorganized», настоящим включенном в качестве ссылки в полном объеме.

Сахара, имеющие O-заместители в рибозильном кольце, также пригодны для применения. Репрезентативные замены кольца O включают, но не ограничиваются ими, S, CH₂, CHF и CF₂.

Олигонуклеотиды могут также иметь миметики сахара, такие как циклобутильные фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара. Репрезентативные патенты США, относящиеся к получению таких модифицированных сахаров, включают, но не ограничиваются ими, US 5359044, US 5466786, US 5519134, US 5591722, US 5597909, US

5646,265 и US 5700920, каждый из которых настоящим включен в качестве ссылки в полном объеме.

Модифицированные межнуклеозидные связи

В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов РНК-агента HBV связаны нестандартными связями или остовами (т. е. модифицированными межнуклеозидными связями или модифицированными остовами). В некоторых вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой не содержащую фосфат ковалентную межнуклеозидную связь. Модифицированные межнуклеозидные связи или остовы включают, но не ограничиваются ими, 5'-фосфоротиоатные группы (обозначенные здесь строчной буквой «s»), хиральные фосфоротиоаты, тиофосфаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, алкилфосфонаты (например, метилфосфонаты или 3'-алкиленфосфонаты), хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты (например, 3'-аминофосфорамидат, аминокилфосфорамидаты или тионофосфорамидаты), тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, морфолиновые связи, боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, 2'-5' связанные аналоги боранофосфатов или боранофосфатов с обратной полярностью, в которой соседние пары нуклеозидных звеньев связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. В некоторых вариантах осуществления в модифицированной межнуклеозидной связи или остове отсутствует атом фосфора. Модифицированные межнуклеозидные связи, в которых отсутствует атом фосфора, включают, но не ограничиваются ими, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные межсахарные связи, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные межсахарные связи или одну или более короткоцепочечных гетероатомных или гетероциклических межсахарных связей. В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеозидные остовы включают, но не ограничиваются ими, силоксановые остовы, сульфидные остовы, сульфоксидные остовы, сульфоновые остовы, формацетильные и тиоформацетильные остовы, метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы, алкенсодержащие остовы, сульфаматные остовы, метиленимино- и метиленигидразино- остовы, сульфонатные и сульфонамидные остовы, амидные остовы и другие остовы, содержащие смешанные компоненты N, O, S и CH₂.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь РНК-агента HBV может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 тиофосфатных связей, антисмысловая цепь РНК-агента HBV может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 тиофосфатных связей, или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь независимо могут содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 тиофосфатных связей. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента РНК-и HBV может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатных связи, антисмысловая цепь агента РНК-и HBV может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатных связи или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь независимо могут содержать 1, 2, 3 или 4 тиофосфатных связи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь РНК-агента HBV содержит по

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

В некоторых вариантах осуществления РНК-агент HBV содержит один или более модифицированных нуклеотидов и одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид комбинируют с модифицированной межнуклеозидной связью.

Химические модификации

РНК-агенты согласно настоящей заявке также могут быть химически модифицированы для повышения стабильности. Нуклеиновые кислоты согласно заявке могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, хорошо известными в данной области. Химические модификации могут включать, помимо прочего, 2'-модификации, введение неприродных оснований, ковалентное присоединение к лиганду и замену фосфатных связей на тиофосфатные связи, инвертированные дезокситимидины. В этом варианте осуществления целостность дуплексной структуры усиливается по меньшей мере одной, а предпочтительно двумя химическими связями. Химическое связывание может быть достигнуто любым из множества хорошо известных способов, например путем введения ковалентных, ионных или водородных связей; гидрофобными взаимодействиями, ван-дер-ваальсовыми или стэкинг-взаимодействиями; за счет координации ионов металлов или за счет использования аналогов пуринов. Химические группы, которые можно использовать для модификации РНК-агентов, предпочтительно включают, без ограничения, метиленовый синий; бифункциональные группы, предпочтительно бис-(2-хлорэтил)амин; -ацетил-N⁷-(p-глиоксилбензоил)цистамин; 4-тиоурацил; и псорален. В одном предпочтительном варианте осуществления линкер представляет собой линкер на основе гексаэтиленгликоля. В этом случае РНК-агенты получают путем твердофазного синтеза, а линкер на основе гексаэтиленгликоля вводят в соответствии со стандартными способами (например, Williams DJ and Hall KB, *Biochem.* (1996) 35: 14665-14670). В конкретном варианте осуществления 5'-конец антисмысловой цепи и 3'-конец смысловой цепи химически связаны через линкер на основе гексаэтиленгликоля. В другом варианте осуществления по меньшей мере один нуклеотид РНК-агента содержит фосфоротиоатную или фосфородитиоатную группы. Химическая

связь на концах РНКи-агента предпочтительно образована связями тройной спирали.

РНКи-агенты HBV

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агенты HBV, раскрытые в настоящем описании, нацелены на ген HBV в положениях генома HBV или рядом с ними, как представлено на ФИГ. 7. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи-агента HBV, раскрытого в настоящем изобретении, включает коровую последовательность удлинения, которая полностью, по существу или, по меньшей мере, частично комплементарна последовательности 19-мера HBV-мишени, раскрытой на ФИГ. 7.

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV включает антисмысловую цепь, где положение 19 антисмысловой цепи (5' -> 3') способно образовывать пару оснований с положением 1 19-мерной последовательности-мишени, показанной на ФИГ. 7. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV включает антисмысловую цепь, где положение 1 антисмысловой цепи (5' -> 3') способно образовывать пару оснований с положением 19 19-мерной последовательности-мишени, показанной на ФИГ. 7. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV включает антисмысловую цепь, где положение 2 антисмысловой цепи (5' -> 3') способно образовывать пару оснований с положением 18 19-мерной последовательности-мишени, показанной на ФИГ. 7. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV включает антисмысловую цепь, где положения 2-18 антисмысловой цепи (5' -> 3') способны образовывать пары оснований с каждым из соответствующих комплементарных оснований, расположенных в положениях 18-2 19-мерной последовательности-мишени, показанной на ФИГ. 7.

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агенты HBV включают коровые 19-мерные нуклеотидные последовательности, показанные на ФИГ. 4-6 или 8. Смысловые цепи и антисмысловые цепи РНКи-агента HBV, которые содержат или состоят из нуклеотидных последовательностей на ФИГ. 4-6 или 8, могут быть модифицированными нуклеотидами или немодифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агенты HBV, имеющие последовательности смысловой и антисмысловой цепи, которые содержат или состоят из последовательностей нуклеотидов на ФИГ. 4-6 или 8, представляют собой все или по существу все модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь РНКи-агента HBV, описанная в настоящем изобретении, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловой цепи на ФИГ. 4-6 или 8. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь РНКи-агента HBV, описанного в настоящем изобретении, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей смысловой цепи на ФИГ. 4-6 или 8.

Модифицированные последовательности антисмысловых цепей РНКи-агента HBV, а также лежащие в их основе немодифицированные последовательности представлены на ФИГ. 6 и 9. Модифицированные последовательности смысловых цепей РНКи-агента HBV, а также лежащие в их основе немодифицированные последовательности

представлены на ФИГ. 6 и 10. При формировании РНки-агентов HBV каждый из нуклеотидов в каждой из немодифицированных последовательностей, перечисленных на ФИГ. 6 и 9-10, могут быть модифицированными нуклеотидами.

Используемый в настоящем описании (в том числе на ФИГ. 9-10), следующие обозначения используются для обозначения модифицированных нуклеотидов, целевых групп и связывающих групп. Специалисту в данной области легко понять, если иное не указано в последовательности, что, когда они присутствуют в олигонуклеотиде, мономеры взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями:

A=аденозин-3'-фосфат;

C=цитидин-3'-фосфат;

G=гуанозин-3'-фосфат;

U=уридин-3'-фосфат

n=любой 2'-ОМе-модифицированный нуклеотид

a=2'-0-метиладенозин-3'-фосфат

as=2'-0-метиладенозин-3'-фосфотиоат

c=2'-0-метилцитидин-3'-фосфат

cs=2'-0-метилцитидин-3'-фосфотиоат

g=2'-0-метилгуанозин-3'-фосфат

gs=2'-0-метилгуанозин-3'-фосфотиоат

t=2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат

ts=2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат

u=2'-0-метилуридин-3'-фосфат

us=2'-0-метилуридин-3'-фосфотиоат Nf=любой 2'-фтормодифицированный

нуклеотид

Af=2'-фтораденозин-3'-фосфат

Afs=2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат

Cf=2'-фторцитидин-3'-фосфат

Cfs=2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат

Gf=2'-фторгуанозин-3'-фосфат

Gfs=2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат

Tf=2'-фтор-5'-метилуридин-3'-фосфат

Tfs=2'-фтор-5'-метилуридин-3'-фосфотиоат

Uf=2'-фторуридин-3'-фосфат

Ufs=2'-фторуридин-3'-фосфотиоат

dN=любой 2'-дезоксирибонуклеотид

dT=2'-дезокситимидин-3'-фосфат

NuNA=миметики 2',3'-секонуклеотидов (разблокированные аналоги нуклеотидных оснований)

NLNA=заблокированный нуклеотид

NfANA=2'-F-арабинонуклеотид

NM=2'-метоксиэтилнуклеотид

AM=2'-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат

AMs=2'-метоксиэтиладенозин-3'-фосфотиоат

TM=2'-метоксиэтилтимидин-3'-фосфат

TMs=2'-метоксиэтилтимидин-3'-фосфотиоат

R=рибитол

(invdN)=любой инвертированный дезоксирибонуклеотид (3'-3' связанный нуклеотид)

(invAb)=инвертированный (3'-3' связанный) неосновной дезоксирибонуклеотид, см.

Таблицу

(invAb)s=инвертированный (3'-3' связанный), лишенный азотистых оснований дезоксирибонуклеотид-5'-фосфотиоат, см. Таблицу 6

(invn)=любой инвертированный нуклеотид 2'-ОМе (3'-3' связанный нуклеотид) s=фосфоротиоатная связь

vpdN=дезоксирибонуклеотид винилфосфонат

(5Me-Nf)=5'-Ме, 2'-фторнуклеотид

cPrp=циклопропилфосфонат, см. таблицу 6 WO 2018027106.

erTcPr=см. таблицу 6 WO2018027106.

erTM=см. таблицу 6 WO2018027106.

Специалисту или среднему специалисту в данной области будет легко понять, что терминальный нуклеотид на 3'-конце данной олигонуклеотидной последовательности обычно имеет гидроксильную (-OH) группу в соответствующем 3'-положении данного мономера вместо фосфатной группы *ex vivo*.

Нацеливающие группы и связывающие группы включают следующие группы, химические структуры которых представлены ниже в Таблице 6 WO 2018027106, а некоторые из них представлены в таблице 10 (Фиг. 12): (PAZ), (NAG13), (NAG13)s, (NAG18), (NAG18)s, (NAG24), (NAG24)s, (NAG25), (NAG25)s, (NAG26), (NAG26)s, (NAG27), (NAG27)s, (NAG28), (NAG28)s, (NAG29), (NAG29)s, (NAG30), (NAG30)s, (NAG31), (NAG31)s, (NAG32), (NAG32)s, (NAG33), (NAG33)s, (NAG34), (NAG34)s, (NAG35), (NAG35)s, (NAG36), (NAG36)s, (NAG37), (NAG37)s, (NAG38), (NAG38)s, (NAG39), (NAG39)s. Каждая смысловая цепь и/или антисмысловая цепь может иметь любые нацеливающие группы или связывающие группы, перечисленные выше, а также другие нацеливающие группы или связывающие группы, конъюгированные с 5'- и/или 3'-концом последовательности.

РНКи-агенты HBV, описанные в настоящем изобретении, образуются путем отжига антисмысловой цепи со смысловой цепью. Репрезентативные пары последовательностей иллюстрируются идентификационными номерами дуплексов (Duplex ID No), показанными на ФИГ. 11.

Для РНКи-агентов HBV, описанных в настоящем изобретении, нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (от 5'-конца к 3'-концу) может быть полностью

комплементарным гену HBV или может быть некомплементарным гену HBV. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (от 5'-конца к 3'-концу) представляет собой U, A или dT. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (от 5'-конца -> 3'-концу) образует пару оснований A:U или U:A со смысловой цепью.

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, имеющую модифицированные нуклеотидные последовательности любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи и/или смысловой цепи любого из дуплексов, описанных в настоящем изобретении, и дополнительно содержит нацеливающую группу лиганда для рецептора асиалогликопротеина.

РНКи-агенты для ингибирования экспрессии гена HBV известны в данной области. Например, РНКи-агенты для ингибирования экспрессии гена HBV включают, но не ограничиваются ими, РНКи-агенты для ингибирования экспрессии гена HBV, описанные в US 20130005793, WO2013003520 и WO2018027106, содержание которых включено в настоящее описание в полном объеме.

Примеры РНКи-агентов для ингибирования экспрессии гена HBV включают, например, РНКи-агенты, содержащие одну из последовательностей в Таблицах 1, 2 и 4 из US 20130005793 (воспроизведенных здесь в виде таблиц 2-4 (ФИГ. 4-6) или в таблицах 1-5 из WO 2018027106 (воспроизведенных здесь в виде Таблиц 5-9 (ФИГ. 7-11)).

Примеры РНКи-агентов для ингибирования экспрессии гена HBV включают, например, РНКи-агенты, содержащие дуплекс, представленный в Таблице 9. В соответствии с конкретными вариантами осуществления РНКи-агент содержит по меньшей мере один из дуплексов AD04872 (SEQ ID NO: 25-26 в настоящем описании) (AM06282-AS (SEQ ID NO: 126 и 171) и AM06288-SS (SEQ ID NO: 252 и 302) из WO2018027106) и AD05070 (SEQ ID NO: 27-28 в настоящем описании) (AM06606-AS (SEQ ID NO: 140 и 188) и AM06605-SS (SEQ ID NO: 262 и 328) из WO 2018027106), каждый из которых конъюгирован с нацеливающим лигандом, таким как один из лигандов, имеющих структуру, изображенную в Таблице 10, например, NAG37.

Нацеливающие группы, связывающие группы и носители для доставки

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV конъюгирован с одной или более ненуклеотидными группами, включая, помимо прочего, нацеливающую группу, связывающую группу, полимер для доставки или носитель для доставки. Ненуклеотидная группа может усиливать нацеливание, доставку или присоединение РНКи-агента. Примеры нацеливающих групп и связывающих групп представлены в Таблице 6 WO 2018027106. Ненуклеотидная группа может быть ковалентно связана с 3'- и/или 5'-концом как смысловой цепи, так и/или антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент HBV содержит ненуклеотидную группу, связанную с 3'- и/или 5'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления ненуклеотидная группа связана с 5'-концом смысловой цепи РНКи-агента HBV. Ненуклеотидная группа

может быть связана прямо или косвенно с РНКи-агентом через линкер/связывающую группу. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа связана с РНКи-агентом посредством лабильной, расщепляемой или обратимой связи или линкера.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа усиливает фармакокинетические или биораспределительные свойства РНКи-агента или конъюгата, к которому она присоединена, для улучшения клеточно- или ткане-специфического распределения и клеточно-специфического поглощения конъюгата. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа усиливает эндоцитоз РНКи-агента.

Нацеливающие группы или нацеливающие фрагменты улучшают фармакокинетические или биораспределительные свойства конъюгата, к которому они присоединены, для улучшения клеточно-специфического распределения и клеточно-специфического поглощения конъюгата. Нацеливающая группа может быть одновалентной, двухвалентной, трехвалентной, четырехвалентной или имеет более высокую валентность. Репрезентативные нацеливающие группы включают, без ограничения, соединения с аффинностью к молекуле клеточной поверхности, лиганды клеточного рецептора, гаптен, антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител и миметики антител с аффинностью к молекулам клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа связана с РНКи-агентом с использованием линкера, такого как линкер ПЭГ, или одной, двух или трех групп, лишенных азотистых оснований, и/или групп рибитола (рибозы, лишенной азотистого основания). В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа содержит кластер производных галактозы. РНКи-агенты HBV, описанные в настоящем изобретении, могут быть синтезированы с реакционноспособной группой, такой как аминогруппа, на 5'-конце. Реакционноспособную группу можно использовать для последующего присоединения нацеливающего фрагмента с использованием способов, типичных в данной области. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа содержит лиганд асиалогликопротеинового рецептора. В некоторых вариантах осуществления лиганд асиалогликопротеинового рецептора включает одно или более производных галактозы или состоит из них. Используемый в настоящем описании термин «производное галактозы» включает как галактозу, так и производные галактозы, имеющие аффинность к асиалогликопротеиновому рецептору, равную или превышающую аффинность галактозы. Производные галактозы включают, но не ограничиваются ими: галактозу, галактозамин, N-формилгалактозамин, N-ацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-н-бутаноилгалактозамин и N-изобутаноилгалактозамин (см., например: Iobst, S.T. and Drickamer, K. J.B.C. 1996, 277, 6686). Производные галактозы и кластеры производных галактозы, которые применимы для доставки *in vivo* олигонуклеотидов и других молекул в печень, известны в данной области (см., например, Baenziger and Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, J. Biol. Chem, 257, 939-945). Производные галактозы использовались для нацеливания молекул на гепатоциты *in vivo* посредством их связывания с асиалогликопротеиновым рецептором (ASGPr), экспрессируемым на

поверхности гепатоцитов. Связывание лигандов ASGPr с ASGPr(s) облегчает клеточно-специфическое нацеливание на гепатоциты и эндоцитоз молекулы в гепатоцитах. Лиганды ASGPr могут быть мономерными (например, имеющими одно производное галактозы) или мультимерными (например, имеющими несколько производных галактозы). Производное галактозы или кластер производных галактозы можно присоединить к 3- или 5'-концу полинуклеотида РНКи с использованием способов, известных в данной области. Получение нацеливающих групп, таких как кластеры производных галактозы, описано, например, в US 20180064819 и US 20170253875, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Используемый в настоящем описании кластер производных галактозы включает молекулу, имеющую от двух до четырех концевых производных галактозы. Терминальное производное галактозы присоединено к молекуле через ее углерод С-1. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы представляет собой тример производного галактозы (также называемый триантенным производным галактозы или трехвалентным производным галактозы). В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы содержит N-ацетилгалактозамина. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы содержит три N-ацетилгалактозамина. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы представляет собой тетрамер производного галактозы (также называемый тетраантенным производным галактозы или четырехвалентным производным галактозы). В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы содержит четыре N-ацетилгалактозамина.

Используемый в настоящем описании тример производного галактозы содержит три производных галактозы, каждое из которых связано с центральной точкой ветвления. Используемый в настоящем описании тетрамер производного галактозы содержит четыре производных галактозы, каждое из которых связано с центральной точкой ветвления. Производные галактозы могут быть присоединены к центральной точке ветвления через атомы углерода С-1 сахаридов. В некоторых вариантах осуществления производные галактозы связаны с точкой ветвления через линкеры или спейсеры. В некоторых вариантах осуществления линкер или спейсер представляет собой гибкий гидрофильный спейсер, такой как группа ПЭГ (см., например, патент США No. 5885968; Biessen et al. *J. Med. Chem.* 1995 Vol. 39 p. 1538-1546). В некоторых вариантах осуществления спейсер PEG представляет собой спейсер PEG3. Точка ветвления может представлять собой любую небольшую молекулу, которая позволяет присоединить три производных галактозы и, кроме того, позволяет присоединить точку ветвления к РНКи-агенту. Примером группы точки ветвления является дилизин или диглутамат. Присоединение точки ветвления к РНКи-агенту может происходить через линкер или спейсер. В некоторых вариантах осуществления линкер или спейсер содержит гибкий гидрофильный спейсер, такой как, но не ограничиваясь этим, ПЭГ-спейсер. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит жесткий линкер, такой как циклическая группа. В некоторых вариантах осуществления производное галактозы содержит или состоит из N-

ацетилгалактозамина. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы состоит из тетрамера производного галактозы, который может представлять собой, например, тетрамер N-ацетилгалактозамина.

В некоторых вариантах осуществления связывающая группа конъюгирована с РНКи-агентом. Связывающая группа облегчает ковалентное связывание агента с нацеливающей группой или полимером для доставки или носителем для доставки. Связывающая группа может быть связана с 3'- или 5'-концом смысловой цепи или антисмысловой цепи РНКи-агента. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа связана со смысловой цепью РНКи-агента. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа конъюгирована с 5'- или 3'-концом смысловой цепи РНКи-агента. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа конъюгирована с 5'-концом смысловой цепи РНКи-агента. Примеры связывающих групп включают, но не ограничиваются ими: реакционноспособные группы, такие как первичные амины и алкины, алкильные группы, нуклеозиды, лишенные азотистого основания, рибит (рибоза, лишенная азотистого основания) и/или группы ПЭГ.

Линкер или связывающая группа представляет собой соединение между двумя атомами, которое связывает одну химическую группу (такую как РНКи-агент) или интересующий сегмент с другой химической группой (такой как нацеливающая группа или полимер для доставки) или интересующим сегментом посредством одной или более ковалентных связей. Лабильное соединение содержит лабильную связь. Связь необязательно может включать спейсер, который увеличивает расстояние между двумя соединенными атомами. Спейсер может дополнительно увеличить гибкость и/или длину соединения. Спейсеры могут включать, но не ограничиваясь этим, алкильные группы, алкенильные группы, алкинильные группы, арильные группы, аралкильные группы, аралкенильные группы и аралкинильные группы; каждая из которых может содержать один или более гетероатомов, гетероциклов, аминокислот, нуклеотидов и сахаридов. Спейсерные группы хорошо известны в данной области техники, и приведенный выше список не предназначен для ограничения объема описания.

Средства доставки

В некоторых вариантах осуществления средство доставки можно использовать для доставки РНКи-агента в клетку или ткань. Средство доставки представляет собой соединение, улучшающее доставку РНКи-агента в клетку или ткань. Средство доставки может включать или состоять из полимера, такого как амфипатический полимер, мембраноактивный полимер, пептид, мелиттиновый пептид, мелиттиноподобный пептид (MLP), липид, обратимо модифицированный полимер или пептид, или обратимо модифицированный мембраноактивный полиамин.

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агенты можно комбинировать с липидами, наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, DPC или другими системами доставки, доступными в данной области. РНКи-агенты также могут быть химически конъюгированы с группами-мишенями, липидами (включая, но не

ограничиваясь ими, холестерин и производные холестерина), наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, DPC (см., например, WO 2000/053722, WO 2008/0022309, WO 2011/104169 и WO 2012/083185, WO 2013/032829, WO 2013/158141, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки), или другие системы доставки, доступные в данной области техники.

Другие липофильные соединения, которые были конъюгированы с олигонуклеотидами, включают 1-пиренбутановую кислоту, 1,3-бис-О-(гексадецил)глицерин и ментол. Одним примером лиганда для рецептор-опосредованного эндоцитоза является фолиевая кислота. Фолиевая кислота проникает в клетку посредством эндоцитоза, опосредованного рецепторами фолиевой кислоты. РНКи-агенты, несущие фолиевую кислоту, будут эффективно транспортироваться в клетку посредством эндоцитоза, опосредованного рецептором фолиевой кислоты. Присоединение фолиевой кислоты к 3'-концу олигонуклеотида приводит к увеличению поглощения олигонуклеотида клетками (Li S, Deshmukh HM and Huang L, *Pharm. Res.* (1998) 15: 1540). Другие лиганды, которые были конъюгированы с олигонуклеотидами, включают полиэтиленгликоли, кластеры углеводов, сшивающие агенты, конъюгаты порфирина и пептиды доставки. В некоторых случаях конъюгация катионного лиганда с олигонуклеотидами часто приводит к повышению устойчивости к нуклеазам. Репрезентативными примерами катионных лигандов являются пропиламмоний и диметилпропиламмоний. Интересно, что антисмысловые олигонуклеотиды, как сообщалось, сохраняли свою высокую аффинность связывания с мРНК, когда катионный лиганд был диспергирован по всему олигонуклеотиду. См. Manoharan M, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* (2002) 12:103 и ссылки там.

Дополнительные модификации также могут быть сделаны в других положениях олигонуклеотида, в частности, в 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеотиде. Например, одна дополнительная модификация конъюгированных с лигандом олигонуклеотидов согласно заявке включает химическое связывание с олигонуклеотидом одного или более дополнительных фрагментов, не относящихся к лигандам, или конъюгатов, которые усиливают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение олигонуклеотида. Такие фрагменты включают, но не ограничиваются ими, липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1989) 86:6553), холевая кислота (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (1994) 4:1053), тиоэфир, например, гексил-S-третилтиол (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), алифатическая цепь, например, додекандиол или ундецильные 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, дигексадецил-гас-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-гас-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, (1995) 36:3651; Shea et al., *Nucl Acids Res.*, (1990) 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля

(Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, (1995) 14:969) или адамантануксусная кислота (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, (1995) 36:3651), пальмитильный фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, (1995) 1264:229), или фрагмент октадециламина или гексиламинокарбонилкохлестерина (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1996) 277:923).

Дополнительные модификации также могут быть сделаны в других положениях олигонуклеотида, в частности, в 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеотиде. Например, одна дополнительная модификация конъюгированных с лигандом олигонуклеотидов согласно заявке включает химическое связывание с олигонуклеотидом одного или более дополнительных фрагментов, не относящихся к лигандам, или конъюгатов, которые усиливают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение олигонуклеотида. Такие фрагменты включают, но не ограничиваются ими, липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1989) 86:6553), холевая кислота (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (1994) 4:1053), тиоэфир, например, гексил-S-третилтиол (Manoharan et al., *Ann. N Y. Acad. Sci.*, (1992) 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (1993) 3:2765), тиохлестерин (Oberhauser et al., *Nucl Acids Res.*, (1992) 20:533), алифатическая цепь, например, додекандиол или ундецильные 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, дигексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, (1995) 36:3651; Shea et al., *Nucl Acids Res.*, (1990) 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, (1995) 14:969) или адамантануксусная кислота (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, (1995) 36:3651), пальмитильный фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, (1995) 1264:229), или фрагмент октадециламина или гексиламинокарбонилкохлестерина (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1996) 277:923).

Заявка также включает композиции, в которых используются олигонуклеотиды, которые являются по существу хирально чистыми в отношении конкретных положений внутри олигонуклеотидов.

Примеры по существу хирально чистых олигонуклеотидов включают, но не ограничиваются ими, олигонуклеотиды, имеющие фосфоротиоатные связи, которые составляют по меньшей мере 75% Sp или Rp (Cook et al., US 5587361), и олигонуклеотиды, содержащие по существу хирально чистые (Sp или Rp) алкилфосфонатные, фосфорамидатные или фосфотриэфирные связи (Cook, US 5212295 и US 5521302).

В некоторых случаях олигонуклеотид может быть модифицирован группой, не относящейся к лиганду. Ряд молекул, не относящихся к лиганду, был конъюгирован с олигонуклеотидами для повышения активности, клеточного распределения или клеточного поглощения олигонуклеотида, и процедуры для выполнения таких

конъюгаций доступны в научной литературе. Такие фрагменты, не относящиеся к лиганду, включают липидные фрагменты, такие как холестерин (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989) 86:6553), холевая кислота (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., (1994, 4: 1053), тиоэфир, например, гексил-S-третилтиол (Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci, (1992, 660:306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., (1993, 3:2765), тиохолестерол (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., (1992, 20:533), алифатическую цепь, например, додекандиоловые или ундецильные 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 триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., (1995) 36:3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., (1990) 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, (1995) 14:969) или адамантануксусную кислота (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., (1995) 36:3651), пальмитильную группу (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, (1995) 1264:229), или фрагмент октадециламина или гексиламинокарбонилкохолестерина (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., (1996) 277:923). Типичные протоколы конъюгации включают синтез олигонуклеотидов, несущих аминоклипер в одном или более положениях последовательности. Затем аминоклипер вступает в реакцию с конъюгируемой молекулой с использованием соответствующих связывающих или активирующих реагентов. Реакцию конъюгации можно проводить либо с олигонуклеотидом, все еще связанным с твердой подложкой, либо после расщепления олигонуклеотида в фазе раствора. Очистка конъюгата олигонуклеотидов с помощью ВЭЖХ обычно дает чистый конъюгат.

Альтернативно, конъюгируемая молекула может быть преобразована в строительный блок, такой как фосфорамидит, посредством спиртовой группы, присутствующей в молекуле, или путем присоединения клипера, несущего спиртовую группу, которая может быть фосфорилирована. Важно отметить, что каждый из этих подходов может быть использован для синтеза олигонуклеотидов, конъюгированных с лигандом. Амино-связанные олигонуклеотиды могут быть соединены непосредственно с лигандом с помощью связывающих реагентов или после активации лиганда в виде NHS или сложного пентафторфенолового эфира. Лигандные фосфорамидиты могут быть синтезированы путем присоединения клипера аминоксанола к одной из карбоксильных групп с последующим фосфитилированием концевой спиртовой функциональной группы. Другие клиперы, такие как цистеамин, также можно использовать для конъюгации с хлорацетильным клипером, присутствующим на синтезированном олигонуклеотиде.

Специалисту в данной области хорошо известны способы введения молекул настоящей заявки в клетки, ткани или организмы. Соответствующие примеры также были предоставлены в подробном описании заявки выше. Например, молекулы нуклеиновой кислоты или векторы настоящей заявки, кодирующие по меньшей мере одну цепь описанных РНК-агентов, могут быть введены в клетки или ткани способами, известными в данной области, такими как трансфекции и т. д.

Также для введения РНКи-агентов были предложены средства и способы. Например, направленная доставка гликозилированными и модифицированными фолатами молекулами, в том числе с использованием полимерных носителей с лигандами, такими как галактоза и лактоза, или присоединение фолиевой кислоты к различным макромолекулам позволяет связывание молекул, подлежащих доставке к фолатным рецепторам. Известна направленная доставка пептидами и белками, отличными от антител, например, включая RGD-модифицированные наночастицы для доставки киРНК *in vivo* или многокомпонентные (невирусные) системы доставки, включающие короткие циклодекстрины, адамантин-ПЭГ. Тем не менее, предложена также направленная доставка с использованием антител или фрагментов антител, включая (моновалентные) Fab-фрагменты антитела (или другие фрагменты такого антитела) или одноцепочечные антитела. Инъекционные подходы для целенаправленной доставки включают, среди прочего, гидрадинамическую внутривенную инъекцию. Кроме того, холестеринные конъюгаты РНКи-агентов могут быть использованы для направленной доставки, при этом конъюгация с липофильными группами усиливает поглощение клетками и улучшает фармакокинетику и биораспределение олигонуклеотидов в тканях. Также известны катионные системы доставки, посредством которых синтетические векторы с суммарным положительным (катионным) зарядом облегчают образование комплекса с полианионной нуклеиновой кислотой и взаимодействие с отрицательно заряженной клеточной мембраной. Такие катионные системы доставки включают также катионные липосомные системы доставки, катионные полимерные и пептидные системы доставки. Другими системами доставки для клеточного поглощения дцРНК/киРНК являются аптамер-дц/киРНК. Кроме того, подходы генной терапии могут быть использованы для доставки описанных РНКи-агентов или молекул нуклеиновых кислот, кодирующих их. Такие системы включают использование непатогенных вирусов, модифицированных вирусных векторов, а также доставки с помощью наночастиц или липосом. Другими способами доставки для клеточного поглощения РНКи-агентов являются экстракорпоральные, например, обработка клеток, органов или тканей *ex vivo*. Некоторые из этих технологий описаны и обобщены в таких публикациях, как Akhtar, *Journal of Clinical Investigation* (2007) 117:3623-3632, Nguyen et al, *Current Opinion in Molecular Therapeutics* (2008) 10: 158-167, Zamboni, *Clin. Cancer Res* (2005) 11:8230-8234 или Ikeda et al., *Pharmaceutical Research* (2006) 23:1631-1640.

Способы получения и применения РНКи-агентов и их конъюгатов известны в данной области. Любые такие известные способы могут быть использованы в контексте настоящей заявки для получения и применения РНКи-агентов и их конъюгатов для ингибирования экспрессии гена HBV. Способы изготовления и использования РНКи-агентов и их конъюгатов описаны, например, в US20130005793, WO2013003520, WO2018027106, US5218105, US5541307, US5521302, US5539082, US5554746, US5571902, US5578718, US5587361, US5506351, US5587469, US5587470, US5608046, US5610289, US6262241, WO 9307883, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве

ссылки в полном объеме.

Композиции, терапевтические комбинации и вакцины

Заявка также относится к композициям, терапевтическим комбинациям, более конкретно к наборам и вакцинам, содержащим один или более антигенов HBV, полинуклеотидов и/или векторов, кодирующих один или более антигенов HBV в соответствии с заявкой, и/или один или более РНК-агентов для ингибирования экспрессии гена HBV. В композициях можно использовать любой из антигенов HBV, полинуклеотидов (включая РНК и ДНК) и/или векторов согласно заявке, описанных в настоящем изобретении, и любой из РНК-агентов для ингибирования экспрессии гена HBV согласно заявке, описанных в настоящем изобретении, терапевтические комбинации или наборы и вакцины согласно заявке.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) или молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, или антиген полимеразы HBV, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, и/или выделенный полипептид или полипептид неприродного происхождения, кодируемый выделенной молекулой нуклеиновой кислоты или молекулой нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК), содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pol HBV, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК), кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК), содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и

выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК), содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pol HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 7. Кодирующие последовательности для укороченного корового антигена HBV и антигена Pol HBV могут присутствовать в одной и той же выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или молекуле нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК) или в двух разных выделенных молекулах нуклеиновой кислоты или молекулах нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК).

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит вектор, предпочтительно ДНК-плазмиду или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит вектор, предпочтительно ДНК-плазмиду или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий антиген Pol HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит вектор, предпочтительно ДНК-плазмиду или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и вектор, предпочтительно ДНК-плазмиду или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий антиген Pol HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 7. Вектор, содержащий кодирующую последовательность укороченного корового антигена HBV, и вектор, содержащий кодирующую последовательность антигена Pol HBV, могут быть одним и тем же вектором или двумя разными векторами.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит вектор, предпочтительно ДНК-плазмиду или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий слитый белок, содержащий укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, функционально связанный с антигеном Pol HBV, содержащим аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%

идентичную SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 7 или наоборот. Предпочтительно слитый белок дополнительно содержит линкер, который функционально связывает укороченный коровый антиген HBV с антигеном Pol HBV или наоборот. Предпочтительно линкер имеет аминокислотную последовательность (AlaGly) n , где n представляет собой целое число от 2 до 5.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенный укороченный коровый антиген HBV или укороченный коровый антиген HBV неприродного происхождения, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенный антиген Pol HBV или антиген Pol HBV неприродного происхождения, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенный укороченный коровый антиген HBV или укороченный коровый антиген HBV неприродного происхождения, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и выделенный антиген Pol HBV или антиген Pol HBV неприродного происхождения, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенный слитый белок или слитый белок неприродного происхождения, содержащий укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14., предпочтительно на 100% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, функционально связанный с антигеном Pol HBV, содержащим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 7 или наоборот. Предпочтительно слитый белок дополнительно содержит линкер, который функционально связывает укороченный коровый антиген HBV с антигеном Pol HBV или наоборот. Предпочтительно линкер имеет аминокислотную последовательность (AlaGly) n , где n представляет собой целое число от 2 до 5.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, такой как агент, описанный в US 20130005793, WO 2013003520 или WO 2018027106.

Заявка также относится к терапевтической комбинации или набору, содержащему полинуклеотиды, экспрессирующие укороченный коровый антиген HBV и антиген pol HBV согласно вариантам осуществления заявки, и/или РНКи-агенты для ингибирования экспрессии гена HBV согласно вариантам осуществления заявки. Любые полинуклеотиды

и/или векторы, кодирующие коровый и рол-антигены HBV согласно заявке, описанные в настоящем изобретении, можно использовать в терапевтических комбинациях или наборах согласно заявке, и любые РНКи-агенты для ингибирования экспрессии гена HBV согласно заявке, описанные в настоящем изобретении, можно использовать в терапевтических комбинациях или наборах согласно заявке.

В соответствии с вариантами осуществления заявки терапевтическая комбинация или набор для применения лечения инфекции HBV у пациента, содержит:

i) по меньшей мере одно из следующего:

a) укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95% идентичной SEQ ID NO: 2, и

b) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV

c) антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H, и

d) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV; и

ii) РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, такой как те, которые описаны в настоящем изобретении.

В конкретном варианте осуществления заявки терапевтическая комбинация или набор содержит: i) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична до SEQ ID NO: 2; ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не имеет активности обратной транскриптазы и активности РНКазы H; и iii) РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, предпочтительно РНКи-агент содержит дуплекс, представленный в Таблице 9, более предпочтительно РНКи-агент содержит по меньшей мере один из дуплексов AD04872 (SEQ ID NO: 25-26) и AD05070 (SEQ ID NO: 27-28), каждый из которых конъюгирован с нацеливающим лигандом, таким как лиганд, имеющий структуру, представленную в Таблице 10, например, NAG37.

Согласно вариантам осуществления заявки полинуклеотиды в вакцинной комбинации или наборе могут быть связаны или разделены, так что антигены HBV, экспрессируемые такими полинуклеотидами, сливаются вместе или продуцируются в виде отдельных белков, независимо от того, экспрессируются ли они одним и тем же или разными полинуклеотидами. В одном варианте осуществления первый и второй

полинуклеотиды присутствуют в отдельных векторах, например, ДНК-плазмидах или вирусных векторах, используемых в комбинации либо в одной и той же, либо в отдельных композициях, так что экспрессируемые белки также являются отдельными белками, но используются в комбинации. В другом варианте осуществления антигена HBV, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут экспрессироваться из одного и того же вектора, так что получается слитый антиген core-pol HBV. Необязательно антигены core и pol могут быть соединены или слиты друг с другом с помощью короткого линкера. Альтернативно, антигены HBV, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут экспрессироваться независимо из одного вектора с использованием сайта проскальзывания рибосомы (также известного как сайт цис-гидролазы) между последовательностями, кодирующими коровый антиген и антиген pol. Эта стратегия приводит к бицистронному экспрессирующему вектору, в котором отдельные коровый и pol-антигены продуцируются из одного транскрипта мРНК. Коровый и pol-антигены, полученные из такого бицистронного экспрессирующего вектора, могут иметь дополнительные N- или C-концевые остатки в зависимости от порядка расположения кодирующих последовательностей в транскрипте мРНК. Примеры сайтов проскальзывания рибосом, которые можно использовать для этой цели, включают, но не ограничиваются ими, сайт проскальзывания FA2 из вируса ящура (FMDV). Другая возможность состоит в том, что антигены HBV, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут экспрессироваться независимо из двух отдельных векторов, один из которых кодирует коровый антиген HBV, а другой кодирует антиген pol HBV.

В предпочтительном варианте осуществления первый и второй полинуклеотиды присутствуют в отдельных векторах, например, ДНК-плазмидах или вирусных векторах. Предпочтительно отдельные векторы присутствуют в одной и той же композиции.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления заявка терапевтическая комбинация или набор содержит первый полинуклеотид, присутствующий в первом векторе, второй полинуклеотид, присутствующий во втором векторе. Первый и второй векторы могут быть одинаковыми или разными. Предпочтительно векторы представляют собой ДНК-плазмиды.

В конкретном варианте осуществления заявки первый вектор представляет собой первую ДНК-плазмиду, второй вектор представляет собой вторую ДНК-плазмиду. Каждая из первой и второй ДНК-плазмид содержит последовательность начала репликации, предпочтительно pUC ORI с SEQ ID NO: 21, и кассету устойчивости к антибиотикам, предпочтительно содержащую кодон-оптимизированный ген Kanr, имеющий полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 23, предпочтительно под контролем промотора bla, например промотора bla последовательности SEQ ID NO: 24. Каждая из первой и второй ДНК-плазмид независимо дополнительно содержит по меньшей мере одну из промоторной последовательности, энхансерной последовательности и полинуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность сигнального пептида, функционально связанную с первой

полинуклеотидной последовательностью или второй полинуклеотидной последовательностью. Предпочтительно каждая из первой и второй ДНК-плазмид содержит 5'-последовательность, функционально связанную с первым полинуклеотидом или вторым полинуклеотидом, где 5'-последовательность содержит от 5'-конца к 3'-конца промоторную последовательность SEQ ID NO: 18 или 19, энхансерную последовательность и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 15. Каждая из первой и второй ДНК-плазмиды может также содержать сигнал полиаденилирования, расположенный в 3'-области от кодирующей последовательности антигена HBV, такой как сигнал полиаденилирования bGH SEQ ID NO: 20.

В одном конкретном варианте осуществления заявки первый вектор представляет собой вирусный вектор, и второй вектор представляет собой вирусный вектор. Предпочтительно каждый из вирусных векторов представляет собой аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35, содержащий экспрессирующую кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий антиген pol HBV или укороченный коровый антиген HBV согласно заявке; 5'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую от 5'-конца до 3'-конца промоторную последовательность, предпочтительно промоторную последовательность CMV SEQ ID NO: 19, энхансерную последовательность, предпочтительно последовательность фрагмента гена AroAI из SEQ ID NO: 12 и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнал секреции иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и 3'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 13.

В другом предпочтительном варианте осуществления заявки первый и второй полинуклеотиды присутствуют в одном векторе, например, ДНК-плазмиде или вирусном векторе. Предпочтительно один вектор представляет собой аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26, содержащий экспрессирующую кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий антиген pol HBV, и укороченный коровый антиген HBV согласно заявке, предпочтительно кодирующий антиген pol HBV и укороченный коровый антиген HBV согласно заявке в качестве слитого белка; 5'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген pol HBV и укороченный коровый антиген, содержащим от 5'-конца до 3'-конца промоторную последовательность, предпочтительно промоторную последовательность CMV SEQ ID NO: 19, энхансерную последовательность, предпочтительно AroAI последовательность фрагмента гена SEQ ID NO: 12 и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнал секреции иммуноглобулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и 3'-

последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 13.

Когда терапевтическая комбинация согласно заявке содержит первый вектор, такой как ДНК-плазмида или вирусный вектор, и второй вектор, такой как ДНК-плазмида или вирусный вектор, количество каждого из первого и второго векторов особо не ограничено. Например, первая ДНК-плазмида и вторая ДНК-плазмида могут присутствовать в массовом соотношении от 10:1 до 1:10, как например, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по массе. Предпочтительно первая и вторая ДНК-плазмида присутствуют в массовом соотношении 1:1. Терапевтическая комбинация согласно заявке может дополнительно содержать третий вектор, кодирующий третий активный агент, применимый для лечения инфекции HBV.

Композиции и терапевтические комбинации согласно заявке могут содержать дополнительные полинуклеотиды или векторы, кодирующие дополнительные антигены HBV и/или дополнительные антигены HBV или их иммуногенные фрагменты, такие как HBsAg, белок L HBV или оболочечный белок HBV, или кодирующую их полинуклеотидную последовательность или РНК-агент для ингибирования экспрессии гена HBV согласно вариантам осуществления заявки. Однако в конкретных вариантах осуществления композиции и терапевтические комбинации согласно заявке не содержат определенных антигенов.

В конкретном варианте осуществления композиция, терапевтическая комбинация или набор согласно заявке не содержат HBsAg или полинуклеотидную последовательность, кодирующую HBsAg.

В другом конкретном варианте осуществления композиция, терапевтическая комбинация или набор согласно заявке не содержат белок L HBV или полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок L HBV.

Еще в одном конкретном варианте осуществления заявки композиция или терапевтическая комбинация согласно заявке не содержит белок оболочки HBV или полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок оболочки HBV.

Композиции и терапевтические комбинации согласно заявке также могут включать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель нетоксичен и не должен влиять на эффективность активного ингредиента. Фармацевтически приемлемые носители могут включать одно или более вспомогательных веществ, таких как связующие, разрыхлители, агенты, вызывающие набухание, суспендирующие агенты, эмульгаторы, смачивающие агенты, смазывающие вещества, ароматизаторы, подсластители, консерванты, красители, солюбилизаторы и покрытия. Фармацевтически приемлемые носители могут включать носители, такие как липидные наночастицы (LNP). Точная природа носителя или другого материала может зависеть от пути введения, например, внутримышечного, внутрикожного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, внутрислизистого (например, кишечника), интраназального или

внутрибрюшинного путей. Для жидких препаратов для инъекций, например суспензий и растворов, подходящие носители и добавки включают воду, гликоли, масла, спирты, консерванты, красители и т. п. Для твердых пероральных препаратов, например, порошков, капсул, каплет, желатиновых капсул и таблеток, подходящие носители и добавки включают крахмалы, сахара, разбавители, гранулирующие агенты, смазывающие вещества, связующие, разрыхляющие агенты и т. п. Для назальных спреев/смесей для ингаляций водный раствор/суспензия может содержать воду, гликоли, масла, смягчающие средства, стабилизаторы, смачивающие вещества, консерванты, ароматические вещества, ароматизаторы и т. п. в качестве подходящих носителей и добавок.

Композиции и терапевтические комбинации для применения могут быть приготовлены из любого вещества, пригодного для введения пациенту для облегчения введения и повышения эффективности, включая, но не ограничиваясь этим, пероральное (энтеральное) введение и парентеральные инъекции. Парентеральные инъекции включают внутривенную инъекцию или инфузию, подкожную инъекцию, внутривоковую инъекцию и внутримышечную инъекцию. Композиции для применения также могут быть приготовлены для других путей введения, включая чресслизистый, глазной, ректальный, имплантацию длительного действия, подъязычное введение, под язык, через слизистую ротовой полости в обход портального кровообращения, ингаляционное или интраназальное.

В предпочтительном варианте осуществления заявки композиции и терапевтические комбинации заявки приготовлены для парентеральной инъекции, предпочтительно подкожной, внутривоковой инъекции или внутримышечной инъекции, более предпочтительно внутримышечной инъекции.

Согласно вариантам осуществления заявки композиции и терапевтические комбинации для введения обычно содержат буферный раствор в фармацевтически приемлемом носителе, например, водном носителе, таком как буферный солевой раствор и т. п., например, фосфатно-солевой буфер (PBS). Композиции и терапевтические комбинации могут также содержать фармацевтически приемлемые вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты, регулирующие pH, и буферные агенты. Например, композиция или терапевтическая комбинация для применения, включающая плазмидную ДНК, может содержать фосфатно-солевой буфер (PBS) в качестве фармацевтически приемлемого носителя. Плазмидная ДНК может присутствовать в концентрации, например, от 0,5 мг/мл до 5 мг/мл, такой как 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, или 5 мг/мл, предпочтительно 1 мг/мл.

Композиции и терапевтические комбинации заявки могут быть приготовлены в виде вакцины (также называемой «иммуногенной композицией») в соответствии со способами, хорошо известными в данной области. Такие композиции могут включать адьюванты для усиления иммунных ответов. Оптимальные соотношения каждого компонента в составе могут быть определены способами, хорошо известными специалистам в данной области, в связи с настоящим изобретением.

В конкретном варианте осуществления заявки композиция или терапевтическая комбинация представляет собой ДНК-вакцину. ДНК-вакцины обычно содержат бактериальные плазмиды, содержащие полинуклеотид, кодирующий интересующий антиген, под контролем сильного эукариотического промотора. Как только плазмиды доставляются в цитоплазму клетки-хозяина, кодируемый антиген продуцируется и процессируется эндогенно. Полученный антиген обычно индуцирует как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ. ДНК-вакцины выгодны, по меньшей мере потому, что они обеспечивают повышенную безопасность, термостабильны, могут быть легко адаптированы для экспрессии антигенных вариантов и просты в производстве. Для приготовления такой ДНК-вакцины можно использовать любую из ДНК-плазмид согласно заявке.

В других конкретных вариантах осуществления заявки композиция или терапевтическая комбинация представляет собой РНК-вакцину. РНК-вакцины обычно содержат по меньшей мере одну молекулу одноцепочечной РНК, кодирующую интересующий антиген, например, слитый белок или антиген HBV в соответствии с заявкой. Как только РНК доставляется в цитоплазму клетки-хозяина, кодируемый антиген продуцируется и процессируется эндогенно, вызывая как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ, подобно ДНК-вакцине. Последовательность РНК может быть оптимизирована по кодонам для повышения эффективности трансляции. Молекула РНК может быть модифицирована любым способом, известным в данной области техники, с учетом настоящего изобретения для повышения стабильности и/или трансляции, например, путем добавления полиА-хвоста, например, по меньшей мере из 30 остатков аденозина; и/или путем экспирования 5'-конца модифицированным рибонуклеотидом, например, 7-метилгуанозиновым кэпом, который может быть включен во время синтеза РНК или сконструирован ферментативно после транскрипции РНК. РНК-вакцина также может представлять собой самореплицирующуюся РНК-вакцину, полученную из экспрессирующего вектора альфавируса. Самореплицирующиеся РНК-вакцины содержат молекулу репликазы РНК, полученную из вируса, принадлежащего к семейству альфавирусов, с субгеномным промотором, который контролирует репликацию слитого белка или РНК антигена HBV, за которым следует искусственный поли-А-хвост, расположенный в 3'-области репликазы.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный адъювант может быть включен в композицию или терапевтическую комбинацию согласно заявке или может вводиться совместно с композицией или терапевтической комбинацией согласно заявке. Использование другого адъюванта является необязательным и может дополнительно усилить иммунный ответ, когда композицию используют для целей вакцинации. Другие адъюванты, подходящие для совместного введения или включения в композиции в соответствии с заявкой, предпочтительно должны быть потенциально безопасными, хорошо переносимыми и эффективными для человека. Адъювант может представлять собой низкомолекулярное соединение или антитело, включая, но не ограничиваясь ими,

ингибиторы иммунных контрольных точек (например, анти-PD1, анти-TIM-3 и т. д.), агонисты toll-подобных рецепторов (например, агонисты TLR7 и/или TLR8), агонисты RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altor Bioscience), мутантные генетические адъюванты IRF3 и IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адъювант FLT3L и IL-7-hyFc. Например, адъюванты могут быть выбраны, например, из следующих анти-HBV агентов: ингибиторы ДНК-полимеразы HBV; Иммуномодуляторы; модуляторы toll-подобного рецептора 7; модуляторы toll-подобного рецептора 8; модуляторы toll-подобного рецептора 3; лиганды рецептора интерферона альфа; ингибиторы гиалуронидазы; Модуляторы IL-10; ингибиторы HBsAg; Модуляторы toll-подобного рецептора 9; ингибиторы циклофилина; Вакцины для профилактики гепатита В; HBV терапевтические вакцины; ингибиторы проникновения вируса HBV; Антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на вирусную мРНК, более конкретно антисмысловые олигонуклеотиды против HBV; короткие интерферирующие РНК (киРНК), более конкретно анти-HBV киРНК; Модуляторы эндонуклеазы; Ингибиторы рибонуклеотидредуктазы; Ингибиторы антигена Е вируса гепатита В; антитела HBV, нацеленные на поверхностные антигены вируса гепатита В; антитела к HBV; антагонисты хемокинов CCR2; агонисты тимозина; цитокины, такие как IL12; Модуляторы сборки капсида, ингибиторы нуклеопротеинов (ингибиторы корового или капсидного белка HBV); полимеры нуклеиновых кислот (NAP); Стимуляторы индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; Стимуляторы NOD2; Рекомбинантный тимозин альфа-1; Ингибиторы репликации вируса гепатита В; ингибиторы Р13К; ингибиторы кзкДНК; ингибиторы иммунных контрольных точек, такие как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3, ингибиторы CTLA-4; Агонисты костимулирующих рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (в частности, Т-клетках), таких как CD27 и CD28; ингибиторы ВТК; Другие лекарственные средства для лечения HBV; ингибиторы IDO; ингибиторы аргиназы; и ингибиторы KDM5.

В некоторых вариантах осуществления каждая из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения независимо приготовлена с липидной наночастицей (LNP).

Заявка также относится к способам приготовления композиций и терапевтических комбинаций заявки. Способ получения композиции или терапевтической комбинации включает смешивание выделенного полинуклеотида, кодирующего антиген, вектора и/или полипептида HBV заявки, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. Специалист в данной области должен быть знаком с обычными методами, используемыми для приготовления таких композиций.

Способы индукции иммунного ответа или лечения инфекции HBV

Заявка также относится к способам индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (HBV) у пациента, включающим введение пациенту иммуногенно эффективного количества композиции или иммуногенной композиции согласно заявке. Любая из композиций и терапевтических комбинаций согласно заявке, описанных в

настоящем изобретении, может быть использована в способах согласно заявке.

Используемый в настоящем описании термин «инфекция» относится к инвазии хозяина агентом, вызывающим заболевание. Агент, вызывающий заболевание, считается «инфекционным», если он способен внедряться в хозяина и реплицироваться или размножаться внутри хозяина. Примеры инфекционных агентов включают вирусы, например, HBV и некоторые виды аденовирусов, прионы, бактерии, грибки, простейшие и т. п. «HBV-инфекция» конкретно относится к инвазии HBV в организм-хозяин, такой как клетки и ткани организма-хозяина.

Фраза «индукция иммунного ответа» при использовании в отношении способов, описанных в настоящем изобретении, охватывает вызов желаемого иммунного ответа или эффекта у пациента, против инфекции, например, инфекции HBV. «Индукция иммунного ответа» также охватывает обеспечение терапевтического иммунитета для лечения против патогенного агента, например, HBV. Используемый в настоящем описании термин «терапевтический иммунитет» или «терапевтический иммунный ответ» означает, что вакцинированный пациент способен бороться с инфекцией патогенным агентом, против которого была сделана вакцинация, например, путем иммунитета против инфекции HBV, полученного путем вакцинации вакциной против HBV. В одном варианте осуществления «индукция иммунного ответа» означает выработку иммунитета у пациента, например, для обеспечения терапевтического эффекта против заболевания, такого как инфекция HBV. В некоторых вариантах осуществления термин «индукция иммунного ответа» относится к вызову или усилению клеточного иммунитета, например, Т-клеточного ответа, против инфекции HBV. В некоторых вариантах осуществления термин «индукция иммунного ответа» относится к вызову или усилению гуморального иммунного ответа против инфекции HBV. В некоторых вариантах осуществления термин «индукция иммунного ответа» относится к вызову или усилению клеточного и гуморального иммунного ответа против инфекции HBV.

Используемый в настоящем описании термин «защитный иммунитет» или «защитный иммунный ответ» означает, что вакцинированный пациент способен бороться с инфекцией патогенного агента, против которого была сделана вакцинация. Обычно у пациента с развившимся «защитным иммунным ответом» развиваются только клинические симптомы от легкой до умеренной степени тяжести или вообще отсутствуют симптомы. Обычно пациент, имеющий «защитный иммунный ответ» или «защитный иммунитет» против определенного агента, не умирает в результате инфекции указанным агентом.

Как правило, введение композиций и терапевтических комбинаций заявки будет иметь терапевтическую цель для создания иммунного ответа против HBV после инфекции HBV или развития симптомов, характерных для инфекции HBV, например, для терапевтической вакцинации.

Используемый в настоящем описании термин «иммуногенно эффективное количество» или «иммунологически эффективное количество» означает количество композиции, полинуклеотида, вектора или антигена, достаточное для индукции желаемого

иммунного эффекта или иммунного ответа у пациента. Иммуногенно эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для индукции иммунного ответа у пациента. Иммуногенно эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для выработки иммунитета у пациента, например, для обеспечения терапевтического эффекта против такого заболевания, как инфекция HBV. Иммуногенно эффективное количество может варьироваться в зависимости от множества факторов, таких как физическое состояние пациента, возраст, вес, состояние здоровья и т. д.; конкретного применения, например, обеспечения защитного иммунитета или терапевтического иммунитета; и конкретного заболевания, например вирусной инфекции, против которой желателен иммунитет. Иммуногенно эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области с учетом настоящего изобретения.

В конкретных вариантах осуществления заявки иммуногенно эффективное количество относится к количеству композиции или терапевтической комбинации, достаточному для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести инфекции HBV или связанного с ней симптома; (ii) уменьшение продолжительности инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (iii) предотвращение прогрессирования инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (iv) вызов регрессии инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (v) предотвращение развития или начала инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (vi) предотвращение рецидива инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (vii) уменьшение частоты госпитализаций пациента с инфекцией HBV; (viii) уменьшение продолжительности госпитализации пациента с инфекцией HBV; (ix) увеличение выживаемости пациента с инфекцией HBV; (x) устранение инфекции HBV у пациента; (xi) ингибирование или снижение репликации HBV у пациента; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии.

Иммуногенно эффективное количество также может быть количеством, достаточным для снижения уровней HBsAg, согласующихся с эволюцией до клинической сероконверсии; для достижения устойчивого клиренса HBsAg, связанного с уменьшением инфицированных гепатоцитов иммунной системой пациента; индуцирования HBV-антиген-специфических активированных Т-клеточных популяций; и/или достижения стойкого отсутствия HBsAg в течение 12 месяцев. Примеры целевого показателя включают более низкий уровень HBsAg ниже порога в 500 копий международных единиц (МЕ) HBsAg и/или более высокое количество CD8.

В качестве общего руководства иммуногенно эффективное количество при использовании по отношению к плазмидной ДНК может варьироваться от приблизительно 0,1 мг/мл до 10 мг/мл всей плазмидной ДНК, например, 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,75 мг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл или 10 мг/мл. Предпочтительно иммуногенно эффективное количество плазмидной ДНК составляет менее 8 мг/мл, более предпочтительно менее 6 мг/мл, еще более предпочтительно 3-4 мг/мл. Иммуногенно эффективное количество может быть получено

из одного вектора или плазмиды или из нескольких векторов или плазмид. В качестве дополнительного общего руководства иммуногенно эффективное количество при использовании в отношении пептида может варьироваться от приблизительно 10 мкг до 1 мг на введение, например 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 9000 или 1000 мкг на одно введение. Иммуногенно эффективное количество можно вводить в одной композиции или в нескольких композициях, как например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 композициях (например, таблетках, капсулах или инъекциях, или любой композиции, адаптированной для внутрикожной доставки, например, для внутрикожной доставки с использованием пластыря для внутрикожной доставки), где введение нескольких капсул или инъекций в совокупности обеспечивает пациенту иммуногенно эффективное количество. Например, при использовании двух ДНК-плазмид иммуногенно эффективное количество может составлять 3-4 мг/мл, по 1,5-2 мг/мл каждой плазмиды. Также возможно вводить иммуногенно эффективное количество пациенту, а затем вводить другую дозу иммуногенно эффективного количества тому же пациенту по так называемой схеме первичной бустерной терапии. Эта общая концепция схемы прайм-буст хорошо известна специалистам в области вакцин. При необходимости к схеме могут быть добавлены дополнительные бустерные введения.

Терапевтическая комбинация, содержащая две ДНК-плазмиды, например, первую ДНК-плазмиду, кодирующую коровый антиген HBV, и вторую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген pol HBV, можно вводить пациенту путем смешивания обеих плазмид и доставки смеси в один анатомический участок. В качестве альтернативы можно провести две отдельные иммунизации, каждая из которых доставляет одну экспрессирующую плазмиду. В таких вариантах осуществления, независимо от того, вводят ли обе плазмиды при одной иммунизации в виде смеси при двух отдельных иммунизациях, первую ДНК-плазмиду и вторую ДНК-плазмиду можно вводить в соотношении от 10:1 до 1:10 по массе, например как 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по массе. Предпочтительно первую и вторую плазмиды ДНК вводят в соотношении 1:1 по массе.

В качестве общего руководства, иммуногенно эффективное количество при использовании в отношении РНК-агента может варьироваться от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, например от приблизительно 0,05 мг до приблизительно 4 мг/кг или от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 3 мг/кг, или, например, приблизительно 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мг/кг, но может быть и выше, например приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг. Также может быть назначена фиксированная разовая доза, например, 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может быть основана на площади поверхности тела пациента, например, 500, 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м². Обычно для лечения пациента можно вводить от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение РНК-агентов можно повторить через один день, два дня, три дня,

четыре дня, пять дней, шесть дней, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев и более. Возможны повторные курсы лечения, а также постоянное введение. Повторное введение может осуществляться в той же дозе или в другой дозе. Например, РНКи-агенты согласно заявке могут быть предоставлены в виде суточной дозы в количестве приблизительно 0,05-5 мг/кг, например, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мг/кг в сутки, по меньшей мере, в один из дней 1, 2, 3, 4, 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 или 40, или альтернативно, по меньшей мере, в одну из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 после начала лечения или любую их комбинацию с использованием разовой или разделенной дозы каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 часа или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04872 и AD05070, вводимых пациенту, составляет приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04872 и AD05070, вводимых пациенту, составляет приблизительно 3:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04872 и AD05070, вводимых пациенту, составляет приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04872 и AD05070, вводимых пациенту, составляет приблизительно 4:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04872 и AD05070, вводимых пациенту, составляет приблизительно 5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение AD04872 и AD05070, вводимых пациенту, составляет приблизительно 1:2.

Предпочтительно пациент, подлежащий лечению в соответствии со способами заявки, представляет собой пациента, инфицированного HBV, в частности, пациента, имеющего хроническую инфекцию HBV. Острая HBV-инфекция характеризуется эффективной активацией врожденной иммунной системы, дополненной последующим широким адаптивным ответом (например, HBV-специфические Т-клетки, нейтрализующие антитела), что обычно приводит к успешному подавлению репликации или удалению инфицированных гепатоцитов. Напротив, такие ответы ухудшаются или уменьшаются из-за высокой вирусной и антигенной нагрузки, например, белки оболочки HBV продуцируются в избытке и могут высвобождаться в виде субвирусных частиц в 1000-кратном избытке по сравнению с инфекционным вирусом.

Хроническая HBV-инфекция описывается фазами, характеризующимися вирусной нагрузкой, уровнем ферментов печени (некрвоспалительная активность), HBeAg или HBsAg-нагрузкой или наличием антител к этим антигенам. Уровни кзкДНК остаются относительно постоянными и составляют приблизительно от 10 до 50 копий на клетку, хотя виремия может значительно варьировать. Сохранение видов кзкДНК приводит к хроническому состоянию. Более конкретно, фазы хронической инфекции HBV включают: (i) фазу иммунотолерантности, характеризующуюся высокой вирусной нагрузкой и нормальным или минимально повышенным уровнем ферментов печени; (ii) HBeAg-

положительную фазу иммунной активации, в которой наблюдаются более низкие или снижающиеся уровни репликации вируса со значительно повышенными ферментами печени; (iii) фазу неактивного носителя HBsAg, которая представляет собой низкорепликативное состояние с низкой вирусной нагрузкой и нормальным уровнем ферментов печени в сыворотке, которое может следовать за сероконверсией HBeAg; и (iv) HBeAg-отрицательную фазу, в которой вирусная репликация происходит периодически (реактивация) с сопутствующими колебаниями уровней печеночных ферментов, мутации в пре-коровом и/или базальном коровом промоторе являются обычными, так что HBeAg не продуцируется инфицированной клеткой.

Используемый в настоящем описании термин «хроническая инфекция HBV» относится к пациенту, у которого детектируемое присутствие HBV длится более 6 месяцев. Пациент с хронической инфекцией HBV может находиться в любой фазе хронической инфекции HBV. Хроническая инфекция HBV понимается в соответствии с ее обычным значением в данной области. Хроническая инфекция HBV может, например, характеризоваться персистенцией HBsAg в течение 6 месяцев или более после острой инфекции HBV. Например, хроническая инфекция HBV, упомянутая в настоящем изобретении, соответствует определению, опубликованному Центрами по борьбе и профилактике заболеваний (CDC), согласно которому хроническая инфекция HBV может быть охарактеризована с помощью таких лабораторных критериев, как: (i) отрицательный результат на антитела IgM к коровому антигену гепатита В (IgM анти-HBc) и положительный на поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), е-антиген гепатита В (HBeAg) или тест на нуклеиновую кислоту на ДНК вируса гепатита В, или (ii) положительный на HBsAg или тест на нуклеиновую кислоту на ДНК HBV или положительный результат на HBeAg два раза с интервалом не менее 6 месяцев.

Предпочтительно иммуногенно эффективное количество относится к количеству композиции или терапевтической комбинации согласно заявке, достаточному для лечения хронической инфекции HBV.

В некоторых вариантах осуществления пациент с хронической инфекцией HBV проходит курс лечения аналогами нуклеозидов (NUC) и у него подавлены NUC. Используемый в настоящем описании термин «NUC-подавленный» относится к пациенту, имеющему неопределяемый уровень вируса гепатита В и стабильные уровни аланинаминотрансферазы (ALT) в течение по меньшей мере шести месяцев. Примеры лечения аналогами нуклеозидов/нуклеотидов включают ингибиторы полимеразы HBV, такие как энтакавир и тенофовир. Предпочтительно, чтобы у пациента с хронической инфекцией HBV не было прогрессирующего фиброза или цирроза печени. Такой пациент обычно имеет показатель METAVIR менее 3 для фиброза и результат фибросканирования менее 9 кПа. Шкала METAVIR представляет собой балльную систему, которая обычно используется для оценки степени воспаления и фиброза путем гистопатологической оценки в биоптатах печени пациентов с гепатитом В. В балльной системе присваиваются два стандартизированных числа: одно отражает степень воспаления, а другое - степень

фиброза.

Считается, что элиминация или уменьшение хронического HBV может способствовать раннему выявлению тяжелых заболеваний печени, включая вирус-индуцированный цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Таким образом, способы применения также могут быть использованы в качестве терапии для лечения HBV-индуцированных заболеваний. Примеры заболеваний, вызванных HBV, включают, но не ограничиваются ими, цирроз печени, рак (например, гепатоцеллюлярную карциному) и фиброз, особенно выраженный фиброз, характеризующийся оценкой METAVIR 3 или выше для фиброза. В таких вариантах осуществления иммуногенно эффективное количество представляет собой количество, достаточное для достижения стойкого отсутствия HBsAg в течение 12 месяцев и значительного ослабления клинического заболевания (например, цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы и т. д.).

Способы в соответствии с вариантами осуществления заявки дополнительно включают введение пациенту другого иммуногенного агента (такого как другой антиген HBV или другой антиген) или другого анти-HBV агента (такого как нуклеозидный аналог или другой анти-HBV агент) в комбинации с композицией согласно заявке. Например, другой агент против HBV или иммуногенный агент может представлять собой низкомолекулярное соединение или антитело, включая, но не ограничиваясь ими, ингибиторы иммунных контрольных точек (например, анти-PD1, анти-TIM-3 и т. д.), агонисты toll-подобных рецепторов (например, агонисты TLR7 и/или агонисты TLR8), агонисты RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altor Bioscience), мутантные генетические адъюванты IRF3 и IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адъювант FLT3L, генетический адъювант IL12, IL-7-hyFc; CAR-T, которые связывают env HBV (клетки S-CAR); модуляторы сборки капсида; ингибиторы кзкДНК, ингибиторы полимеразы HBV (например, энтекавир и тенофовир). Один или другой активный анти-HBV агент может представлять собой, например, низкомолекулярное соединение, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, белок или нуклеиновую кислоту. Тот или иной анти-HBV-агент может быть, например, выбран из ингибиторов ДНК-полимеразы HBV; Иммуномодуляторов; модуляторов Toll-подобного рецептора 7; модуляторов Toll-подобного рецептора 8; модуляторов Toll-подобного рецептора 3; лигандов рецептора интерферона альфа; ингибиторов гиалуронидазы; Модуляторов IL-10; ингибиторов HBsAg; Модуляторов Toll-подобного рецептора 9; ингибиторов циклофилина; Вакцин для профилактики гепатита В; HBV терапевтических вакцин; ингибиторов проникновения вируса HBV; Антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на вирусную мРНК, более конкретно антисмысловых олигонуклеотидов против HBV; коротких интерферирующих РНК (киРНК), более конкретно анти-HBV миРНК; Модуляторов эндонуклеазы; Ингибиторов рибонуклеотидредуктазы; Ингибиторов антигена Е вируса гепатита В; антител HBV, нацеленных на поверхностные антигены вируса гепатита В; антител к HBV; антагонистов хемокинов CCR2; агонистов тимозина; цитокинов, таких как IL12; Модуляторов сборки капсида, ингибиторов нуклеопротеинов (ингибиторов корового или

капсидного белка HBV); полимеров нуклеиновых кислот (NAP); Стимуляторов индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; Стимуляторов NOD2; Рекомбинантного тимозина альфа-1; Ингибиторов репликации вируса гепатита В; ингибиторов PI3K; ингибиторов кзкДНК; ингибиторов иммунных контрольных точек, таких как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3 и ингибиторы CTLA-4; Агонистов костимулирующих рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (в частности, Т-клетках), таких как CD27, CD28; ингибиторов ВТК; Других лекарственных средств для лечения HBV; ингибиторов IDO; ингибиторов аргиназы; и ингибиторов KDM5.

Способы доставки

Композиции и терапевтические комбинации согласно заявке можно вводить пациенту любым способом, известным в данной области техники, с учетом настоящего описания, включая, но не ограничиваясь этим, парентеральное введение (например, внутримышечную, подкожную, внутривенную или внутрикожную инъекцию), пероральное введение, трансдермальное введение и назальное введение. Предпочтительно композиции и терапевтические комбинации вводят парентерально (например, путем внутримышечной инъекции или внутрикожной инъекции) или чрескожно.

В некоторых вариантах осуществления заявки, в которых композиция или терапевтическая комбинация содержит одну или более ДНК-плазмид, введение может осуществляться путем инъекции через кожу, например, внутримышечной или внутрикожной инъекции, предпочтительно внутримышечной инъекции. Внутримышечную инъекцию можно сочетать с электропорацией, т. е. применением электрического поля для облегчения доставки ДНК-плазмид в клетки. Используемый в настоящем описании термин «электропорация» относится к использованию импульса трансмембранного электрического поля для индукции микроскопических путей (пор) в биомембране. Во время электропорации *in vivo* к клеткам прикладывают электрические поля соответствующей величины и продолжительности, вызывая временное состояние повышенной проницаемости клеточной мембраны, что позволяет клеткам поглощать молекулы, неспособные самостоятельно пересекать клеточные мембраны. Создание таких пор с помощью электропорации облегчает прохождение биомолекул, таких как плазмиды, олигонуклеотиды, миРНК, лекарственные средства и т. д., с одной стороны клеточной мембраны на другую. Было показано, что электропорация *in vivo* для доставки ДНК-вакцин значительно увеличивает поглощение плазмиды клетками-хозяевами, а также приводит к легкому или умеренному воспалению в участке инъекции. В результате эффективность трансфекции и иммунный ответ значительно улучшаются (например, до 1000 раз и 100 раз, соответственно) при внутрикожной или внутримышечной электропорации по сравнению с обычной инъекцией.

В типичном варианте осуществления электропорация сочетается с внутримышечной инъекцией. Однако также возможно сочетать электропорацию с другими формами парентерального введения, например внутрикожной инъекцией, подкожной

инъекцией и т. д.

Введение композиции, терапевтической комбинации или вакцины для применения посредством электропорации может быть осуществлено с использованием устройств для электропорации, которые могут быть сконфигурированы для доставки в желаемую ткань млекопитающего импульса энергии, эффективного для того, чтобы вызвать образование обратимых пор в клеточных мембранах. Устройство для электропорации может включать в себя компонент для электропорации и узел электрода или узел рукоятки. Компонент электропорации может включать в себя один или более из следующих компонентов устройств электропорации: контроллер, генератор сигналов тока, тестер импеданса, регистратор сигналов, элемент ввода, элемент отчета о состоянии, порт связи, компонент памяти, источник питания и выключатель питания. Электропорация может быть осуществлена с использованием устройства для электропорации *in vivo*. Примеры устройств для электропорации и способов электропорации, которые могут облегчить доставку композиций и терапевтических комбинаций заявки, особенно тех, которые содержат ДНК-плазмиды, включают CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA), электропоратор Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.) Систему доставки Tri-Grid™ (Ichor Medical Systems, Inc., Сан-Диего, Калифорния 92121) и системы, описанные в Патенте США № 7664545, Патенте США № 8209006, Патенте США № 9452285, Патенте США № 5273525, Патенте США № 6110161, Патенте США № 6261281, Патенте США № 6958060 и Патенте США № 6939862, Патенте США № 7328064, Патенте США № 6041252, Патенте США № 5873849, Патенте США № 6278895, Патенте США № 6319901, Патенте США № 6912417, Патенте № 8187249, Патенте США № 9364664, Патенте США № 9802035, Патенте США № 6117660 и публикации международной патентной заявки WO 2017172838, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Другие примеры устройств для электропорации *in vivo* описаны в международной патентной заявке, озаглавленной «Способ и устройство для доставки вакцин против вируса гепатита В (HBV)», поданной в тот же день, что и настоящая заявка, с регистрационным номером поверенного № 688097-405WO, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Также для доставки композиций и терапевтических комбинаций в заявке предусмотрено использование импульсного электрического поля, например, как описано, в Патенте США № 6697669, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В других вариантах осуществления заявки, в которых композиция или терапевтическая комбинация содержит одну или более ДНК-плазмид, способ введения является чрескожным. Чрескожное введение можно сочетать с эпидермальной кожной абразией для облегчения доставки ДНК-плазмид в клетки. Например, дерматологический пластырь можно использовать для эпидермальной кожной абразии. После удаления дерматологического пластыря композиция или терапевтическая комбинация могут быть нанесены на поврежденную кожу.

Способы доставки не ограничиваются вышеописанными вариантами

осуществления, и можно использовать любые средства для внутриклеточной доставки. Другие способы внутриклеточной доставки, предусмотренные способами заявки, включают, но не ограничиваются ими, инкапсуляцию в липосомы, липидные наночастицы (LNP) и т. д.

В некоторых вариантах применения способ введения представляет собой липидную композицию, такую как липидная наночастица (LNP). Липидные композиции, предпочтительно липидные наночастицы, которые можно использовать для доставки терапевтического продукта (такого как одна или более молекул нуклеиновой кислоты по изобретению), включают, но не ограничиваются ими, липосомы или липидные везикулы, где водный объем инкапсулирован амфипатическими липидными бислоями, или где липиды покрывают внутреннюю часть, которая содержит терапевтический продукт; или липидные агрегаты или мицеллы, где инкапсулированный в липид терапевтический продукт содержится в относительно неупорядоченной липидной смеси.

В конкретных вариантах осуществления LNP содержат катионный липид для инкапсуляции и/или усиления доставки молекулы нуклеиновой кислоты, такой как молекула ДНК или РНК по изобретению, в клетку-мишень. Катионным липидом может быть любой вид липида, который несет суммарный положительный заряд при выбранном значении pH, таком как физиологическое pH. Липидные наночастицы могут быть получены включением многокомпонентных смесей липидов в различных соотношениях с использованием одного или более катионных липидов, некаатионных липидов и липидов, модифицированных полиэтиленгликолем (ПЭГ). В литературе описано несколько катионных липидов, многие из которых коммерчески доступны. Например, подходящие катионные липиды для использования в композициях и способах по изобретению включают 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP).

Композиции LNP могут включать анионные липиды. Анионные липиды могут представлять собой любые виды липидов, которые несут суммарный отрицательный заряд при выбранном pH, таком как физиологическое pH. Анионные липиды в сочетании с катионными липидами используются для уменьшения общего поверхностного заряда LNP и для введения pH-зависимого разрушения бислоевой структуры LNP, облегчая высвобождение нуклеотидов. В литературе описано несколько анионных липидов, многие из которых коммерчески доступны. Например, подходящие анионные липиды для использования в композициях и способах по изобретению включают 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE).

LNP могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, принимая во внимание настоящее изобретение. Например, LNP можно приготовить с помощью введения или разбавления этанола, гидратации тонкой пленки, замораживания-оттаивания, френч-пресса или мембранной экструзии, диафильтрации, обработки ультразвуком, диализа с детергентом, эфирной инфузии и выпаривания с обращенной фазой.

Некоторые примеры липидов, липидных композиций и способов создания

липидных носителей для доставки активных молекул нуклеиновых кислот, таких как соответствующие настоящему изобретению, описаны в: US 2017/0190661, US 2006/0008910, US 2015/0064242, US 2005/0064595, WO/ 2019/036030, US2019/0022247, WO/2019/036028, WO/2019/036008, WO/2019/036000, US2016/0376224, US2017/0119904, WO/2018/200943, WO/2018/1918 и US 2013/0195968, соответствующее содержание каждого из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Фармацевтическая композиция, содержащая РНКи-агенты согласно заявке, содержит фармакологически эффективное количество по меньшей мере одного типа РНКи и фармацевтически приемлемый носитель. Однако такая «фармацевтическая композиция» может также содержать отдельные цепи таких РНКи-агентов или вектора(ов), содержащие регуляторную последовательность, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере одну смысловую или антисмысловую цепь, входящую в состав РНКи согласно настоящей заявке. Также предполагается, что клетки, ткани или выделенные органы, которые экспрессируют или содержат определенную в настоящем описании РНКи, могут быть использованы в качестве «фармацевтических композиций».

РНКи-агенты для ингибирования экспрессии гена HBV согласно заявке можно вводить пациенту любым подходящим путем, например, парентерально путем внутривенной (i.v.) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно, подкожно или внутрибрюшинно. Внутривенную инфузию можно проводить, например, в течение 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 минут или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов.

Для внутримышечного, подкожного и внутривенного применения фармацевтические композиции, содержащие РНКи-агенты согласно заявке, обычно предоставляются в виде стерильных водных растворов или суспензий, забуференных до соответствующего pH и изотоничности. В предпочтительном варианте осуществления носитель состоит исключительно из водного буфера. В этом контексте «исключительно» означает отсутствие вспомогательных агентов или инкапсулирующих веществ, которые могли бы повлиять или опосредовать поглощение дцРНК клетками, экспрессирующими ген вируса гепатита В. Водные суспензии согласно заявке могут включать суспендирующие агенты, такие как производные целлюлозы, альгинат натрия, поливинилпирролидон и трагакантовую камедь, и смачивающий агент, такой как лецитин. Подходящие консерванты для водных суспензий включают этил- и н-пропил-п-гидроксibenзоат. Фармацевтические композиции, содержащие РНКи-агенты, применимые согласно заявке, также включают инкапсулированные составы для защиты РНКи-агентов от быстрого выведения из организма, такие как препарат с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких композиций будут очевидны специалистам в данной области. Липосомные суспензии и биспецифические антитела

также могут быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в публикации РСТ W091/06309 и WO 2011/003780, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Адьюванты

В некоторых вариантах осуществления способ индукции иммунного ответа против HBV дополнительно включает введение адьюванта. Термины «адьювант» и «иммуностимулятор» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и определяются как одно или более веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В этом контексте адьювант используется для усиления иммунного ответа на антигены HBV и антигенные полипептиды HBV согласно заявке.

В соответствии с вариантами осуществления заявки адьювант может присутствовать в терапевтической комбинации или композиции заявки или вводится в виде отдельной композиции. Адьювантом может быть, например, низкомолекулярное соединение или антитело. Примеры адьювантов, подходящих для использования в заявке, включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы иммунных контрольных точек (например, анти-PD1, анти-TIM-3 и т. д.), агонисты Toll-подобных рецепторов (например, агонисты TLR7 и/или TLR8) агонисты RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altor Bioscience), мутантные генетические адьюванты IRF3 и IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адьювант FLT3L, генетический адьювант IL12 и IL-7-hyFc. Примеры адьювантов могут быть выбраны, например, из следующих анти-HBV агентов: ингибиторы ДНК-полимеразы HBV; Иммуномодуляторы; модуляторы toll-подобного рецептора 7; модуляторы toll-подобного рецептора 8; модуляторы toll-подобного рецептора 3; лиганды рецептора интерферона альфа; ингибиторы гиалуронидазы; Модуляторы IL-10; ингибиторы HBsAg; Модуляторы toll-подобного рецептора 9; ингибиторы циклофилина; профилактические вакцины гепатита В; терапевтические вакцины против HBV; ингибиторы проникновения вируса HBV; Антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на вирусную мРНК, более конкретно антисмысловые олигонуклеотиды против HBV; короткие интерферирующие РНК (киРНК), более конкретно анти-HBV киРНК; Модуляторы эндонуклеазы; Ингибиторы рибонуклеотидредуктазы; Ингибиторы антигена Е вируса гепатита В; антитела HBV, нацеленные на поверхностные антигены вируса гепатита В; антитела к HBV; антагонисты хемокинов CCR2; агонисты тимозина; цитокины, такие как IL12; Модуляторы сборки капсида, ингибиторы нуклеопротеинов (ингибиторы корового или капсидного белка HBV); полимеры нуклеиновых кислот (NAP); Стимуляторы индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; Стимуляторы NOD2; Рекомбинантный тимозин альфа-1; Ингибиторы репликации вируса гепатита В; ингибиторы Р13К; ингибиторы кзкДНК; ингибиторы иммунных контрольных точек, такие как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3, ингибиторы CTLA-4; Агонисты костимулирующих рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (в частности, Т-клетках), таких как CD27

и CD28; ингибиторы ВТК; Другие лекарственные средства для лечения HBV; ингибиторы IDO; ингибиторы аргиназы; и ингибиторы KDM5.

Композиции и терапевтические комбинации согласно заявке также можно вводить в комбинации по меньшей мере с одним другим анти-HBV-агентом. Примеры анти-HBV-агентов, подходящих для использования в настоящей заявке, включают, но не ограничиваются ими, низкомолекулярные соединения, антитела и/или CAR-T-терапию, которые связывают env HBV (клетки S-CAR), модуляторы сборки капсида, агонисты TLR (например, агонисты TLR7 и/или TLR8), ингибиторы кзкДНК, ингибиторы полимеразы HBV (например, энтекавир и тенофовир) и/или ингибиторы иммунных контрольных точек и т. д.

По меньшей мере один анти-HBV-агент может быть, например, выбран из ингибиторов ДНК-полимеразы HBV; Иммуномодуляторов; модуляторов Toll-подобного рецептора 7; модуляторов Toll-подобного рецептора 8; модуляторов Toll-подобного рецептора 3; лигандов рецептора интерферона альфа; ингибиторов гиалуронидазы; Модуляторов IL-10; ингибиторов HBsAg; Модуляторов Toll-подобного рецептора 9; ингибиторов циклофилина; Вакцин для профилактики гепатита В; терапевтических вакцин против HBV; ингибиторов проникновения вируса HBV; Антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на вирусную мРНК, более конкретно антисмысловых олигонуклеотидов против HBV; коротких интерферирующих РНК (киРНК), более конкретно анти-HBV киРНК; Модуляторов эндонуклеазы; Ингибиторов рибонуклеотидредуктазы; Ингибиторов антигена Е вируса гепатита В; антител HBV, нацеленных на поверхностные антигены вируса гепатита В; антител к HBV; антагонистов хемокинов CCR2; агонистов тимозина; цитокинов, таких как IL12; Модуляторов сборки капсида, ингибиторов нуклеопротеинов (ингибиторов корового или капсидного белка HBV); полимеров нуклеиновых кислот (NAP); Стимуляторов индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; Стимуляторов NOD2; Рекомбинантного тимозина альфа-1; Ингибиторов репликации вируса гепатита В; ингибиторов РЗК; ингибиторов кзкДНК; ингибиторов иммунных контрольных точек, таких как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3 и ингибиторы CTLA-4; Агонистов костимулирующих рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (в частности, Т-клетках), таких как CD27, CD28; ингибиторы ВТК; Других лекарственных средств для лечения HBV; ингибиторы IDO; ингибиторы аргиназы; и ингибиторы KDM5. Такие анти-HBV-агенты можно вводить с композициями и терапевтическими комбинациями одновременно или последовательно.

Методы Прайм/Буст иммунизации

Варианты осуществления заявки также предусматривают введение иммуногенно эффективного количества композиции или терапевтической комбинации пациенту и последующее введение другой дозы иммуногенно эффективного количества композиции или терапевтической комбинации тому же пациенту в так называемой схеме прайм-буст. Таким образом, в одном варианте осуществления композиция или терапевтическая

комбинация для применения представляет собой первичную вакцину, используемую для примирования иммунного ответа. В другом варианте осуществления композиция или терапевтическая комбинация согласно заявке представляет собой бустерную вакцину, используемую для стимулирования иммунного ответа. Примирующие и бустерные вакцины согласно заявке можно использовать в способах согласно заявке, описанных в настоящем изобретении. Эта общая концепция схемы прайм-буст хорошо известна специалистам в области вакцин. Любая из композиций и терапевтических комбинаций согласно заявке, описанная в настоящем изобретении, может быть использована в качестве примирующих и/или бустерных вакцин для примирования и/или стимулирования иммунного ответа против HBV.

В некоторых вариантах осуществления заявки композицию или терапевтическую комбинацию согласно заявке можно вводить для первичной иммунизации. Композицию или терапевтическую комбинацию можно вводить повторно для бустерной иммунизации. Дополнительные бустерные введения композиции или комбинации вакцин могут быть необязательно добавлены к схеме по мере необходимости. Адьювант может присутствовать в композиции согласно заявке, используемой для бустерной иммунизации, присутствовать в отдельной композиции для введения вместе с композицией или терапевтической комбинацией согласно заявке для бустерной иммунизации, или может вводиться сам по себе в качестве бустерной иммунизации. В тех вариантах осуществления, в которых в схему включен адьювант, его предпочтительно используют для бустерной иммунизации.

Иллюстративный и не ограничивающий пример схемы первичной иммунизации включает введение разовой дозы иммуногенно эффективного количества композиции или терапевтической комбинации согласно заявке пациенту для примирования иммунного ответа; и последующее введение другой дозы иммуногенно эффективного количества композиции или терапевтической комбинации для стимулирования иммунного ответа, при этом бустерная иммунизация сначала проводится приблизительно через две-шесть недель, предпочтительно через четыре недели после первоначального введения первичной иммунизации. Необязательно, приблизительно через 10-14 недель, предпочтительно через 12 недель, после первоначального проведения первичной иммунизации проводят дополнительную бустерную иммунизацию композицией или терапевтической комбинацией, или другим адьювантом.

Наборы

Также в настоящем описании предложен набор, содержащий терапевтическую комбинацию согласно заявке. Набор может содержать первый полинуклеотид, второй полинуклеотид и РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV в одной или более отдельных композициях, или набор может содержать первый полинуклеотид, второй полинуклеотид и РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV в одной композиции. Набор может дополнительно содержать один или более адьювантов или иммуностимуляторов и/или анти-HBV-агентов.

Способность индуцировать или стимулировать иммунный ответ против HBV при введении в организм животного или человека можно оценить либо *in vitro*, либо *in vivo* с использованием различных анализов, которые являются стандартными в данной области. Общее описание методов, доступных для оценки начала и активации иммунного ответа, см., например, в Coligan et al. (1992 and 1994, *Current Protocols in Immunology*; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). Измерение клеточного иммунитета может быть выполнено путем измерения профилей цитокинов, секретируемых активированными эффекторными клетками, в том числе происходящими из CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (например, количественное определение клеток, продуцирующих IL-10 или IFN гамма, с помощью ELISPOT), путем определения статуса активации иммунных эффекторных клеток (например, анализ пролиферации Т-клеток с помощью классического анализа поглощения [3H] тимидина или анализ на основе проточной цитометрии), анализ антиген-специфических Т-лимфоцитов у сенсibilизированного пациента (например, пептид-специфический лизис в анализе цитотоксичности и т. д.)

Способность стимулировать клеточный и/или гуморальный ответ можно определить по связыванию антител и/или конкуренции при связывании (см., например, Harlow, 1989, *Antibodies*, Cold Spring Harbour Press). Например, титры антител, вырабатываемых в ответ на введение композиции, содержащей иммуноген, можно измерить с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Иммунный ответ также можно измерить с помощью анализа нейтрализующих антител, где нейтрализация вируса определяется как потеря инфекционности в результате реакции/ингибирования/нейтрализации вируса при использовании специфических антител. Иммунный ответ можно дополнительно измерить с помощью анализа антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Изобретение также относится к следующим неограничивающим вариантам осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой терапевтическую комбинацию для лечения инфекции вируса гепатита В (HBV) у пациента, содержащую:

i) по меньшей мере одно из следующего:

a) укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 2,

b) первую молекулу нуклеиновой кислоты не природного происхождения, содержащая первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV

c) антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью

РНКазы H, и

d) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV; и

ii) РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, такой как те, которые описаны в US 20130005793, WO 2013003520 или WO 2018027106, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Вариант осуществления 2 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 1, содержащую по меньшей мере один из антигена полимеразы HBV и укороченного корового антигена HBV.

Вариант осуществления 3 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 2, содержащую антиген полимеразы HBV и укороченный коровый антиген HBV.

Вариант осуществления 4 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 1, содержащую по меньшей мере одну из первой молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащей первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, и второй молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащей вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV.

Вариант осуществления 5 представляет собой терапевтическую комбинацию для лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV), у пациента, содержащую

i) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2; и

ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H; и

iii) РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, такой как те, которые описаны в US 20130005793, WO 2013003520 или WO 2018027106, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Вариант осуществления 6 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 4 или 5, где первая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом укороченного корового антигена HBV.

Вариант осуществления 6а представляет собой терапевтическую комбинацию

любого из вариантов осуществления 4-6, где вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом антигена полимеразы HBV.

Вариант осуществления 6b представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 6 или 6a, где сигнальная последовательность независимо содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 6c представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 6 или 6a, где сигнальная последовательность независимо кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

Вариант осуществления 7 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-6c, где антиген полимеразы HBV содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98%, как например, по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления 7a представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 7, где антиген полимеразы HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления 7b представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-7a, где укороченный коровый антиген HBV состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98%, например по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 7c представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 7b, где укороченный антиген HBV состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 8 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-7c, где каждая из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения представляет собой молекулу ДНК.

Вариант осуществления 8a представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 8, где молекула ДНК присутствует в ДНК-векторе.

Вариант осуществления 8b представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 8a, где ДНК-вектор выбран из группы, состоящей из ДНК-плазмид, бактериальных искусственных хромосом, искусственных хромосом дрожжей и замкнутой линейной дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 8c представляет собой терапевтическую комбинацию варианта 8, где молекула ДНК присутствует в вирусном векторе.

Вариант 8d представляет собой терапевтическую комбинацию варианта 8c, где вирусный вектор выбран из группы, состоящей из бактериофагов, вирусов животных и вирусов растений.

Вариант осуществления 8e представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-7c, где каждая из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения представляет собой молекулу РНК.

Вариант осуществления 8f представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 8e, где молекула РНК представляет собой репликон РНК, предпочтительно репликон самореплицирующейся РНК, репликон мРНК, модифицированный репликон мРНК или самоамплифицирующуюся мРНК.

Вариант осуществления 8g представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-8f, где каждая из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения независимо приготовлена с липидной композицией, предпочтительно с липидной наночастицей (LNP).

Вариант осуществления 9 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 4-8g, содержащую первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения и вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

Вариант осуществления 10 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 4-8g, содержащую первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения и вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения в двух разных молекулах нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

Вариант осуществления 11 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 4-10, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, как например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 11a представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 11, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 98%, как например, по меньшей мере 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 12 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 11a, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 13 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 4-12, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, как например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% или 100%, идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 13а представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 13, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 98%, как например, по меньшей мере 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100%, идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 14 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 13а, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 15 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где РНКи-агент имеет коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, представленные в Таблице 2.

Вариант осуществления 15а представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где РНКи-агент имеет последовательность смысловой цепи и последовательность антисмысловой цепи, представленные в Таблице 3.

Вариант осуществления 15b представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где РНКи-агент имеет коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, представленные в Таблице 4.

Вариант осуществления 15с представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 15b, где РНКи-агент имеет модифицированную последовательность смысловой цепи и модифицированную последовательность антисмысловой цепи, представленные в Таблице 4.

Вариант осуществления 15d представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где РНКи-агент нацелен на последовательность-мишень, представленную в Таблице 5.

Вариант осуществления 15е представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где РНКи-агент имеет коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, представленные в Таблице 6.

Вариант осуществления 15f представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где РНКи-агент имеет коровую антисмысловую последовательность, представленную в Таблице 7, и коровую смысловую последовательность, представленную в Таблице 8.

Вариант осуществления 15g представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 15f, где РНКи-агент имеет модифицированную последовательность смысловой цепи, представленную в Таблице 7, и модифицированную

последовательность антисмысловой цепи, представленную в Таблице 8.

Вариант осуществления 15h представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где РНКи-агент имеет дуплекс антисмысловой цепи и смысловой цепи, представленный в Таблице 9.

Вариант осуществления 15i представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 15h, где РНКи-агент имеет дуплексную структуру AD04580; AD04585; AD04776; AD04872; AD04962; AD04963; AD04982; или AD05070, представленные в Таблице 9.

Вариант осуществления 15j представляет собой терапевтическую комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 1-14, где терапевтическая комбинация содержит первый РНКи-агент, нацеленный на открытую рамку считывания S (ORF) гена HBV, и второй РНКи-агент, нацеленный на открытую рамку считывания X (ORF) гена HBV.

Вариант осуществления 15k представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 15j, где первый РНКи-агент выбран из группы, состоящей из: AD04001; AD04002; AD04003; AD04004; AD04005; AD04006; AD04007; AD04008; AD04009; AD04010; AD04422; AD04423; AD04425; AD04426; AD04427; AD04428; AD04429; AD04430; AD04431; AD04432; AD04433; AD04434; AD04435; AD04436; AD04437; AD04438; AD04439; AD04440; AD04441; AD04442; AD04511; AD04581; AD04583; AD04584; AD04585; AD04586; AD04587; AD04588; AD04590; AD04591; AD04592; AD04593; AD04594; AD04595; AD04596; AD04597; AD04598; AD04599; AD04734; AD04771; AD04772; AD04773; AD04774; AD04775; AD04822; AD04871; AD04872; AD04873; AD04874; AD04875; AD04876; AD04962; и AD05164; и второй РНКи-агент выбран из группы, состоящей из: AD03498; AD03499; AD03500; AD03501; AD03738; AD03739; AD03967; AD03968; AD03969; AD03970; AD03971; AD03972; AD03973; AD03974; AD03975; AD03976; AD03977; AD03978; AD04176; AD04177; AD04178; AD04412; AD04413; AD04414; AD04415; AD04416; AD04417; AD04418; AD04419; AD04420; AD04421; AD04570; AD04571; AD04572; AD04573; AD04574; AD04575; AD04576; AD04577; AD04578; AD04579; AD04580; AD04776; AD04777; AD04778; AD04823; AD04881; AD04882; AD04883; AD04884; AD04885; AD04963; AD04981; AD04982; AD04983; AD05069; AD05070; AD05071; AD05072; AD05073; AD05074; AD05075; AD05076; AD05077; AD05078; AD05147; AD05148; AD05149; и AD05165, каждый из которых описан в WO 2018027106 и описание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Вариант осуществления 15l представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 15k, где первый РНКи-агент представляет собой AD04872, который содержит дуплекс, имеющий последовательности SEQ ID NO: 25-26, а второй РНКи-агент представляет собой AD05070, который содержит дуплекс, имеющий последовательности SEQ ID NO: 27-28.

Вариант осуществления 15m представляет собой терапевтическую комбинацию

варианта осуществления 15k, где первый РНКи-агент представляет собой AD04872, а второй РНКи-агент представляет собой AD04982.

Вариант осуществления 15n представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 15k, где первый РНКи-агент представляет собой AD04872, а второй РНКи-агент представляет собой AD04776.

Вариант осуществления 15o представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 15k, где первый РНКи-агент представляет собой AD04585, а второй РНКи-агент представляет собой AD04580.

Вариант осуществления 15p представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-15o, где РНКи-агент приготовлен в виде липидной композиции, предпочтительно липидной наночастицы.

Вариант осуществления 15p представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-15o, где РНКи-агент конъюгирован с нацеливающим лигандом.

Вариант осуществления 15q представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 15p, где нацеливающий лиганд содержит N-ацетилгалактозамин.

Вариант осуществления 15r представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 15p, где нацеливающим лигандом является (NAG13), (NAG13)s, (NAG18), (NAG18)s, (NAG24), (NAG24)s, (NAG25), (NAG25)s, (NAG26), (NAG26)s, (NAG27), (NAG27)s, (NAG28), (NAG28)s, (NAG29), (NAG29)s, (NAG30), (NAG30)s, (NAG31), (NAG31)s, (NAG32), (NAG32)s, (NAG33), (NAG33)s, (NAG34), (NAG34)s, (NAG35), (NAG35)s, (NAG36), (NAG36)s, (NAG37), (NAG37)s, (NAG38), (NAG38)s, (NAG39) или (NAG39), представленные в Таблице 10, каждый из которых более подробно описан в WO 2018027106, и описание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Вариант осуществления 15s представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 15p, где нацеливающим лигандом является (NAG34), (NAG34)s, (NAG35), (NAG35)s, (NAG36), (NAG36)s, (NAG37), (NAG37)s, (NAG38), (NAG38)s, (NAG39) или (NAG39), более предпочтительно (NAG37) или (NAG37)s.

Вариант осуществления 15t представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 15p-15s, где нацеливающий лиганд конъюгирован со смысловой цепью РНКи-агента.

Вариант осуществления 16 представляет собой набор, содержащий терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-15t и инструкции по применению терапевтической комбинации для лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV), у пациента.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV), у пациента, включающий введение пациенту терапевтической комбинации любого из вариантов осуществления 1-15t.

Вариант осуществления 17a представляет собой способ варианта осуществления

17, где лечение индуцирует иммунный ответ против вируса гепатита В у пациента, предпочтительно у пациента с хронической инфекцией HBV.

Вариант осуществления 17b представляет собой способ варианта осуществления 17 или 17a, где пациент имеет хроническую инфекцию HBV.

Вариант осуществления 17c представляет собой способ любого из вариантов осуществления 17-17b, где пациент нуждается в лечении заболевания, вызванного HBV, выбранного из группы, состоящей из прогрессирующего фиброза, цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (HCC).

Вариант осуществления 18 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 17-17c, где терапевтическую комбинацию вводят путем инъекции через кожу, например, путем внутримышечной или внутрикожной инъекции, предпочтительно внутримышечной инъекции.

Вариант осуществления 19 представляет собой способ варианта осуществления 18, где терапевтическая комбинация содержит по меньшей мере одну из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

Вариант осуществления 19a представляет собой способ варианта осуществления 19, где терапевтическая комбинация содержит первую и вторую молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ варианта осуществления 19 или 19a, где молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения вводят пациенту посредством внутримышечной инъекции в комбинации с электропорацией.

Вариант осуществления 21 представляет собой способ варианта осуществления 19 или 19a, где молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения вводят пациенту с помощью липидной композиции, предпочтительно с помощью липидной наночастицы.

ПРИМЕРЫ

Специалистам в данной области техники будет понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отклонения от их широкой изобретательской концепции. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предназначено для охвата модификаций в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено настоящим описанием.

Пример 1. Плазмида, содержащая HBV core, и плазмида, содержащая HBV pol

Схематическое изображение векторов pDK-pol и pDK-core показано на ФИГ.1А и 1В, соответственно. Оптимизированную для антигенов HBV core или pol экспрессирующую кассету, содержащую промотор CMV (SEQ ID NO: 18), энхансер сплайсинга (тройная составная последовательность) (SEQ ID NO: 10), сигнальный пептид-предшественник цистатина S SPCS (NP_0018901.1) (SEQ ID NO: 9) и ген pol (SEQ ID NO: 5) или core (SEQ ID NO: 2) вводили в остов плазмиды pDK с использованием стандартных методов молекулярной биологии.

Плазмиды тестировали *in vitro* на экспрессию core- и pol-антигенов с помощью вестерн-блоттинга с использованием core- и pol-специфических антител, и было показано, что они обеспечивают согласованный профиль экспрессии для клеточных и секретируемых core- и pol-антигенов (данные не показаны).

Пример 2. Генерация аденовирусных векторов, экспрессирующих слияние укороченного core-антигена HBV с Pol-антигеном HBV

Создание аденовирусного вектора было разработано как слитый белок, экспрессируемый из одной открытой рамки считывания. Дополнительные конфигурации для экспрессии двух белков, например также можно предусмотреть использование двух отдельных экспрессирующих кассет или использование 2А-подобной последовательности для разделения двух последовательностей.

Дизайн экспрессионных кассет для аденовирусных векторов

Экспрессирующие кассеты (схемы на ФИГ. 2А и ФИГ. 2В) состоят из промотора CMV (SEQ ID NO: 19), интрона (SEQ ID NO: 12) (фрагмент, полученный из гена AroAI человека - номер доступа в GenBank X01038). пары оснований 295-523, содержащие второй интрон AroAI), за которыми следует оптимизированная кодирующая последовательность - либо только core, либо слитый белок core и полимеразы, которому предшествует последовательность, кодирующая сигнал секреции иммуноглобулина человека (SEQ ID NO: 14), а затем следует сигнал полиаденилирования SV40 (SEQ ID NO: 13).

Сигнал секреции был включен из-за прошлого опыта, показывающего улучшение технологичности некоторых аденовирусных векторов, содержащих секретируемые трансгены, без влияния на вызванный Т-клеточный ответ (эксперименты на мышах).

Последние два остатка белка Core (VV) и первые два остатка белка Полимеразы (MP) при слиянии приводят к соединительной последовательности (VVMP), которая присутствует на белке дофаминового рецептора человека (изоформа D3), наряду с фланкирующими гомологиями.

Вставка линкера AGAG между последовательностями core и полимеразы устраняет эту гомологию и не дает дальнейших совпадений в Blast человеческого протеома.

Пример 3. Исследование иммуногенности ДНК-вакцины *in vivo* на мышах

Иммунотерапевтическую ДНК-вакцину, содержащую плазмиды ДНК, кодирующие core-антиген HBV или антиген полимеразы HBV, испытывали на мышах. Цель исследования заключалась в выявлении Т-клеточных ответов, индуцированных вакциной после внутримышечного введения путем электропорации мышам линии BALB/c. Первоначальные исследования иммуногенности были сосредоточены на определении клеточных иммунных ответов, которые могут быть вызваны введенными антигенами HBV.

В частности, протестированные плазмиды включали плазмиду pDK-Pol и плазмиду pDK-Core, как показано на ФИГ. 1А и 1В, соответственно, и как описано выше в Примере 1. Плазида pDK-Pol кодировала антиген полимеразы, имеющий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 7, а плазида pDK-Core кодировала core-антиген, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Сначала тестировали ответы Т-клеток, индуцированные каждой плазмидой в отдельности. Вакцину ДНК-плазмиды (пДНК) вводили внутримышечно посредством электропорации мышам Balb/c с использованием коммерчески доступной системы доставки TriGrid™ для внутримышечного введения (TDS-IM), адаптированной для применения в мышечной модели в *cranialis tibialis*. См. публикацию международной патентной заявки WO2017172838 и Заявку на патент США № 62/607430, озаглавленную «Method and Apparatus for the Delivery of Hepatitis B Virus (HBV) Vaccines», поданную 19 декабря 2017 г. для дополнительного описания методов и устройств для внутримышечной доставки ДНК мышам путем электропорации, описания которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В частности, чип TDS-IM устройства TDS-IM v1.0, имеющего электродный чип с расстоянием между электродами 2,5 мм и диаметром электрода 0,030 дюйма, вводили чрескожно в выбранную мышцу с проводящей длиной 3,2 мм и эффективной глубиной проникновения 3,2 мм, и большую ось алмазной конфигурации электродов ориентировали параллельно мышечным волокнам. После введения электрода начинали инъекцию для распределения ДНК (например, 0,020 мл) в мышце. После завершения внутримышечной инъекции локально прикладывали электрическое поле 250 В/см (приложенное напряжение 59,4-65,6 В, ограничения по приложенному току менее 4 А, 0,16 А/с) на общую продолжительность приблизительно 400 мс с рабочим циклом 10% (т. е. напряжение активно подается в течение приблизительно 40 мс из приблизительно 400 мс продолжительности) с 6 импульсами. После завершения процедуры электропорации матрицу TriGrid™ удаляли, и животных извлекали. Введение высоких доз (20 мкг) мышам BALB/c проводили, как показано в Таблице 1. Шести мышам вводили плазмидную ДНК, кодирующую core-антиген HBV (pDK-core; группа 1), шести мышам вводили плазмидную ДНК, кодирующую pol-антиген HBV (pDK-pol; группа 2), а двум мышам вводили пустой вектор в качестве отрицательного контроля. Животных дважды иммунизировали ДНК с интервалом в две недели, а спленоциты собирали через неделю после последней иммунизации.

Таблица 1: Экспериментальный план пилотного исследования по иммунизации мышей.

Группа	N	пДНК	Сайт одностороннего введения (альтернативные стороны)	Доза	Объем	Дни введения	Конечная точка (сбор селезенки) День
1	6	Core	СТ+ЕР	20 мкг	20 мкл	0, 14	21
2	6	Pol	СТ+ЕР	20 мкг	20 мкл	0, 14	21
3	2	Пустой вектор (отр. контроль)	СТ+ЕР	20 мкг	20 мкл	0, 14	21

СТ, *cranialis tibialis* мышца; EP, электропорация.

Антиген-специфические ответы анализировали и количественно определяли с помощью метода иммуноферментного пятна IFN- γ (ELISPOT). В этом анализе выделенные спленоциты иммунизированных животных инкубировали в течение ночи с пулами пептидов, покрывающими белок Core, белок Pol или малый пептидный лидер и соединительную последовательность (2 мкг/мл каждого пептида). Эти пулы состояли из 15-мерных пептидов, которые перекрываются 11 остатками, соответствующими консенсусной последовательности Genotypes BCD вакцинных векторов Core и Pol. Большой белок Pol HBV 94 кДа разделяли посередине на два пула пептидов. Антиген-специфические Т-клетки стимулировали пулами гомологичных пептидов, а IFN- γ -положительные Т-клетки оценивали с использованием анализа ELISPOT. Высвобождение IFN- γ одной антиген-специфической Т-клеткой визуализировали с помощью соответствующих антител и последующего хромогенного детектирования в виде окрашенного пятна на микропланшете, называемого пятнообразующей клеткой (SFC).

Существенный Т-клеточный ответ против HBV Core был достигнут у мышей, иммунизированных плазмидой pDK-Core ДНК-вакцины (Группа 1), достигая 1000 SFC на 106 клеток (ФИГ. 3). Ответы Pol Т-клеток на пул пептидов Pol 1 были сильными (~ 1000 SFC на 106 клеток). Слабые Pol2-направленные клеточные ответы против Pol2, вероятно, были связаны с ограниченным разнообразием МНС у мышей, феноменом, называемым Т-клеточным иммунодоминированием, определяемым как неодинаковое распознавание различных эпитопов одного антигена. Было проведено подтверждающее исследование, подтверждающее результаты, полученные в этом исследовании (данные не показаны).

Приведенные выше результаты демонстрируют, что вакцинация ДНК-плазмидной вакциной, кодирующей антигены HBV, вызывает клеточные иммунные ответы против введенных антигенов HBV у мышей. Аналогичные результаты были также получены с приматами, отличными от человека (данные не показаны).

Пример 4. Исследование иммуногенности ДНК-вакцины *in vivo* в комбинации с киРНК HBV на мышах

Самцов мышей C57BL/6 (возраст 6-8 недель; Жанвье, Франция) инфицировали путем инъекции в хвостовую вену 1×10^{11} vg AAV-HBV (FivePlus MMI, Китай), разведенного в 1xPBS. Инфекции давали развиться за 28 дней до начала обработки. Затем мышей (n=8/группу) делили на 6 отдельных групп для исследования киРНК отдельно или терапевтической вакцины (Tx Vx) отдельно или в комбинации (Таблица 2). TxVx представляет собой смесь 1:1 плазмиды pDK-Pol и плазмиды pDK-Core из приведенного выше примера 1 (см. также ФИГ. 1A и 1B, соответственно). киРНК описана в WO 2018 027106 (например, пункт 54 в WO 2018 027106), в частности, представляет собой смесь двух РНКи-агентов AD04872+AD5070, AD04872+AD04982, AD04872+AD04776 или AD04585+AD04580, как описано в WO 2018 027106. Доза и время введения дозы как для киРНК, так и для Tx Vx приведены в Таблице 2. Первый день обработки обозначен как D0 и наступает после 28-дневного периода развития инфекции.

Таблица 2: Краткое описание схемы обработки для каждой из исследуемых групп

Группа	Мышей/на группу	Tx Vx	Tx Vx Время введения	киРНК	киРНК Время введения
1	8	носитель	Д0, Д21	носитель	Д0, Д21
2	8	носитель	-	10 мг/кг	Д0, Д21
3	8	10 мкг pol/ 10мкг core	Д0, Д21	носитель	-
4	8	10 мкг pol/ 10мкг core	Д0, Д21	10 мг/кг	Д0, Д21
5	8	10 мкг pol/ 10мкг core	Д21, Д42	носитель	-
6	8	10 мкг pol/ 10мкг core	Д21, Д42	10 мг/кг	Д0, Д21
7	8	10 мкг pol/ 10мкг core	Д42, Д63	10 мг/кг	Д0, Д21
8	8	10 мкг pol/ 10мкг core	Д42, Д63	носитель	Д0, Д21

- обработку не назначали

Tx Vx разводили в 1×PBS в концентрациях, указанных в Таблице 2, и вводили посредством электропорации в большеберцовую мышцу (Ischor, США). киРНК вводили посредством подкожной инъекции в заднюю часть шеи в концентрации 10 мг/кг в 1хPBS. Комбинацию миРНК и Tx Vx в группах 4 и 6 вводили вместе (группа 4) или в шахматном порядке, так что киРНК вводили за 3 недели до первой дозы Tx Vx (группа 6) или через 3 недели после последней обработки киРНК (группа 7). Все конечные точки наступают через 3 недели после последнего введения лекарственного средства, что соответствует 42-му дню для групп 1-4, 63-му дню для групп 5 и 6 и 84-му дню для групп 7 и 8.

Забор образцов крови проводили еженедельно для измерения вирусных параметров (HBeAg, HBsAg и ДНК HBV) и ALT печени в сыворотке. Селезенку брали в конечных точках, и иммуногенность оценивается во всех группах с помощью IFN γ ELISPOT после стимуляции ex vivo пулами пептидов HBV, охватывающими как последовательности core, так и последовательности pol Tx Vx. Все конечные точки соответствуют сроку через 3 недели после последней терапевтической дозы.

Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, предназначены только для иллюстративных целей, и что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отклонения от их широкой изобретательской концепции. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но

предназначено для охвата модификаций в пределах сущности и объема изобретения, определенных прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтическая комбинация для применения в лечении инфекции вируса гепатита В (HBV) у пациента, содержащая:

i) по меньшей мере одно из следующего:

a) укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, и

b) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV,

c) антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H, и

d) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV; и

ii) РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, предпочтительно РНКи-агент выбран из группы, состоящей из:

1) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, которые представлены в Таблице 2;

2) РНКи-агента, имеющего последовательность смысловой цепи и последовательность антисмысловой цепи, которые представлены в Таблице 3;

3) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, которые представлены в Таблице 4, предпочтительно РНКи имеет модифицированную последовательность смысловой цепи и модифицированную последовательность антисмысловой цепи, которые представлены в Таблице 4;

4) РНКи-агента, нацеленного на последовательность-мишень, представленную в Таблице 5;

5) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, которые представлены в Таблице 6;

6) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность антисмысловой цепи, представленную в Таблице 7, и коровую последовательность смысловой цепи, представленную в Таблице 8, предпочтительно РНКи имеет модифицированную последовательность смысловой цепи, представленную в Таблице 7, и модифицированную последовательность антисмысловой цепи, представленную в Таблице 8; и

7) РНКи-агента, имеющего дуплекс антисмысловой цепи и смысловой цепи, представленный в Таблице 9, предпочтительно, РНКи-агент содержит дуплекс, представленный в Таблице 9.

2. Терапевтическая комбинация по п.1, содержащая по меньшей мере один компонент из числа антигена полимеразы HBV и укороченного корового антигена HBV.

3. Терапевтическая комбинация по п.2, содержащая антиген полимеразы HBV и укороченный коровый антиген HBV.

4. Терапевтическая комбинация по п.1, содержащая по меньшей мере одну молекулу из числа первой молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащей первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, и второй молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащей вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV.

5. Терапевтическая комбинация для применения в лечении инфекции вируса гепатита В (HBV) у пациента, содержащая

i) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2; и

ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н; и

iii) РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена HBV, где РНКи-агент выбран из группы, состоящей из:

1) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, которые представлены в Таблице 2;

2) РНКи-агента, имеющего последовательность смысловой цепи и последовательность антисмысловой цепи, которые представлены в Таблице 3;

3) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, которые представлены в Таблице 4, предпочтительно РНКи имеет модифицированную последовательность смысловой цепи и модифицированную последовательность антисмысловой цепи, которые представлены в Таблице 4;

4) РНКи-агента, нацеленного на последовательность-мишень, представленную в Таблице 5;

5) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность смысловой цепи и коровую последовательность антисмысловой цепи, которые представлены в Таблице 6;

6) РНКи-агента, имеющего коровую последовательность антисмысловой цепи, представленную в Таблице 7, и коровую последовательность смысловой цепи, представленную в Таблице 8, предпочтительно РНКи имеет модифицированную последовательность смысловой цепи, представленную в Таблице 7, и модифицированную последовательность антисмысловой цепи, представленную в Таблице 8; и

7) РНКи-агента, имеющего дуплекс антисмысловой цепи и смысловой цепи,

представленный в Таблице 9, предпочтительно, РНКи-агент содержит дуплекс, представленный в Таблице 9, более предпочтительно РНКи-агент конъюгирован с нацеливающим лигандом.

6. Терапевтическая комбинация по п.4 или 5, где первая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом укороченного корового антигена HBV, и вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом антигена полимеразы HBV, предпочтительно сигнальная последовательность независимо содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15, предпочтительно сигнальная последовательность независимо кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

7. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-6, где

а) укороченный коровый антиген HBV состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и

б) антиген полимеразы HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

8. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-7, где каждая из первой и второй молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения представляет собой молекулу ДНК, предпочтительно молекула ДНК присутствует в плазмидном или вирусном векторе.

9. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 4-8, содержащая первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения и вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

10. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 4-8, содержащая первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения и вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения в двух разных молекулах нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

11. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 4-10, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

12. Терапевтическая комбинация по п.11, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

13. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 4-12, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность,

имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

14. Терапевтическая комбинация по п.13, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

15. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-14, где РНКи-агент имеет дуплексную структуру AD04580; AD04585; AD04776; AD04872; AD04962; AD04963; AD04982; или AD05070, которые представлены в Таблице 9, предпочтительно РНКи-агент конъюгирован с нацеливающим лигандом (NAG13), (NAG13), (NAG18), (NAG18), (NAG24), (NAG24), (NAG25), (NAG25)s, (NAG26), (NAG26)s, (NAG27), (NAG27)s, (NAG28), (NAG28)s, (NAG29), (NAG29)s, (NAG30), (NAG30)s, (NAG31), (NAG31)s, (NAG32), (NAG32)s, (NAG33), (NAG33)s, (NAG34), (NAG34)s, (NAG35), (NAG35)s, (NAG36), (NAG36)s, (NAG37), (NAG37), (NAG38), (NAG38), (NAG39) или (NAG39), которые изображены в Таблице 10.

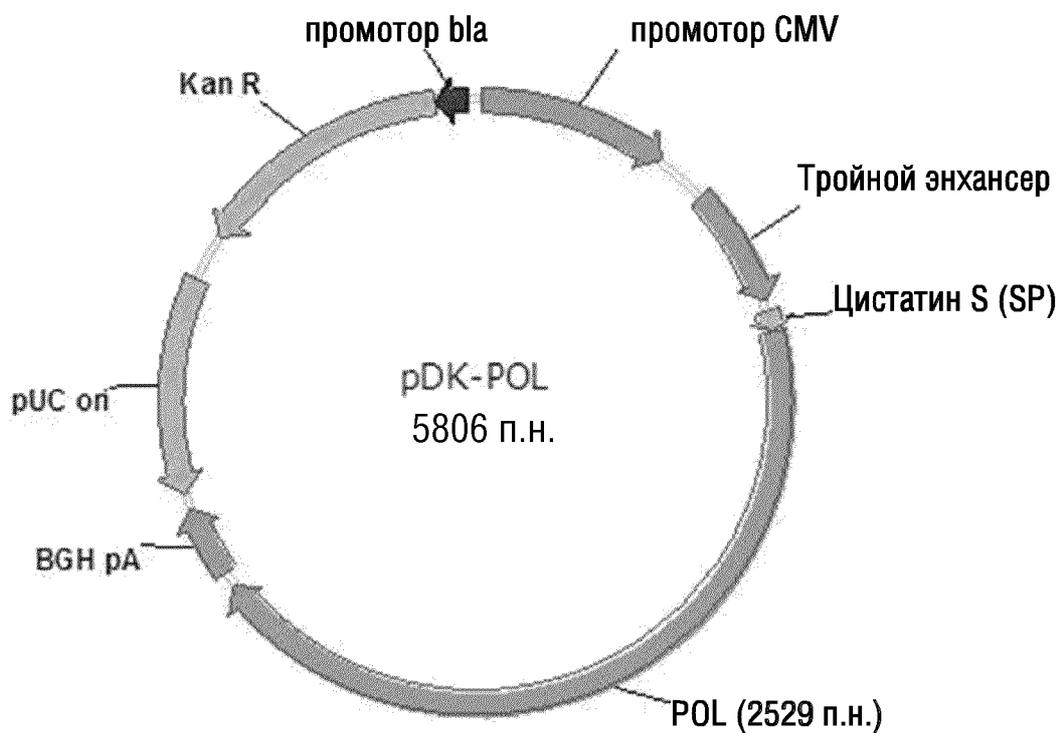
16. Набор, содержащий терапевтическую комбинацию по любому из пп. 1-15 и инструкции по применению терапевтической комбинации в лечении инфекции вируса гепатита В (HBV) у пациента.

17. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-15 для применения в лечении инфекции вируса гепатита В (HBV) у пациента.

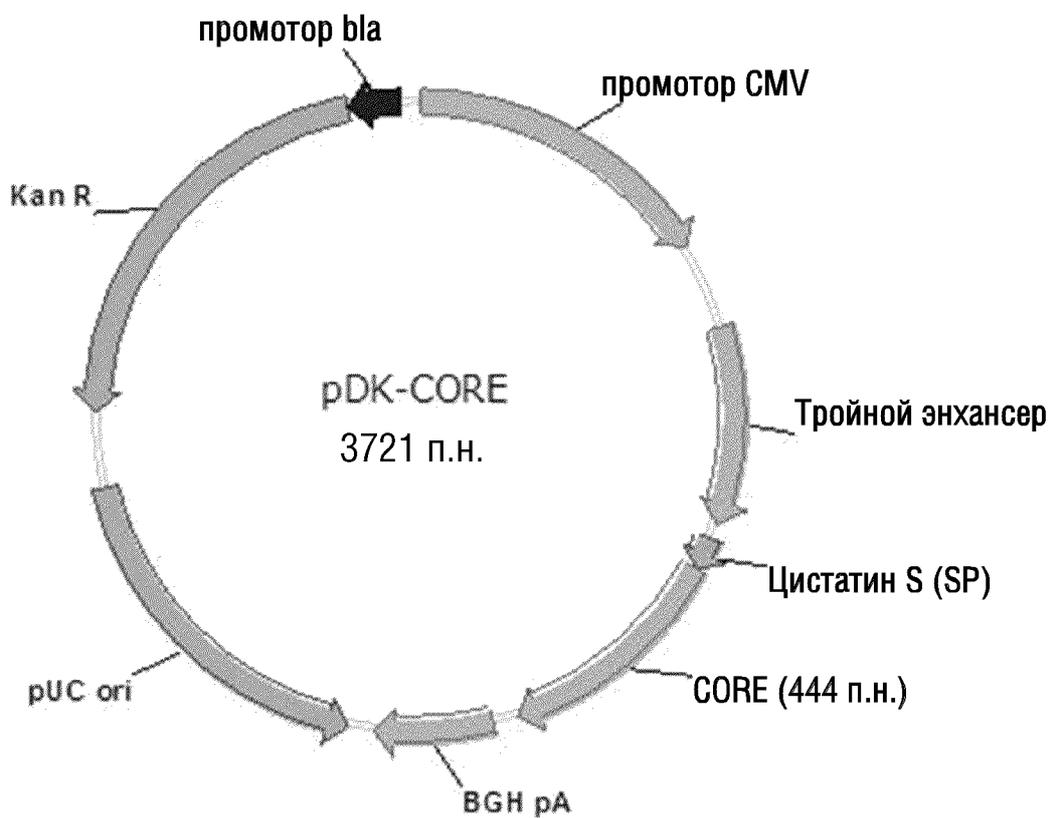
По доверенности

1/42

ФИГ.1А



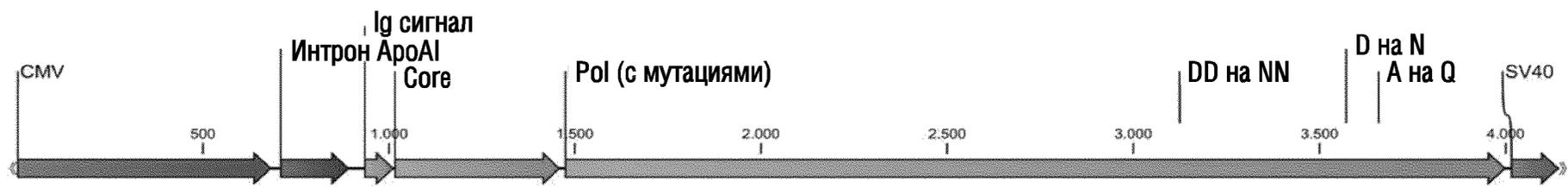
ФИГ.1В



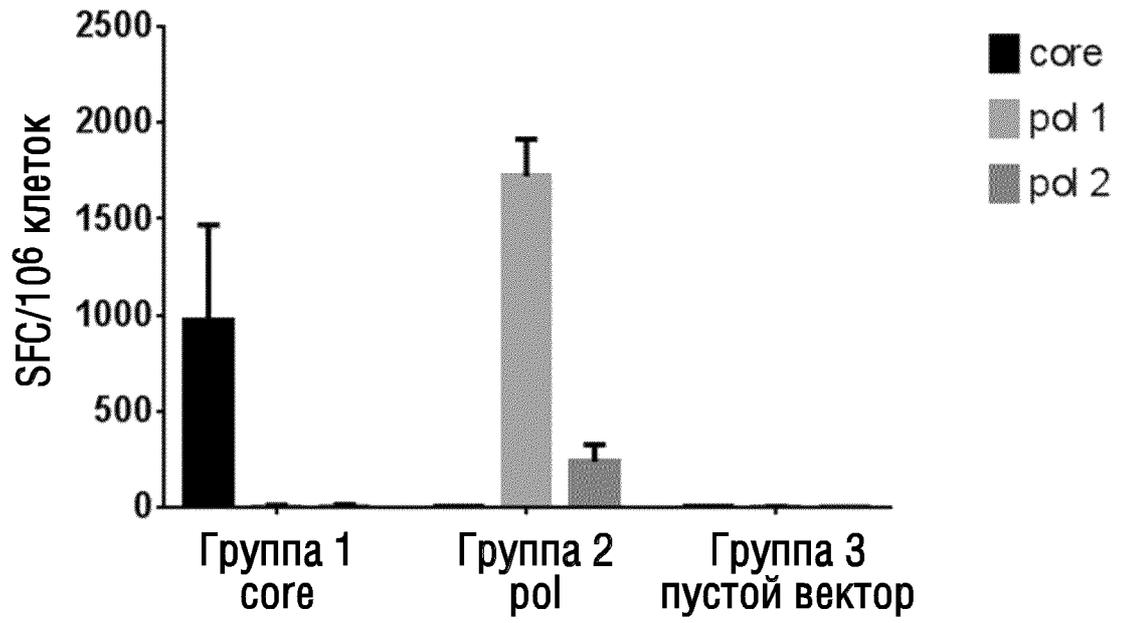
ФИГ.2А



ФИГ.2В



ФИГ.3



ФИГ.4

Таблица 2. Коровые последовательности дцРНК, нацеленной на ген HBV, из US20130005793

SEQ ID NO Последоват. смысловой цепи (5'-3')	SEQ ID NO Последоват. антисмысл. цепи (5'-3')
1 CAAGGUAUGUUGCCCGUUU	157 AAACGGGCAACAUACCUUG
2 CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	158 TACCAUUUAUGCCUACAG
3 UCUGCGGCGUUUAUCAUA	159 UAUGAUAAAACGCCGCAGA
3 UCUGCGGCGUUUAUCAUA	160 TAUGAUAAAACGCCGCAGA
4 ACCUCUGCCUAAUCAUCUC	161 GAGAUGAUUAGGCAGAGGU
5 UUUACUAGUGCCAUUUGUA	162 TACAAAUGGCACUAGUAAA
6 ACCUCUGCCUAAUCAUCUA	163 TAGAUGAUUAGGCAGAGGU
7 CUGUAGGCAUAAAUUGGUC	164 GACCAUUUAUGCCUACAG
8 UGUCUGCGGCGUUUAUCA	165 UGAUAAAACGCCGCAGACA
8 UGUCUGCGGCGUUUAUCA	166 TGAUAAAACGCCGCAGACA
9 UACUAGUGCCAUUUGUUCA	167 UGAACAAAUIGGCACUAGUA
9 UACUAGUGCCAUUUGUUCA	168 TGAACAAAUIGGCACUAGUA
10 CAACUUUUUCACCUCUGCA	169 TGCAGAGGUGAAAAGUUG
11 CCAUUUGUUCAGUGGUUCG	170 CGAACCACUGAACAAAUGG
12 CCAAGUGUUUGCUGACGCA	171 UGCGUCAGCAAACACUUGG
12 CCAAGUGUUUGCUGACGCA	172 TGCGUCAGCAAACACUUGG
13 CCAUUUGUUCAGUGGUUCA	173 TGAACCACUGAACAAAUGG
14 UUUACUAGUGCCAUUUGUU	174 AACAAAUGGCACUAGUAAA
15 CACCUCUGCCUAAUCAUCA	175 TGAUGAUUAGGCAGAGGUG
16 CUGGCUCAGUUUACUAGUG	176 CACUAGUAAACUGAGCCAG
17 CAAGGUAUGUUGCCCGUUA	177 TAACGGGCAACAUACCUUG
18 CUGGCUCAGUUUACUAGUA	178 TACUAGUAAACUGAGCCAG
19 GAGGCUUGUAGGCAUAAAUU	179 AAUUUUAUGCCUACAGCCUC
20 CAGUUUACUAGUGCCAUUU	180 AAAUGGCACUAGUAAACUG
21 AGGUAUGUUGCCCGUUUGU	181 ACAAACGGGCAACAUACCU
22 UAUGUUGCCCGUUUGUCCA	182 UGGACAAACGGGCAACAU
23 GAGGCUUGUAGGCAUAAAU	183 TAUUUUAUGCCUACAGCCUC
24 GUCUGCGGCGUUUAUCAU	184 AUGAUAAAACGCCGCAGAC
25 CAACUUUUUCACCUCUGCC	185 GGCAGAGGUGAAAAGUUG
26 CCGUGUGCACUUCGCUUCA	186 UGAAGCGAAGUGCACACGG
26 CCGUGUGCACUUCGCUUCA	187 TGAAGCGAAGUGCACACGG
27 UCAAGGUAUGUUGCCCGUA	188 TACGGGCAACAUACCUUGA
28 CAGUUUACUAGUGCCAUUA	189 TAAUGGCACUAGUAAACUG
29 UGGUGGACUUCUCUCAAUU	190 AAUUGAGAGAAGUCCACCA
30 AGGUAUGUUGCCCGUUUGA	191 TCAAACGGGCAACAUACCU
31 CUGCUCUGUUACAGGCGG	192 CCGCCUGUAAACAGAGCAG
32 UAUGUUGCCCGUUUGUCCU	193 AGGACAAACGGGCAACAU
33 UCAAGGUAUGUUGCCCGUU	194 AACGGGCAACAUACCUUGA
34 UCUUAUCAACACUCCGGA	195 UCCGGAAGUGUUGAUAGA
34 UCUUAUCAACACUCCGGA	196 TCCGGAAGUGUUGAUAGA

ФИГ.4 (продолжение)

35	CACCUCUGCCUAAUCAUCU	197	AGAUGAUUAGGCAGAGGUG
36	AUAAGAGGACUCUUGGACU	198	AGUCCAAGAGUCCUCUUAU
37	GUCUGCGGGGUUUUAUCA	199	TUGAUAAAACGCCGCAGAC
38	GGCGCUGAAUCCCGCGGAC	200	GUCCGCGGGAUUCAGCGCC
39	CGCGUCGCAGAAGAUCUCA	201	UGAGAUUCUUGCGACGCG
40	AAUGUCAACGACCGACCUU	202	AAGGUCGGUCGUUGACAUU
41	GCUCAGUUUACUAGUGCCA	203	UGGCACUAGUAAACUGAGC
42	UGGUGGACUUCUCUCAUA	204	TAUUGAGAGAAGUCCACCA
43	AUCGCCGCGUCGCAGAAGA	205	UCUUCUGCGACGCGGGCAU
44	GCCAUUUGUUCAGUGGUUC	206	GAACCACUGAACAAUUGGC
45	CGAUCCAUACUGCGGAACU	207	AGUCCCGCAGUAUGGAUCG
46	UCACCUCUGCCUAAUCAUC	208	GAUGAUUAGGCAGAGGUGA
47	GUGGACUUCUCUCAUUUU	209	AAAAUUGAGAGAAGUCCAC
48	GGGUACCAUAUUCUUGGG	210	CCCAAGAAUUGGUGACCC
49	GCCGCGUCGCAGAAGAUUCU	211	AGAUCUUCUGCGACGCGGC
50	UCAAUCGCCGCGUCGCAGA	212	UCUGCGACGCGGCGAUUGA
51	UGGAUGUGUCUGCGGGGUU	213	AACGCCGCAGACACAUCCA
52	UACUGUUAAGCCUCCAAG	214	CUUGGAGGCUUGAACAGUA
53	GUUUACUAGUGCCAUUUGU	215	ACAAAUGGCACUAGUAAAC
54	ACUAGUGCCAUUUGUUCAG	216	CUGAACAAUUGGCACUAGU
55	CCGCGUCGCAGAAGAUUCU	217	GAGAUUCUUGCGACGCGG
56	UAUCUUAUCAACACUCCG	218	CGGAAGUGUUGAUAGUAU
57	GGCCAAAUUCGCAGUCCC	219	GGGACUGCGAAUUUUGGCC
58	UUCACCUCUGCCUAAUCAU	220	AUGAUUAGGCAGAGGUGAA
59	CUCAGUUUACUAGUGCCAU	221	AUGGCACUAGUAAACUGAG
60	UGUUGCCCGUUUGUCCUCU	222	AGAGGACAAACGGGCAACA
61	UAGUGCCAUUUGUUCAGUG	223	CACUGAACAAUUGGCACUA
62	AGGCUGUAGGCAUAAAUUG	224	CAAUUUUUGCCUACAGCCU
63	AUGUGUCUGCGGCGUUUUA	225	UAAAACGCCGCAGACACAU
63	AUGUGUCUGCGGCGUUUUA	226	TAAAACGCCGCAGACACAU
64	ACUUCGCUUACCCUCUGCA	227	UGCAGAGGUGAAGCGAAGU
65	CGUGUGCACUUCGCUUCAC	228	GUGAAGCGAAGUGCACACG
66	GUGGUGGACUUCUCUCAAU	229	AUUGAGAGAAGUCCACCAC
67	UGUGUCUGCGGCGUUUUAU	230	AUAAAACGCCGCAGACACA
68	AAGGUUUGUUGCCCGUUUG	231	CAAACGGGCAACAUACCUU
69	UCAACGACCGACCUUGAGG	232	CCUCAAGGUCGGUCGUUGA
70	CAUAAGAGGACUCUUGGAC	233	GUCCAAGAGUCCUCUUAUG
71	GUCAACGACCGACCUUGAG	234	CUCAAGGUCGGUCGUUGAC
72	AUAUUCUUGGGAACAAGAG	235	CUCUUGUUCCCAAGAAUUAU
73	UGCUCGUGUACAGGCGGG	236	CCCGCCUGUAAACACGAGCA
74	CAAUCGCCGCGUCGCAGAA	237	UUCUGCGACGCGGCGAUUG
75	ACUGUUAAGCCUCCAAGC	238	GCUUGGAGGCUUGAACAGU
76	CGCCGCGUCGCAGAAGAUC	239	GAUCUUCUGCGACGCGGCG

ФИГ.4 (продолжение)

77	CAUUUGUUCAGUGGUUCGU	240	ACGAACCACUGAACAAAUG
78	CGCUGAAUCCCGCGGACGA	241	UCGUCCGCGGGAUUCAGCG
79	UGGGUCACCAUUAUUCUUGG	242	CCAAGAAUAUGGUGACCCA
80	UCCUCUGCCGAUCCAUAUCU	243	AGUAUGGAUCGGCAGAGGA
81	AUGUCAACGACCGACCUUG	244	CAAGGUCGGUCGUUGACAU
82	CCUCUGCCUAAUCAUCUCA	245	UGAGAUGAUUAGGCAGAGG
83	ACCGUGUGCACUUCGCUUC	246	GAAGCGAAGUGCACACGGU
84	UGCCGAUCCAUAUCUGCGGA	247	UCCGCAGUAUGGAUCGGCA
85	CAGAGUCUAGACUCUGUGU	248	ACCACGAGUCUAGACUCUG
86	CUGUUCAAGCCUCCAAGCU	249	AGCUUGGAGGCUUGAACAG
87	GGAGGCUGUAGGCAUAAAU	250	AUUUAUGCCUACAGCCUCC
88	AGGAGGCGUGAGGCAUAAA	251	UUUAUGCCUACAGCCUCCU
89	GGUGGACUUCUCUCAAUUU	252	AAAUUGAGAGAAGUCCACC
90	GCAACUUUUUCACCUCUGC	253	GCAGAGGUGAAAAAGUUGC
91	CUGCUCGUGUACAGGCGA	254	TCGCCUGUACACGAGCAG
92	CUAGUGCCAUUUGUUCAGU	255	ACUGAACAAAUGGCACUAG
93	CUGCCGAUCCAUAUCUGCGG	256	CCGCAGUAUGGAUCGGCAG
94	GUGUGCACUUCGCUUCACC	257	GGUGAAGCGAAGUGCACAC
95	GCUCGUGUACAGGCGGGC	258	GCCCGCCUGUACACGAGC
96	CCUAUCUUUAUCAACACUUC	259	GAAGUGUUGAUAAGAUAGG
97	UCUCAAUUCGCGCGUCGCA	260	UGCGACGCGGCGAUUGAGA
98	GCCCUCUCUGCCUUCUCA	261	UGAGAAGGCACAGACGGGC
99	CUAUCUUAUCAACACUCC	262	GGAAGUGUUGAUAAAGAUAG
100	AUGUUGCCCGUUUGUCCUC	263	GAGGACAAACGGGCAACAU
101	GUAUGUUGCCCGUUUGUCC	264	GGACAAACGGGCAACAUAC
102	CUUCGCUUCACCUCUGCAC	265	GUGCAGAGGUGAAGCGAAG
103	UGUGCACUUCGCUUCACCU	266	AGGUGAAGCGAAGUGCACA
104	GCCAAAUUCGCAGUCCCG	267	CGGGACUGCGAAUUUUGGC
105	CCUGCUCGUGUACAGGCG	268	CGCCUGUACACGAGCAGG
106	UGGAGUGUGGAUUCGCACU	269	AGUGCGAAUCCACACUCCA
107	AACGACCGACCUUGAGGCA	270	UGCCUCAAGGUCGGUCGUU
108	ACAGAGUCUAGACUCGUGG	271	CCACGAGUCUAGACUCUGU
109	AAUCGCGCGUCGCAGAAG	272	CUUCUGCGACGCGGCGAUU
110	GGUAUGUUGCCCGUUUGUC	273	GACAAACGGGCAACAUACC
111	GCCGAUCCAUAUCUGCGGAA	274	UUCGCGAGUAUGGAUCGGC
112	GCCCUAUCUUAUCAACACU	275	AGUGUUGAUAAGAUAGGGC
113	AGUUUACUAGUGCCAUUUG	276	CAAUUGGCACUAGUAAACU
114	UGUCAACGACCGACCUUGA	277	UCAAGGUCGGUCGUUGACA
115	ACUUCUCUCAAUUUUCUAG	278	CUAGAAAAUUGAGAGAAGU
116	GCGCGGGACGUCCUUGUC	279	GACAAAGGACGUCCCGCGC
117	UCUAGACUCGUGGUGGACU	280	AGUCCACCACGAGUCUAGA
118	GAUCCAUAUCGCGGAACUC	281	GAGUUCGCGAGUAUGGAUC
119	CUCUGCCGAUCCAUAUCUGC	282	GCAGUAUGGAUCGGCAGAG

ФИГ.4 (продолжение)

120	UCUGCCGAUCCAUAUCUGCG	283	CGCAGUAUGGAUCGGCAGA
121	CCUCUGCCGAUCCAUAUCUG	284	CAGUAUJGGAUCGGCAGAGG
122	GCACCUCUCUUUACGCGGU	285	ACCGCGUAAAGAGAGGUGC
123	AAGAACUCCCUCGCCUCGC	286	GCGAGGCGAGGGAGUUCUU
124	GAACUCCCUCGCCUCGCAG	287	CUGCGAGGCGAGGGAGUUC
125	UCUCUCAUUUUCUAGGGC	288	GCCCUAGAAAUUGAGAGA
126	GGGCGCACCUCUCUUUACG	289	CGUAAAGAGAGGUGCGCCC
127	CCGAUCCAUAUCUGCGGAAC	290	GUUCCGCAGUAUGGAUCGG
128	AACUCCCUCGCCUCGCAGA	291	UCUGCGAGGCGAGGGAGUU
129	CUCCUCUGCCGAUCCAUAUC	292	GUAUGGAUCGGCAGAGGAG
130	GGAGUGUGGAUUCGCACUC	293	GAGUGCGAAUCCACACUCC
131	CGGGCGCACCUCUCUUUAC	294	GUAAAGAGAGGUGCGCCCG
132	GUCUCAAUUCGCCGCGUCGC	295	GCGACGCGGGCAUUGAGAC
133	AUCCAUAUCUGCGGAACUCC	296	GGAGUUCGCGAGUAUGGAU
134	CGCACCUCUCUUUACGCGG	297	CCGCGUAAAGAGAGGUGCG
135	CAACGACCGACCUUGAGGC	298	GCCUCAAGGUCGGUCGUUG
136	CCAUAUCUGCGGAACUCCUA	299	UAGGAGUUCGCGAGUAUGG
137	UGAAUCCC GCGGACGACCC	300	GGGUCGUCCGCGGGAUUCA
138	AGAACUCCCUCGCCUCGCA	301	UGCGAGGCGAGGGAGUUCU
139	GGCGCACCUCUCUUUACGC	302	GCGUAAAGAGAGGUGCGCC
140	GCGCACCUCUCUUUACGCG	303	CGCGUAAAGAGAGGUGCGC
141	GCUGAAUCCC GCGGACGAC	304	GUCGUCCGCGGGAUUCAGC
142	CACUUCGCUUACCCUCUGC	305	GCAGAGGUGAAGCGAAGUG
143	CUCAAUCGCCGCGUCGCAG	306	CUGCGACGCGGGCAUUGAG
144	UCCCGUCGGCGCUGAAUCC	307	GGAUUCAGCGCCGACGGGA
145	CUGAAUCCC GCGGACGACC	308	GGUCGUCCGCGGGAUUCAG
146	AGAGUCUAGACUCGUGGUG	309	CACCACGAGUCUAGACUCU
147	UCCAUAUCUGCGGAACUCCU	310	AGGAGUUCGCGAGUAUGGA
148	GCGCUGAAUCCC GCGGACG	311	CGUCCGCGGGAUUCAGCGC
149	AGUGUGGAUUCGCACUCCU	312	AGGAGUGCGAAUCCACACU
150	CCCUGCUCGUGUACAGGC	313	GCCUGUAACACGAGCAGGG
151	GAAUCCC GCGGACGACCCG	314	CGGGUCGUCCGCGGGAUUC
152	AAGCUGUGCCUUGGGUGGC	315	GCCACCCAAGGCACAGCUU
153	GCCUUGCUCGUGUACAGG	316	CCUGUAACACGAGCAGGGC
154	GUCCCGUCGGCGCUGAAUC	317	GAUUCAGCGCCGACGGGAC
155	AUCUUAUCAACACUUCGGG	318	CCGGAAGUGUUGAUUAAGAU
156	CUUAUCAACACUUCGGAA	319	UUCGGGAAGUGUUGAUUAAG
156	CUUAUCAACACUUCGGAA	320	TUCCGGAAGUGUUGAUUAAG

ФИГ.5

Таблица 3. Модифицированные последовательности дцРНК, нацеленных на ген HBV, из US20130005793

SEQ ID NO	Последовательность смысловой цепи (5'-3')	SEQ ID NO	Последовательность антисмысловой цепи (5'-3')
321	caAGGGuAuGuuGcccGuuudTsdT	485	AAACGGGcAAcAuACCUUGdTsdT
322	CfuGfuAfgGfcAfuAfaAfuUfgGfuAf(invdt)	486	pdTAfcCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgdTsdT
323	ucuGcGGcGuuuuAucAuAdTsdT	487	uAUGAuAAAACGCCGcAGAdTsdT
324	UfcUfgCfgGfcGfuUfuUfaUfcAfuAf(invdt)	488	pdTAfuGfaUfaAfaAfcGfcCfcGfaGfadTsdT
325	accucuGccuAAucAucucdTsdT	489	GAGAUGAUuAGGcAGAGGUdTsdT
326	UfuUfaCfuAfgUfgCfcAfuUfuGfuAf(invdt)	490	pdTAfcAfaAfuGfgCfaCfuAfgUfaAfadTsdT
327	AfcCfuCfuGfcCfuAfaUfcAfuCfuAf(invdt)	491	pdTAfgAfuGfaUfuAfgGfcAfgAfgGfudTsdT
328	cuGuAGGcAuAAAuuGGucdTsdT	492	GACcAAUUuAUGCCuAcAGdTsdT
329	ugucuGcGGcGuuuuAucAdTsdT	493	UGAuAAAACGCCGcAGAcAdTsdT
330	UfgUfcUfgCfgGfcGfuUfuUfaUfcAf(invdt)	494	pdTGfaUfaAfaAfcGfcCfcGfaGfaCfadTsdT
331	uacuAGuGccAuuuGuucAdTsdT	495	UGAAcAAAUGGcACuAGuAdTsdT
332	UfaCfuAfgUfgCfcAfuUfuGfuUfcAf(invdt)	496	pdTGfaAfcAfaAfuGfgCfaCfuAfgUfadTsdT
333	CfaAfcUfuUfuUfcAfcCfuCfuGfcAf(invdt)	497	pdTGfcAfgAfgGfuGfaAfaAfaGfuUfgdTsdT
334	ccAuuuGuucAGuGGuucGdTsdT	498	CGAACcACUGAAcAAAUGGdTsdT
335	ccAAGuGuuuGcuGAcGcAdTsdT	499	UGCGUcAGcAAAACUUGGdTsdT
336	CfcAfaGfuGfuUfuGfcUfgAfcGfcAf(invdt)	500	pdTGfcGfuCfaGfcAfaAfcAfcUfuGfgdTsdT
337	CfcAfuUfuGfuUfcAfgUfgGfuUfcAf(invdt)	501	pdTGfaAfcCfaCfuGfaAfcAfaAfuGfgdTsdT
338	uuuAcuAGuGccAuuuGuudTsdT	502	AAcAAAUGGcACuAGuAAAdTsdT
339	CfaCfcUfcUfgCfcUfaAfuCfaUfcAf(invdt)	503	pdTGfaUfgAfuUfaGfgCfaGfaGfgUfgdTsdT
340	cuGGcucAGuuuAcuAGuGdTsdT	504	cACuAGuAAACUGAGCcAGdTsdT
341	CfaAfgGfuAfuGfuUfgCfcCfuUfuAf(invdt)	505	pdTAfaCfcGfgCfaAfcAfuAfcCfuUfgdTsdT
342	CfuGfgCfuCfaGfuUfuAfcUfaGfuAf(invdt)	506	pdTAfcUfaGfuAfaAfcUfgAfgCfcAfgdTsdT
343	gaGGcuGuAGGcAuAAAuudTsdT	507	AAUUuAUGCCuAcAGCCUCdTsdT
344	caGuuuAcuAGuGccAuudTsdT	508	AAAUGGcACuAGuAAACUGdTsdT

ФИГ.5 (продолжение)

345	agGuAuGuuGcccGuuuGudTsdT	509	AcAAACGGGcAAcAuACCUdTsdT
346	UfaUfgUfuGfcCfcGfuUfuGfuCfcAf(invdt)	510	pdTGfgAfcAfaAfcGfgGfcAfaCfaUfadTsdT
347	GfaGfgCfuGfuAfgGfcAfuAfaAfuAf(invdt)	511	pdTAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfcUfcdTsdT
348	gucuGcGGcGuuuuAucAudTsdT	512	AUGAuAAAACGCCGcAGACdTsdT
349	caAcuuuuuAccucuGccdTsdT	513	GGcAGAGGUGAAAAAGUUGdTsdT
350	ccGuGuGcAcuucGcuucAdTsdT	514	UGAAGCGAAGUGcAcACGGdTsdT
351	CfcGfuGfuGfcAfcUfuCfgCfuUfcAf(invdt)	515	pdTGfaAfgCfgAfaGfuGfcAfcAfcGfgdTsdT
352	UfcAfaGfgUfaUfgUfuGfcCfcGfuAf(invdt)	516	pdTAfcGfgGfcAfaCfaUfaCfcUfuGfadTsdT
353	CfaGfuUfuAfcUfaGfuGfcCfaUfuAf(invdt)	517	pdTAfaUfgGfcAfcUfaGfuAfaAfcUfgdTsdT
354	ugGuGGAcuuucucAAuudTsdT	518	AAUUGAGAGAAGUCCAcCdTsdT
355	AfgGfuAfuGfuUfgCfcCfgUfuUfgAf(invdt)	519	pdTCfaAfaCfgGfgCfaAfcAfuAfcCfudTsdT
356	cuGcucGuGuuAcAGGcGGdTsdT	520	CCGCCUGuAAcACGAGcAGdTsdT
357	uauGuuGcccGuuuGuccudTsdT	521	AGGAcAAACGGGcAAcAuAdTsdT
358	ucAAGGuAuGuuGcccGuudTsdT	522	AACGGGcAAcAuACCUUGAdTsdT
359	ucuuAucAAcAcuuccGGAdTsdT	523	UCCGGAAGUGUUGAuAAGAdTsdT
360	UfcUfuAfuCfaAfcAfcUfuCfcGfgAf(invdt)	524	pdTCfcGfgAfaGfuGfuUfgAfuAfaGfadTsdT
361	caccucuGccuAAucAucudTsdT	525	AGAUGAUuAGGcAGAGGUGdTsdT
362	auAAGAGGAcucuuGGAcudTsdT	526	AGUCcAAGAGUCCUCUuAUdTsdT
363	GfuCfuGfcGfgCfgUfuUfuAfuCfaAf(invdt)	527	pdTUfgAfuAfaAfaCfcCfcGfcAfgAfcdTsdT
364	ggcGcuGAAucccGcGGAcdTsdT	528	GUCCGCGGGAUUCAGCGCCdTsdT
365	cgcGucGcAGAAGAucucAdTsdT	529	UGAGAUCUUCUGCGACGCGdTsdT
366	aaUGucAAcGAccGAccuudTsdT	530	AAGGUCGUGCGUUGAcAUUdTsdT
367	gcucAGuuuAcuAGuGccAdTsdT	531	UGGcACuAGuAAACUGAGCdTsdT
368	UfgGfuGfgAfcUfuCfuCfuCfaAfuAf(invdt)	532	pdTAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfadTsdT
369	aucGccGcGucGcAGAAGAdTsdT	533	UCUUCUGCGACGCGGCGAUdTsdT
370	gccAuuuGuucAGuGGuucdTsdT	534	GAACcACUGAAcAAAUGGCdTsdT
371	cgAuccAuAcuGcGGAAcudTsdT	535	AGUCCGcAGuAUGGAUCGdTsdT
372	ucAccucuGccuAAucAucdTsdT	536	GAUGAUuAGGcAGAGGUGAdTsdT
373	guGGAcuuucucAAuuuudTsdT	537	AAAAUUGAGAGAAGUCCAcCdTsdT
374	ggGucAccAuAuucuuGGdTsdT	538	CCcAAGAAuAUGGUGACCCdTsdT
375	gccGcGucGcAGAAGAucudTsdT	539	AGAUCUUCUGCGACGCGCdTsdT
376	ucAAucGccGcGucGcAGAdTsdT	540	UCUGCGACGCGCGAUUGAdTsdT

ФИГ.5 (продолжение)

377	ugGAuGuGucuGcGGcGuudTsdT	541	AACGCCGcAGAcAcAUCcAdTsdT
378	uacuGuucAAGccuccAAGdTsdT	542	CUUGGAGGCUUGAAcAGuAdTsdT
379	guuuAcuAGuGccAuuuGudTsdT	543	AcAAAUGGcACuAGuAAACdTsdT
380	acuAGuGccAuuuGuucAGdTsdT	544	CUGAAcAAAUGGcACuAGUdTsdT
381	ccGcGucGcAGAAGAuucudTsdT	545	GAGAUCUUCUGCGACGCGdTsdT
382	uaucuuAucAAcAcuuccGdTsdT	546	CGGAAGUGUUGAuAAGAuAdTsdT
383	ggccAAAuucGcAGuccdTsdT	547	GGGACUGCGAAUUUUGGCCdTsdT
384	uucAccucuGccuAAucAudTsdT	548	AUGAUuAGGcAGAGGUGAAdTsdT
385	cucAGuuuAcuAGuGccAudTsdT	549	AUGGcACuAGuAAACUGAGdTsdT
386	uguuGcccGuuuGuccucudTsdT	550	AGAGGAcAAACGGGcAAcAdTsdT
387	uaGuGccAuuuGuucAGuGdTsdT	551	cACUGAAcAAAUGGcACuAdTsdT
388	agGcuGuAGGcAuAAuuGdTsdT	552	cAAUuAuUGCCuAcAGCCUdTsdT
389	auGuGucuGcGGcGuuuuAdTsdT	553	uAAAACGCCGcAGAcAcAUdTsdT
390	AfuGfuGfuCfuGfcGfgCfgUfuUfuAf(invdt)	554	pdTAfaAfaCfcGfcAfgAfcAfcAfudTsdT
391	acuucGcuucAccucuGcAdTsdT	555	UGcAGAGGUGAAGCGAAGUdTsdT
392	cguGuGcAcuucGcuucAcdTsdT	556	GUGAAGCGAAGUGcAcACGdTsdT
393	guGGuGGAcuucucucAAudTsdT	557	AUUGAGAGAAGUCcAcCACdTsdT
394	uguGucuGcGGcGuuuuAudTsdT	558	AuAAAACGCCGcAGAcAcAdTsdT
395	aaGGuAuGuuGcccGuuuGdTsdT	559	cAAACGGGcAAcAuACCUUdTsdT
396	ucAAcGAccGAccuuGAGGdTsdT	560	CCUcAAGGUCGGUCGUUGAdTsdT
397	cauAAGAGGAcucuuGGAcdTsdT	561	GUCcAAGAGUCCUCUuAUGdTsdT
398	gucAAcGAccGAccuuGAGdTsdT	562	CUcAAGGUCGGUCGUUGACdTsdT
399	auAuucuuGGAAcAAGAGdTsdT	563	CUCUUGUUCcAAGAAuAUdTsdT
400	ugcucGuGuuAcAGGcGGGdTsdT	564	CCC GCCUGuAAcACGAGcAdTsdT
401	caAucGccGcGucGcAGAAdTsdT	565	UUCUGCGACGCGCGAUUGdTsdT
402	acuGuucAAGccuccAAGdTsdT	566	GCUUGGAGGCUUGAAcAGUdTsdT
403	cgccGcGucGcAGAAGAuCdTsdT	567	GAUCUUCUGCGACGCGCGdTsdT
404	cauuuGuucAGuGGuucGudTsdT	568	ACGAACcACUGAAcAAAUGdTsdT
405	cgcuGAAucccGcGGAcGAdTsdT	569	UCGUCCGCGGGAUUcAGCGdTsdT
406	ugGGucAccAuAuucuuGGdTsdT	570	CcAAGAAuAUGGUGACCcAdTsdT
407	uccucuGccGAuccAuAcudTsdT	571	AGuAUGGAUCGGcAGAGGAdTsdT
408	auGucAAcGAccGAccuuGdTsdT	572	cAAGGUCGGUCGUUGAcAUdTsdT

ФИГ.5 (продолжение)

409	ccucuGccuAAucAucucAdTsdT	573	UGAGAUGAUuAGGcAGAGGdTsdT
410	accGuGuGcAcuucGcuucdTsdT	574	GAAGCGAAGUGcAcACGGUdTsdT
411	ugccGAuccAuAcuGcGGAdTsdT	575	UCCGcAGuAUGGAUCGGcAdTsdT
412	caGAGucuAGAcucGuGGudTsdT	576	ACcACGAGUCuAGACUCUGdTsdT
413	cuGuucAAGccuccAAGcudTsdT	577	AGCUUGGAGGCUUGAAcAGdTsdT
414	ggAGGcuGuAGGcAuAAAudTsdT	578	AUUuAUGCCuAcAGCCUCCdTsdT
415	agGAGGcuGuAGGcAuAAAdTsdT	579	UUuAUGCCuAcAGCCUCCUdTsdT
416	gguGGAcuucucucAAuuudTsdT	580	AAAUUGAGAGAAGUCcACCDTsdT
417	gcAAcuuuuucAccucuGcdTsdT	581	GcAGAGGUGAAAAGUUGCdTsdT
418	CfuGfcUfcGfuGfuUfaCfaGfgCfgAf(invdt)	582	pdTCfgCfcUfgUfaAfcAfcGfaGfcAfgdTsdT
419	cuAGuGccAuuuGuucAGudTsdT	583	ACUGAAcAAAUGGcACuAGdTsdT
420	cuGccGAuccAuAcuGcGGdTsdT	584	CCGcAGuAUGGAUCGGcAGdTsdT
421	guGuGcAcuucGcuucAccdTsdT	585	GGUGAAGCGAAGUGcAcACdTsdT
422	gcucGuGuuAcAGGcGGGdTsdT	586	GCCCCCGUGuAAcACGAGCdTsdT
423	ccuAucuuAucAAcAcuucdTsdT	587	GAAGUGUUGAuAAGAuAGdTsdT
424	ucucAAucGccGcGucGcAdTsdT	588	UGCGACGCGCGAUUGAGAdTsdT
425	gcccGucuGuGccuucucAdTsdT	589	UGAGAAGGcAcAGACGGGCdTsdT
426	cuAucuuAucAAcAcuucdTsdT	590	GGAAGUGUUGAuAAGAuAGdTsdT
427	auGuuGcccGuuuGuuccdTsdT	591	GAGGAcAAACGGGcAAcAUdTsdT
428	guAuGuuGcccGuuuGuuccdTsdT	592	GGAcAAACGGGcAAcAuACdTsdT
429	cuucGcuucAccucuGcAdTsdT	593	GUGcAGAGGUGAAGCGAAGdTsdT
430	uguGcAcuucGcuucAccudTsdT	594	AGGUGAAGCGAAGUGcAcAdTsdT
431	gccAAAuucGcAGucccGdTsdT	595	CGGGACUGCGAAUUUUGGCdTsdT
432	ccuGcuGcGuuAcAGGcGdTsdT	596	CGCCUGuAAcACGAGcAGGdTsdT
433	ugGAGuGuGGAuucGcAcudTsdT	597	AGUGCGAAUCcAcACUCcAdTsdT
434	aacGAccAccuuGAGGcAdTsdT	598	UGCCUcAAGGUCGGUCGUUdTsdT
435	acAGAGucuAGAcucGuGGdTsdT	599	CcACGAGUCuAGACUCUGUdTsdT
436	aaucGccGcGucGcAGAAGdTsdT	600	CUUCUGCGACGCGCGAUUdTsdT
437	gguAuGuuGcccGuuuGucdTsdT	601	GAcAAACGGGcAAcAuACCdTsdT
438	gccGAuccAuAcuGcGGAAdTsdT	602	UUCGcAGuAUGGAUCGGCdTsdT
439	gcccuAucuuAucAAcAcudTsdT	603	AGUGUUGAuAAGAuAGGGCdTsdT
440	aguuuAcuAGuGccAuuuGdTsdT	604	cAAAUJGcACuAGuAAACUdTsdT

ФИГ.5 (продолжение)

441	ugucAAcGAccGAccuuGAdTsdT	605	UcAAGGUCGGUCGUUGAcAdTsdT
442	acuucucucAAuuuuucuAGdTsdT	606	CuAGAAAAUUGAGAGAAGUdTsdT
443	gcGcGGGAcGuccuuuGucdTsdT	607	GAcAAAGGACGUCCCCGCGdTsdT
444	ucuAGAcucGuGGuGGAcudTsdT	608	AGUCcACcACGAGUCuAGAdTsdT
445	gauccAuAcuGcGGAAcucdTsdT	609	GAGUUCcGcAGuAUGGAUCdTsdT
446	cucuGccGAuccAuAcuGcdTsdT	610	GcAGuAUGGAUCGGcAGAGdTsdT
447	ucuGccGAuccAuAcuGcGdTsdT	611	CGcAGuAUGGAUCGGcAGAdTsdT
448	ccucuGccGAuccAuAcuGdTsdT	612	cAGuAUGGAUCGGcAGAGGdTsdT
449	gcAccucucuuuAcGcGGudTsdT	613	ACCGCGuAAAGAGAGGUGCdTsdT
450	aaGAAcuccucGccucGcdTsdT	614	GCGAGGCGAGGGAGUUCUdTsdT
451	gaAcuc.cucGccucGcAGdTsdT	615	CUGCGAGGCGAGGGAGUUCdTsdT
452	ucucucAAuuuuucuAGGGcdTsdT	616	GCCCuAGAAAAUUGAGAGAdTsdT
453	ggGcGcAccucucuuuAcGdTsdT	617	CGuAAAGAGAGGUGCGCCdTsdT
454	ccGAuccAuAcuGcGGAAcdTsdT	618	GUUCcGcAGuAUGGAUCGGdTsdT
455	aacuccucGccucGcAGAdTsdT	619	UcUGCGAGGCGAGGGAGUUCdTsdT
456	cuccucuGccGAuccAuAcdTsdT	620	GuAUGGAUCGGcAGAGGAGdTsdT
457	ggAGuGuGGAuucGcAcucdTsdT	621	GAGUGCGAAUcAcACUCCdTsdT
458	cgGGcGcAccucucuuuAcdTsdT	622	GuAAAGAGAGGUGCGCCGdTsdT
459	gucucAAucGccGcGucGcdTsdT	623	GCGACGCGGCGAUUGAGACdTsdT
460	auccAuAcuGcGGAAcuccdTsdT	624	GGAGUUCcGcAGuAUGGAUdTsdT
461	cgcAccucucuuuAcGcGGdTsdT	625	CCCGGuAAAGAGAGGUGCGdTsdT
462	caAcGAccGAccuuGAGGcdTsdT	626	GCCUcAAGGUCGGUCGUUGdTsdT
463	ccAuAcuGcGGAAcuccuAdTsdT	627	uAGGAGUUCcGcAGuAUGGdTsdT
464	ugAAuccGcGGAcGAcccdTsdT	628	GGGUCGUCCGCGGGAUUCAdTsdT
465	agAAcuccucGccucGcAdTsdT	629	UGCGAGGCGAGGGAGUUCdTsdT
466	ggcGcAccucucuuuAcGcdTsdT	630	GCGuAAAGAGAGGUGCGCCdTsdT
467	gcGcAccucucuuuAcGcGdTsdT	631	CGCGuAAAGAGAGGUGCGCdTsdT
468	gcuGAAuccGcGGAcGAccdTsdT	632	GUCGUCCGCGGGAUUCAGCdTsdT
469	cacucGcuucAccucGcdTsdT	633	GcAGAGGUGAAGCGAAGUGdTsdT
470	cucAAucGccGcGucGcAGdTsdT	634	CUGCGACGCGGCGAUUGAGdTsdT
471	ucccGucGGcGcuGAAuccdTsdT	635	GGAUUCAGCGCCGACGGAdTsdT
472	cuGAAuccGcGGAcGAccdTsdT	636	GGUCGUCCGCGGGAUUCAGdTsdT
473	agAGucuAGAcucGuGGuGdTsdT	637	cACcACGAGUCuAGACUCUdTsdT
474	uccAuAcuGcGGAAcuccdTsdT	638	AGGAGUUCcGcAGuAUGGAdTsdT
475	gcGcuGAAuccGcGGAcGdTsdT	639	CGUCCGCGGGAUUCAGCGCdTsdT
476	aguGuGGAuucGcAcuccdTsdT	640	AGGAGUGCGAAUcAcACUdTsdT
477	cccuGcucGuGuuAcAGGcdTsdT	641	GCCUGuAAcACGAGcAGGGdTsdT
478	gaAuccGcGGAcGAcccdTsdT	642	CGGGUCGUCCGCGGGAUUCdTsdT
479	aaGcuGuGccuuGGGuGGcdTsdT	643	GCCACCcAAGGcAcAGCUUdTsdT
480	gccuGcucGuGuuAcAGGdTsdT	644	CCUGuAAcACGAGcAGGGCdTsdT
481	gucccGucGGcGcuGAAuccdTsdT	645	GAUUCAGCGCCGACGGGACdTsdT
482	aucuuAucAAcAcuuccGGdTsdT	646	CCGGAAGUGUUGAuAAGAUdTsdT
483	cuuAucAAcAcuuccGGAAdTsdT	647	UUCCGGAAGUGUUGAuAAGdTsdT

ФИГ.6

Таблица 4. Коровые последовательности дцРНК, нацеленные на ген HBV, и их модифицированные эквиваленты из US20130005793

Коровая последовательность				Модифицированная последовательность			
SEQ ID NO	Последовательность смысловой цепи (5'-3')	SEQ ID NO	Последовательность смысловой цепи (5'-3')	SEQ ID NO	Последовательность антисмысловой цепи (5'-3')	SEQ ID NO	Последовательность антисмысловой цепи (5'-3')
1	CAAGGUUUGUUGCCCGUUU	157	AAACGGGCAACAUACCUUG	321	caAGGuAuGuuGcccGuuu dTsdT	485	AAACGGGcAAcAuACCUUGd TsdT
2	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	158	TACCAAUUUAUGCCUACAG	322	CfuGfuAfgGfcAfuAfaAfu UfgGfuAf(invdt)	486	pdTafcCfaAfuUfuAfuGfcCfu AfcAfgdTsdT
3	UCUGCGGCGUUUUUAUCAUA	159	UAUGAUAAAACGCCGCAGA	323	ucuGcGgGcGuuuuAucAuA dTsdT	487	uAUGAuAAAACGCCcAGAd TsdT
3	UCUGCGGCGUUUUUAUCAUA	160	TAUGAUAAAACGCCGCAGA	324	UfcUfgCfgGfcGfuUfuUfa UfcAfuAf(invdt)	488	pdTAfuGfaUfaAfaAfcGfcCfc CfaGfadTsdT
4	ACCUCUGCCUAAUCAUCUC	161	GAGAUGAUUAGGCAGAGGU	325	aecucuGccuAAucAucucd TsdT	489	GAGAUGAUuAGGcAGAGGU dTsdT
5	UUUACUAGUGCCAUUUGUA	162	TACAAAUGGCACUAGUAAA	326	UfuUfaCfuAfgUfgCfcAfu UfuGfuAf(invdt)	490	pdTafcAfaAfuGfgCfaCfuAfg UfaAfadTsdT
6	ACCUCUGCCUAAUCAUCUA	163	TAGAUGAUUAGGCAGAGGU	327	AfcCfuCfuGfcCfuAfaUfcA fuCfuAf(invdt)	491	pdTAfgAfuGfaUfuAfgGfcAfg AfgGfudTsdT
7	CUGUAGGCAUAAAUUGGUC	164	GACCAAUUUUUGCCUACAG	328	cuGuAGGcAuAAuuGGu cdTsdT	492	GACcAAUuuAUGCCuAcAGd TsdT
8	UGUCUGCGGCGUUUUUAUCA	165	UGAUAAAACGCCGCAGACA	329	ugucuGcGgGcGuuuuAucA dTsdT	493	UGAuAAAACGCCcAGAcAd TsdT
8	UGUCUGCGGCGUUUUUAUCA	166	TGAUAAAACGCCGCAGACA	330	UfgUfcUfgCfgGfcGfuUfu UfaUfcAf(invdt)	494	pdTGfaUfaAfaAfcGfcCfcCfa GfaCfadTsdT
9	UACUAGUGCCAUUUGUUCA	167	UGAACAAAUGGCACUAGUA	331	uacuAGuGccAuuuGuucA dTsdT	495	UGAAcAAAUGGcACuAGuAd TsdT
9	UACUAGUGCCAUUUGUUCA	168	TGAACAAAUGGCACUAGUA	332	UfaCfuAfgUfgCfcAfuUfu GfuUfcAf(invdt)	496	pdTGfaAfcAfaAfuGfgCfaCfu AfgUfadTsdT
10	CAACUUUUUACACCUCUGCA	169	TGCAGAGGUGAAAAAGUUG	333	CfaAfcUfuUfuUfcAfcCfuC fuGfcAf(invdt)	497	pdTGfcAfgAfgGfuGfaAfaAfa GfuUfgdTsdT

ФИГ.6 (продолжение)

11	CCAUUUUUUUCAGUGGU UCG	170	CGAACCACUGAACAAAUGG	334	ccAuuuGuucAGuGGuucG dTsdT	498	CGAACcACUGAAcAAAUGGd TsdT
12	CCAAGUGUUUCUGAC GCA	171	UGCGUCAGCAAACACUUGG	335	ccAAGuGuuuGcuGAcGc AdTsdT	499	UGCGUcAGcAAAcACUUGd TsdT
12	CCAAGUGUUUCUGAC GCA	172	TGCGUCAGCAAACACUUGG	336	CfcAfaGfuGfuUfuGfcUfg AfcGfcAf(invdt)	500	pdTGfcGfuCfaGfcAfaAfcAfc UfuGfgdTsdT
13	CCAUUUUUUUCAGUGGU UCA	173	TGAACCACUGAACAAAUGG	337	CfcAfuUfuGfuUfcAfgUfg GfuUfcAf(invdt)	501	pdTGfaAfcCfaCfuGfaAfcAfa AfuGfgdTsdT
14	UUUACUAGUGCCAUUU GUU	174	AACAAAUGGCACUAGUAAA	338	uuuAcuAGuGccAuuuGuu dTsdT	502	AAcAAAUGGcACuAGuAAAd TsdT
15	CACCUCUGCCUAAUCAU CA	175	TGAUGAUUAGGCAGAGGU G	339	CfaCfcUfcUfgCfcUfaAfuC faUfcAf(invdt)	503	pdTGfaUfgAfuUfaGfgCfaGfa GfgUfgdTsdT
16	CUGGCUCAGUUUACUA GUG	176	CACUAGUAAAACUGAGCCAG	340	cuGgcucAGuuuAcuAGu GdTsdT	504	cAcuAGuAAACUGAGCcAGd TsdT
17	CAAGGUAUGUUGCCCG UUA	177	TAACGGGCAACAUACCUUG	341	CfaAfgGfuAfuGfuUfgCfc CfuUfuAf(invdt)	505	pdTAfaCfuGfuCfaAfcAfuAfcC fuUfgdTsdT
18	CUGGCUCAGUUUACUA GUA	178	TACUAGUAAAACUGAGCCAG	342	CfuGfgCfuCfaGfuUfuAfc UfaGfuAf(invdt)	506	pdTAfcUfaGfuAfaAfcUfgAfg CfcAfgdTsdT
19	GAGGCUGUAGGCAUAA AUU	179	AAUUUAUGCCUACAGCCUC	343	gaGgcuGuAGGcAuAAAu udTsdT	507	AAUuuAUGCCuAcAGCCUCd TsdT
20	CAGUUUACUAGUGCCAU UU	180	AAAUGGCACUAGUAAACUG	344	caGuuuAcuAGuGccAuuu dTsdT	508	AAAUGGcACuAGuAAACUGd TsdT
21	AGGUAUGUUGCCCGUU UGU	181	ACAAACGGGCAACAUACCU	345	agGuAuGuuGcccGuuuGu dTsdT	509	AcAAACGGGcAAcAuACCUd TsdT
22	UAUGUUGCCCGUUUGU CCA	182	UGGACAAACGGGCAACUA	346	UfaUfgUfuGfcCfcGfuUfu GfuCfcAf(invdt)	510	pdTGfgAfcAfaAfcGfgGfcAfa CfaUfadTsdT
23	GAGGCUGUAGGCAUAA AUA	183	TAUUUAUGCCUACAGCCUC	347	GfaGfgCfuGfuAfgGfcAfu AfaAfuAf(invdt)	511	pdTAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfg CfcUfcdTsdT
24	GUCUGCGGCGUUUUAU CAU	184	AUGAUAAAACGCCGAGAC	348	gucuGcGGcGuuuuAucAu dTsdT	512	AUGAuAAAACGCCGcAGACd TsdT
25	CAACUUUUUCACCUCUG CC	185	GGCAGAGGUGAAAAAGUU G	349	caAcuuuuucAccucuGccd TsdT	513	GGcAGAGGUAAAAAGUUG dTsdT

ФИГ.6 (продолжение)

26	CCGUGUGCACUUCGCUU CA	186	UGAAGCGAAGUGCACACGG	350	ccGuGuGcAcuucGcuucA dTsdT	514	UGAAGCGAAGUGcAcACGG dTsdT
26	CCGUGUGCACUUCGCUU CA	187	TGAAGCGAAGUGCACACGG	351	CfcGfuGfuGfcAfcUfuCfcG fuUfcAf(invdt)	515	pdTGfaAfgCfgAfaGfuGfcAfc AfcGfgdTsdT
27	UCAAGGUAUGUUGCCC GUA	188	TACGGGCAACAUACCUUGA	352	UfcAfaGfgUfaUfgUfuGfc CfcGfuAf(invdt)	516	pdTAfcGfgGfcAfaCfaUfaCfc UfuGfadTsdT
28	CAGUUUACUAGUGCCAU UA	189	TAAUGGCACUAGUAAACUG	353	CfaGfuUfuAfcUfaGfuGfc CfaUfuAf(invdt)	517	pdTAfaUfgGfcAfcUfaGfuAfa AfcUfgdTsdT
29	UGGUGGACUUCUCUCA AUU	190	AAUUGAGAGAAGUCCACCA	354	ugGuGGAcuucucucAAuu dTsdT	518	AAUUGAGAGAAGUCCAcCcAd TsdT
30	AGGUUUGUUGCCCGUU UGA	191	TCAAACGGGCAACAUACCU	355	AfgGfuAfuGfuUfgCfcCfc UfuUfgAf(invdt)	519	pdTCfaAfaCfcGfgCfaAfcAfu AfcCfudTsdT
31	CUGCUCGUGUUACAGGC GG	192	CCGCCUGUAAACAGGAGCAG	356	cuGcucGuGuuuAcAGGcG GdTsdT	520	CCGCCUGuAAcACGAGcAGd TsdT
32	UAUGUUGCCCGUUUGU CCU	193	AGGACAAACGGGCAACAU	357	uauGuuGcccGuuuGuccu dTsdT	521	AGGAcAAACGGGcAAcAuAd TsdT
33	UCAAGGUAUGUUGCCC GUU	194	AACGGGCAACAUACCUUGA	358	ucAAGGuAuGuuGcccGu udTsdT	522	AACGGGcAAcAuACCUUGAd TsdT
34	UCUUAUCAACACUUCGG GA	195	UCCGGAAGUGUUGAUUAAG A	359	ucuuAucAacAcuuccGGA dTsdT	523	UCCGGAAGUGUUGAUUAAGA dTsdT
34	UCUUAUCAACACUUCGG GA	196	TCCGGAAGUGUUGAUUAAGA	360	UfcUfuAfuCfaAfcAfcUfuC fcGfgAf(invdt)	524	pdTCfcGfgAfaGfuGfuUfgAfu AfaGfadTsdT
35	CACCUCUGCCUAAUCAU CU	197	AGAUGAUUAGGAGAGGU G	361	caccucuGccuAAucAucud TsdT	525	AGAUGAUuAGGcAGAGGUG dTsdT
36	AUAAGAGGACUCUUGG ACU	198	AGUCCAAGAGUCCUCUUAU	362	auAAGAGGAcucuuGGAc udTsdT	526	AGUCcAAGAGUCCUCUuAU dTsdT
37	GUCUGCGGCGUUUUUAU CAA	199	TUGAUAAAACGCCGAGAC	363	GfuCfuGfcGfgCfcUfuUfu AfuCfaAf(invdt)	527	pdTUfgAfuAfaAfaCfcCfcGfc AfgAfcdTsdT
38	GGCGCUGAAUCCCGCGG AC	200	GUCCGCGGGAUUCAGCGCC	364	ggcGcuGAAucccGcGGAc dTsdT	528	GUCCGCGGGAUUCAGCGCC dTsdT
39	CGCGUCGAGAGAAGAU CA	201	UGAGAUUUUCUGCGACGCG	365	cgcGucGcAGAAGAucucA dTsdT	529	UGAGAUUUUCUGCGACGCG dTsdT

ФИГ.6 (продолжение)

40	AAUGUCAACGACCGACC UU	202	AAGGUCGGUCGUUGACAU U	366	aaUGucAAcGAccGAccuu dTsdT	530	AAGGUCGGUCGUUGAcAUU dTsdT
41	GCUCAGUUUACUAGUG CCA	203	UGGCACUAGUAAACUGAGC	367	gcucAGuuuAcuAGuGccA dTsdT	531	UGGcACuAGuAAACUGAGCd TsdT
42	UGGUGGACUUCUCUCA AUA	204	TAUUGAGAGAAGUCCACCA	368	UfgGfuGfgAfcUfuCfuCfu CfaAfuAf(invdT)	532	pdTAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfc AfcCfadTsdT
43	AUCGCCGCGUCGCAGAA GA	205	UCUUCUGCGACGCGGCGAU	369	aucGccGcGucGcAGAAGA dTsdT	533	UCUUCUGCGACGCGGCGAU dTsdT
44	GCCAUUUUGUUCAGUGG UUC	206	GAACCACUGAACAAAUGGC	370	gccAuuuGuucAGuGGuuc dTsdT	534	GAACcACUGAAcAAAUGGcd TsdT
45	CGAUCCAUACUGCGGAA CU	207	AGUUCGCGAGUAUGGAUCG	371	cgAuuccAuAcuGcGGAAcu dTsdT	535	AGUUCCGcAGuAUGGAUCG dTsdT
46	UCACCUCUGCCUAAUCA UC	208	GAUGAUUAGGCAGAGGUG A	372	ucAccucuGccuAAucAucd TsdT	536	GAUGAUuAGGcAGAGGUGA dTsdT
47	GUGGACUUCUCUCAAU UUU	209	AAAAUUGAGAGAAGUCCAC	373	guGGACuucucucAuuuu dTsdT	537	AAAAUUGAGAGAAGUCcAC dTsdT
48	GGGUCACCAUAUUCUU GGG	210	CCCAAGAAUUGGUGACCC	374	ggGucAccAuAuucuuGGG dTsdT	538	CCcAAGAAuAUGGUGACCCd TsdT
49	GCCGCGUCGCAGAAGAU CU	211	AGAUCUUCUGCGACGCGGC	375	gccGcGucGcAGAAGAuuc dTsdT	539	AGAUCUUCUGCGACGCGGC dTsdT
50	UCAAUCGCCGCGUCGCA GA	212	UCUGCGACGCGCGAUUGA	376	ucAAucGccGcGucGcAGA dTsdT	540	UCUGCGACGCGCGAUUGA dTsdT
51	UGGAUGUGUCUGCGGC GUU	213	AACGCCGAGACACAUCCA	377	ugGAuGuGucGcGGcGu udTsdT	541	AACGCCGcAGAcAcAUcAdT sdT
52	UACUGUUAAGCCUCCA AG	214	CUUGGAGGCUUGAACAGUA	378	uacuGuucAAGccuccAAG dTsdT	542	CUUGGAGGCUUGAAcAGuA dTsdT
53	GUUUACUAGUGCCAUU UGU	215	ACAAAUGGCACUAGUAAAC	379	guuuAcuAGuGccAuuuGu dTsdT	543	AcAAAUGGcACuAGuAAACd TsdT
54	ACUAGUGCCAUUUGUU CAG	216	CUGAACAAAUGGCACUAGU	380	acuAGuGccAuuuGuucAG dTsdT	544	CUGAAcAAAUGGcACuAGUd TsdT
55	CCGCGUCGCAGAAGAUC UC	217	GAGAUCUUCUGCGACGCGG	381	ccGcGucGcAGAAGAuuc dTsdT	545	GAGAUCUUCUGCGACGCGG dTsdT

ФИГ.6 (продолжение)

56	UAUCUUAUCAACACUUC CG	218	CGGAAGUGUUGAUAGAU A	382	uaucuuAucAAcAcuuccGd TsdT	546	CGGAAGUGUUGAuAAGAuA dTsdT
57	GGCCAAAUIUCGCAGUC CC	219	GGGACUGCGAAUUUUGGCC	383	ggccAAAuucGcAGucccd TsdT	547	GGGACUGCGAAUUUUGGCC dTsdT
58	UUCACCUCUGCCUAAUC AU	220	AUGAUUAGGCAGAGGUGA A	384	uucAccucuGccuAAucAud TsdT	548	AUGAUuAGGcAGAGGUGAA dTsdT
59	CUCAGUUUACUAGUGCC AU	221	AUGGCACUAGUAAACUGAG	385	cucAGuuuAcuAGuGccAu dTsdT	549	AUGGcACuAGuAAACUGAG dTsdT
60	UGUUGCCCGUUUGUCC UCU	222	AGAGGACAAACGGGCAACA	386	uguuGcccGuuuGuccucud TsdT	550	AGAGGAcAAACGGGcAAcAd TsdT
61	UAGUGCCAUUUGUUCA GUG	223	CACUGAACAAUUGGCACUA	387	uaGuGccAuuuGuucAGu GdTsdT	551	cACUGAcAAAUUGGcACuAd TsdT
62	AGGCUGUAGGCAUAAA UUG	224	CAAUUUAUGCCUACAGCCU	388	agGcuGuAGGcAuAAAuu GdTsdT	552	cAAUUuAUGCCuAcAGCCUd TsdT
63	AUGUGUCUGCGGCGUU UUA	225	UAAAACGCCCGCAGACACAU	389	auGuGucuGcGGcGuuuu AdTsdT	553	uAAAACGCCGcAGAcAcAuD TsdT
63	AUGUGUCUGCGGCGUU UUA	226	TAAAACGCCCGCAGACACAU	390	AfuGfuGfuCfuGfcGfgCfg UfuUfuAf(invdt)	554	pdTAfaAfaCfcCfcGfcAfgAfcA fcAfudTsdT
64	ACUUCGCUUCACCUCUG CA	227	UGCAGAGGUGAAGCGAAGU	391	acuucGcuucAccucuGcAd TsdT	555	UGcAGAGGUGAAGCGAAGU dTsdT
65	CGUGUGCACUUCGCUUC AC	228	GUGAAGCGAAGUGCACACG	392	cguGuGcAcuucGcuucAcd TsdT	556	GUGAAGCGAAGUGcAcACG dTsdT
66	GUGGUGGACUUCUCUC AAU	229	AUUGAGAGAAGUCCACCAC	393	guGGuGGAcuucucucAAu dTsdT	557	AUUGAGAGAAGUCcAcCcAd TsdT
67	UGUGUCUGCGGCGUUU UAU	230	AUAAAACGCCCGCAGACACA	394	uguGucuGcGGcGuuuuAu dTsdT	558	AuAAAACGCCGcAGAcAcAdT sdT
68	AAGGU AUGUUGCCCGU UUG	231	CAAACGGGCAACAUACCUU	395	aaGGuAuGuuGcccGuuu GdTsdT	559	CAAACGGGcAAcAuACCUUd TsdT
69	UCAACGACCGACCUUGA GG	232	CCUCAAGGUCGUCGUUGA	396	ucAAcGAccGAccuuGAGG dTsdT	560	CCUcAAGGUCGGUCGUUGA dTsdT
70	CAUAAGAGGACUCUUG GAC	233	GUCCAAGAGUCCUCUUAUG	397	cauAAGAGGAcucuuGGA cdTsdT	561	GUCcAAGAGUCCUCUuAUG dTsdT

ФИГ.6 (продолжение)

71	GUCAACGACCGACCUUG AG	234	CUCAAGGUCGGUCGUUGAC	398	gucAacGAccGAccuuGAG dTsdT	562	CUcAAGGUCGGUCGUUGAC dTsdT
72	AUAUUCUUGGGAACAA GAG	235	CUCUUGUUCcCAAGAAUUAU	399	auAuuuuGGGAAcAAGA GdTsdT	563	CUCUUGUUCcCAAGAAuAU dTsdT
73	UGCUCGUGUUACAGGC GGG	236	CCCGCCUGUAAACACGAGCA	400	ugcucGuGuuAcAGGcGG GdTsdT	564	CCCGCCUGuAAAcACGAGcAd TsdT
74	CAAUCGCCGCGUCGCAG AA	237	UUCUGCGACGCGGCGAUUG	401	caAucGccGcGucGcAGAA dTsdT	565	UUCUGCGACGCGGCGAUUG dTsdT
75	ACUGUUCAAGCCUCCAA GC	238	GCUUGGAGGCUUGAACAG U	402	acuGuucAAGccuccAAGc dTsdT	566	GCUUGGAGGCUUGAAcAGU dTsdT
76	CGCCGCGUCGCAGAAGA UC	239	GAUCUUCUGCGACGCGGCG	403	cgccGcGucGcAGAAGauc dTsdT	567	GAUCUUCUGCGACGCGGCG dTsdT
77	CAUUUGUUCAGUGGUU CGU	240	ACGAACCACUGAACAAUUG	404	cauuuGuucAGuGGuucGu dTsdT	568	ACGAACcACUGAAcAAAUGd TsdT
78	CGCUGAAUCCCGGGAC GA	241	UCGUCCGCGGGAUUCAGCG	405	cgcuGAAuccGcGGAcGA dTsdT	569	UCGUCCGCGGGAUUcAGCG dTsdT
79	UGGGUCACCAUAUUCU UGG	242	CCAAGAAUAUGGUGACCCA	406	ugGGuAcceAuAuuuuGG dTsdT	570	CcAAGAAuAUGGUGACcAd TsdT
80	UCCUCUGCCGAUCCAUA CU	243	AGUAUGGAUCGGCAGAGGA	407	uccucuGccGAuccAuAcud TsdT	571	AGuAUGGAUCGGcAGAGGA dTsdT
81	AUGUCAACGACCGACCU UG	244	CAAGGUCGGUCGUUGACAU	408	auGucAAcGAccGAccuuG dTsdT	572	cAAGGUCGGUCGUUGAcAU dTsdT
82	CCUCUGCCUAAUCAUCU CA	245	UGAGAUGAUUAGGCAGAG G	409	ccucuGccuAAucAucucAd TsdT	573	UGAGAUGAUuAGGcAGAGG dTsdT
83	ACCGUGUGCACUUCGCU UC	246	GAAGCGAAGUGCACACGGU	410	accGuGuGcAcuucGcuuc dTsdT	574	GAAGCGAAGUGcAcACGGU dTsdT
84	UGCCGAUCCAUACUGCG GA	247	UCCGCAGUAUGGAUCGGCA	411	ugccGAuccAuAcuGcGGA dTsdT	575	UCCGcAGuAUGGAUCGGcA dTsdT
85	CAGAGUCUAGACUCGUG GU	248	ACCACGAGUCUAGACUCUG	412	caGAGucuAGAcucGuGG udTsdT	576	ACcACGAGUcuAGACUCUGd TsdT
86	CUGUUCAAGCCUCCAAG CU	249	AGCUUGGAGGCUUGAACAG	413	cuGuucAAGccuccAAGcu dTsdT	577	AGCUUGGAGGCUUGAAcAG dTsdT

ФИГ.6 (продолжение)

87	GGAGGCUUGUAGGCAUA AAU	250	AUUUAUGCCUACAGCCUCC	414	ggAGGcuGuAGGcAuAAA udTsdT	578	AUUuAUGCCuAcAGCCUCCd TsdT
88	AGGAGGCUUGUAGGCAU AAA	251	UUUUAUGCCUACAGCCUCCU	415	agGAGGcuGuAGGcAuAA AdTsdT	579	UUuAUGCCuAcAGCCUCCUd TsdT
89	GGUGGACUUCUCUCAA UUU	252	AAAUUGAGAGAAGUCCACC	416	gguGGAcuucucucAAuuu dTsdT	580	AAAUUGAGAGAAGUCCACC dTsdT
90	GCAACUUUUUACCCUCU GC	253	GCAGAGGUGAAAAAGUUGC	417	gcAAcuuuuuAccucuGcd TsdT	581	GcAGAGGUGAAAAAGUUGC dTsdT
91	CUGCUCGUGUUACAGGC GA	254	TCGCCUGUAACACGAGCAG	418	CfuGfcUfcGfuGfuUfaCfa GfgCfGfA(invdt)	582	pdTCfgCfcUfgUfaAfcAfcGfa GfcAfgdTsdT
92	CUAGUGCCAUUUGUUC AGU	255	ACUGAACAAAUGGCACUAG	419	cuAGuGccAuuuGuucAGu dTsdT	583	ACUGAAcAAAUGGcAcuAGd TsdT
93	CUGCCGAUCCAUCUGC GG	256	CCGCAGUAUGGAUCGGCAG	420	cuGccGAuccAuAcuGcGG dTsdT	584	CCGcAGuAUGGAUCGGcAGd TsdT
94	GUGUGCACUUCGUUCA CC	257	GGUGAAGCGAAGUGCACAC	421	guGuGcAcuucGcuucAccd TsdT	585	GGUGAAGCGAAGUGcAcAC dTsdT
95	GCUCGUGUUACAGGCG GGC	258	GCCCCGCCUGUAACACGAGC	422	gcucGuGuuAcAGGcGGG cdTsdT	586	GCCCCGCCUGuAAcACGAGCd TsdT
96	CCUUAUCUUAUCAACACU UC	259	GAAGUGUUGAUAGAUAG G	423	ccuAucuuAucAAcAcuucd TsdT	587	GAAGUGUUGAuAAGAuAGG dTsdT
97	UCUCAAUCCGCCGCGUCG CA	260	UGCGACGCGGCGAUUGAGA	424	ucucAAucGccGcGucGcA dTsdT	588	UGCGACGCGGCGAUUGAGA dTsdT
98	GCCCCGUCUGUGCCUUCU CA	261	UGAGAAGGCACAGACGGGC	425	gcccGueuGuGccuucucAd TsdT	589	UGAGAAGGcAcAGACGGGC dTsdT
99	CUAUCUUAUCAACACUU CC	262	GGAAGUGUUGAUAGAUAG G	426	cuAucuuAucAAcAcuucd TsdT	590	GGAAGUGUUGAuAAGAuAG dTsdT
100	AUGUUGCCCCGUUUGUC CUC	263	GAGGACAAACGGGCAACAU	427	auGuuGcccGuuuGuuccuc dTsdT	591	GAGGAcAAACGGGcAAcAUd TsdT
101	GUAUGUUGCCCCGUUUG UCC	264	GGACAAACGGGCAACAUAC	428	guAuGuuGcccGuuuGuucc dTsdT	592	GGAcAAACGGGcAAcAuAcD TsdT
102	CUUCGCUUACCCUCUGC AC	265	GUGCAGAGGUGAAGCGAAG	429	cuucGcuucAccucuGcAcD TsdT	593	GUGCAGAGGUGAAGCGAAG dTsdT

ФИГ.6 (продолжение)

103	UGUGCACUUCGCUUCAC CU	266	AGGUGAAGCGAAGUGCACA	430	uguGcAcuucGcuucAccud TsdT	594	AGGUGAAGCGAAGUGcAcA dTsdT
104	GCCAAAUUCGCAGUCC CG	267	CGGGACUGCGAAUUUUGGC	431	gccAAAuucGcAGucccG dTsdT	595	CGGGACUGCGAAUUUUGGC dTsdT
105	CCUGCUCGUGUUACAGG CG	268	CGCCUGAACACGAGCAGG	432	ccuGcucGuGuuAcAGGeG dTsdT	596	CGCCUGuAAcACGAGcAGGd TsdT
106	UGGAGUGUGGAUUCGC ACU	269	AGUGCGAAUCCACACUCCA	433	ugGAGuGuGGAuucGcAc udTsdT	597	AGUGCGAAUcAcACUcAd TsdT
107	AACGACCGACCUUGAGG CA	270	UGCCUCAAGGUCGGUCGUU	434	aacGAccGAccuuGAGGcA dTsdT	598	UGCCUcAAGGUCGGUCGUU dTsdT
108	ACAGAGUCUAGACUCGU GG	271	CCACGAGUCUAGACUCUGU	435	acAGAGucucAGAcucGuG GdTsdT	599	CcACGAGUCuAGACUCUGU dTsdT
109	AAUCGCCGCGUCGCAGA AG	272	CUUCUGCGACGCGGCGAAU	436	aaucGccGcGucGcAGAAG dTsdT	600	CUUCUGCGACGCGGCGAAU dTsdT
110	GGUAUGUUGCCCGUUU GUC	273	GACAAACGGGCAACAUAAC	437	gguAuGuuGcccGuuuGuc dTsdT	601	GAcAAACGGGcAAcAuACcd TsdT
111	GCCGAUCCAUACUGCGG AA	274	UUCCGCAGUAUGGAUCGGC	438	gccGAuccAuAcuGcGGAA dTsdT	602	UUCCGcAGuAUGGAUCGGC dTsdT
112	GCCCUAUCUUAUCAACA CU	275	AGUGUUGAUAAAGAUAGGG C	439	gccccAucuuAucAAcAcud TsdT	603	AGUGUUGAuAAGAuAGGGC dTsdT
113	AGUUUACUAGUGCCAU UUG	276	CAAAUGGCACUAGUAAACU	440	aguuuAcuAGuGccAuuuG dTsdT	604	cAAAUGGcAcuAGuAAACUd TsdT
114	UGUCAACGACCGACCUU GA	277	UCAAGGUCGGUCGUUGACA	441	ugucAAcGAccGAccuuGA dTsdT	605	UcAAGGUCGGUCGUUGAcA dTsdT
115	ACUUCUCUCAAUUUUCU AG	278	CUAGAAAAUUGAGAGAAGU	442	acuucucucAAuuuuucAG dTsdT	606	CuAGAAAAUUGAGAGAAGU dTsdT
116	GCGCGGGACGUCCUUU GUC	279	GACAAAGGACGUCCCGCGC	443	gcGcGGGAcGuccuuuGuc dTsdT	607	GAcAAAGGACGUCCCGCGcd TsdT
117	UCUAGACUCGUGGUGG ACU	280	AGUCCACCACGAGUCUAGA	444	ucuAGAcucGuGGuGGAc udTsdT	608	AGUCcAcAcAGAGUCuAGAd TsdT
118	GAUCCAUACUGCGGAAC UC	281	GAGUCCGCAGUAUGGAUC	445	gauccAuAcuGcGGAAcuc dTsdT	609	GAGUCCGcAGuAUGGAUC dTsdT

ФИГ.6 (продолжение)

119	CUCUGCCGAUCCAUAUCU GC	282	GCAGUAUGGAUCGGCAGAG	446	cucuGccGAuccAuAcuGcd TsdT	610	GcAGuAUGGAUCGGcAGAG dTsdT
120	UCUGCCGAUCCAUAUCUG CG	283	CGCAGUAUGGAUCGGCAGA	447	ucuGccGAuccAuAcuGcG dTsdT	611	CGcAGuAUGGAUCGGcAGA dTsdT
121	CCUCUGCCGAUCCAUAUC UG	284	CAGUAUGGAUCGGCAGAGG	448	ccucuGccGAuccAuAcuGd TsdT	612	cAGuAUGGAUCGGcAGAGG dTsdT
122	GCACCUUCUCUUUACGCG GU	285	ACCGCGUAAAGAGAGGUGC	449	gcAccucucuuuAcGcGGud TsdT	613	ACCGCuAAAGAGAGGUGC dTsdT
123	AAGAACUCCUCGCCUC GC	286	GCGAGGCGAGGGAGUUCU U	450	aaGAAccuccucGccucGcd TsdT	614	GCGAGGCGAGGGAGUUCU UdTsdT
124	GAACUCCUCGCCUCGC AG	287	CUGCGAGGCGAGGGAGUUC	451	gaAuccuccucGccucGcGd TsdT	615	CUGCGAGGCGAGGGAGUUC dTsdT
125	UCUCUCAUUUUUCUAG GGC	288	GCCCUAGAAAAUUGAGAGA	452	ucucucAAuuuuuAGGGc dTsdT	616	GCCCuAGAAAAUUGAGAGA dTsdT
126	GGGGCGACCUCUCUUUA CG	289	CGUAAAGAGAGGUGCGCCC	453	ggGcGcAccucucuuuAcGd TsdT	617	CGuAAAGAGAGGUGCGCCC dTsdT
127	CCGAUCCAUAUCGCGGA AC	290	GUUCCGCAGUAUGGAUCGG	454	ccGAuccAuAcuGcGGAAc dTsdT	618	GUUCCGcAGuAUGGAUCGG dTsdT
128	AACUCCUCGCCUCGCA GA	291	UCUGCGAGGCGAGGGAGU U	455	aacuccucGccucGcAGAd TsdT	619	UCUGCGAGGCGAGGGAGU UdTsdT
129	CUCCUCUGCCGAUCCAUA AC	292	GUAUGGAUCGGCAGAGGA G	456	cuccueuGccGAuccAuAcd TsdT	620	GuAUGGAUCGGcAGAGGAG dTsdT
130	GGAGUGUGGAUUCGCA CUC	293	GAGUGCGAAUCCACACUCC	457	ggAGuGuGGAuccGcAcuc dTsdT	621	GAGUGCGAAUCcAcACUCCd TsdT
131	CGGGCGCACCUCUCUUU AC	294	GUAAAGAGAGGUGCGCCCG	458	cgGGcGcAccucucuuuAcd TsdT	622	GuAAAGAGAGGUGCGCCCG dTsdT
132	GUCUCAUUCGCCGCGUC GC	295	GCGACGCGCGAUUGAGAC	459	gucucAAucGccGcGucGcd TsdT	623	GCGACGCGCGAUUGAGAC dTsdT
133	AUCCAUAUCGCGGAACU CC	296	GGAGUCCGCAGUAUGGA U	460	auccAuAcuGcGGAucc dTsdT	624	GGAGUCCGcAGuAUGGAU dTsdT
134	CGCACCUUCUUUACGCG GG	297	CCGCGUAAAGAGAGGUGCG	461	cgcAccucucuuuAcGcGGd TsdT	625	CCGCGuAAAGAGAGGUGCG dTsdT

ФИГ.6 (продолжение)

135	CAACGACCGACCUUGAG GC	298	GCCUCAAGGUCGGUCGUUG	462	caAcGAccGAccuuGAGGc dTsdT	626	GCCUcAAGGUCGGUCGUUG dTsdT
136	CCAUAUCUGCGGAACUCC UA	299	UAGGAGUUCGCGAGUAUG G	463	ccAuAcuGcGGAAcuccuA dTsdT	627	uAGGAGUUCGcAGuAUGG dTsdT
137	UGAAUCCCGCGGACGAC CC	300	GGGUCGUCGCGGGAUUCA	464	ugAAuccGcGGAcGAcc dTsdT	628	GGGUCGUCGCGGGAUuCA dTsdT
138	AGAACUCCUCGCCUCG CA	301	UGCGAGGCGAGGGAGUUC U	465	agAAcuccucGccucGcAd TsdT	629	UGCGAGGCGAGGGAGUUC UdTsdT
139	GGCGACCCUCUCUUUAC GC	302	GCGUAAAAGAGAGGUCGCC	466	ggcGcAccucucuuAcGcd TsdT	630	GCGuAAAAGAGAGGUCGCC dTsdT
140	GCGCACCCUCUUUACG CG	303	CGCGUAAAAGAGAGGUGCGC	467	gcGcAccucucuuAcGcGd TsdT	631	CGCGuAAAAGAGAGGUGCGC dTsdT
141	GCUGAAUCCCGCGGACG AC	304	GUCGUCCGCGGGAUUCAGC	468	gcuGAAuccGcGGAcGAc dTsdT	632	GUCGUCCGCGGGAUucAGC dTsdT
142	CACUUCGCUUACCUCU GC	305	GCAGAGGUGAAGCGAAGUG	469	cacuucGcuucAccucucGod TsdT	633	GcAGAGGUGAAGCGAAGUG dTsdT
143	CUCAUUCGCGCGUCGCG AG	306	CUGCGACGCGGCGAUUGAG	470	cucAAucGccGcGucGcAG dTsdT	634	CUGCGACGCGGCGAUUGAG dTsdT
144	UCCCGUCGCGCGUGAAU CC	307	GGAUUCAGCGCCGACGGA	471	ucccGucGGcGcuGAAucc dTsdT	635	GGAUucAGCGCCGACGGGA dTsdT
145	CUGAAUCCCGCGGACGA CC	308	GGUCGUCGCGGGAUUCAG	472	cuGAAuccGcGGAcGAcc dTsdT	636	GGUCGUCGCGGGAUucAG dTsdT
146	AGAGUCUAGACUCGUG GUG	309	CACCACGAGUCUAGACUCU	473	agAGucUAGAcucGuGGu GdTsdT	637	cAccACGAGUCuAGACUCUd TsdT
147	UCCAUACUGCGGAACUC CU	310	AGGAGUUCGCGAGUAUGGA	474	uccAuAcuGcGGAAcuccu dTsdT	638	AGGAGUUCGcAGuAUGGA dTsdT
148	GCGCUGAAUCCCGCGGA CG	311	CGUCCGCGGGAUUCAGCGC	475	gcGcuGAAuccGcGGAcG dTsdT	639	CGUCCGCGGGAUucAGCGC dTsdT
149	AGUGUGGAUUCGCACU CCU	312	AGGAGUGCGAAUCCACACU	476	aguGuGGAAuccGcAcuccu dTsdT	640	AGGAGUGCGAAUCCAcACU dTsdT
150	CCCUGCUCGUGUACAG GC	313	GCCUGUAACACGAGCAGGG	477	cccuGcucGuGuuAcAGGc dTsdT	641	GCCUGuAAcACGAGcAGGGd TsdT
151	GAAUCCCGCGGACGACC CG	314	CGGGUCGUCGCGGGAUUC	478	gaAuccGcGGAcGAccG dTsdT	642	CGGGUCGUCGCGGGAUUC dTsdT
152	AAGCUGUGCCUUGGGU GGC	315	GCCACCCAAGGCACAGCUU	479	aaGcuGuGccuuGGGuGG cdTsdT	643	GcAcCCcAAGGcAcAGCUUd TsdT
153	GCCUGCUCGUGUUAACA GG	316	CCUGUAACACGAGCAGGGC	480	gccccGcucGuGuuAcAGG dTsdT	644	CCUGuAAcACGAGcAGGGCd TsdT
154	GUCCGUCGCGCGUGAA UC	317	GAUUCAGCGCCGACGGGAC	481	gucccGucGcGcGcuGAAuc dTsdT	645	GAUucAGCGCCGACGGGAC dTsdT
155	AUCUUUAACAACAUUCC GG	318	CCGGAAGUGUUGAUAGA U	482	aucuuAucAAcAcuuccGG dTsdT	646	CCGGAAGUGUUGAuAAGAU dTsdT
156	CUUAUCAACACUUCGG AA	319	UCCGGAAGUGUUGAUAA G	483	cuuAucAAcAcuuccGGAA dTsdT	647	UCCGGAAGUGUUGAuAAG dTsdT
156	CUUAUCAACACUUCGG AA	320	TUCCGGAAGUGUUGAUAG	484	CfuUfaUfcAfaCfaCfuUfcC fgGfaAf(invdt)	648	pdTUfcCfGfAfgUfgUfuGfa UfaAfgdTsdT

ФИГ.7

Таблица 5. Пример 19-мерных целевых последовательностей кДНК HBV, взятых из подтипа HBV ADW2, генотип А, полный геном GeneBank AM282986.1 из W02018027106

SEQ ID No.	HBV 19-мер Целевая последовательность (5'→3')	Геномное положение SEQ ID NO: 1	Область HBV гена целевая
2	GTGGTGGACTTCTCTCAAT	256-274	S ORF
3	TGGTGGACTTCTCTCAATT	257-275	S ORF
4	GGA CTCTCTCAATTTCT	261-279	S ORF
5	GCTGTAGGCATAAATTGGT	1780-1798	X ORF
6	CTGTAGGCATAAATTGGTC	1781-1799	X ORF

ФИГ.8

Таблица 6. Последовательности коровых фрагментов антисмысловой цепи и смысловой цепи РНК-агента HBV W02018027106 (N=любой нуклеотид)

SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность (5'→3') (19-мер)	SEQ ID NO:	Смысловая последовательность (5'→3') (19-мер)	Геномное положение SEQ ID NO: 1
7	AUUGAGAGAAGUCCACCAC	34	GUGGUGGACUUCUCUCAAU	256-274
8	UUUGAGAGAAGUCCACCAC	35	GUGGUGGACUUCUCUCAAA	256-274
9	AUUGAGAGAAGUCCACCAN	36	NUGGUGGACUUCUCUCAAU	256-274
10	UUUGAGAGAAGUCCACCAN	37	NUGGUGGACUUCUCUCAAA	256-274
11	NUUGAGAGAAGUCCACCAN	38	NUGGUGGACUUCUCUCAAN	256-274
12	AAUUGAGAGAAGUCCACCA	39	UGGUGGACUUCUCUCAAAU	257-275
13	UAUUGAGAGAAGUCCACCA	40	UGGUGGACUUCUCUCAAAU	257-275
14	AAUUGAGAGAAGUCCACCN	41	NGGUGGACUUCUCUCAAAU	257-275
15	UAUUGAGAGAAGUCCACCN	42	NGGUGGACUUCUCUCAAAU	257-275
16	NAUUGAGAGAAGUCCACCN	43	NGGUGGACUUCUCUCAAAU	257-275
17	AGAAAAUUGAGAGAAGUCC	44	GGACUUCUCUCAAAUUUCU	261-279
18	UGAAAAUUGAGAGAAGUCC	45	GGACUUCUCUCAAAUUUCA	261-279
19	AGAAAAUUGAGAGAAGUCN	46	NGACUUCUCUCAAAUUUCU	261-279
20	UGAAAAUUGAGAGAAGUCN	47	NGACUUCUCUCAAAUUUCA	261-279
21	NGAAAAUUGAGAGAAGUCN	48	NGACUUCUCUCAAAUUUCN	261-279
22	ACCAUUUAUGCCUACAGC	49	GCUGUAGGCAUAAAUUGGU	1780-1798
23	UCCAUUUAUGCCUACAGC	50	GCUGUAGGCAUAAAUUGGA	1780-1798
24	ACCAUUUAUGCCUACAGN	51	NCUGUAGGCAUAAAUUGGU	1780-1798
25	UCCAUUUAUGCCUACAGN	52	NCUGUAGGCAUAAAUUGGA	1780-1798
26	NCCAUUUAUGCCUACAGN	53	NCUGUAGGCAUAAAUUGGN	1780-1798
27	GACCAUUUAUGCCUACAG	54	CUGUAGGCAUAAAUUGGUC	1781-1799
28	AACCAUUUAUGCCUACAG	55	CUGUAGGCAUAAAUUGGUU	1781-1799
29	UACCAUUUAUGCCUACAG	56	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	1781-1799
SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность (5'→3') (19-мер)	SEQ ID NO:	Смысловая последовательность (5'→3') (19-мер)	Геномное положение SEQ ID NO: 1
30	GACCAUUUAUGCCUACAN	57	NUGUAGGCAUAAAUUGGUC	1781-1799
31	AACCAUUUAUGCCUACAN	58	NUGUAGGCAUAAAUUGGUU	1781-1799
32	UACCAUUUAUGCCUACAN	59	NUGUAGGCAUAAAUUGGUA	1781-1799
33	NACCAUUUAUGCCUACAN	60	NUGUAGGCAUAAAUUGGUN	1781-1799

ФИГ.9

Таблица 7. Антисмысловая последовательность РНК-агента HBV из W02018027106

ID AS цепи	Модифицированная последовательность (5'→3')	SEQ ID NO	Немодифицированная последовательность (5'→3')	SEQ ID NO
AM03508-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfccsusuAu	61	UACCAAUUUUAUGCCUACAGGCCUUAU	149
AM04441-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfcsesu	62	UACCAAUUUUAUGCCUACAGGCCU	150
AM04442-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfcsesu	63	UACCAAUUUUAUGCCUACAGGCCU	150
AM04443-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfsc	64	UACCAAUUUUAUGCCUACAGGC	151
AM04661-AS	usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfeacsusu	65	UGUGAAGCGAAGUGCACACUU	152
AM04768-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfcsuscgc	66	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCCUCCGC	153
AM04769-AS	vpusAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfcsuscgc	67	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCCUCCGC	153
AM05011-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu	68	UACCAAUUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05012-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfggsc	69	UACCAAUUUUAUGCCUACAGGC	151
AM05013-AS	vpusAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfsc	70	UACCAAUUUUAUGCCUACAGGC	151
AM05014-AS	vpusAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu	71	UACCAAUUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05052-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfsa	72	AUUGAGAGAAGUCCACCACGA	155
AM05053-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfsa	73	AUUGAGAGAAGUCCACCACGA	155
AM05054-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfsa	74	AUUGAGAGAAGUCCACCACUU	156
AM05055-AS	vpusUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfsa	75	UUUGAGAGAAGUCCACCACGA	157
AM05056-AS	asAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	76	AAUUGAGAGAAGUCCACCACG	158
AM05057-AS	asAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	77	AAUUGAGAGAAGUCCACCACG	158
AM05058-AS	asAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	78	AAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	159
AM05060-AS	vpusAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	79	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05351-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfsu	80	UACCAAUUUUAUGCCUACAGGU	161
AM05608-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgsusu	81	UACCAAUUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05609-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc	82	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCC	162
AM05610-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgccusu	83	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCCUU	163
AM05611-AS	usAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgccusc	84	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCCUC	164

AM05612-AS	usAfsCcaauUfuAfuGfcCfuacagcsc	85	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCC	162
AM05613-AS	usAfsCcaauUfuAfuGfcCfuacagccusu	86	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCCUU	163
AM05614-AS	usAfsCcaauUfuAfuGfcCfuacagccusc	87	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCCUC	164
AM05618-AS	asUfsusgagaGfaAfgUfcCfaccacusu	88	AUUGAGAGAAGUCCACCACUU	156
AM05621-AS	usUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcusu	89	UUUGAGAGAAGUCCACCACUU	165
AM05623-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcggusu	90	AUUGAGAGAAGUCCACCACGGUU	166
AM05626-AS	asUfsusgagaGfaAfgUfcCfaccaggsusu	91	AUUGAGAGAAGUCCACCACGGUU	166
AM05628-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcgagsu	92	AUUGAGAGAAGUCCACCACGAGU	167
AM05631-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	93	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05632-AS	usAfsusugagAfgAfaGfuCfcaccacsg	94	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05633-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsgusu	95	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGUU	168
AM05634-AS	usAfsusugagAfgAfaGfuCfcaccacgag	96	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	169
AM05635-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	97	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	169
AM05637-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsgsa	98	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	170
AM05638-AS	usAfsusugagAfgAfaGfuCfcaccacgsa	99	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	170
AM05747-AS	asGfsasAfaAfuugagAfgAfaGfuCfcAfc	100	AGAAAUAUUGAGAGAAGUCCAC	171
AM05849-AS	usAfsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgusu	101	UACCAAUUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05850-AS	usAfsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgcsc	102	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCC	162
AM05851-AS	usAfsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgcsc	103	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCUU	172
AM05852-AS	usAfsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccusu	104	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCCU	173
AM05853-AS	usAfsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccusu	105	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCCUU	163
AM05854-AS	usAfsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccusc	106	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCCUC	164
AM05855-AS	cPrpusAfsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu	107	UACCAAUUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05860-AS	cPrpusAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	108	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05862-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfaCfsg	109	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	174
AM05863-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfaCfsg	110	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05864-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfaCfsg	111	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM05865-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfaCfsgsa	112	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	170

ФИГ.9 (продолжение)

AM05867-AS	vpusAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfaCfsg	113	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05873-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfeAfcusu	114	UUUGAGAGAAGUCCACCACUU	165
AM05874-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfeAfcgsa	115	UUUGAGAGAAGUCCACCACGA	157
AM05875-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfeAfcgusu	116	UUUGAGAGAAGUCCACCACGUU	176
AM05876-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfeAfcgag	117	UUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	177
AM05877-AS	cPrpusUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfeAfcusu	118	UUUGAGAGAAGUCCACCACUU	165
AM06074-AS	cPrpusAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacusu	119	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06142-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacusu	120	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06143-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacgusu	121	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGUU	168
AM06144-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacuus(invAb)	122	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06145-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacgag	123	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	169
AM06222-AS	usAfsusUfgAfgAfaGfuCfcAfcCfacusu	124	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06281-AS	asGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcusu	125	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCUU	178
AM06282-AS	asGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcase	126	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCAC	171
AM06283-AS	asGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcacusu	127	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCACUU	179
AM06284-AS	asGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcacsc	128	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCACC	180
AM06285-AS	usGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcusu	129	UGAAAAUUGAGAGAAGUCCUU	152
AM06286-AS	usGfsasAfaAfuUfgAfgAfaGfuCfcase	130	UGAAAAUUGAGAGAAGUCCAC	181
AM06299-AS	asCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcusu	131	ACCAAUUUUUGCCUACAGCUU	182
AM06300-AS	asCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcusu	132	ACCAAUUUUUGCCUACAGCCUU	183
AM06301-AS	asCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcusc	133	ACCAAUUUUUGCCUACAGCCUC	184
AM06302-AS	usCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcusu	134	UCCA AUUUUUGCCUACAGCUU	185
AM06303-AS	usCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcusu	135	UCCA AUUUUUGCCUACAGCCUU	186
AM06463-AS	cPrpusAfsesCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgesc	136	UACCAAUUUUUGCCUACAGCC	162
AM06464-AS	usAfsesCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgesc	137	UACCAAUUUUUGCCUACAGCC	162
AM06465-AS	cPrpusAfsesCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgesc	138	UACCAAUUUUUGCCUACAGCC	162
AM06604-AS	usAfsesCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgesu	139	UACCAAUUUUUGCCUACAGCU	187
AM06606-AS	usAfsesCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgesg	140	UACCAAUUUUUGCCUACAGCG	188
AM06608-AS	asAfsesCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgesc	141	AACCAAUUUUUGCCUACAGCC	189
AM06611-AS	usAfsesCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu	142	UACCAAUUUUUGCCUACAGUU	154
AM06612-AS	usAfsesCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfsc	143	UACCAAUUUUUGCCUACAGCC	162
AM06614-AS	asCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcCfsu	144	ACCAAUUUUUGCCUACAGCCU	190
AM06616-AS	usCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcCfsu	145	UCCA AUUUUUGCCUACAGCCU	191
AM06618-AS	asCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccsg	146	ACCAAUUUUUGCCUACAGCCG	192
AM06620-AS	usCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccsg	147	UCCA AUUUUUGCCUACAGCCG	193
AM06751-AS	usAfsesCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgesg	148	UACCAAUUUUUGCCUACAGGG	194

ФИГ.10

Таблица 8. Смысловая последовательность РНК-агента HBV из WO2018027106

ID цепи	Модифицированная последовательность (5'→3')	SEQ ID NO	Немодифицированная последовательность (5'→3')	SEQ ID NO
AM0444-SS	(NAG25)uusgscugugGfCfAfuaaaugguauS(inv dT)	195	UUGCCUGUAGGCAUAAAUUGGUAUT	275
AM0445-SS	(NAG25)uauausgscugugGfCfAfuaaaugguA(inv dA)	196	UUAUAGCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	276
AM04767-SS	(NAG25)jcggaagsgcugugGfCfAfuaaauggTM(inv dA)	197	GCGGAGGCGUGUAGGCAUAAAUUGGTA	277
AM05010-SS	(NAG25)jcsugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	198	CUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	278
AM05015-SS	(NAG25)jsgscugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	199	GCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	279
AM05016-SS	(NAG25)jsgscugugGfCfAfuaaaugguS(inv dA)	200	GCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	279
AM05017-SS	(NAG25)jsgscugugGfCfAfuaaaugguAMs(inv Ab)	201	GCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	279
AM05018-SS	(NAG25)jsgscugugGfCfAfuaaauggTMAMs(inv Ab)	202	GCCUGUAGGCAUAAAUUGGTA	280
AM05019-SS	(NAG25)jsasacugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	203	AACUGUAGGCAUAAAUUGGUA	281
AM05034-SS	(NAG25)jsuscgugugGfAfcfuucucuaauS(inv Ab)	204	UCGUGGAGGACUUCUCUCAAU	282
AM05046-SS	(NAG25)jsasagugugGfAfcfuucucuaauS(inv Ab)	205	AAGUGGAGGACUUCUCUCAAU	283
AM05047-SS	(NAG25)juscgugugGfAfcfuucucuaAMTMs(inv Ab)	206	UCGUGGAGGACUUCUCUCAAT	284
AM05048-SS	(NAG25)jscgugugGfCfUfucucuaauS(inv Ab)	207	CGUGGAGGACUUCUCUCAAUU	285
AM05049-SS	(NAG25)jsasagugugGfCfUfucucuaauS(inv Ab)	208	AAUGGAGGACUUCUCUCAAUU	286
AM05050-SS	(NAG25)jscgugugGfCfUfucucuaaTMTMs(inv Ab)	209	CGUGGAGGACUUCUCUCAATT	287
AM05051-SS	(NAG25)jsggacucuCfUfcfaauuuucuaas(inv Ab)	210	GGACUUCUCUCAUUUUCUAA	288
AM05063-SS	(NAG25)jscgugugGfCfUfucucuaauS(inv Ab)	211	CGUGGAGGACUUCUCUCAUA	289
AM05064-SS	(NAG25)juscgugugGfAfcfuucucuaaas(inv Ab)	212	UCGUGGAGGACUUCUCUCAAA	290
AM05346-SS	(NAG31)jsascugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	213	ACCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	291
AM05347-SS	(NAG31)js(inv Ab)scugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	214	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	292
AM05606-SS	(NAG25)js(inv Ab)scugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	215	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	292
AM05607-SS	(NAG37)js(inv Ab)scugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	216	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	292
AM05615-SS	(NAG25)js(inv Ab)scugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	217	ACUGUAGGCAUAAAUUGGUA	293
ID цепи	Модифицированная последовательность (5'→3')	SEQ ID NO	Немодифицированная последовательность (5'→3')	SEQ ID NO
AM05616-SS	(NAG25)jsggugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	218	GCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	294
AM05617-SS	(NAG37)jsasagugugGfAfcfuucucuaauS(inv Ab)	219	AAGUGGAGGACUUCUCUCAAU	283
AM05620-SS	(NAG25)jsasagugugGfAfcfuucucuaaas(inv Ab)	220	AAGUGGAGGACUUCUCUCAAA	295
AM05622-SS	(NAG25)jscgugugGfAfcfuucucuaauS(inv Ab)	221	CCGUGGAGGACUUCUCUCAAU	296
AM05624-SS	(NAG25)js(inv Ab)scgugugGfAfcfuucucuaauS(inv Ab)	222	CCGUGGAGGACUUCUCUCAAU	296
AM05627-SS	(NAG25)jscucgugugGfAfcfuucucuaauS(inv Ab)	223	CUCGUGGAGGACUUCUCUCAAU	297
AM05629-SS	(NAG25)js(inv Ab)sgugugGfAfcfuucucuaauS(inv Ab)	224	GUGGAGGACUUCUCUCAAU	298
AM05630-SS	(NAG25)js(inv Ab)sgugugGfAfcfuucucuaauS(inv Ab)	225	GUGGAGGACUUCUCUCAAUUU	299
AM05636-SS	(NAG25)juscgugugGfCfUfucucuaauS(inv Ab)	226	UCGUGGAGGACUUCUCUCAAUU	300
AM05639-SS	(NAG25)js(inv Ab)sgugugGfCfUfucucuaauS(inv Ab)	227	UGGAGGACUUCUCUCAAUU	301
AM05640-SS	(NAG37)js(inv Ab)sgugugGfCfUfucucuaauS(inv Ab)	228	UGGAGGACUUCUCUCAAUU	301
AM05746-SS	(NAG25)jsggacucuCfUfcfuaauuuucus(inv Ab)	229	GUGGACUUCUCUCAUUUUCU	302
AM05856-SS	(NAG25)js(inv Ab)scugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	230	CUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	278
AM05857-SS	(NAG25)js(inv Ab)scugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	231	GCUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	303
AM05858-SS	(NAG25)js(inv Ab)sgcugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	232	GCCUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	304
AM05859-SS	(NAG25)js(inv Ab)saacugugGfCfAfuaaaugguauS(inv Ab)	233	AACUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	305
AM05868-SS	(NAG25)js(inv Ab)uggugGfCfUfucucuaauS(inv Ab)	234	UGGAGGACUUCUCUCAAUUU	306
AM05869-SS	(NAG25)js(inv Ab)sgugugGfCfUfucucuaauS(inv Ab)	235	GUGGAGGACUUCUCUCAAUUU	307
AM05870-SS	(NAG25)jsasagugugGfCfUfucucuaauS(inv Ab)	236	AAUGGAGGACUUCUCUCAAUUU	308
AM05871-SS	(NAG25)jscgugugGfCfUfucucuaauS(inv Ab)	237	CGUGGAGGACUUCUCUCAAUUU	309
AM05872-SS	(NAG31)jscgugugGfCfUfucucuaauS(inv Ab)	238	CGUGGAGGACUUCUCUCAUA	289
AM05879-SS	(NAG25)js(inv Ab)saagugugGfAfcfuucucuaauS(inv Ab)	239	AAGUGGAGGACUUCUCUCAAU	283
AM05880-SS	(NAG25)js(inv Ab)sgugugGfAfcfuucucuaauS(inv Ab)	240	GUGGAGGACUUCUCUCAAUUU	310
AM05881-SS	(NAG25)js(inv Ab)scugugGfAfcfuucucuaauS(inv Ab)	241	CGUGGAGGACUUCUCUCAAUUU	311

ФИГ.10 (продолжение)

ID цепи	Модифицированная последовательность (5'→3')	SEQ ID NO	Немодифицированная последовательность (5'→3')	SEQ ID NO
AM05882-SS	(NAG25)sasaguggugGfAfCfuucucucaaausu(inv Ab)	242	AAGUGGUGGACUUCUCUCAAAU	312
AM05883-SS	(NAG25)suscguggugGfAfCfuucucucaaausu(inv Ab)	243	UCGUGGUGGACUUCUCUCAAAU	313
AM06146-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgcuguggAfCfUfucucucaaausu(inv Ab)	244	GUGGUGGACUUCUCUCAAAU	307
AM06147-SS	(NAG37)s(inv Ab)scguguggAfCfUfucucucaaausu(inv Ab)	245	CGUGGUGGACUUCUCUCAAAU	309
AM06148-SS	(NAG37)s(inv Ab)scucguggugAfCfUfucucucaaausu(inv Ab)	246	CUCGUGGUGGACUUCUCUCAAAU	314
AM06149-SS	(NAG37)s(inv Ab)scucguggugAfCfUfucucucaaausu(inv Ab)	247	CUCGUGGUGGACUUCUCUCAAAU	315
AM06150-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgcugugGfCfAfuuaaugguas(inv Ab)	248	GGCUGUAGGCAUAAAUGGUA	294
AM06151-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgaggcugugGfCfAfuuaaugguas(inv Ab)	249	GAGGCUGUAGGCAUAAAUGGUA	316
AM06152-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgaggcugugGfCfAfuuaaugguas(inv Ab)	250	GAGGCUGUAGGCAUAAAUGGUAU	317
AM06287-SS	(NAG37)s(inv Ab)sggacuuCfUfCfucauuuuucas(inv Ab)	251	GGACUUCUCUCAUUUUUCU	318
AM06288-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgggacuuCfUfCfucauuuuucas(inv Ab)	252	GUGGACUUCUCUCAUUUUUCU	302
AM06289-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgggacuuCfUfCfucauuuuucas(inv Ab)	253	GGUGGACUUCUCUCAUUUUUCU	319
AM06290-SS	(NAG37)s(inv Ab)sggacuuCfUfCfucauuuuucas(inv Ab)	254	GGACUUCUCUCAUUUUUCA	320
AM06291-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgggacuuCfUfCfucauuuuucas(inv Ab)	255	GUGGACUUCUCUCAUUUUUCA	321
AM06304-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgcuguaGfGfCfauaauggus(inv Ab)	256	GCUGUAGGCAUAAAUGGU	322
AM06305-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgcuguaGfGfCfauaauggus(inv Ab)	257	GGCUGUAGGCAUAAAUGGU	323
AM06306-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgaggcuguaGfGfCfauaauggus(inv Ab)	258	GAGGCUGUAGGCAUAAAUGGU	324
AM06307-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgcuguaGfGfCfauaauggus(inv Ab)	259	GCUGUAGGCAUAAAUGGA	325
AM06308-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgcuguaGfGfCfauaauggus(inv Ab)	260	GGCUGUAGGCAUAAAUGGA	326
AM06603-SS	(NAG37)s(inv Ab)sagcuguaGfCfAfuuaaugguas(inv Ab)	261	AGCUGUAGGCAUAAAUGGUA	327
AM06605-SS	(NAG37)s(inv Ab)scgcuguaGfCfAfuuaaugguas(inv Ab)	262	CGCUGUAGGCAUAAAUGGUA	328
AM06607-SS	(NAG37)s(inv Ab)sgcuguaGfCfAfuuaaugguas(inv Ab)	263	GGCUGUAGGCAUAAAUGGUU	329
AM06609-SS	(NAG37)s(inv Ab)scuguaGfCfAfuuaaugguas(inv Ab)	264	CUGUAGGCAUAAAUGGUAU	278
AM06610-SS	(NAG37)s(inv Ab)scuGfuAfgGfCfAfuAfaAfuUfgGfuasuus(inv Ab)	265	CUGUAGGCAUAAAUGGUAU	278
ID цепи	Модифицированная последовательность (5'→3')	SEQ ID NO	Немодифицированная последовательность (5'→3')	SEQ ID NO
AM06613-SS	(NAG37)s(inv Ab)sagcuguaGfGfCfauaauggus(inv Ab)	266	AGGCUGUAGGCAUAAAUGGU	330
AM06615-SS	(NAG37)s(inv Ab)sagcuguaGfGfCfauaauggus(inv Ab)	267	AGGCUGUAGGCAUAAAUGGA	331
AM06617-SS	(NAG37)s(inv Ab)scgcuguaGfGfCfauaauggus(inv Ab)	268	CGGCUGUAGGCAUAAAUGGU	332
AM06619-SS	(NAG37)s(inv Ab)scgcuguaGfGfCfauaauggus(inv Ab)	269	CGGCUGUAGGCAUAAAUGGA	333
AM06750-SS	(NAG37)s(inv Ab)scuccuguaGfCfAfuuaaugguas(inv Ab)	270	CCCUGUAGGCAUAAAUGGUA	334
AM06752-SS	(NAG37)scgcuguaGfCfAfuuaaugguas(inv Ab)	271	CGCUGUAGGCAUAAAUGGUA	328
AM06753-SS	(NAG37)scuccuguaGfCfAfuuaaugguas(inv Ab)	272	CCCUGUAGGCAUAAAUGGUA	334
AM06776-SS	(NAG25)s(inv Ab)sgggacuuCfUfCfucauuuuucas(inv Ab)	273	GUGGACUUCUCUCAUUUUUCU	302
AM06777-SS	(NAG25)s(inv Ab)scgcuguaGfCfAfuuaaugguas(inv Ab)	274	CGCUGUAGGCAUAAAUGGUA	328

ФИГ.11

Таблица 9. Примеры дуплексов РНК-агента HBV из WO2018027106

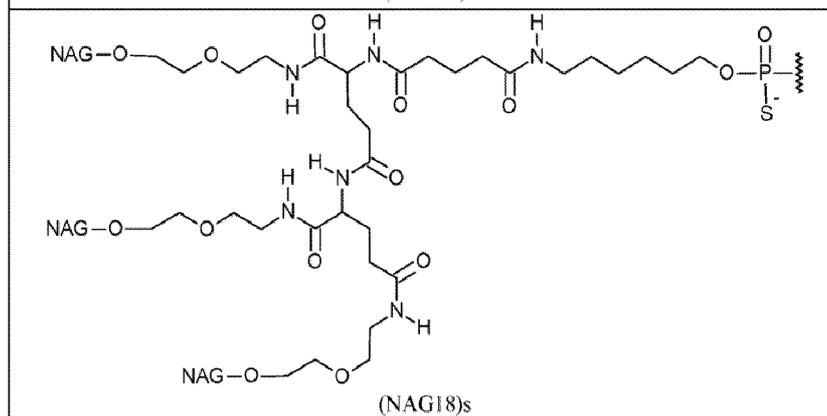
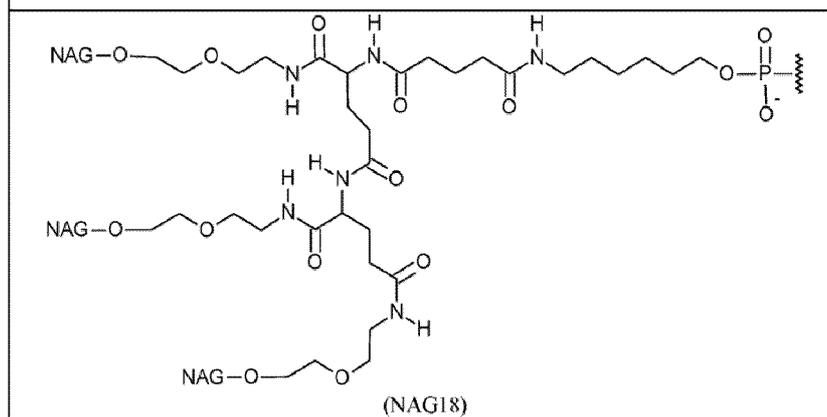
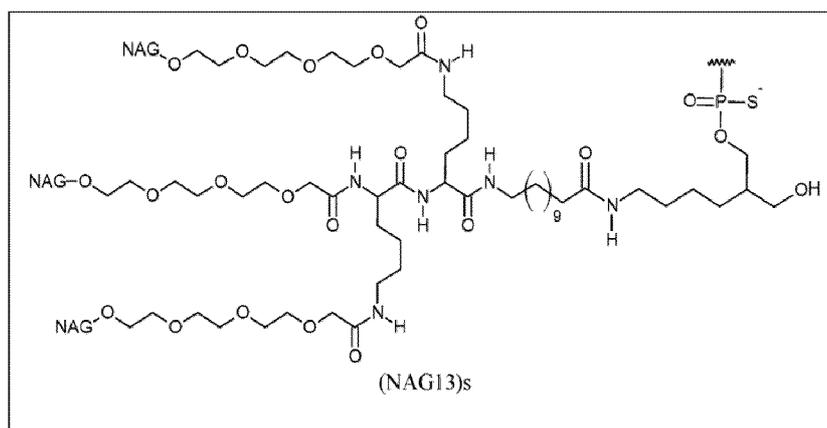
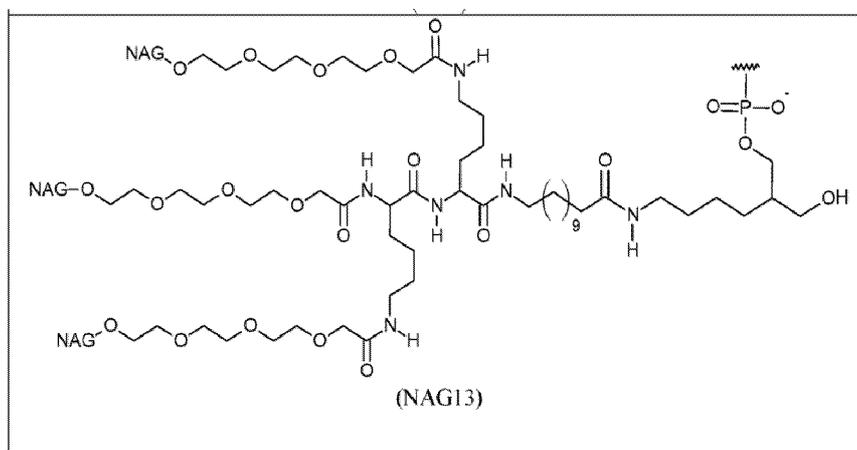
Дуплекс, ID	Антисмысловая цепь, ID	Смысловая цепь, ID	Дуплекс, ID	Антисмысловая цепь, ID	Смысловая цепь, ID
AD03498	AM03508-AS	AM04445-SS	AD04426	AM05623-AS	AM05622-SS
AD03499	AM04441-AS	AM04444-SS	AD04427	AM05623-AS	AM05624-SS
AD03500	AM04442-AS	AM04444-SS	AD04428	AM05626-AS	AM05622-SS
AD03501	AM04443-AS	AM04444-SS	AD04429	AM05626-AS	AM05624-SS
AD03738	AM04768-AS	AM04767-SS	AD04430	AM05628-AS	AM05627-SS
AD03739	AM04769-AS	AM04767-SS	AD04431	AM05054-AS	AM05629-SS
AD03967	AM04443-AS	AM05010-SS	AD04432	AM05054-AS	AM05630-SS
AD03968	AM05011-AS	AM05010-SS	AD04433	AM05631-AS	AM05048-SS
AD03969	AM04443-AS	AM05015-SS	AD04434	AM05632-AS	AM05048-SS
AD03970	AM05011-AS	AM05019-SS	AD04435	AM05633-AS	AM05048-SS
AD03971	AM05012-AS	AM05015-SS	AD04436	AM05635-AS	AM05048-SS
AD03972	AM04443-AS	AM05016-SS	AD04437	AM05634-AS	AM05048-SS
AD03973	AM04443-AS	AM05017-SS	AD04438	AM05637-AS	AM05636-SS
AD03974	AM04443-AS	AM05018-SS	AD04439	AM05638-AS	AM05636-SS
AD03975	AM05013-AS	AM05015-SS	AD04440	AM05058-AS	AM05639-SS
AD03976	AM05014-AS	AM05019-SS	AD04441	AM05057-AS	AM05639-SS
AD03977	AM05013-AS	AM05017-SS	AD04442	AM05057-AS	AM05640-SS
AD03978	AM05013-AS	AM04444-SS	AD04511	AM05747-AS	AM05746-SS
AD04001	AM05052-AS	AM05034-SS	AD04570	AM05011-AS	AM05856-SS
AD04002	AM05053-AS	AM05034-SS	AD04571	AM05849-AS	AM05856-SS
AD04003	AM05054-AS	AM05046-SS	AD04572	AM05850-AS	AM05856-SS
AD04004	AM05052-AS	AM05047-SS	AD04573	AM05851-AS	AM05857-SS
AD04005	AM05055-AS	AM05064-SS	AD04574	AM05852-AS	AM05857-SS
AD04006	AM05056-AS	AM05048-SS	AD04575	AM05853-AS	AM05858-SS
AD04007	AM05057-AS	AM05048-SS	AD04576	AM05854-AS	AM05858-SS
AD04008	AM05058-AS	AM05049-SS	AD04577	AM05011-AS	AM05859-SS
AD04009	AM05056-AS	AM05050-SS	AD04578	AM05850-AS	AM05858-SS
AD04010	AM05060-AS	AM05063-SS	AD04579	AM05014-AS	AM05347-SS
AD04176	AM05351-AS	AM05346-SS	AD04580	AM05855-AS	AM05347-SS
AD04177	AM04443-AS	AM05347-SS	AD04581	AM05860-AS	AM05063-SS
AD04178	AM05011-AS	AM05347-SS	AD04583	AM05862-AS	AM05868-SS
AD04412	AM05011-AS	AM05606-SS	AD04584	AM05863-AS	AM05868-SS
AD04413	AM05011-AS	AM05607-SS	AD04585	AM05864-AS	AM05869-SS
AD04414	AM05608-AS	AM05606-SS	AD04586	AM05865-AS	AM05869-SS
AD04415	AM05011-AS	AM05615-SS	AD04587	AM05862-AS	AM05870-SS
AD04416	AM05609-AS	AM05616-SS	AD04588	AM05863-AS	AM05871-SS
AD04417	AM05610-AS	AM05616-SS	AD04590	AM05867-AS	AM05063-SS
AD04418	AM05611-AS	AM05616-SS	AD04591	AM05860-AS	AM05872-SS
AD04419	AM05612-AS	AM05616-SS	AD04592	AM05054-AS	AM05879-SS
AD04420	AM05613-AS	AM05616-SS	AD04593	AM05873-AS	AM05880-SS
AD04421	AM05614-AS	AM05616-SS	AD04594	AM05874-AS	AM05880-SS
AD04422	AM05054-AS	AM05617-SS	AD04595	AM05875-AS	AM05881-SS
AD04423	AM05618-AS	AM05046-SS	AD04596	AM05876-AS	AM05881-SS
AD04425	AM05621-AS	AM05620-SS	AD04597	AM05873-AS	AM05882-SS

ФИГ.11 (продолжение)

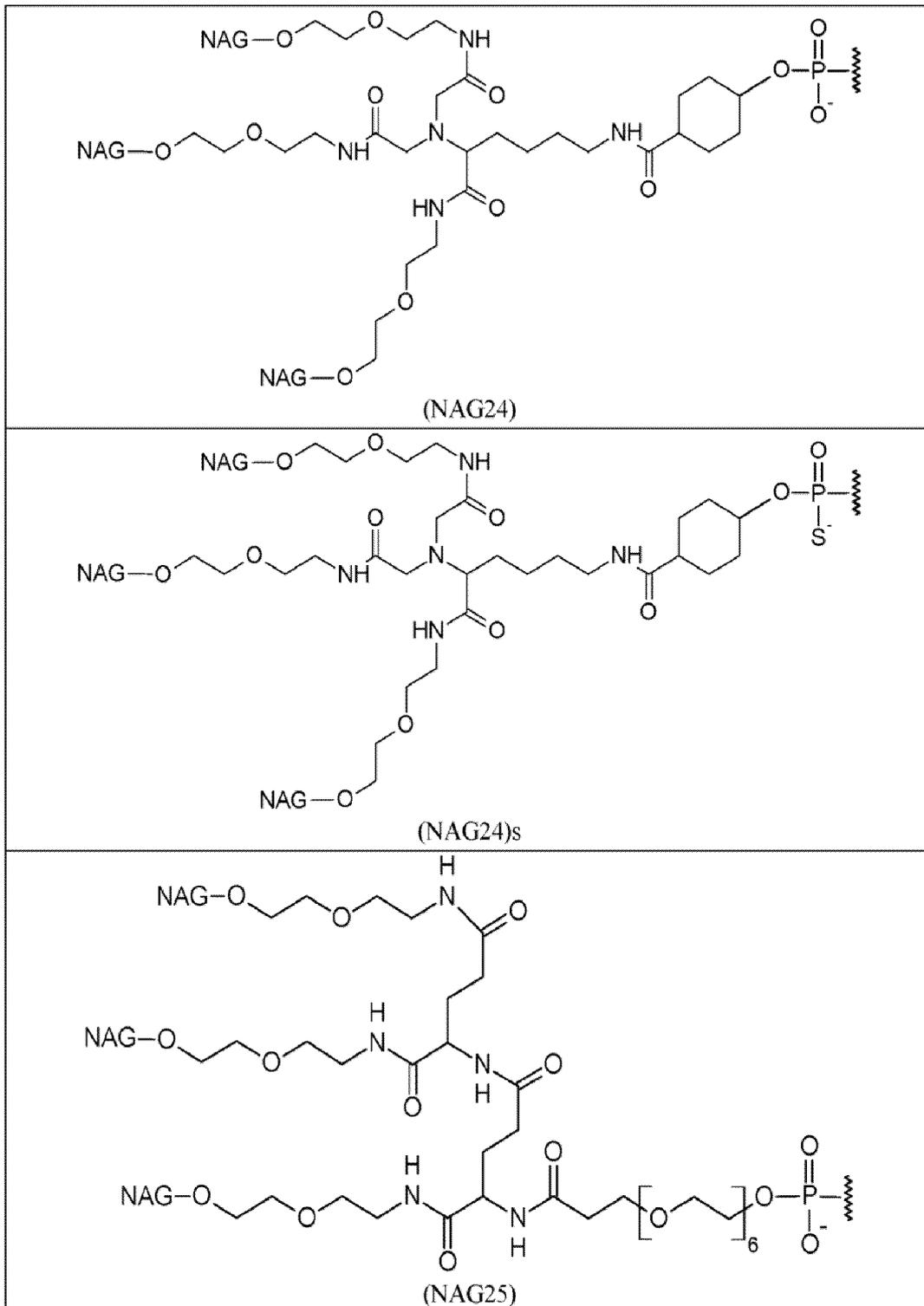
Дуплекс, ID	Антисмысловая цепь, ID	Смысловая цепь, ID
AD04598	AM05874-AS	AM05883-SS
AD04599	AM05877-AS	AM05620-SS
AD04734	AM06074-AS	AM05869-SS
AD04771	AM06142-AS	AM06146-SS
AD04772	AM06143-AS	AM06147-SS
AD04773	AM06144-AS	AM06146-SS
AD04774	AM06145-AS	AM06148-SS
AD04775	AM06145-AS	AM06149-SS
AD04776	AM05850-AS	AM06150-SS
AD04777	AM05854-AS	AM06151-SS
AD04778	AM05854-AS	AM06152-SS
AD04822	AM06222-AS	AM06146-SS
AD04823	AM05609-AS	AM06150-SS
AD04871	AM06281-AS	AM06287-SS
AD04872	AM06282-AS	AM06288-SS
AD04873	AM06283-AS	AM06288-SS
AD04874	AM06284-AS	AM06289-SS
AD04875	AM06285-AS	AM06290-SS
AD04876	AM06286-AS	AM06291-SS
AD04881	AM06299-AS	AM06304-SS
AD04882	AM06300-AS	AM06305-SS
AD04883	AM06301-AS	AM06306-SS
AD04884	AM06302-AS	AM06307-SS
AD04885	AM06303-AS	AM06308-SS
AD04962	AM05864-AS	AM06146-SS
AD04963	AM05855-AS	AM05607-SS
AD04981	AM06463-AS	AM06150-SS
AD04982	AM06464-AS	AM06150-SS
AD04983	AM06465-AS	AM06150-SS
AD05069	AM06604-AS	AM06603-SS
AD05070	AM06606-AS	AM06605-SS
AD05071	AM06608-AS	AM06607-SS
AD05072	AM05011-AS	AM06609-SS
AD05073	AM06611-AS	AM06610-SS
AD05074	AM06612-AS	AM06150-SS
AD05075	AM06614-AS	AM06613-SS
AD05076	AM06616-AS	AM06615-SS
AD05077	AM06618-AS	AM06617-SS
AD05078	AM06620-AS	AM06619-SS
AD05147	AM06751-AS	AM06750-SS
AD05148	AM06606-AS	AM06752-SS
AD05149	AM06751-AS	AM06753-SS
AD05164	AM06282-AS	AM06776-SS
AD05165	AM06606-AS	AM06777-SS

ФИГ.12

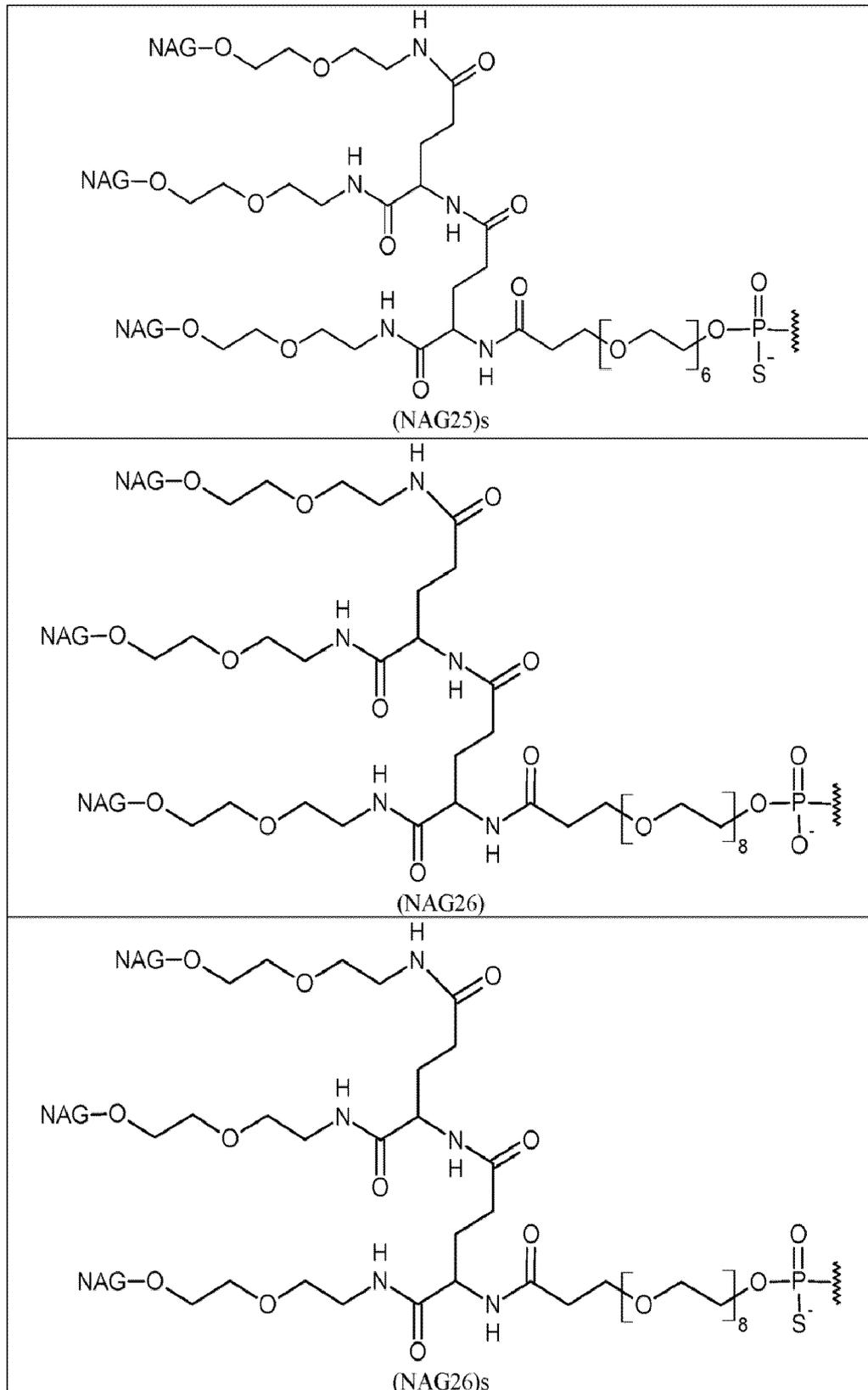
Таблица 10. Примеры нацеливающих лигандов



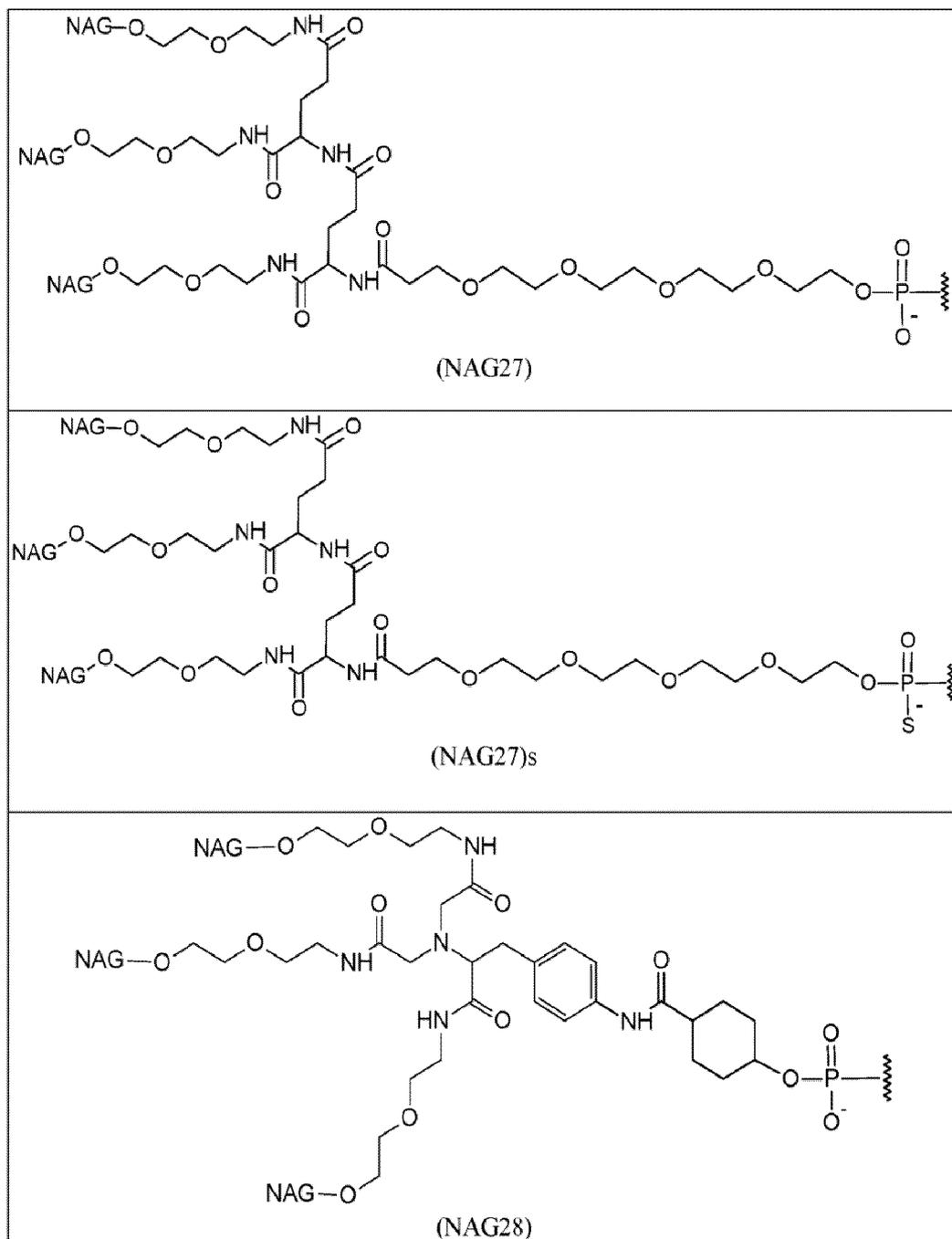
ФИГ.12 (продолжение)



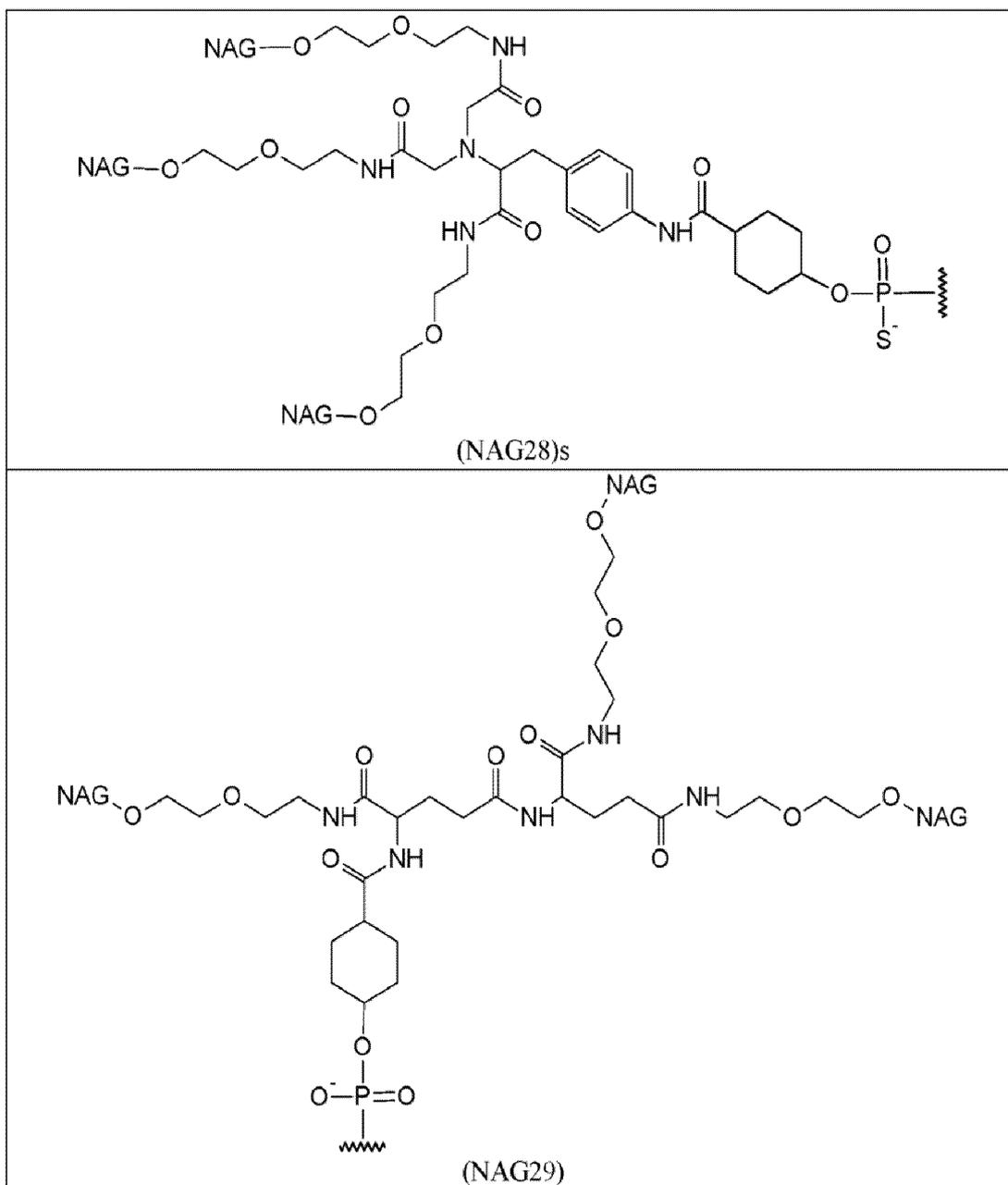
ФИГ.12 (продолжение)



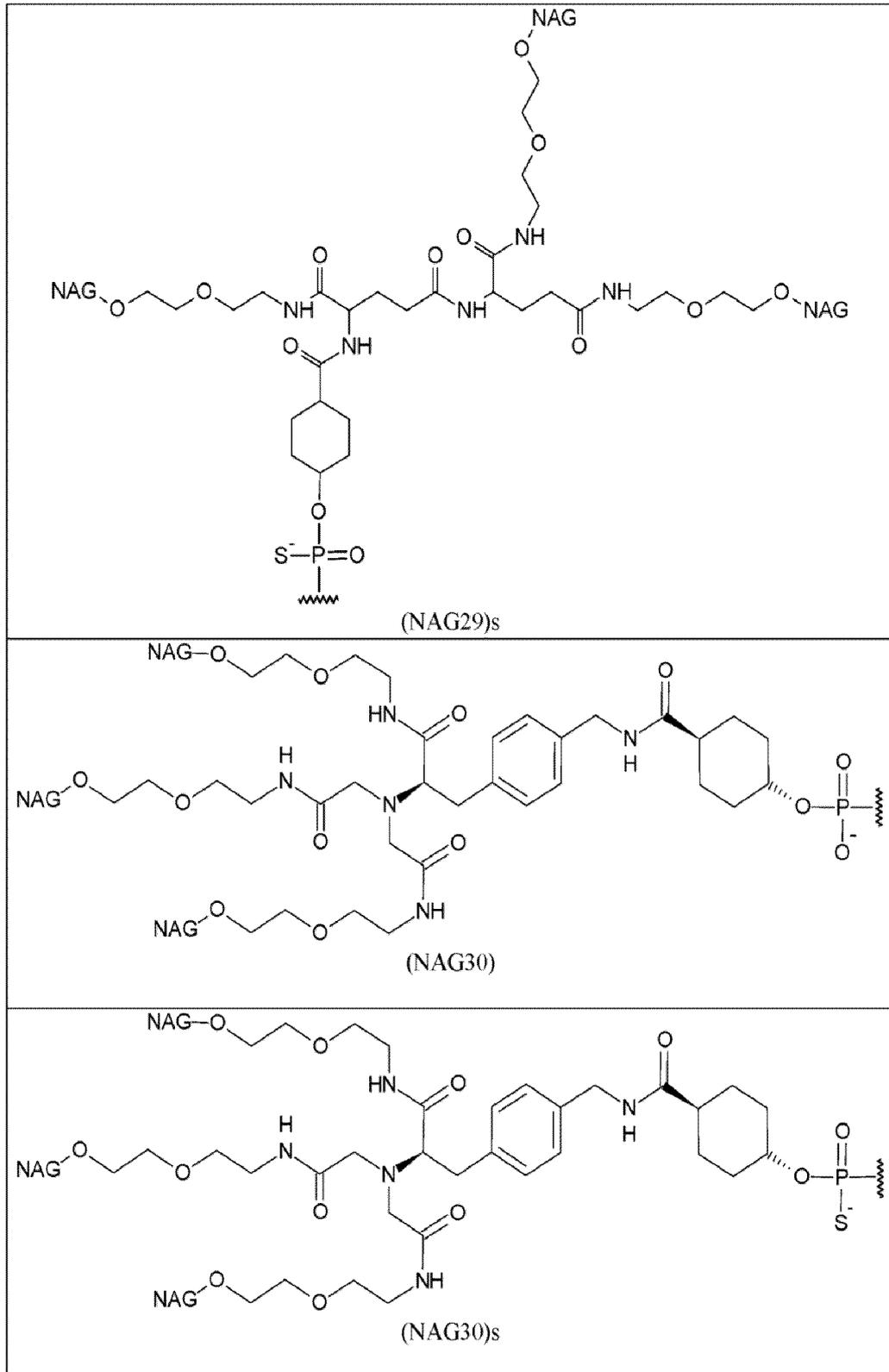
ФИГ.12 (продолжение)



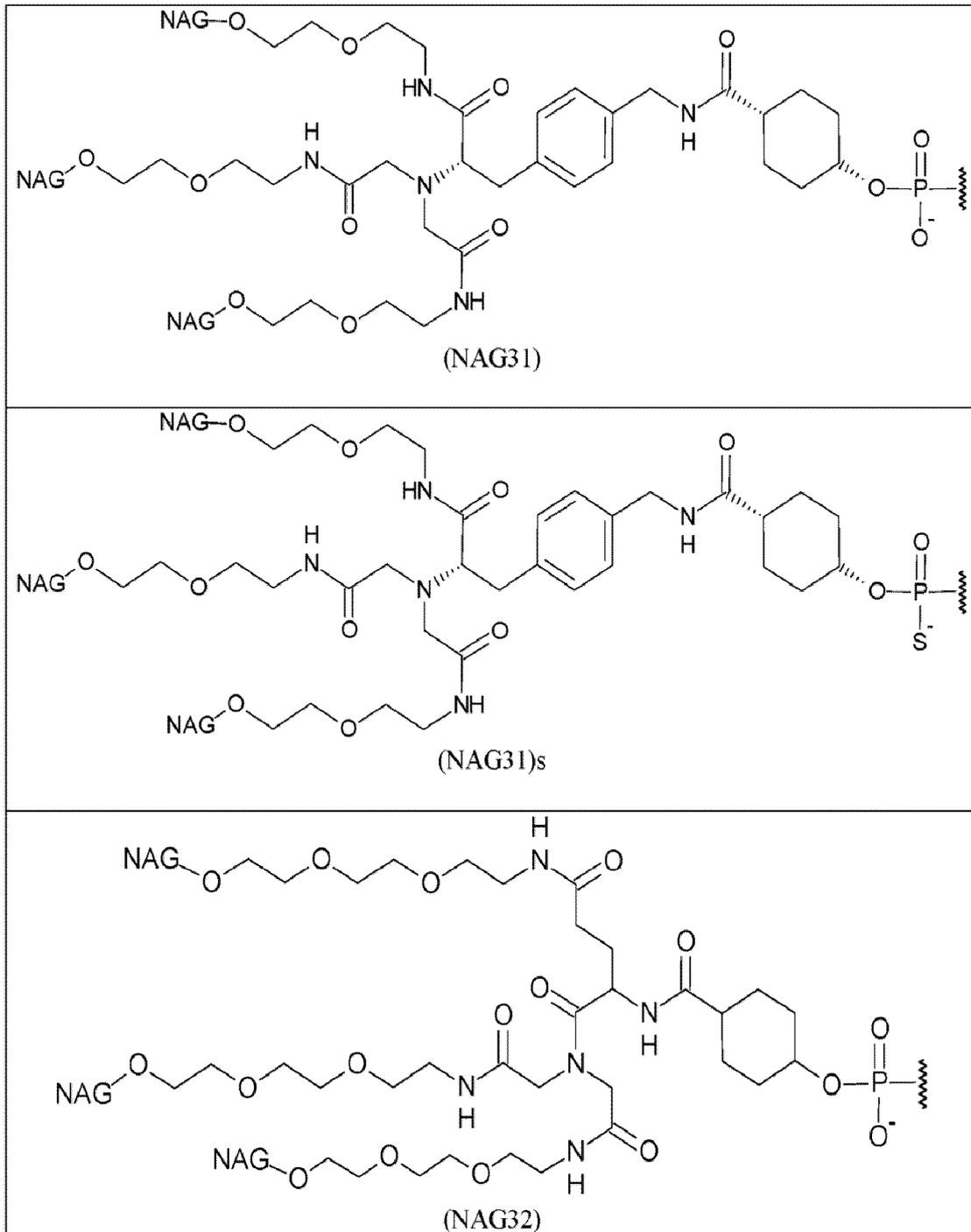
ФИГ.12 (продолжение)



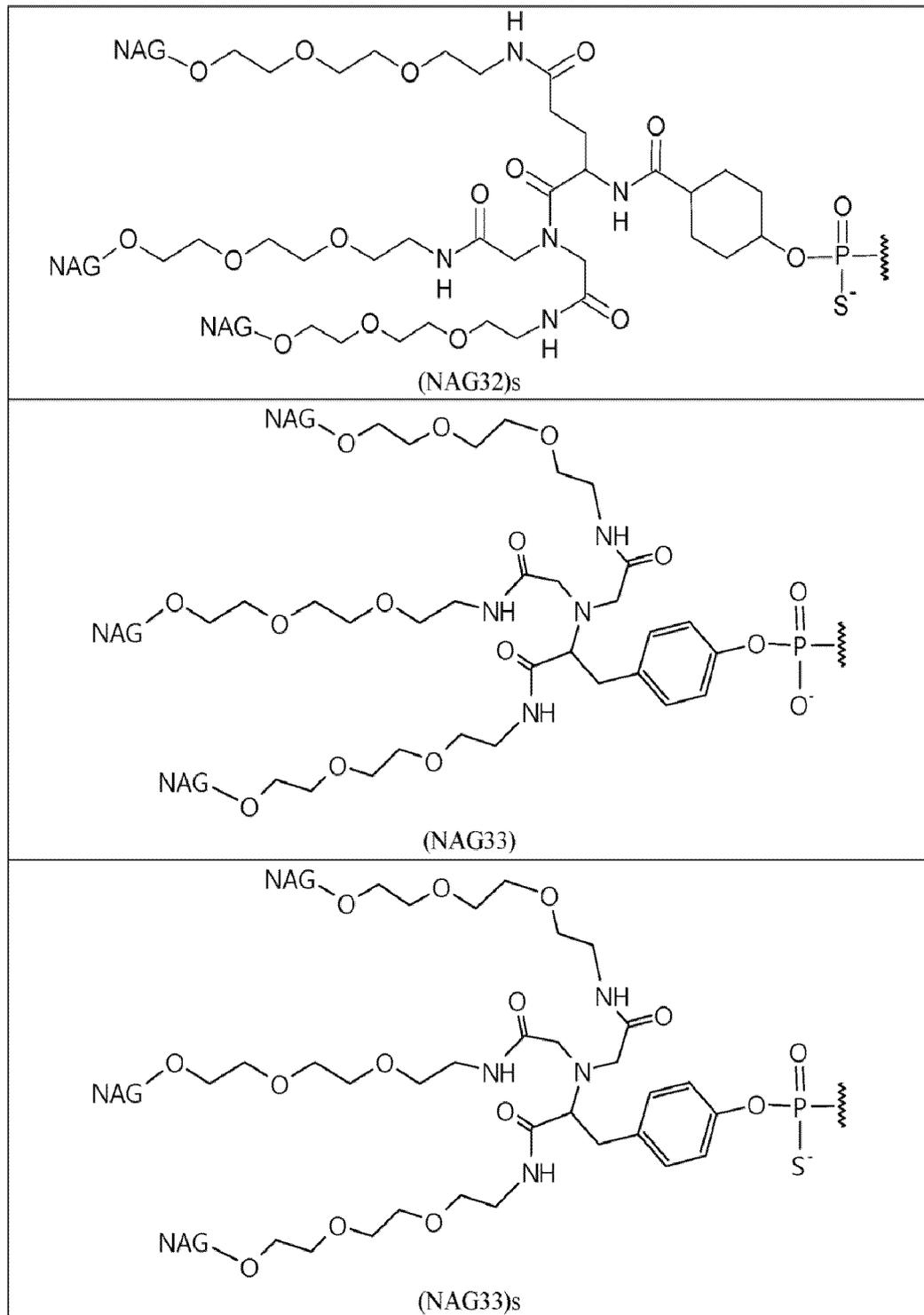
ФИГ.12 (продолжение)



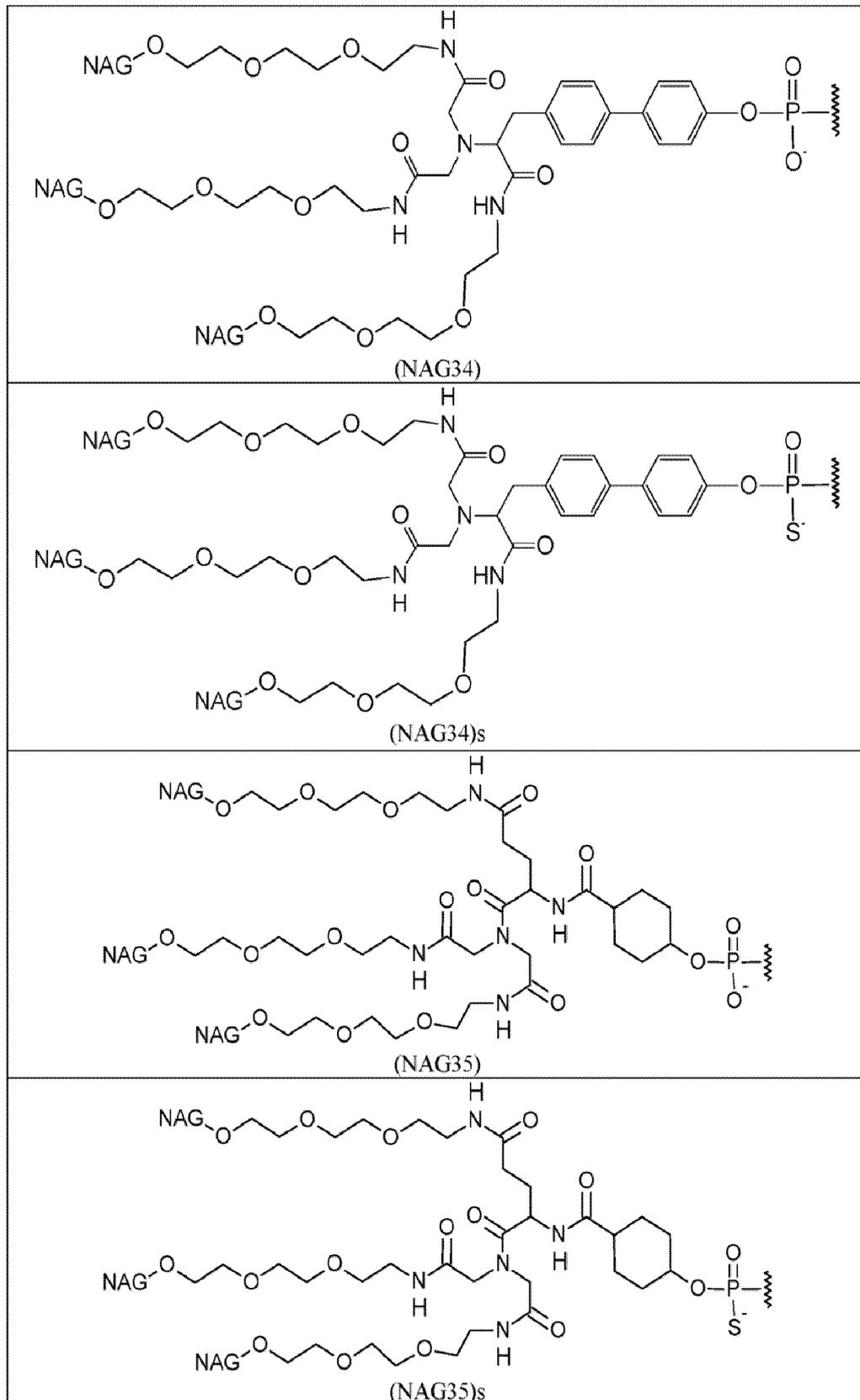
ФИГ.12 (продолжение)



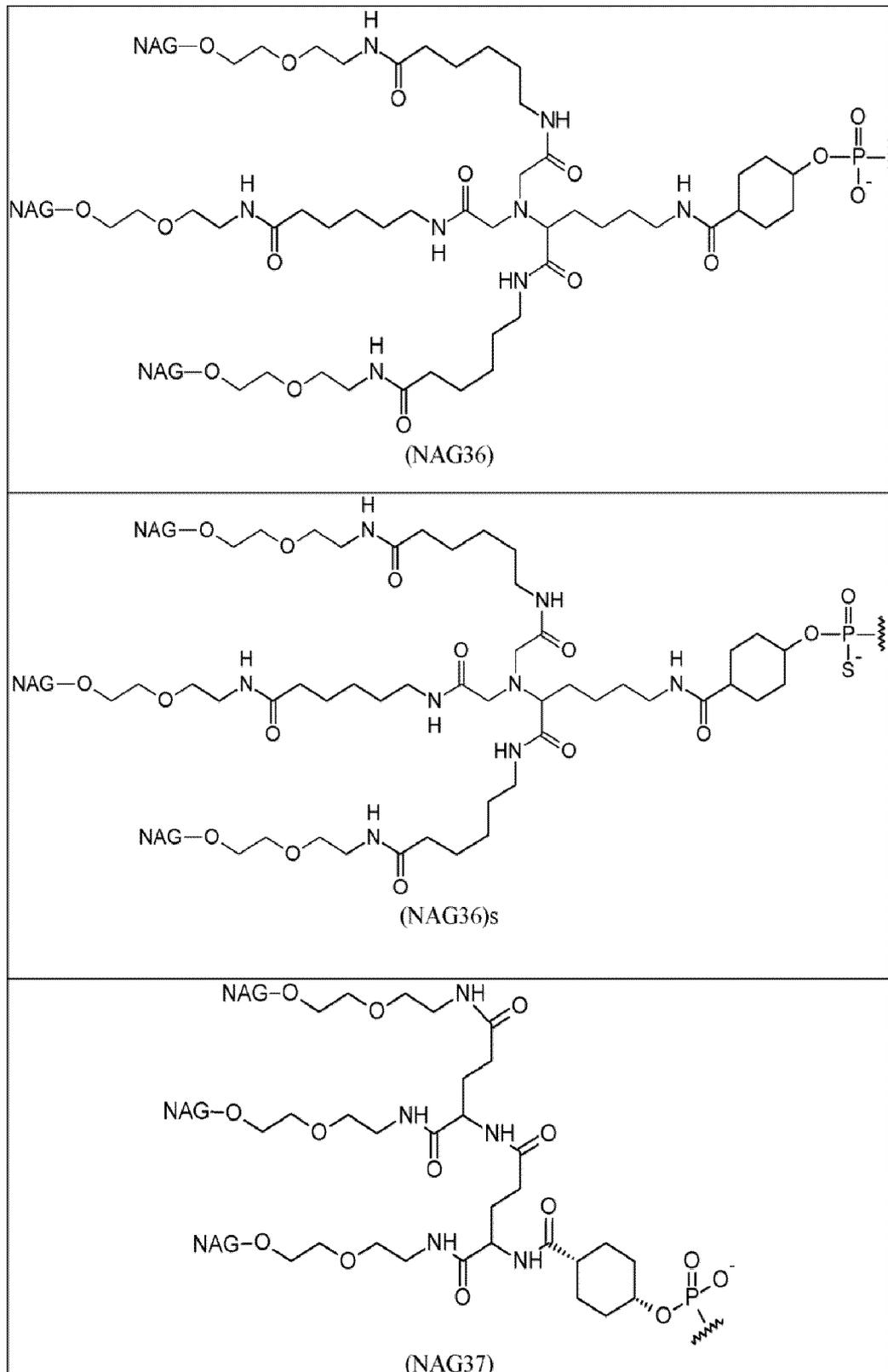
ФИГ.12 (продолжение)



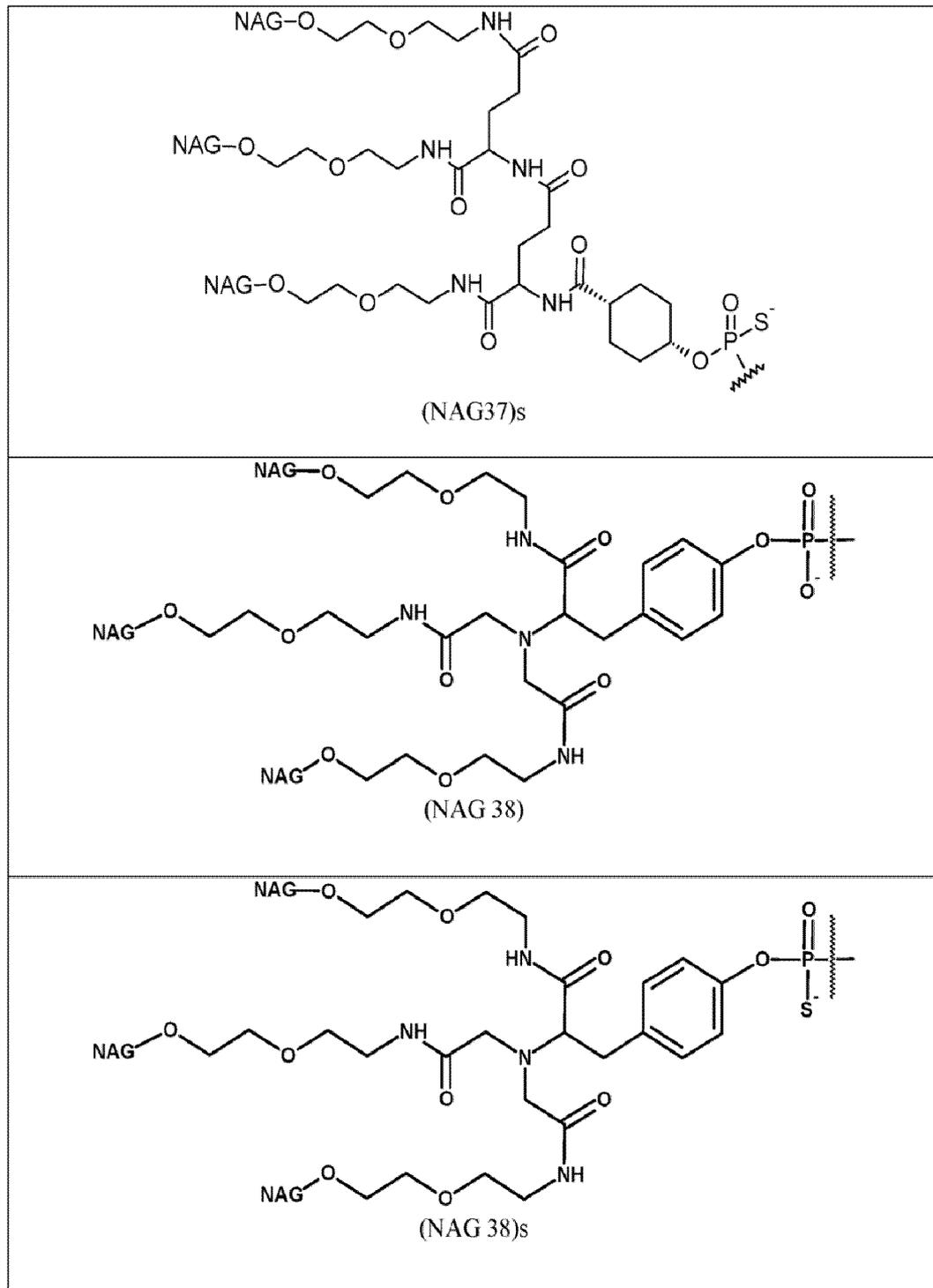
ФИГ.12 (продолжение)



ФИГ.12 (продолжение)



ФИГ.12 (продолжение)



ФИГ.12 (продолжение)

