



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **127745** (13) **C2**
(51) МПК
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2021 00688</p> <p>(22) Дата подання заявки: 12.08.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 21.12.2023</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/718,314</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 13.08.2018</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 14.04.2021, Бюл.№ 15</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 20.12.2023, Бюл.№ 51</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2019/046142, 12.08.2019</p>	<p>(72) Винахідник(и): Джадхав Васант Р. (US), Майер Мартін А. (US), Мільштейн Стюарт (US), Шлегель Марк К. (US)</p> <p>(73) Володілець (володільці): АЛЬНІЛАМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК., 300 Third Street, 3rd Floor, Cambridge, Massachusetts 02142, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Михайлюк Ганна Валентинівна, реєстр. №184</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2016/077321 A1, 19.05.2016 WO 2017/027350 A2, 16.02.2017 WO 2018/027106 A2, 08.02.2018 MARK K. SCHLEGEL ET AL, "Chirality Dependent Potency Enhancement and Structural Impact of Glycol Nucleic Acid Modification on siRNA", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 19.06.2017. - Vol. 139. - No. 25, doi:10.1021/jacs.7b02694. - P. 8537-8546</p>
--	--

(54) КОМПОЗИЦІЇ, ЩО МІСТЯТЬ ЗАСІБ НА ОСНОВІ dsRNA ВІРУСУ ГЕПАТИТУ В (HBV), ТА СПОСОБИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується засобів на основі дwonиткової РНК, що націлюються на геном вірусу гепатиту В (HBV), і способів використання таких засобів для інгібування експресії одного або більше генів HBV, і способів лікування суб'єктів, що мають інфекцію, спричинену HBV, або асоційоване з HBV порушення, наприклад інфекцію, що являє собою хронічний гепатит В.

UA 127745 C2

Перелік послідовностей, асоційованих з даною заявкою, наданий у форматі текстового документа замість паперової копії і включений у даний документ в опис за допомогою посилання. Назва текстового файлу, що містить перелік послідовностей являє собою 930385_410WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Розмір текстового файлу становить 83,1 Кб, дата створення 4 серпня 2019 року, і він подається в електронному вигляді через EFS-Web.

ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

По всьому світу понад 400 мільйонів людей хронічно заражені HBV і, таким чином, мають підвищений ризик розвитку серйозних захворювань печінки, таких як хронічний гепатит, цироз, печінкова недостатність і гепатоцелюлярна карцинома (HCC), що призводить до 60000 смертей щороку.

Природний розвиток хронічної інфекції, спричиненої HBV, передбачає чотири послідовні фази: (1) рання фаза «імунотолерантності», високі рівні реплікації вірусу і мінімальне запалення печінки; (2) імунореактивна фаза, значне запалення печінки і підвищений вміст амінотрансфераз у сироватці крові; у деяких пацієнтів прогресує до (3) «нереплікативної» фази, сероконверсія до антитіл до HBe, невизначуваний або низький рівень віремії (нижче 2000 МО/мл за аналізами на основі ПЛР) та усунення запалення печінки; і (4) HBeAg-негативний хронічний гепатит В, спричинений появою специфічних вірусних мутацій, які перешкоджають виробленню HBeAg, але не перешкоджають реплікації вірусу. Ця форма хронічного гепатиту В (CHB) характеризується коливанням рівня ДНК HBV у сироватці крові та амінотрансфераз (ALT та AST) у сироватці крові та прогресуючим захворюванням печінки. Важливо зазначити, що CHB може бути як HBeAg-позитивним, так і HBeAg-негативним CHB. Довготривалі дослідження пацієнтів з CHB свідчать, що сукупна 5-річна частота розвитку цирозу становить від 8 до 20 %. 5-річна сукупна частота декомпенсації печінки становить приблизно 20 %. Світовий рівень захворюваності на HCC зріс, і в даний час вона є п'ятим за поширеністю видом раку. Щорічна захворюваність на пов'язаний з HBV HCC є високою, коливається в межах 2-5 % при встановленні цирозу.

Основною метою лікування інфекції, спричиненої HBV, є постійне пригнічення реплікації HBV і полегшування захворювання печінки. Клінічно важливими короткотривалими цілями є досягнення сероконверсії HBeAg, нормалізації рівня ALT та AST у сироватці крові, усунення запалення печінки та попередження декомпенсації печінки. Кінцевою метою лікування є досягнення довготривалої відповіді для запобігання розвитку цирозу та раку печінки для продовження виживання. Інфекцію, спричинену HBV, неможливо повністю усунути через збереження певної форми вірусної ковалентно замкнутої циркулярної ДНК (cccHBV-ДНК) в ядрах інфікованих гепатоцитів. Однак індуковане лікуванням виведення HBsAg в сироватці крові є маркером завершення хронічної інфекції, спричиненої HBV, і асоціюється з найкращими довготривалими результатами.

Сучасні стандартні способи лікування інфекції, спричиненої HBV, включають види імунотерапії на основі інтерферону або тимозину- α 1 та пригнічення продукування вірусів шляхом інгібування полімерази HBV. Інгібітори полімерази HBV ефективні у зниженні продукування вірусів, але практично не впливають на швидке зниження рівня HBsAg або можуть повільно знижувати рівень HBsAg за довготривалого лікування в обмеженої кількості пацієнтів (як це відбувається у випадку використання тенофовіру дінопроксили фумарату). За допомогою імунотерапії на основі інтерферону можна досягнути зниження як продукування вірусу, так і раннього виведення HBsAg з крові, але лише у невеликого відсотка суб'єктів, що проходять лікування. Загальноновизнана роль HBsAg у крові полягає у відокремленні антитіл до HBsAg та наданні можливості інфекційним вірусним частинкам уникнути виявлення імунною системою, що, імовірно, є однією з причин, чому інфекція, спричинена HBV, залишається хронічним станом. Окрім того, усі з HBsAg, HBeAg та HBcAg мають імуноінгібувальні властивості, і персистенція цих вірусних білків у крові пацієнтів після введення будь-якого з доступних на сьогодні засобів лікування інфекції, спричиненої HBV, імовірно, має значний вплив на запобігання досягнення імунологічного контролю щодо інфекції, спричиненої HBV, в організмі пацієнтів.

Хоча всі три головних білка HBV (HBsAg, HBeAg та HBcAg) мають імуноінгібувальні властивості, HBsAg становить переважну більшість білка HBV у кровотоці суб'єктів, інфікованих HBV. Крім того, хоча видалення (шляхом сероконверсії) HBeAg або зменшення сироваткової віремії не корелює з розвитком стійкого контролю щодо інфекції, спричиненої HBV, без лікування, видалення сироваткового HBsAg з крові (і сероконверсія) за інфекції, спричиненої HBV, є загальноновизнаним прогностичним показником протівірусної відповіді на лікування, що приведе до контролю щодо інфекції, спричиненої HBV, без лікування (хоча це відбувається лише у невеликої частини пацієнтів, які отримують імунотерапію). Таким чином, хоча зниження

всіх трьох основних білків HBV (HBsAg, HBeAg та HBcAg) може привести до найкращого усунення інгібувального ефекту, видалення тільки HBsAg, імовірно, само по собі є достатнім для усунення основного ступеня вірусного інгібування імунної функції у суб'єктів з інфекцією, спричиненою HBV.

Отже, за відсутності будь-якої поточної схеми лікування, яка може відновити імунологічний контроль щодо інфекції, спричиненої HBV, у значної частини пацієнтів, існує потреба в ефективному лікуванні проти інфекції, спричиненої HBV, яке може інгібувати реплікацію вірусів, а також відновити імунологічний контроль у більшості пацієнтів. Відповідно, в даній галузі техніки існує потреба в альтернативних засобах терапії та засобах комбінованої терапії для суб'єктів, інфікованих HBV або які мають асоційоване з HBV захворювання.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У деяких варіантах здійснення даний винахід передбачає композиції, що містять засіб на основі дwonиткової рибонуклеїнової кислоти (dsRNA), які впливають на розщеплення РНК-транскриптів гену вірусу гепатиту В (HBV), опосередковане РНК-індукованим комплексом сайленсингу (RISC). Ген HBV може перебувати всередині клітини, наприклад клітини всередині суб'єкта, такого як людина.

Даний винахід також передбачає способи і засоби терапії для лікування суб'єкта, що має порушення, при якому інгібування експресії гена HBV принесе користь, наприклад інфекцію, спричинену HBV, або асоційоване з HBV захворювання, таке як інфекція, що являю собою хронічний гепатит В (CHB), з використанням композицій, що містять засіб на основі dsRNA, які впливають на розщеплення РНК-транскриптів гену HBV, опосередковане РНК-індукованим комплексом сайленсингу (RISC), для інгібування експресії гена HBV.

В одному аспекті даний винахід передбачає засоби на основі dsRNA для інгібування експресії HBV. Наприклад, даний винахід передбачає засіб на основі dsRNA, що містить сенсову нитку та антисенсову нитку, які утворюють дwonиткову ділянку, при цьому антисенсова нитка включає модифіковану нуклеотидну послідовність, наведену під:

5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16),
 5'-usGfsuga(Agn)gCgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18),
 5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20),
 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:23),
 5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24),
 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO:25) або
 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28),
 де а, с, g та u являють собою 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат та 2'-О-метилуридин-3'-фосфат відповідно;
 Af, Cf, Gf та Uf являють собою 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат та 2'-фторуридин-3'-фосфат відповідно;
 dA, dC, dG та dT являють собою 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфат, 2'-дезокситидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат та 2'-дезокситимідин-3'-фосфат відповідно;
 (Agn) являє собою аденозин-гліколь-нуклеїнову кислоту (GNA); і
 s являє собою фосфотіоатний зв'язок.

У деяких варіантах здійснення сенсова нитка включає модифіковану нуклеотидну послідовність 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29),
 де а, с, g та u являють собою 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат та 2'-О-метилуридин-3'-фосфат відповідно;
 Af, Cf, Gf та Uf являють собою 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат та 2'-фторуридин-3'-фосфат відповідно; і
 s являє собою фосфотіоатний зв'язок.

У деяких варіантах здійснення антисенсова нитка та сенсова нитка включають модифіковані нуклеотидні послідовності, наведені під:

(a) 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16) та 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);
 (b) 5'-usGfsuga(Agn)gCgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18) та 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);
 (c) 5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20) та 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);
 (d) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:23) та 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);
 (e) 5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24) та 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

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

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

де a, c, g та u являють собою 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат та 2'-О-метилуридин-3'-фосфат відповідно;

Af, Cf, Gf та Uf являють собою 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат та 2'-фторуридин-3'-фосфат відповідно;

dA, dC, dG та dT являють собою 2'-дезок시아денозин-3'-фосфат, 2'-дезоксцитидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат та 2'-дезокситимідин-3'-фосфат відповідно;

(Agn) являє собою аденозин-гліколь-нуклеїнову кислоту (GNA); і

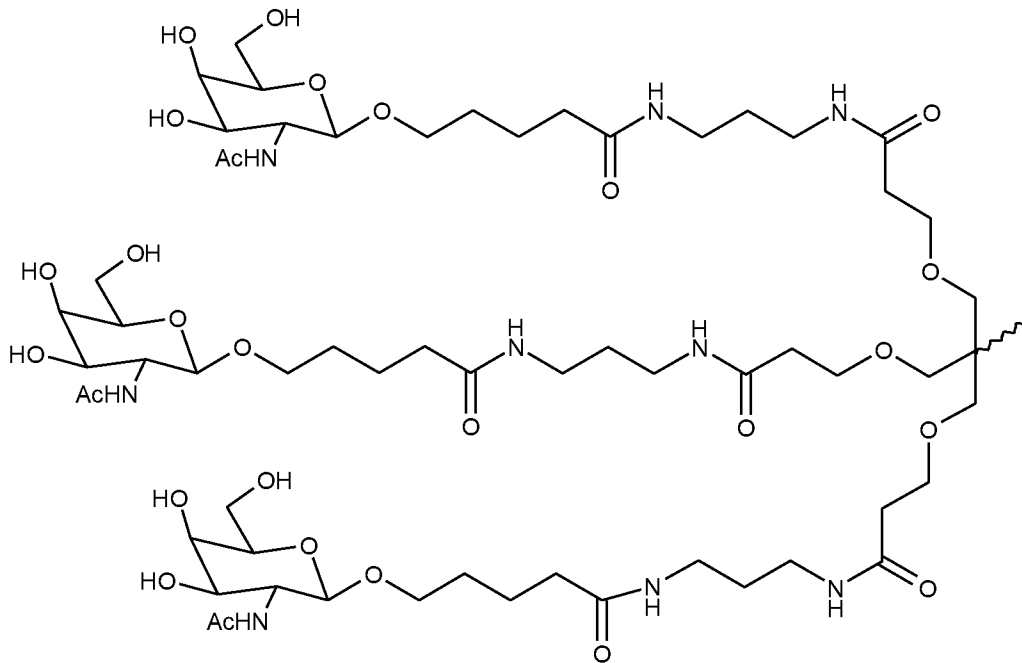
s являє собою фосфотіоатний зв'язок.

У деяких варіантах здійснення щонайменше одна нитка засобу на основі dsRNA включає 3'-липкий кінець зі щонайменше 1 нуклеотиду. У деяких варіантах здійснення щонайменше одна нитка засобу на основі dsRNA включає 3'-липкий кінець з 2 нуклеотидів.

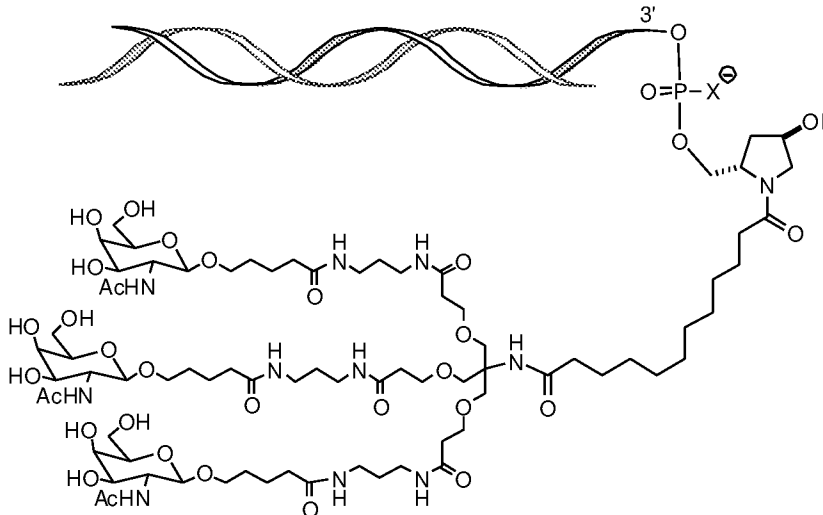
У деяких варіантах здійснення довжина двониткової ділянки засобу на основі dsRNA становить 19-21 пару нуклеотидів.

У деяких варіантах здійснення кожна нитка засобу на основі dsRNA незалежно містить 19-23 нуклеотиди. У деяких варіантах здійснення кожна нитка засобу на основі dsRNA незалежно містить 19-21 нуклеотид.

У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA додатково містить ліганд. У деяких варіантах здійснення ліганд кон'югований з 3'-кінцем сенсової нитки засобу на основі dsRNA. У деяких варіантах здійснення ліганд являє собою похідну N-ацетилгалактозаміну (GalNAc). У певних варіантах здійснення ліганд являє собою



У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA кон'югований з лігандом, як показано на наступній схемі:



де X являє собою O або S. У деяких варіантах здійснення X являє собою O.

У деяких варіантах здійснення антисенсова нитка складається з модифікованої нуклеотидної послідовності, наведеної під:

- 5
10
- 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16),
 - 5'-usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18),
 - 5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20),
 - 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:23),
 - 5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24),
 - 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO:25) або
 - 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28),

де a, c, g та u являють собою 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат та 2'-О-метилуридин-3'-фосфат відповідно;

15 Af, Cf, Gf та Uf являють собою 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат та 2'-фторуридин-3'-фосфат відповідно;

dA, dC, dG та dT являють собою 2'-дезоксаденозин-3'-фосфат, 2'-дезоксцитидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат та 2'-дезокситимідин-3'-фосфат відповідно;

(Agn) являє собою аденозин-гліколь-нуклеїнову кислоту (GNA); i

20 s являє собою фосфотіоатний зв'язок.

У деяких варіантах здійснення даний винахід передбачає засіб на основі dsRNA, при цьому сенсова нитка та антисенсова нитка складаються з модифікованих нуклеотидних послідовностей, наведених під:

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

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

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

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

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

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

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

де a, c, g та u являють собою 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат та 2'-О-метилуридин-3'-фосфат відповідно;

40 Af, Cf, Gf та Uf являють собою 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат та 2'-фторуридин-3'-фосфат відповідно;

dA, dC, dG та dT являють собою 2'-дезоксаденозин-3'-фосфат, 2'-дезоксцитидин-3'-фосфат, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат та 2'-дезокситимідин-3'-фосфат відповідно;

(Agn) являє собою аденозин-гліколь-нуклеїнову кислоту (GNA);

s являє собою фосфотіоатний зв'язок; і

3'-кінець сенсової нитки кон'югований з лігандом, що являє собою N-[трис(GalNAc-алкіл)-амідодеканоїл]-4-гідроксипролінол (L96).

В іншому аспекті даний винахід також передбачає клітину, що містить засіб на основі dsRNA, розкритий у даному документі.

Даний винахід також передбачає фармацевтичну композицію, що містить засіб на основі dsRNA, описаний у даному документі, і фармацевтичний наповнювач.

Даний винахід також передбачає спосіб інгібування експресії гена вірусу гепатиту В (HBV) в клітині, при цьому спосіб передбачає приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA або фармацевтичною композицією, розкритими в даному документі, з інгібуванням таким чином експресії гена HBV в клітині. У деяких варіантах здійснення клітина перебуває в організмі суб'єкта. У деяких варіантах здійснення суб'єктом є людина. У деяких варіантах здійснення суб'єкт страждає від асоційованого з HBV захворювання. У деяких варіантах здійснення клітина перебуває *in vitro*. У деяких варіантах здійснення експресія гена HBV інгібується на щонайменше 80 %, 90 %, 95 % або 98 % або до рівня, нижчого ніж той, який можна виявити конкретним способом аналізу.

Даний винахід також передбачає спосіб інгібування реплікації вірусу гепатиту В (HBV) в клітині, при цьому спосіб передбачає приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA або фармацевтичною композицією, розкритими в даному документі, з інгібуванням таким чином реплікації HBV в клітині. У деяких варіантах здійснення клітина перебуває в організмі суб'єкта. У деяких варіантах здійснення суб'єктом є людина. У певних варіантах здійснення суб'єкт страждає від асоційованого з HBV захворювання. У деяких варіантах здійснення клітина перебуває *in vitro*. У певних варіантах здійснення реплікація HBV в клітині інгібується на щонайменше 80 %, 90 %, 95 % або 98 % або до рівня, нижчого ніж той, який можна виявити конкретним способом аналізу.

У даному документі також передбачається спосіб зниження рівня антигена вірусу гепатиту В (HBV) у суб'єкта, інфікованого HBV, що включає введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості засобу на основі dsRNA або фармацевтичної композиції, розкритих у даному документі, зі зниженням таким чином рівня антигена HBV в організмі суб'єкта. У деяких варіантах здійснення антиген HBV являє собою HBsAg. У деяких варіантах здійснення антиген HBV являє собою HBeAg. У деяких варіантах здійснення антиген HBV вимірюють в сироватці крові, одержаній від суб'єкта. У деяких варіантах здійснення суб'єкт є HBeAg-позитивним. У деяких варіантах здійснення суб'єкт є HBeAg-негативним. У деяких варіантах здійснення рівень антигена HBV в сироватці крові знижується на щонайменше 1 log₁₀, щонайменше 2 log₁₀, щонайменше 3 log₁₀ або щонайменше 4 log₁₀ або до рівня, нижчого ніж той, який можна виявити конкретним способом аналізу.

Даний винахід також передбачає спосіб зниження вірусного навантаження вірусу гепатиту В (HBV) у суб'єкта, інфікованого HBV, що включає введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості засобу на основі dsRNA або фармацевтичної композиції, розкритих у даному документі, зі зниженням таким чином вірусного навантаження HBV щодо організму суб'єкта. У деяких варіантах здійснення вірусне навантаження HBV вимірюють в сироватці крові, одержаній від суб'єкта. У деяких варіантах здійснення суб'єкт є HBeAg-позитивним. У деяких варіантах здійснення суб'єкт є HBeAg-негативним. У деяких варіантах здійснення вірусне навантаження HBV в сироватці крові знижується на щонайменше 1 log₁₀, щонайменше 2 log₁₀, щонайменше 3 log₁₀ або щонайменше 4 log₁₀ або до рівня, нижчого ніж той, який можна виявити конкретним способом аналізу.

У даному документі також передбачається спосіб лікування суб'єкта, який має інфекцію, спричинену вірусом гепатиту В (HBV), або асоційоване з HBV порушення, що включає введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості засобу на основі dsRNA або фармацевтичної композиції, розкритих у даному документі, завдяки чому здійснюється лікування суб'єкта. У деяких варіантах здійснення суб'єкт є HBeAg-позитивним. У деяких варіантах здійснення суб'єкт є HBeAg-негативним. У деяких варіантах здійснення асоційоване з HBV порушення являє собою хронічний гепатит, і суб'єкт є HBeAg-позитивним. У деяких варіантах здійснення асоційоване з HBV порушення являє собою хронічний гепатит, і суб'єкт є HBeAg-негативним.

У деяких варіантах здійснення вищенаведених способів засіб на основі dsRNA вводять суб'єкту в дозі, що становить від 0,01 мг/кг до 10 мг/кг, від 0,5 мг/кг до 50 мг/кг або від 3 мг/кг до 10 мг/кг. У деяких варіантах здійснення способів засіб на основі dsRNA вводять суб'єкту в дозі, що становить від 3 мг/кг до 10 мг/кг. У деяких варіантах здійснення способів засіб на основі dsRNA вводять суб'єкту у фіксованій дозі, що становить від 50 мг до 200 мг.

60

У деяких варіантах здійснення вищенаведених способів засіб на основі dsRNA вводять суб'єкту підшкірно.

У деяких варіантах здійснення вищенаведених способів засіб на основі dsRNA вводять суб'єкту в кількості двох або більше доз.

5 У деяких варіантах здійснення вищенаведених способів засіб на основі dsRNA вводять суб'єкту один раз на місяць, один раз на два місяці або один раз на три місяці. У деяких варіантах здійснення способів засіб на основі dsRNA вводять суб'єкту не частіше, ніж один раз на місяць.

10 У деяких варіантах здійснення вищенаведених способів спосіб додатково передбачає введення суб'єкту додаткового терапевтичного засобу, наприклад одного або більше додаткових терапевтичних засобів. Додатковий терапевтичний засіб може включати без обмеження протівірусний засіб, інгібітор зворотної транскриптази, імуностимулятор, терапевтичну вакцину, інгібітор вірусного проникнення, олігонуклеотид, що інгібує секрецію або вивільнення HbsAg, інгібітор збирання капсиду та інгібітор утворення ковалентно замкненої

15 кільцевої (ccc) ДНК HBV та комбінацію будь-яких з вищенаведених. У деяких варіантах здійснення додатковий терапевтичний засіб являє собою інгібітор зворотної транскриптази.
У деяких варіантах здійснення вводять більше ніж один додатковий терапевтичний засіб, і при цьому додатковими терапевтичними засобами є інгібітор зворотної транскриптази та імуностимулятор. Інгібітор зворотної транскриптази може включати без обмеження тенофовіру

20 дизопроксилу фумарат (TDF), тенофовіру алафенамід, ламівудин, адефовіру дипівоксил, ентекавір (ETV), телбівудин та AGX-1009. Імуностимулятор може включати без обмеження пегільований інтерферон альфа-2а (PEG-IFN- α 2а), інтерферон альфа-2b, рекомбінантний людський інтерлейкін-7 та агоніст Toll-подібного рецептора 7 (TLR7).

25 Також у даному документі передбачаються композиції для практичного здійснення будь-якого зі способів, розкритих у даному документі. У деяких варіантах здійснення винахід передбачає засіб на основі dsRNA або фармацевтичну композицію, розкриті в даному документі, для використання в лікуванні інфекції, спричиненої вірусом гепатиту В (HBV), у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення даний винахід передбачає засіб на основі dsRNA або фармацевтичну композицію, розкриті в даному документі, для використання в лікуванні асоційованого з вірусом гепатиту В (HBV) порушення у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення асоційоване з HBV порушення являє собою хронічний гепатит, і суб'єкт є HBeAg-позитивним. У деяких варіантах здійснення асоційоване з HBV порушення являє собою хронічний гепатит, і суб'єкт є HBeAg-негативним. У деяких варіантах здійснення суб'єкту вводять або вводили

30 додатковий терапевтичний засіб, наприклад протівірусний засіб, інгібітор зворотної транскриптази, імуностимулятор, терапевтичну вакцину, інгібітор вірусного проникнення, олігонуклеотид, що інгібує секрецію або вивільнення HbsAg, інгібітор збирання капсиду або інгібітор утворення ковалентно замкненої кільцевої (ccc) ДНК HBV або комбінацію будь-яких з вищенаведених. У деяких варіантах здійснення додатковий терапевтичний засіб являє собою

35 інгібітор зворотної транскриптази, наприклад тенофовіру дизопроксилу фумарат (TDF), тенофовіру алафенамід, ламівудин, адефовіру дипівоксил, ентекавір (ETV), телбівудин або AGX-1009. У деяких варіантах здійснення додаткові терапевтичні засоби, що підлягають введенню, являють собою інгібітор зворотної транскриптази (наприклад, тенофовіру дизопроксилу фумарат (TDF), тенофовіру алафенамід, ламівудин, адефовіру дипівоксил, ентекавір (ETV), телбівудин або AGX-1009) та імуностимулятор (наприклад, пегільований

40 інтерферон альфа-2а (PEG-IFN- α 2а), інтерферон альфа-2b, рекомбінантний людський інтерлейкін-7 або агоніст Toll-подібного рецептора 7 (TLR7)).

Даний винахід передбачає використання засобу на основі dsRNA або фармацевтичної композиції, розкритих у даному документі, для практичного здійснення будь-якого з вищенаведених способів.

50 Даний винахід також передбачає використання засобу на основі dsRNA, розкритого у даному документі, для одержання або виготовлення лікарського препарату для практичного здійснення будь-якого з вищенаведених способів.

Даний винахід також передбачає набори, що включають засіб на основі dsRNA або фармацевтичну композицію, розкриті в даному документі, необов'язково з інструкціями для

55 практичного здійснення способу, описаного в даному документі.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

60 На фігурі 1 схематично зображена структура дwonиткового геному HBV розміром близько 3,2 т. п. о. Реплікація геному HBV відбувається через РНК-посередник і під час неї утворюються 4 вірусні транскрипти, що перекриваються (транскрипт довжиною приблизно 3,5 т. н., транскрипт довжиною приблизно 2,4 т. н., транскрипт довжиною приблизно 2,1 т. н. та транскрипт

довжиною приблизно 0,7 т. н.), які кодують сім вірусних білків (пре-S1, пре-S2, S, P, X, пре-C та C), що трансклюються у трьох рамках зчитування.

На фігурах 2A-2B продемонстровано концентрації HBsAg (A) в сироватці крові (нг/мл) та (B) рівні HBsAg в сироватці крові щодо попередньої дози на мишачій моделі AAV-HBV. На фігурі 2A продемонстровано рівні HBsAg у сироватці крові мишей HBV-AAV, яким попередньо вводили дозу (дні -24, -2, 0), або з наступною одноразовою дозою AD-81890, що становила 0,3, 1 або 3 мг/кг (дні 14, 21, 33, 47, 59, 74). Кожна точка демонструє середнє значення, одержане для $n=6-9$ тварин, та планки демонструють SD. На фігурі 2B продемонстровано рівні HBsAg у сироватці крові мишей HBV-AAV щодо попередньої дози (дні -24, -2, 0) або наступної одноразової дози AD-81890, що становила 0,3, 1 або 3 мг/кг (дні 14, 21, 33, 47, 59, 74). Кожна точка демонструє середнє значення, одержане для n , що становило 6-9 тварин, та планки демонструють SD.

На фігурі 3 продемонстровано рівні HBsAg у сироватці крові щодо попередньої дози на мишачій моделі AAV-HBV в дні: -55, -27, -13, 0, 14, 28, 42, 56, 84, 112 та 140. Режими введення доз включали контроль (PBS) Q2W x 6; AD-66810 (1 мг/кг; Q2W x 6); AD-81890 (1 мг/кг; Q2W x 6); AD-81890 (1 мг/кг; QM x 3); AD-81890 (3 мг/кг; Q2W x 6); AD-81890 (3 мг/кг; QM x 3); та AD-81890 (9 мг/кг; QM x 1). Першу дозу вводили в день 0. Кожна точка демонструє середнє значення, одержане для n , що становило 4-6 тварин, та планки демонструють SD.

На фігурі 4 продемонстровано коробкові діаграми, на яких показана \log_2 -кратна зміна (оброблені/контроль) для всіх генів, що істотно пригнічувались (кореговане p -значення $< 0,05$, \log_2 -кратна зміна < 0) з AD-66810 або AD-81890. Товсті горизонтальні лінії демонструють медіанне значення \log_2 -кратної зміни, вертикальний діапазон кожного блока демонструє міжквартильний діапазон (IQR) та вуса доходять до $\pm 1,58 \text{ IQR}/\sqrt{N}$, де N являє собою кількість генів в кожній групі. Статистичну значимість оцінювали, використовуючи двосторонній двозразковий t -критерій Велча.

На фігурах 5A-5B продемонстровано рівні ALT в PХВ-мишах протягом часу після введення AD-66810 (фігура 5A) або AD-81890 (фігура 5B) щодо мишей, яким вводили PBS. Мишам вводили дози в дні: 0, 21, 28, 35 та 42 з використанням 12, 36 або 100 мг/кг AD-66810, AD-81890 або PBS (контроль) за допомогою підшкірної ін'єкції ($n=4$ на групу). Кров збирали за допомогою способу забору крові через ретроорбітальний синус двічі на тиждень і сироватку крові готували із використанням стандартних способів.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід передбачає композиції, що містять засіб на основі dsRNA, які впливають на розщеплення РНК-транскриптів гену вірусу гепатиту В (HBV), опосередковане РНК-індукованим комплексом сайленсингу (RISC). Ген може перебувати всередині клітини, наприклад клітини всередині суб'єкта, такого як людина. Використання цих засобів на основі dsRNA сприяє національному руйнуванню mRNA відповідного гена (гена HBV) у ссавців.

Засоби на основі dsRNA, описані в даному документі, розробили для націлювання на ділянки в геномі HBV, які є конзервативними серед щонайменше восьми відомих генотипів HBV. Крім того, засоби на основі dsRNA за даним винаходом розробили для інгібування всіх стадій життєвого циклу HBV, наприклад реплікації, збирання, секреції вірусу та секреції субвірусних антигенів, шляхом інгібування експресії більше, ніж одного гена HBV. Зокрема, оскільки в результаті транскрипції геному HBV утворюються поліцистронні РНК, що перекриваються, у деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA, спрямований на один ген HBV, приводить до значного інгібування експресії більшості або всіх транскриптів HBV. Наприклад, через те, що геном HBV транскрибується в одну mRNA, засіб на основі dsRNA за даним винаходом, спрямований на ген S, приведе до інгібування експресії не тільки гена S, а також експресії генів нижче на шляху полімерази. Також засоби на основі dsRNA за даним винаходом розробили для інгібування вірусної реплікації HBV за допомогою націлювання на структурні гени HBV та ген X HBV, дозволяючи таким чином імунній системі суб'єкта виявляти й надавати відповідь на наявність HBsAg з виробленням антитіл до HBV для усунення інфекції, спричиненої HBV. Не обмежуючись будь-якою теорією, вважають, що комбінація або підкомбінація вищезгаданих властивостей та специфічних цільових сайтів або специфічних модифікацій в цих засобах на основі dsRNA надають засобам на основі dsRNA за даним винаходом поліпшену ефективність, стабільність, безпечність, потужність та тривалість дії.

Використовуючи аналізи *in vitro* та *in vivo*, винахідники даного винаходу продемонстрували, що засоби на основі dsRNA, що спрямовані на ген HBV, можуть дієво опосередковувати RNAi, що приводить до значного інгібування експресії більше, ніж одного гена HBV. Таким чином, способи та композиції, що включають такі засоби на основі dsRNA, є застосовними для лікування суб'єкта, що має інфекцію, спричинену HBV, або асоційоване з HBV захворювання, таке як хронічний гепатит В (СНВ).

Відповідно, даний винахід також передбачає способи для лікування суб'єкта, що має порушення, за якого інгібування або зниження експресії гена HBV принесе користь, наприклад асоційоване з HBV захворювання, таке як хронічну інфекцію, спричинену вірусом гепатиту В (CHB), з використанням композицій, що містять засіб на основі dsRNA, які впливають на розщеплення РНК-транскриптів гену HBV, опосередковане РНК-індукованим комплексом сайленсингу (RISC).

Засоби на основі dsRNA за даним винаходом включають нитку РНК (антисенсову нитку), що містить ділянку комплементарності, довжиною приблизно 19-21 нуклеотидів, наприклад довжиною приблизно 19 нуклеотидів, яка по суті є комплементарною щонайменше частині транскрипту mRNA гена HBV зі щонайменше одного генотипу HBV. Зрозуміло, що існує декілька генотипів HBV, саме тому засіб на основі dsRNA за даним винаходом можна змінювати за його ступенем комплементарності до різних генотипів HBV.

У деяких варіантах здійснення сенсова й антисенсова нитки утворюють дуплекс із 19-21 суміжного нуклеотиду.

У подальшому детальному описі розкриваються принципи одержання та використання композицій, що містять засоби на основі dsRNA, для інгібування експресії гена HBV, а також композиції, шляхи використання та способи лікування суб'єктів, які мають захворювання та порушення, за яких інгібування або зниження експресії гена HBV принесе користь.

I. Визначення

Для того, щоб даний винахід можна було легше зрозуміти, спочатку наведені визначення певних термінів. Крім того, слід зазначити, що у всіх випадках, коли згадуються значення або діапазон значень параметра, мається на увазі, що значення та діапазони, проміжні щодо згаданих значень, також передбачаються як частина цього опису.

Якщо контекст не вимагає іншого, у всьому даному описі та формулі винаходу слово «передбачають» та його варіації, такі як «передбачає» і «що передбачає», мають тлумачитися у відкритому, всеохоплювальному значенні, тобто як «включає без обмеження». «Складається з» означає виключення більше ніж слідової кількості елементів інших інгредієнтів або суттєвих стадій способів, розкритих у даному документі. Наприклад, полінуклеотид складається з послідовності нуклеотидів, якщо він не включає будь-які додаткові нуклеотиди, але не виключає включення ліганду, наприклад націлювального ліганду, або модифікацій. Термін «складається по суті з» обмежує обсяг пункту формули описаними матеріалами або стадіями або тим, що не матеріально впливає на базові характеристики винаходу, що заявляється. Наприклад, фармацевтична композиція, яка складається по суті з елементів, визначених в даному документі, не виключає слідові кількості забруднювачів, що залишилися від способу виділення та очищення, і фармацевтично прийнятні носії, такі як фосфат-буферний сольовий розчин, консерванти тощо. Подібним чином, полінуклеотид складається по суті з послідовності нуклеотидів, якщо полінуклеотид включає додаткові нуклеотиди, які становлять не більше, ніж 20 % довжини полінуклеотиду і суттєво не впливають на активність полінуклеотиду (наприклад, змінюють активність полінуклеотиду на не більше, ніж 50 %). Варіанти здійснення, описані кожним з перехідних термінів знаходяться в межах об'єму даного винаходу.

Форма однини використовується в даному документі для позначення одного або більше, ніж одного (тобто щонайменше одного) граматичного об'єкта продукту. Як приклад, «елемент» означає один елемент або більше, ніж один елемент, наприклад багато елементів.

Термін «що включає» використовується в даному документі для позначення фрази «що включає без обмеження» і використовується взаємозамінно з нею.

Термін «або» використовується в даному документі для позначення терміна «та/або», якщо контекст явно не вказує інше, і використовується взаємозамінно з ним. Наприклад, «сенсова нитка або антисенсова нитка» слід розуміти, як «сенсова нитка або антисенсова нитка або сенсова нитка й антисенсова нитка».

Термін «приблизно» використовується в даному документі для позначення перебування в межах типових у даній галузі техніки діапазонів припустимих значень. Наприклад, «приблизно» можна розуміти як перебування в межах 2 середньоквадратичних відхилень від середнього значення. Якщо «приблизно» розташоване перед послідовністю або діапазоном числових значень, слід розуміти, що «приблизно» може модифікувати кожне з числових значень в послідовності або діапазоні.

Термін «щонайменше» перед числовим значенням або послідовністю числових значень слід розуміти, як кожне число в послідовності та всі наступні числові значення або цілі числа, які логічно можуть бути включені, як зрозуміло з контексту. Наприклад, кількість нуклеотидів в молекулі нуклеїнової кислоти має бути цілим числом. Наприклад, «щонайменше 18 нуклеотидів молекули нуклеїнової кислоти з 21 нуклеотиду» означає, що 18, 19, 20 або 21 нуклеотид мають

зазначену властивість. Якщо «щонайменше» розташоване перед послідовністю або діапазоном числових значень, слід розуміти, що «щонайменше» може модифікувати кожне з числових значень в послідовності або діапазоні.

5 Використовувані в даному документі «не більше ніж» або «менше ніж» розуміють як значення, сусіднє з фразою, та логічно менші значення або цілі числа, як логічно витікає з контексту, аж до нуля. Наприклад, дуплекс з «липким» кінцем «не більше ніж із 2 нуклеотидів» має «липкий» кінець із 2, 1 або 0 нуклеотидів. Якщо «не більше ніж» розташоване перед послідовністю або діапазоном числових значень, слід розуміти, що «не більше ніж» може модифікувати кожне з числових значень в послідовності або діапазоні.

10 Використовувані в даному документі діапазони включають у себе як верхню, так і нижню межу.

У разі суперечності між послідовністю та її зазначеним сайтом у транскрипті чи іншій послідовності нуклеотидна послідовність, згадана в даному описі, має переважне значення.

15 Різні варіанти здійснення даного винаходу можуть застосовуватися в комбінації так, як визначено фахівцем у даній галузі.

Використовуваний у даному документі «вірус гепатиту В», що застосовується взаємозамінно з терміном «HBV», стосується добре відомого нецитопатичного тропного до печінки ДНК-вірусу, що належить до родини *Herpesviridae*.

20 Геном HBV являє собою частково двониткову кільцеву ДНК з рамками зчитування, що перекриваються (див., наприклад, фігуру 1).

За розміром існує чотири транскрипти (які в даному документі можуть називатися «генами» або «відкритими рамками зчитування»), які кодується геномом HBV. Вони містять відкриті рамки зчитування за назвою С, Х, Р та S. Коровий білок кодується геном С (HBcAg). Антиген е вірусу гепатиту В (HBeAg) продукується шляхом протеолітичного процесингу прекорового білка (пре-С). ДНК-полімераза кодується геном Р. Ген S являє собою ген, який кодує поверхневі антигени (HBsAg). Ген HBsAg являє собою одну довгу відкриту рамку зчитування, яка містить три внутрішньорамкові «стартові» (ATG) кодони, що зумовлюють утворення поліпептидів трьох різних розмірів, які називаються великим, середнім та малим антигенами S: пре-S1 + пре-S2 + S, пре-S2 + S або S. Поверхневі антигени, крім того, що вони декорують оболонку HBV, також є частиною субвірусних частинок, які продукуються з великим надлишком порівняно з віріонними частинками і відіграють роль в імунній толерантності та у відокремленні антитіл до HBsAg, завдяки чому забезпечується можливість уникнення виявлення інфекційних частинок імунною системою. Функція неструктурного білка, кодованого геном Х, є не повністю зрозумілою, але він відіграє роль у трансактивації транскрипції та реплікації і асоційований з розвитком раку печінки.

35 HBV є одним з небагатьох ДНК-вірусів, які використовують зворотну транскриптазу в процесі реплікації, яка передбачає декілька стадій, у тому числі проникнення до клітини, скидання оболонки та транспортування вірусного геному до ядра. Спочатку реплікація геному HBV передбачає утворення проміжної РНК, яка потім піддається зворотній транскрипції з продукуванням вірусного ДНК-геному.

40 Після інфікування клітини HBV вірусна геномна розслаблена кільцева ДНК (rcDNA) транспортується в ядро клітини і перетворюється на епісомну ковалентно замкнену кільцеву ДНК (cccDNA), яка служить матрицею транскрипції для вірусних mRNA. Після транскрипції та ядерного експорту цитоплазматична вірусна прегеномна РНК (pgRNA) збирається за допомогою полімерази HBV та капсидних білків з утворенням нуклеокапсиду, всередині якого в ході зворотної транскрипції, каталізованої полімеразою, утворюється мінус-ниткова ДНК, яка згодом копіюється у вигляді плюс-ниткової ДНК з утворенням rcDNA-геному потомства. Потім зрілі нуклеокапсиди або упаковуються з вірусними білками оболонки з виходом у вигляді віріонних частинок, або переносяться до ядра для ампліфікації резервуару cccDNA через шлях ампліфікації внутрішньоклітинної cccDNA. cccDNA являє собою важливу складову циклу реплікації HBV і відповідає за впровадження інфекції та персистенцію вірусу.

50 Інфекція, спричинена HBV, приводить до утворення двох різних типів частинок: 1) самого інфекційного вірусу HBV (або частинки Дейна), який включає в себе вірусний капсид, зібраний з HBcAg та вкритий оболонкою, що складається з ліпідної мембрани з поверхневими антигенами HBV, та 2) субвірусних частинок (або SVP), які містять малу та середню форми поверхневого антигена HBsAg вірусу гепатиту В, які не є інфекційними. На кожен продуковану вірусну частинку в кров вивільняється понад 10000 SVP. Таким чином, SVP (та білок HBsAg, який вони несуть) складають переважну більшість вірусного білка в крові. Клітини, інфіковані HBV, також секретують розчинний продукт протеолізу прекорового білка, який називається антигеном е HBV (HBeAg).

60 Визначено вісім генотипів HBV, позначених від А до Н, та запропоновано два додаткові

генотипи I та J, кожен з яких має чітко визначене географічне поширення. Цей вірус є нецитопатичним, при цьому вірусоспецифічний клітинний імунітет є головним визначним чинником результату впливу гострої інфекції, спричиненої HBV, з усуненням захворювань печінки протягом 6 місяців або хронічної інфекції, спричиненої HBV, яка часто асоційована з прогресуючим ураженням печінки.

Термін «HBV» включає в себе будь-який з генотипів HBV (від A до J). Повну кодувальну послідовність еталонної послідовності геному HBV можна знайти, наприклад, під номерами доступу в GenBank GI:21326584 (SEQ ID NO:1) та GI:3582357 (SEQ ID NO:3). Антисенсові послідовності представлені під SEQ ID NO:2 та SEQ ID NO:4 відповідно. Амінокислотні послідовності для білків С, Х, Р та S можна знайти, наприклад, в NCBI під номерами доступу YP_009173857.1 (білок С) (SEQ ID NO:37); YP_009173867.1 та BAA32912.1 (білок Х) (SEQ ID NO: 36 та 40); YP_009173866.1 та BAA32913.1 (білок Р) (SEQ ID NO:32 та 38) та YP_009173869.1, YP_009173870.1, YP_009173871.1 та BAA32914.1 (білок S) (SEQ ID NO: 33, 34, 35, 39). Послідовності білків та ДНК з генотипу D HBV штаму ауw представлені під SEQ ID NO: 36-37. Послідовності білків та ДНК з генотипу С HBV представлені під SEQ ID NO: 38-39. Додаткові приклади послідовностей білків та ДНК HBV або їх зворотні комплементарні послідовності представлені під SEQ ID NO: 41-49.

Додаткові приклади послідовностей mRNA HBV є легкодоступними в загальнодоступних базах даних, наприклад, GenBank, UniProt та OMIM. Міжнародний репозиторій даних про штами вірусу гепатиту В доступний на <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/HepSEQ/main.php>.

Термін «HBV», використовуваний у даному документі, також стосується варіантів послідовності ДНК геному HBV, що зустрічаються в природі, наприклад генотипів А-J та їх варіантів.

Використовуваний в даному документі «вірус гепатиту D», що застосовується взаємозамінно з терміном «HDV», стосується добре відомого нецитопатичного тропного до печінки ДНК-вірусу, що належить до родини *Hepadnaviridae*. Див., наприклад, Ciancio and Rizzetto, *Nat. Rev.* 11:68-71, 2014; Le Gal et al., *Emerg. Infect. Dis.* 12:1447-1450, 2006; та Abbas and Afzal, *World J. Hep.*, 5:666-675, 2013, кожне з яких включене за допомогою посилання. Якщо не вказано інше, HDV стосується всіх клад і варіантів HDV.

HDV продукує один білок, названий HDAg. Він з'являється у двох формах; 27 кДа великий-HDAg (також позначається як IHD, L-HDAg та великий HDV-антиген) та малий-HDAg, 24 кДа (також позначається як sHD, S-HDAg та малий HDV-антиген). N-кінці двох форм є ідентичними; вони відрізняються 19 амінокислотами на С-кінці великого HDAg. Обидві ізоформи одержуються з тієї самої рамки зчитування, яка містить стоп-кодон UAG в 196 кодоні, та зазвичай з неї продукується тільки малий-HDAg. Однак, редагування за допомогою клітинного ферменту аденозин-дезамінази-1 змінює стоп-кодон на UCG, дозволяючи продукуватися великому-HDAg. Незважаючи на те, що вони характеризуються на 90 % ідентичними послідовностями, ці два білки відіграють протилежну роль під час протікання інфекції. HDAg-S продукується на ранніх стадіях інфекції, та потрапляє до ядра, та підтримує реплікацію вірусу. HDAg-L, навпаки, продукується на пізніх стадіях інфекції, діє як інгібітор реплікації вірусу, та він потрібен для складання вірусних частинок.

Додаткові приклади послідовностей mRNA HDV є легкодоступними в загальнодоступних базах даних, наприклад GenBank, UniProt та OMIM.

Термін «HDV», використовуваний у даному документі, також стосується варіантів послідовності ДНК геному HDV, що зустрічаються в природі.

Використовуваний у даному документі термін «аналог нуклеотиду(нуклеозиду)» або «інгібітор зворотної транскриптази» означає інгібітор реплікації ДНК, який є структурно подібним до нуклеотиду або нуклеозиду та специфічно інгібує реплікацію сссDNA HBV і не суттєво інгібує реплікацію ДНК хазяїна (наприклад, людини). Такі інгібітори включають тенофовіру дизопроксилу фумарат (TDF), тенофовіру алафенамід (TAF), ламівудин, адефовіру дипівоксил, ентекавір (ETV), телбівудин, AGX-1009, емтрицитабін, клевудин, ритонавір, дипівоксил, лобукавір, фамвір, FTC, N-ацетилцистеїн (NAC), PC1323, терадигм-HBV, тимозин-альфа, ганцикловір, безифовір (ANA-380/LB-80380) та тенофовір-ексалідекс (TLX/CMX157). У певних варіантах здійснення аналог нуклеотиду(нуклеозиду) являє собою ентекавір (ETV). Аналоги нуклеотидів(нуклеозидів) є комерційно доступними з низки джерел та застосовуються у способах, представлених у даному документі, за показаннями згідно з їх інструкцією із використання (наприклад, зазвичай вводяться перорально у певній дозі) або як визначено кваліфікованим фахівцем у галузі лікування HBV.

Використовувана в даному документі «цільова послідовність» стосується неперервної частини нуклеотидної послідовності молекули mRNA, яка утворюється в процесі транскрипції

гена HBV, зокрема mRNA, яка є продуктом процесингу РНК первинного продукту транскрипції. У деяких варіантах здійснення цільова частина послідовності буде щонайменше достатньо довгою, щоб служити субстратом для спрямовуваного засобом на основі dsRNA розщеплення в цій частині або поряд з цією частиною нуклеотидної послідовності молекули mRNA, яка утворюється в процесі транскрипції гена HBV.

Цільова послідовність може мати довжину приблизно від 19 до 21 нуклеотиду, наприклад довжину 19, 20 або 21 нуклеотид.

Використовуваний у даному документі термін «нитка, що містить послідовність» стосується олігонуклеотиду, що містить ланцюг з нуклеотидів, який описується послідовністю, згадувану із використанням стандартної номенклатури нуклеотидів.

Кожен з «G», «C», «A», «T» і «U», зазвичай, означає нуклеотид, який як основу містить відповідно гуанін, цитозин, аденін, тимідин і урацил. Однак, буде зрозуміло, що термін «рибонуклеотид» або «нуклеотид» також може стосуватися модифікованого нуклеотиду, який більш детально описаний нижче, або імітувального замінного фрагмента (див., наприклад, таблицю 1). Фахівцю в даній галузі добре відомо, що гуанін, цитозин, аденін і урацил можуть бути замінені іншими фрагментами без суттєвої зміни властивостей спарювання основ олігонуклеотиду, який містить нуклеотид, що несе такий замінений фрагмент. Наприклад, без обмеження, нуклеотид, що містить інозин як основу, може утворювати пару основ з нуклеотидами, які містять аденін, цитозин або урацил. Отже, нуклеотиди, що містять урацил, гуанін або аденін, можуть бути замінені в нуклеотидних послідовностях dsRNA, описаних у даному винаході, нуклеотидами, які містять, наприклад, інозин. В іншому прикладі аденін і цитозин в будь-якому місці в олігонуклеотиді можуть бути замінені відповідно гуаніном і урацилом з утворенням неоднозначних пар основ G-U з цільовою mRNA. Послідовності, що містять такі замінені фрагменти, є придатними для композицій і способів, описаних у даному винаході.

Терміни «засіб на основі dsRNA», «засіб для RNAi», «засіб на основі iRNA» та «засіб для РНК-інтерференції», що використовуються в даному документі взаємозамінно, стосуються засобу, котрий містить РНК у тому значенні, в якому даний термін визначено в даному документі, і який опосередковує цілеспрямоване розщеплення РНК-транскрипту через шлях за участю РНК-індукованого комплексу сайленсингу (RISC). Засіб на основі dsRNA направляє специфічне щодо послідовності руйнування mRNA за допомогою процесу, відомого як РНК-інтерференція (RNAi). Засіб на основі dsRNA модулює, наприклад інгібує, експресію гена HBV (наприклад, одного або більше генів HBV) в клітині, наприклад клітині в організмі суб'єкта, такого як суб'єкта-савця.

«Засіб на основі dsRNA» для використання в композиціях, шляхах використання та способах, розкритих у даному документі являє собою двониткову РНК, і в даному документі її називають «засіб на основі dsRNA», «засіб на основі двониткової РНК», «молекула двониткової РНК (dsRNA)», «dsRNA», «iRNA», «засіб на основі iRNA», «засіб на основі dsRNAi», «засіб для RNAi» або «siRNA». Термін «dsRNA» стосується комплексу молекул рибонуклеїнової кислоти з дуплексною структурою, що містить дві антипаралельні та по суті комплементарні нитки нуклеїнової кислоти, котрі розглядаються як такі, що мають «сенсову» і «антисенсову» орієнтації щодо цільової РНК, тобто гена HBV. У деяких варіантах здійснення даного винаходу dsRNA запускає руйнування цільової РНК, наприклад mRNA, через пост-транскрипційний механізм сайленсингу генів, що називається у даному документі РНК-інтерференцією або RNAi.

Зазвичай, кожна нитка молекули dsRNA може містити рибонуклеотиди, але, як докладно описано в даному документі, кожна нитка або обидві нитки також можуть містити один або більше нуклеотидів, відмінних від рибонуклеотидів, наприклад дезоксирибонуклеотид або модифікований нуклеотид. Крім того, використовуваний у даному описі «засіб на основі dsRNA» може включати рибонуклеотиди з хімічними модифікаціями; засіб на основі dsRNA може включати суттєві модифікації багатьох нуклеотидів. Використовуваний у даному документі термін «модифікований нуклеотид» стосується нуклеотиду, який незалежно має модифікований цукровий фрагмент, модифікований міжнуклеотидний зв'язок або модифіковану нуклеїнову основу. Таким чином, термін «модифікований нуклеотид» охоплює заміни, додавання або видалення, наприклад функціональної групи або атома, в міжнуклеозидних зв'язках, цукрових фрагментах або нуклеїнових основах. Модифікації, придатні для використання в засобах за даним винаходом включають усі типи модифікацій, розкритих у даному документі або відомих з рівня техніки. Будь-які такі модифікації, які використовуються в молекулі типу засобу на основі dsRNA, охоплені терміном «засіб на основі dsRNA» в контексті даних опису та формули винаходу.

Термін «інгібування», використовуваний у даному документі, використовують взаємозамінно

зі «зниженням», «сайленсингом», «знижувальною регуляцією», «пригніченням» та іншими подібними термінами, і він включає будь-який рівень інгібування. Інгібування переважно включає статистично значуще або клінічно значуще інгібування.

5 Фраза «інгібування експресії HBV» або «інгібування експресії гена HBV», використовувана в даному документі, включає інгібування експресії будь-якого гена HBV (наприклад, гена HBV, що експресується з HBV під час інфікування вірусом HBV, гена HBV, що експресується з експресійної конструкції в клітині), а також варіантів або мутантних форм гена HBV, що кодують білок HBV. Терміни включають нокдаун будь-якого транскрипту HBV (наприклад, транскрипту, довжиною 3,5 т. н., 2,4 т. н., 2,1 т. н. або 0,7 т. н.), що кодує один або більше вірусних білків HBV (таких як, наприклад, preS1/2-S, preS, S, P, X, preC та C), а також варіантів або мутантних форм гена HBV.

«Інгібування експресії гена HBV» включає будь-який рівень інгібування гена HBV або транскрипту, наприклад щонайменше часткове пригнічення експресії гена HBV, наприклад гена S, P, X або C HBV або будь-якої їх комбінації, наприклад S, P та C. Експресію гена HBV можна оцінювати, виходячи з рівня або зміни рівня будь-якої змінної, асоційованої з експресією гена HBV, наприклад рівня mRNA HBV, або рівня білка HBV або рівня cccDNA HBV. Цей рівень можна оцінювати в окремій клітині або в групі клітин, зокрема, наприклад, у зразку, одержаному від суб'єкта, наприклад, рівні можна відстежувати у сироватці крові. Інгібування можна оцінювати за зниженням абсолютного або відносного рівня однієї або більше з цих змінних порівняно з контрольним рівнем. Контрольний рівень може являти собою будь-який тип контрольного рівня, який використовують у даній галузі, наприклад рівень у початковий момент часу до введення дози або рівень, визначений у подібного суб'єкта, або середній по популяції з придатного контрольного суб'єкта, клітини або зразка, які є необробленими або обробленими контролем (наприклад, контроль тільки з буфером або контроль з неактивним засобом).

25 У деяких варіантах здійснення способів за даним винаходом, експресія гена HBV інгібується на щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, наприклад, у суб'єкта на щонайменше 1 log 10, 2 log 10, 3 log 10 або 4 log 10 або до рівня, нижчого ніж той, який можна виявити конкретним аналізом. У переважних варіантах здійснення інгібування експресії гена HBV у суб'єкта приводить до клінічно значущого інгібування рівня експресії гена, наприклад інгібування, достатнього для надання можливості розвитку ефективної імунної відповіді щодо білка HBV, або якщо його вводять окремо або в комбінації з іншими засобами з метою викликати імунну відповідь або посилити її.

В аналізі на основі клітин *in vitro* або в моделі експресії гетерологічних генів *in vivo*, наприклад мишачій моделі AAV-hHBV, описаній у даному документі, переважним є інгібування загальної експресії HBV на щонайменше 90 %, наприклад щонайменше 1 log 10, 2 log10 або 3 log10. Під час лікування суб'єкта з інфекцією, спричиненою HBV, переважним є зменшення на щонайменше 90 % рівня гена або білка HBV, тобто різниця рівня гена або білка HBV перед і після лікування. Може бути потрібною більше, ніж одна доза для досягнення необхідного рівня інгібування.

40 Інгібування експресії гена HBV може проявлятися як зниження кількості РНК, що експресується першою клітиною або групою клітин (такі клітини можуть бути присутніми, наприклад, у зразку, одержаному від суб'єкта), в яких транскрибується ген HBV і яку або які обробляли (наприклад, шляхом приведення клітини або клітин у контакт із засобом на основі dsRNA за даним винаходом або шляхом уведення засобу на основі dsRNA за даним винаходом суб'єкту, в організмі якого клітини є чи були присутніми) таким чином, щоб експресія гена HBV інгібувалася, порівняно з другою клітиною або групою клітин, по суті ідентичних першій клітині або групі клітин, але яку або які не обробляли (контрольною(ими) клітиною(ами)). У переважних варіантах здійснення інгібування оцінюють за допомогою способу RT-PCR, представленого в прикладі 2 з WO 2016/077321 (спосіб з якої включений у даний документ за допомогою посилання), при цьому аналізи *in vitro* проводять у відповідним чином підібраній лінії клітин з дуплексом у концентрації 10 нМ, і рівень mRNA в оброблених клітинах виражають у вигляді відсоткової частки від рівня mRNA в контрольних клітинах із використанням наступної формули:

$$\frac{(mRNA_{\text{в контрольних клітинах}}) - (mRNA_{\text{оброблених клітинах}})}{(mRNA_{\text{в контрольних клітинах}})} \cdot 100\%$$

55

Як альтернатива, інгібування експресії гена HBV можна оцінювати за зниженням параметра, який функціонально пов'язаний з експресією гена HBV. Сайленсинг гена HBV можна виявити в будь-якій клітині, що експресує ген HBV конститутивно або за допомогою генної інженерії, і за допомогою будь-якого аналізу, відомого з рівня техніки.

Інгібування експресії білка HBV може проявлятися як зниження рівня білка HBV, який експресується клітиною або групою клітин (наприклад, рівня білка, експресованого у зразку, одержаному від суб'єкта). Як пояснюється вище стосовно оцінки пригнічення експресії mRNA, інгібування рівнів експресії білка в обробленій клітині або групі клітин може аналогічним чином
5 бути виражене у вигляді відсоткової частки від рівня білка в контрольних клітині або групі клітин або у сироватці крові.

Контрольні клітина або група клітин, які можна застосовувати для оцінки інгібування експресії гена HBV, включають клітину або групу клітин, які ще не були приведені в контакт із засобом на основі dsRNA за даним винаходом. Наприклад, контрольні клітина або група клітин
10 можуть бути одержані від окремого суб'єкта (наприклад, суб'єкта-людини або суб'єкта-тварини) перед лікуванням суб'єкта за допомогою засобу на основі dsRNA. В альтернативних варіантах здійснення рівень можна порівнювати з відповідним контрольним зразком, наприклад контрольним зразком з відомої популяції.

Рівень РНК HBV, яка експресується клітиною або групою клітин, або рівень РНК HBV, що циркулює, можна визначати за допомогою будь-якого відомого з рівня техніки способу оцінки експресії mRNA, переважно за допомогою способу RT-PCR, представленого в прикладі 2 з WO 2016/077321. У деяких варіантах здійснення рівень експресії гена HBV (наприклад, загальної РНК HBV, транскрипту HBV, наприклад транскрипту HBV розміром 3,5 т. н.) у зразку визначають шляхом виявлення транскрибованого полінуклеотиду або його частини, наприклад
20 РНК гена HBV. РНК можна екстрагувати з клітин за допомогою методик екстракції РНК, зокрема, наприклад, екстракції за допомогою кислого фенолу/гуанідинізоціанату (RNAzol B; Biogenesis), наборів для одержання РНК RNeasy (Qiagen®) або PAXgene (PreAnalytix, Швейцарія). Типові формати аналізів, в яких використовують гібридизацію рибонуклеїнових кислот, включають ядерні кінетичні аналізи, RT-PCR, аналізи із захистом від дії РНКаз (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035), нозерн-блотинг, гібридизацію in situ і мікроматричні аналізи. mRNA HBV, що циркулює, можна виявляти із використанням способів, описаних у WO 2012/177906, способи з якої включені в даний документ за допомогою посилання.

У деяких варіантах здійснення рівень експресії гена HBV визначають із використанням зонда на основі нуклеїнової кислоти. Термін «зонд», використовуваний у даному документі, стосується
30 будь-якої молекули, здатної селективно зв'язуватися з конкретним геном HBV. Зонди можуть бути синтезовані фахівцем у даній галузі або одержані з відповідних біологічних препаратів. Зонди можуть бути спеціально сконструйовані таким чином, щоб вони були міченими. Приклади молекул, які можна використовувати як зонди, включають без обмеження РНК, ДНК, білки, антитіла та органічні молекули.

Виділену РНК можна використовувати для аналізів з гібридизацією або ампліфікацією, що включають без обмеження нозерн-блот-аналізи, аналізи шляхом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) та аналізи із використанням матриць із зондами. Один спосіб визначення рівнів mRNA передбачає приведення виділеної mRNA у контакт з молекулою нуклеїнової кислоти (зондом), яка може гібридуватися з mRNA HBV. У деяких варіантах здійснення mRNA
40 іммобілізують на твердій поверхні та приводять у контакт із зондом, наприклад, шляхом пропускання виділеної mRNA через агарозний гель і перенесення mRNA з гелю на мембрану, таку як нітроцелюлозна. У деяких інших варіантах здійснення зонд(и) іммобілізують на твердій поверхні, і mRNA приводять у контакт із зондом(ами), наприклад, на матриці GeneChip® від Affymetrix. Фахівець у даній галузі може легко адаптувати відомі способи виявлення mRNA для використання у визначенні рівня mRNA HBV.

Альтернативний спосіб визначення рівня експресії гена HBV у зразку передбачає процес ампліфікації або зворотної транскрипції (з одержанням cDNA) нуклеїнової кислоти, наприклад mRNA, у зразку, наприклад, за допомогою RT-PCR (експериментальний варіант здійснення викладено у Mullis, 1987, патент США № 4683202), лігазної ланцюгової реакції (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), самопідтримувальної реплікації послідовностей (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), транскрипційної ампліфікаційної системи (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-бета-реплікази (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), реплікації за механізмом «кільця, що котиться» (Lizardi et al., патент США № 5854033) або будь-якого іншого способу ампліфікації нуклеїнової кислоти з наступним виявленням ампліфікованих молекул за допомогою методик, добре відомих фахівцям у даній галузі. Ці схеми виявлення є особливо застосовними для виявлення молекул нуклеїнової кислоти, якщо такі молекули присутні в дуже малих кількостях. У конкретних аспектах даного винаходу рівень експресії гена HBV визначають за допомогою кількісної RT-PCR з флуорогенними зондами (тобто системи TaqMan™), наприклад із використанням способу,
50 55 60 представленого в даному документі.

Рівні експресії РНК HBV можна відстежувати за допомогою мембранного блоту (як, наприклад, застосований в аналізі за методом гібридизації, такого як нозерн-, дот-блот тощо) або мікролунок, пробірок для зразків, гелів, гранул або волокон (або будь-якої твердої основи, що містить зв'язані нуклеїнові кислоти). Див. патенти США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 та 5445934, які включені в даний документ за допомогою посилання щодо ідей, що мають відношення до таких способів. Визначення рівня експресії HBV може також включати використання зондів на основі нуклеїнових кислот у розчині.

У переважних варіантах здійснення рівень експресії РНК оцінюють із використанням ПЛР у режимі реального часу (qPCR). Використання таких способів описане та проілюстроване в прикладі 2 з WO2016/077321.

Рівень експресії білка HBV можна визначити за допомогою будь-якого способу вимірювання рівнів білка, відомого з рівня техніки. Такі способи включають, наприклад, електрофорез, капілярний електрофорез, високоефективну рідинну хроматографію (HPLC), тонкошарову хроматографію (TLC), гіпердифузійну хроматографію, реакції преципітації в рідині або гелі, абсорбційну спектроскопію, колориметричні аналізи, спектрофотометричні аналізи, проточну цитометрію, імунодифузійну (одиночну або подвійну), імуноелектрофорез, вестерн-блотинг, радіоімунологічний аналіз (RIA), твердофазні імуноферментні аналізи (ELISA), імунофлуоресцентні аналізи, електрохемилюмінесцентні аналізи тощо.

Засоби на основі dsRNA

Дуплексна ділянка може бути будь-якої довжини, яка сприяє специфічному руйнуванню необхідної цільової РНК через RISC-шлях, та її довжина може знаходитись в діапазоні від приблизно 19-21 пари основ, наприклад довжина може становити приблизно 19, 20 або 21 пару основ. Ілюстративні засоби на основі dsRNA, описані в даному документі, включають довжини дуплексів, що становлять 19-21 пару основ.

Якщо дві по суті комплементарні нитки dsRNA утворені з окремих молекул РНК, то ці молекули не обов'язково повинні, але можуть бути з'єднані ковалентно. Якщо дві нитки з'єднані ковалентно іншим чином, ніж неперервним ланцюгом з нуклеотидів від 3'-кінця однієї нитки до 5'-кінця відповідної іншої нитки, які утворюють дуплексну структуру, то з'єднувальну структуру називають «лінкером». Нитки РНК можуть мати однакову або різну кількість нуклеотидів. Максимальна кількість пар основ являє собою кількість нуклеотидів у найкоротшій нитці dsRNA за винятком будь-яких липких кінців, присутніх у дуплексі. Крім дуплексної структури засіб на основі dsRNA може передбачати один або більше нуклеотидних липких кінців.

Використовуваний у даному документі термін «нуклеотидний липкий кінець» стосується щонайменше одного неспареного нуклеотиду, який виступає з дуплексної структури двониткового засобу на основі dsRNA. Наприклад, якщо 3'-кінець однієї нитки dsRNA виходить за межі 5'-кінця іншої нитки або навпаки, то утворюється нуклеотидний липкий кінець. dsRNA може містити липкий кінець щонайменше з одного нуклеотиду; як альтернатива, липкий кінець може містити два нуклеотиди. Нуклеотидний липкий кінець може містити аналог нуклеотиду/нуклеозиду, зокрема дезоксинуклеотиду/нуклеозиду, або складатися з нього. Липкий(і) кінець(кінці) може(можуть) розташовуватися у сенсовій нитці, антисенсовій нитці або будь-якій їх комбінації. Крім того, нуклеотид(и) липкого кінця може(можуть) бути присутнім(и) на 5'-кінці, 3'-кінці або обох кінцях антисенсової або сенсової нитки dsRNA. У переважному варіанті здійснення липкий кінець наявний на 3'-кінці антисенсової нитки.

«Затуплений кінець» або «тупий кінець» означає, що на кінці двониткового засобу на основі dsRNA немає неспарених нуклеотидів, тобто немає нуклеотидного липкого кінця. Засіб на основі dsRNA з «тупими кінцями» являє собою dsRNA, яка є двонитковою по всій довжині, тобто не має нуклеотидного липкого кінця на будь-якому кінці молекули. У деяких варіантах здійснення засоби на основі dsRNA за даним винаходом включають засоби на основі dsRNA з нуклеотидним липким кінцем на одному кінці (тобто засоби з одним липким кінцем і одним тупим кінцем) або з нуклеотидними липкими кінцями на обох кінцях.

Термін «антисенсова нитка» або «спрямовувальна нитка» стосується нитки засобу на основі dsRNA, яка містить ділянку, по суті комплементарну цільовій послідовності, наприклад mRNA HBV. Використовуваний в даному документі термін «ділянка комплементарності» стосується ділянки антисенсової нитки, яка є по суті комплементарною послідовності, наприклад цільовій послідовності, наприклад нуклеотидній послідовності HBV, визначеній в даному документі. Якщо ділянка комплементарності не повністю комплементарна цільовій послідовності, то помилкові спарювання можуть розташовуватися у внутрішніх або кінцевих ділянках молекули. Зазвичай, найбільш допустимі помилкові спарювання знаходяться в кінцевих ділянках, наприклад в межах 5, 4, 3, 2 або 1 нуклеотиду 5'- або 3'-кінця засобу на основі dsRNA. У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA за даним винаходом передбачає помилкове

спарювання нуклеотидів в антисенсовій нитці. У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA за даним винаходом передбачає помилкове спарювання нуклеотидів в сенсовій нитці. У деяких варіантах здійснення помилкове спарювання нуклеотидів знаходиться, наприклад, в межах 5, 4, 3, 2 або 1 нуклеотиду від 3'-кінця засобу на основі dsRNA. У деяких варіантах здійснення помилкове спарювання нуклеотидів знаходиться, наприклад, в межах 3'-кінцевого нуклеотиду засобу на основі dsRNA.

Термін «сенсова нитка» або «супровідна нитка», використовуваний у даному документі, стосується нитки засобу на основі dsRNA, що включає ділянку, яка є по суті комплементарною ділянці антисенсової нитки, як цей термін визначений у даному документі.

Використовуваний у даному документі, і якщо не вказане інше, термін «комплементарний» при використанні для опису першої нуклеотидної послідовності щодо другої нуклеотидної послідовності означає здатність олігонуклеотиду або полінуклеотиду, що містить першу нуклеотидну послідовність, гібридизуватися й утворювати дуплексну структуру за певних умов з олігонуклеотидом або полінуклеотидом, що містить другу нуклеотидну послідовність, як буде зрозуміло фахівцю в даній галузі. Наприклад, такі умови можуть являти собою жорсткі умови, де жорсткі умови можуть включати 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C або 70°C протягом 12-16 годин з наступним промиванням (див., наприклад, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Можна застосовувати інші умови, такі як фізіологічно відповідні умови, характерні для організму. Фахівець у даній галузі зможе визначити набір умов, найбільш придатних для тестування комплементарності двох послідовностей відповідно до кінцевого використання гібридизованих нуклеотидів.

Комплементарні послідовності в межах засобу на основі dsRNA, наприклад в межах засобу на основі dsRNA, описаного в даному документі, включають утворення пар основ олігонуклеотиду або полінуклеотиду, що містить першу нуклеотидну послідовність, з олігонуклеотидом або полінуклеотидом, який містить другу нуклеотидну послідовність, по всій довжині однієї або обох нуклеотидних послідовностей. Такі послідовності можуть бути вказані в даному документі як «повністю комплементарні» щодо одна одної. Однак, якщо в даному документі перша послідовність зазначена як «по суті комплементарна» щодо другої послідовності, дві послідовності можуть бути повністю комплементарними, або вони можуть утворювати одну або більше, але, як правило, не більше 4, 3, або 2 помилково спарених пар основ під час гібридизації з утворенням дуплексу, довжиною до 21 пари основ, із збереженням при цьому здатності гібридизуватися за умов, найбільш відповідних їх кінцевому використанню, наприклад інгібуванню експресії гена за допомогою RISC-шляху. Однак, якщо два олігонуклеотиди призначені для утворення в разі гібридизації одного або більше одониткових липких кінців, такі липкі кінці не будуть вважатися помилковими спарюваннями щодо визначення комплементарності. Наприклад, засіб на основі dsRNA, що містить один олігонуклеотид довжиною 21 нуклеотид та інший олігонуклеотид довжиною 23 нуклеотиди, де довший олігонуклеотид містить послідовність із 21 нуклеотиду, яка повністю комплементарна коротшому олігонуклеотиду, може бути названий як «повністю комплементарний» для цілей, описаних у даному документі.

«Комплементарні» послідовності, використовувані у даному документі, можуть також включати або можуть бути утворені повністю з пар основ, утворених не за моделлю Уотсона-Кріка, або пар основ, утворених із нуклеотидів, що не існують у природі, і модифікованих нуклеотидів, у такій мірі, за якої виконуються вищевказані вимоги щодо їх здатності гібридизуватися. Такі пари основ, утворені не за моделлю Уотсона-Кріка, включають без обмеження неоднозначні G:U або Хугстинівські пари основ.

Терміни «комплементарний», «повністю комплементарний» і «по суті комплементарний» у даному документі можна використовувати щодо збігу основ між сенсовою ниткою й антисенсовою ниткою dsRNA, або між антисенсовою ниткою засобу на основі dsRNA і цільовою послідовністю, як буде зрозуміло з контексту їх використання. Зрозуміло, що відомі декілька генотипів HBV. Таким чином, засіб на основі dsRNA, сконструйований таким чином, щоб він був повністю комплементарним до одного з генотипів HBV, може бути не повністю комплементарним до всіх генотипів HBV. Засіб на основі dsRNA, що націлений на специфічний сайт, є ефективним щодо цільового нокдауну серед декількох генотипів без того, щоб бути повністю комплементарним серед усіх генотипів.

Використовуваний у даному документі полінуклеотид, що є «по суті комплементарним щонайменше частині» матричної РНК (mRNA), стосується полінуклеотиду, який є по суті комплементарним неперервній частині mRNA, що становить інтерес (наприклад, mRNA, яка кодує ген HBV). Наприклад, полінуклеотид є комплементарним щонайменше частині mRNA

HBV, якщо послідовність є по суті комплементарною безперервній частині mRNA, що кодує ген HBV.

Відповідно, у деяких варіантах здійснення полінуклеотиди антисенсової нитки, розкриті в даному документі, є повністю комплементарними цільовій послідовності HBV. У деяких інших варіантах здійснення полінуклеотиди антисенсової нитки, розкриті в даному документі, є по суті комплементарними цільовій послідовності HBV та включають неперервну нуклеотидну послідовність, яка характеризується щонайменше 80 % комплементарністю по всій своїй довжині з еквівалентною ділянкою нуклеотидної послідовності під SEQ ID NO:1 або фрагментом SEQ ID NO:1, такою як щонайменше 80 %, 85 %, 90 % або 95 % комплементарність.

У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA за даним винаходом включає сенсову нитку, яка є по суті комплементарною антисенсовому полінуклеотиду, який, в свою чергу, є комплементарним цільовій послідовності HBV, та де полінуклеотиди сенсової нитки включають неперервну нуклеотидну послідовність, яка характеризується щонайменше 80 % комплементарністю по всій своїй довжині з еквівалентною ділянкою послідовності нуклеотидів під SEQ ID NO:2, як, наприклад, щонайменше 85 %, 90 % або 95 % комплементарністю.

У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA включає антисенсову нитку, яка є по суті комплементарною цільовій послідовності HBV та включає неперервну нуклеотидну послідовність, яка характеризується щонайменше 80 % комплементарністю по всій своїй довжині з еквівалентною ділянкою нуклеотидної послідовності будь-якої із сенсових нуклеотидних послідовностей в таблиці 2 або фрагмента будь-якої із сенсових нуклеотидних послідовностей в таблиці 2, як, наприклад, щонайменше 85 %, 90 % або 95 % комплементарністю.

Як докладно описано в даному документі, кожна нитка або обидві нитки також можуть містити один або більше нуклеотидів, відмінних від рибонуклеотидів, наприклад дезоксирибонуклеотид або модифікований нуклеотид. Крім того, засіб на основі dsRNA може включати рибонуклеотиди з хімічними модифікаціями. Такі модифікації можуть включати всі типи модифікацій, розкритих у даному документі або відомих з рівня техніки. Будь-які такі модифікації, які використовуються в засобі на основі dsRNA, можна охоплювати терміном «засіб на основі dsRNA» у контексті даних опису та формули винаходу.

У деяких варіантах здійснення більшість нуклеотидів кожної нитки є рибонуклеотидами, але, як детально описано в даному документі, кожна нитка або обидві нитки можуть також включати один або більше нуклеотидів, відмінних від рибонуклеотидів, наприклад дезоксирибонуклеотид або модифікований нуклеотид. Крім того, засіб на основі dsRNA може включати рибонуклеотиди з хімічними модифікаціями. Такі модифікації можуть включати всі типи модифікацій, розкритих у даному документі або відомих з рівня техніки. Будь-які такі модифікації, які використовуються в засобі на основі dsRNA, охоплюються терміном «засіб на основі dsRNA» і «засіб на основі dsRNA» у контексті даних опису та формули винаходу.

Термін «нижчий» у контексті щодо рівня експресії гена HBV або продукування білка HBV у суб'єкта або маркера або симптому захворювання стосується статистично значущого зменшення такого рівня. Зниження може бути, наприклад, на щонайменше 80 %, 85 %, 90 % або 95 % або до рівня, нижчого ніж той, який можна виявити конкретним способом виявлення, або у більшій мірі у напрямку до нормального рівня або до нормального рівня (який може становити або не становити нуль). Для відстежування інфекції, спричиненої HBV, зазвичай використовують шкалу \log_{10} для опису рівня антигенемії (наприклад, рівня HBsAg у сироватці крові) або віремії (рівня ДНК HBV у сироватці крові). Зрозуміло, що зменшення, позначене у 1 \log_{10} , являє собою зменшення на 90 % (залишається 10 %), зменшення, позначене у 2 \log_{10} , являє собою зменшення на 99 % (залишається 1 %) тощо. У певних варіантах здійснення маркер захворювання знижується до рівня, нижчого ніж той, який можна виявити. У певних варіантах здійснення способи включають клінічно значуще інгібування експресії HBV, наприклад, як продемонстровано за допомогою клінічно значущого результату після лікування суб'єкта засобом зі зниженням експресії HBV. У деяких варіантах здійснення щонайменше часткове пригнічення експресії гена HBV оцінюють за зниженням кількості mRNA HBV, яку можна виділити або виявити в перших клітині або групі клітин, в яких транскрибується ген HBV та яка була оброблена або які були оброблені так, що експресія гена HBV інгібується, порівняно з другими клітиною або групою клітин, по суті ідентичних першим клітині або групі клітин, але яка не була оброблена або які не були оброблені подібним способом (контрольні клітини).

У певних варіантах здійснення «нижчий» або «знижувати» слід розуміти, як пониження або зниження рівня у напрямку до нормального рівня або до нормального рівня, тобто нормалізацію рівня. У певних варіантах здійснення експресія мішені нормалізується до рівня, прийнятого як такий, що перебуває в межах норми для індивідуума без такого порушення, наприклад рівень

маркера захворювання, такого як ALT або AST, зменшується до рівня, прийнятого як такий, що перебуває в межах норми для індивідуума без такого порушення. Якщо рівень, асоційований із захворюванням, є підвищеним щодо нормального рівня, то зміну обчислюють від верхнього рівня норми (ULN). Якщо рівень, асоційований із захворюванням, є зменшеним щодо нормального рівня, то зміну обчислюють від нижчого рівня норми (LLN). Зниження являє собою відсоткову різницю зміни між значенням у суб'єкта та нормальним значенням. Наприклад, нормальний рівень AST може бути наведений як 10-40 одиниць на літр. Якщо суб'єкт з рівнем AST, що становить 200 одиниць на літр, тобто 5-кратним щодо ULN, на 160 одиниць на літр вищим за вищий рівень, визначений для норми, до лікування має рівень AST, що становить 120 одиниць на літр, тобто 3-кратний щодо ULN, на 80 одиниць на літр вищий за вищий рівень, визначений для норми, після лікування, то підвищений рівень AST буде знижений у напрямку до норми на 50 % (80/160).

Як інший приклад, вважають, що нормальний рівень ALT, зазвичай, становить від 7 до 55 одиниць на літр (од./л), що встановлює верхній рівень за норми, що становить 55 од./л. Суб'єкт з рівнем ALT, що становить 100 од./л, до лікування (на 45 од./л вище верхнього рівня, визначеного для норми,) та 75 од./л після лікування (зниженим на 25 од./л), то рівень ALT суб'єкта є пониженим в напрямку до нормального рівня на 55 % (25/45 x 100 %). Як використовується в даному документі, якщо захворювання асоційоване з підвищеним показником щодо симптому, то вважають, що «нормальний» являє собою верхній рівень, встановлений для норми. Якщо захворювання асоційоване зі зниженим показником щодо симптому, то вважають, що «нормальний» являє собою нижній рівень, встановлений для норми.

Фраза «приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA», таким як dsRNA, використовується в даному документі, включає приведення клітини в контакт за допомогою будь-яких можливих способів. Приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA передбачає приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA *in vitro* або приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA *in vivo*. Приведення в контакт можна здійснювати безпосередньо або опосередковано. Таким чином, наприклад, засіб на основі dsRNA можна приводити у фізичний контакт з клітиною індивідуумом, що здійснює спосіб, або, як альтернатива, засіб на основі dsRNA можна розмістити в умовах, які дозволять засобу потім прийти в контакт з клітиною або стануть причиною цього.

Приведення клітини в контакт *in vitro* можна виконувати, наприклад, шляхом інкубування клітини із засобом на основі dsRNA. Приведення клітини в контакт *in vivo* можна виконувати, наприклад, шляхом введення ін'єкції засобу на основі dsRNA у тканину, в якій розташована клітина, або поруч з нею, або шляхом введення ін'єкції засобу на основі dsRNA в іншу ділянку, наприклад кровотік або підшкірний простір, так, що засіб буде згодом досягати тканини, в якій розташована клітина, котру необхідно привести в контакт із засобом. Наприклад, засіб на основі dsRNA може містити ліганд, наприклад GalNAc₃, котрий спрямовує засіб на основі dsRNA до місця, що становить інтерес, наприклад до печінки, або може бути пов'язаний з ним. Також можливі комбінації способів приведення в контакт *in vitro* та *in vivo*. Наприклад, клітину можна приводити в контакт *in vitro* із засобом на основі dsRNA та потім пересаджувати суб'єкту.

У деяких варіантах здійснення приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA включає «введення» або «доставку засобу на основі dsRNA в клітину» шляхом сприяння поглинанню або абсорбції в клітину або покращення їх ступеню. Абсорбція або поглинання засобу на основі dsRNA може відбуватися шляхом спонтанних дифузійних або активних клітинних процесів, або за допомогою допоміжних засобів або пристроїв. Введення засобу на основі dsRNA в клітину можна проводити *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, у випадку введення *in vivo*, засіб на основі dsRNA можна вводити за допомогою ін'єкції в ділянку тканини або вводити системно. Введення в клітину *in vitro* передбачає відомі з рівня техніки способи, такі як електропорація й ліпофекція. Додаткові підходи описані нижче в даному документі або відомі з рівня техніки.

Використовуваний у даному документі «суб'єкт» являє собою тварину, таку як ссавець, зокрема будь-якого ссавця, який може бути інфікований HBV, наприклад примата (такого як людина, примата, відмінний від людини, наприклад мавпу або шимпанзе) або тварину, яка вважається прийнятною клінічною моделлю інфекції, спричиненої HBV, мишачу модель HBV-AAV (див., наприклад, Yang et al. (2014) Cell and Mol Immunol 11:71) або трансгенну мишачу модель HBV 1.3xfs (Guidotti et al. (1995) J. Virol. 69:6158). У деяких варіантах здійснення суб'єкт має інфекцію, спричинену вірусом гепатиту В (HBV). У деяких варіантах здійснення суб'єкт має як інфекцію, спричинену вірусом гепатиту В (HBV), так й інфекцію, спричинену вірусом гепатиту D (HDV). У деяких варіантах здійснення суб'єкт являє собою людину, таку як людина, що має

інфекцію, спричинену HBV, особливо хронічну, інфекцію, спричинену вірусом гепатиту В (HBV).

Використовувані в даному документі терміни «здійснення лікування» або «лікування» стосуються корисного або необхідного результату, що включає без обмеження полегшення або нормалізація щодо однієї або більше ознак або симптомів, асоційованих з небажаною експресією гена HBV або реплікацією HBV, наприклад наявності сссDNA HBV в сироватці крові або печінці; наявності ДНК HBV в сироватці крові; наявності антигена HBV в сироватці крові або печінці, наприклад HBsAg або HBeAg; підвищеного рівня ALT; підвищеного рівня AST (вважається, що нормальний діапазон, зазвичай, знаходиться в межах від приблизно 10 до 34 од./л); відсутності або низького рівня антитіл до HBV, враження печінки; цирозу; гепатиту дельта, гострого гепатиту В; гострого фульмінантного гепатиту В; хронічного гепатиту В; фіброзу печінки; захворювання печінки на термінальній стадії; гепатоцелюлярної карциноми; подібного сироватковій хворобі синдрому; анорексії; нудоти; блювання, слабкої гарячки; міалгії; втомлюваності; порушених відчуттів смакової гостроти та запаху (відраза до їжі та сигарет); болю у правому верхньому квадранті та епігастриального болю (періодичний, від легкого до помірного); енцефалопатії печінки; сонливості; порушення режиму сну; сплутаності свідомості; коми; асцити; шлунково-кишкової кровотечі; коагулопатії; розлиття жовчі; гепатомегалії (злегка збільшена, м'яка печінка); спленомегалії; еритеми долонь; павукоподібної гемангіоми; м'язової атрофії; павукоподібної ангіоми; запалення кровноносних судин; варикозної кровотечі; периферійного набряку; гінекомастії; атрофії тестикул; порушення з боку черевних колатеральних вен (голова медузи); рівнів ALT вищих, ніж рівні AST; підвищених рівнів гамма-глутаміл-транспептидази (GGT) (вважається, що нормальний діапазон, зазвичай, знаходиться в межах від приблизно 8 до 65 од./л) та лужної фосфатази (ALP) (вважається, що нормальний діапазон, зазвичай, знаходиться в межах від приблизно 44 до 147 МО/л (міжнародних одиниць на літр), є не більшим, ніж 3-кратне значення ULN); злегка низьких рівнів альбуміну; підвищених рівнів заліза в сироватці крові; лейкопенії (тобто гранулоцитопенії); лімфоцитозу; підвищеної швидкості осадження еритроцитів (ESR); скороченого виживання червоних клітин крові; гемолізу; тромбоцитопенії; пролонгації міжнародного коефіцієнта нормалізації (INR); наявності в сироватці крові або печінці HBsAg, HBeAg або антитіла класу імуноглобуліна М (IgM) до корового білка гепатиту В (антитіло до HBs); наявності антитіла до поверхневого білка гепатиту В (антитіла до HBs), антитіла до е білка гепатиту В (антитіла до HBe) або ДНК HBV; підвищених рівнів білірубіну; гіперглобулінемії; наявності тканино-неспецифічних антитіл, таких як антитіла до гладеньких м'язів (ASMA) або антитіла до ядер (ANA) (10-20 %); наявності тканино-специфічних антитіл, таких як антитіла до щитовидної залози (10-20 %); підвищених рівнів ревматоїдного фактору (RF); низького рівня тромбоцитів і лейкоцитів; лобулярного некрозу з дегенеративними та регенеративними гепатоцелюлярними змінами та супутніми запаленнями і переважно центрилобулярного некрозу, що виявляється чи не виявляється. Імовірність розвитку фіброзу печінки знижують, наприклад, якщо індивідуум має один або більше факторів ризику розвитку фіброзу печінки, наприклад інфекція, що являє собою хронічний гепатит В, у нього або не розвивається фіброз печінки, або розвивається фіброз печінки з меншою тяжкістю щодо популяції, що має ті самі фактори ризику і не отримує засіб лікування, описаний у даному документі. Ефективним попередженням вважають відсутність розвитку захворювання, порушення або стану або зниження ступеня розвитку ознаки або симптому, асоційованих з таким захворюванням, порушенням або станом (наприклад, на клінічно значущу величину) або призупинення прояву відкладених ознак або симптомів (наприклад, на дні, тижні, місяці або роки). «Лікування» також може означати подовження виживання порівняно з очікуваним виживанням за відсутності лікування. Для попередження може вимагатися введення більше, ніж однієї дози.

У переважних варіантах здійснення лікування інфекції, спричиненої HBV, приводить до «функціональноговиліковування» гепатиту В. Використовуване в даному документі «функціональневиліковування» слід розуміти, як виведення HBsAg, котрий циркулює, і яке переважно супроводжується переходом до стану, в якому антитіла до HBsAg стають виявлюваними із використанням клінічно релевантного аналізу. Наприклад, виявлювані антитіла можуть передбачати сигнал, вищий, ніж 10 мМО/мл, вимірний за допомогою хемілюмінесцентного імуноаналізу на мікрочастинках (СМІА) або будь-якого іншого імуноаналізу, названий сероконверсією антитіл до HBs. Функціональневиліковування не вимагає виведення усіх реплікативних форм HBV (наприклад, сссDNA з печінки). Сероконверсія антитіл до HBs відбувається спонтанно у приблизно 0,2-1 % хронічно інфікованих пацієнтів на рік. Однак, навіть після сероконверсії антитіл до HBs протягом декількох десятиліть спостерігається низький рівень персистенції HBV, що свідчить про те, що відбувається функціональне, а не повневиліковування. Без обмеження конкретним механізмом

передбачається, що імунна система може тримати HBV під контролем. Функціональне виліковування надає можливість припинити будь-яке лікування інфекції, спричиненої HBV. Однак, слід розуміти, що «функціональне виліковування» інфекції, спричиненої HBV, може бути недостатнім для запобігання або лікування захворювань або станів, які є наслідком інфекції, спричиненої HBV, наприклад фіброз печінки, НСС, цироз.

Використовуваний у даному документі термін «захворювання, асоційоване з вірусом гепатиту В» або «асоційоване з HBV захворювання» являє собою захворювання або порушення, спричинене інфекцією, спричиноюю HBV, або реплікацією HBV або асоційоване з ними. Термін «асоційоване з HBV захворювання» включає захворювання, порушення або стан, щодо яких було б сприятливим зниження експресії або реплікації гена HBV. Необмежувальні приклади асоційованих з HBV захворювань включають, наприклад, інфекцію, спричинену вірусом гепатиту D, гепатит дельта, гострий гепатит В; гострий фульмінантний гепатит В; хронічний гепатит В; фіброз печінки; захворювання печінки на термінальній стадії та гепатоцелюлярну карциному.

У деяких варіантах здійснення асоційоване з HBV захворювання являє собою інфекцію, спричинену вірусом гепатиту D. Вірус гепатиту D або вірус гепатиту дельта (HDV) являє собою патоген людини. Однак, вірус є дефектним та розраховує на обов'язкові допоміжні функції, що надаються вірусом гепатиту В (HBV), для перенесення; і справді, HDV потребує асоційованого або попередньо існуючої інфекції, спричиненої HBV, для того, щоб стати інфекційним та розмножитись, зокрема, вірусну оболонку, що містить поверхневий антиген гепатиту В. HDV може призвести до тяжкої гострої та хронічної форми захворювання печінки, асоційованого з HBV. Інфекція, що являє собою гепатит D або гепатит дельта, є високо ендемічною в декількох країнах Африки, регіоні Амазонки та на середньому сході, в той час як його поширеність є низькою в промислово розвинутих країнах, за винятком Середземномор'я.

Передача HDV може відбуватися або через одночасне інфікування HBV (спільне інфікування) або вона накладається на хронічний гепатит В або стан переносника гепатиту В (суперінфекція). Як суперінфекція, так і спільне інфікування HDV призводить до більш тяжких ускладнень, порівняно з інфекцією, спричиноюю лише HBV. Такі ускладнення включають вищу ймовірність зазнати печінкової недостатності за гострих інфекцій та швидке прогресування у бік цирозу печінки з підвищеним шансом розвитку раку печінки за хронічних інфекцій. В комбінації з вірусом гепатиту В, гепатит D характеризується найвищим рівнем смертності зі всіх інфекцій, що являють собою гепатит, і він становить 20 %.

У деяких варіантах здійснення асоційоване з HBV захворювання являє собою гострий гепатит В. Гострий гепатит В передбачає запалення печінки, що триває менше, ніж шість місяців. Типові симптоми гострого гепатиту В являють собою втомлюваність, анорексію, нудоту та блювання. Часто спостерігають дуже високі значення амінотрансферази (>1000 од./л) та гіпербілірубінемію. Тяжкі випадки гострого гепатиту В можуть швидко прогресувати у бік гострої печінкової недостатності, що позначається низькою синтетичною функцією печінки. Це також позначають як протромбіновий час (PT), що становить 16 секунд, або міжнародний коефіцієнт нормалізації (INR), що становить 1,5, за відсутності попереднього захворювання печінки. Гострий гепатит В може розвинути у хронічний гепатит В.

У деяких варіантах здійснення асоційоване з HBV захворювання являє собою хронічний гепатит. Хронічний гепатит В (CHB) передбачає запалення печінки, що триває більше, ніж шість місяців. Суб'єкти, що мають CHB є HBsAg-позитивними та мають або високу віремію ($\geq 10^4$ копій ДНК HBV/мл крові), або низьку віремію ($< 10^3$ копій ДНК HBV/мл крові). У деяких варіантах здійснення суб'єкти були інфіковані HBV протягом щонайменше п'яти років. У деяких варіантах здійснення суб'єкти були інфіковані HBV протягом щонайменше десяти років. У деяких варіантах здійснення суб'єкти одержали інфекцію, спричинену HBV, при народженні. Суб'єкти, що мають захворювання, що являє собою хронічний гепатит В, можуть бути імунотолерантними або мати неактивну хронічну інфекцію без будь-яких ознак активного захворювання, та вони також не мають симптомів. Пацієнти з хронічним активним гепатитом, особливо під час реплікативної фази, можуть мати симптоми подібні до таких за гострого гепатиту. Суб'єкти, що мають захворювання, що являє собою хронічний гепатит В, можуть мати активну хронічну інфекцію, що супроводжується некрозапальним захворюванням печінки, мають збільшену інтенсивність метаболізму гепатоцитів за відсутності виявлюваного некрозапалення або мають неактивну хронічну інфекцію без будь-яких ознак активного захворювання, і вони також не мають симптомів. Персистенція інфекції, спричиненої HBV, у суб'єктів з CHB зумовлена cccDNA HBV. У деяких варіантах здійснення суб'єкт, що має CHB, є HBeAg-позитивним. В іншому варіанті здійснення суб'єкт, що має CHB, є HBeAg-негативним. Суб'єкти, що мають CHB, характеризуються рівнем ДНК HBV в сироватці крові, що становить менше, ніж 10^5 , та стійким

підвищенням рівнів трансаміназ, наприклад ALT, AST та гама-глутаміл-трансферази. Суб'єкт, що має СНВ, може мати бал біопсії печінки, що становить менше, ніж 4 (наприклад, бал некрозапалення).

У деяких варіантах здійснення асоційоване з HBV захворювання являє собою гострий фульмінантний гепатит В. Суб'єкт, що має гострий фульмінантний гепатит В, має симптоми гострого гепатиту і додаткові симптоми, сплутаність свідомості або кому (через печінкову недостатність щодо детоксикації хімічних речовин) та синці або крововиливи (через недостатню кількість факторів згортання крові).

У суб'єктів, що мають інфекцію, спричинену HBV, наприклад СНВ, може розвинутися фіброз печінки. Відповідно, у деяких варіантах здійснення асоційоване з HBV захворювання являє собою фіброз печінки. Фіброз печінки або цироз визначають гістологічно, як дифузний процес у печінці, що характеризується фіброзом (надлишком волокнистої сполучної тканини) та переходом нормальної структури печінки в структурно ненормальні вузли.

У суб'єктів, що мають інфекцію, спричинену HBV, наприклад СНВ, може розвинути захворювання печінки на термінальній стадії. Відповідно, у деяких варіантах здійснення асоційоване з HBV захворювання являє собою захворювання печінки на термінальній стадії. Наприклад, фіброз печінки може прогресувати до точки, коли організм більше не здатен компенсувати, наприклад знижену функцію печінки, спричинену фіброзом печінки (тобто декомпенсованою печінкою), та спричинювати, наприклад, психічні та неврологічні симптоми та печінкову недостатність.

У суб'єктів, що мають інфекцію, спричинену HBV, наприклад СНВ, може розвинути гепатоцелюлярна карцинома (НСС), яка також позначається як злоякісна гепатома. Відповідно, у деяких варіантах здійснення асоційоване з HBV захворювання являє собою НСС. НСС зазвичай розвивається у суб'єктів, що мають СНВ, та вона може бути фіброламельарною, псевдогландулярною (аденоїдною), плеоморфною (гігантоклітинною) або прозороклітинною.

«Асоційоване з HDV порушення» або «порушення, асоційоване з вірусом гепатиту D» являє собою захворювання або порушення, асоційоване з експресією HDV. Ілюстративні асоційовані з HDV порушення включають інфекцію, спричинену вірусом гепатиту В, гострий гепатит В, гострий гепатит D; гострий фульмінантний гепатит D; хронічний гепатит D; фіброз печінки; захворювання печінки на термінальній стадії та гепатоцелюлярну карциному.

Передбачається, що «терапевтично ефективна кількість», використовувана в даному документі, включає кількість засобу на основі dsRNA, яка, в разі введення пацієнту для лікування суб'єкта, що має інфекцію, спричинену HBV, або асоційоване з HBV захворювання, є достатньою для ефективного лікування захворювання (наприклад, шляхом зниження ступеню прояву або підтримання наявного захворювання або одного або більше симптомів захворювання). «Терапевтично ефективна кількість» може варіюватися залежно від засобу на основі dsRNA, шляху введення засобу, захворювання та його тяжкості, а також анамнезу, віку, ваги, родинного анамнезу, генетичної характеристики, стадії патологічних процесів, опосередкованих експресією гену HBV, типів попередніх або супутніх видів лікування, за наявності таких, та інших індивідуальних особливостей пацієнта, який підлягає лікуванню. Для терапевтично ефективної кількості може вимагатися введення більше, ніж однієї дози.

«Терапевтично ефективна кількість» також передбачає кількість засобу на основі dsRNA, яка викликає деякий необхідний ефект за прийнятного співвідношення користь/ризик, прийнятого щодо будь-якого лікування. Засоби на основі dsRNA, використовувани у способах за даним винаходом, можна вводити у кількості, достатній для досягнення прийнятного співвідношення користь/ризик, прийнятого щодо такого лікування.

Термін «зразок», використовуваний у даному документі, передбачає сукупність подібних рідин, клітин або тканин, виділених з організму суб'єкта, а також рідин, клітин або тканин, наявних в організмі суб'єкта. Приклади біологічних рідин включають кров, сироватку крові й серозні рідини, плазму крові, лімфу, сечу, слину тощо. Зразки тканин можуть включати в себе зразки з тканин, органів або локальних ділянок. Наприклад, зразки можуть бути одержані з конкретних органів, частин органів або рідин або клітин з цих органів. У певних варіантах здійснення зразки можна одержати з печінки (наприклад, усієї печінки, або певних сегментів печінки, або певних типів клітин у печінці, таких як, наприклад, гепатоцити). У переважних варіантах здійснення «зразок, одержаний від суб'єкта» стосується крові або плазми крові, або сироватки крові, одержаної з крові, узятої в суб'єкта. У додаткових варіантах здійснення «зразок, одержаний від суб'єкта» стосується тканини печінки (або її складових компонентів) або тканини крові (або її складових компонентів, наприклад сироватки крові), одержаних від суб'єкта.

60

II. Засоби на основі dsRNA

Даний винахід передбачає засоби на основі dsRNA, які інгібують експресію одного або більше генів HBV. У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA включає молекули двониткової рибонуклеїнової кислоти (dsRNA) для інгібування експресії гена HBV в клітині, такій як клітина в організмі суб'єкта, наприклад ссавця, такого як людина, що має асоційоване з HBV захворювання, наприклад хронічний гепатит В. Засоби на основі dsRNA включають антисенсову нитку, що має ділянку комплементарності, яка є комплементарною щонайменше частині mRNA, утвореній під час експресії гена HBV. Довжина ділянки комплементарності становить приблизно 19-21 нуклеотид. У випадку контакту з клітиною, що експресує ген HBV, засіб на основі dsRNA інгібує експресію гена HBV на щонайменше 80 %, що встановлено шляхом аналізу, наприклад, за допомогою ПЛР або способу з використанням розгалуженої ДНК (bdNA), або способу на основі аналізу білків, як, наприклад, за допомогою імунофлуоресцентного аналізу із використанням, наприклад, методик вестерн-блотингу або проточної цитометрії. У переважних варіантах здійснення відсоток інгібування засобом на основі dsRNA, що використовували в концентрації 10 нМ в процесі трансфекції, визначають із використанням способу ПЛР в реальному часі, який наведено в прикладі 2, з використанням лінії клітин, описаної там же.

dsRNA включає дві нитки РНК, які є комплементарними та гібридизуються з утворенням дуплексної структури в умовах, за яких буде застосовуватися dsRNA. Одна нитка dsRNA (антисенсова нитка) передбачає ділянку комплементарності, яка є по суті комплементарною, і, зазвичай, повністю комплементарною, цільовій послідовності. Однак, через варіації послідовностей серед генотипів HBV, dsRNA може бути повністю комплементарною деяким, але не всім, генотипам HBV. Цільова послідовність може бути одержана з послідовності mRNA, утвореної під час експресії гена HBV. Інша нитка (сенсова нитка) передбачає ділянку, яка є комплементарною антисенсовій нитці, так що дві нитки гібридизуються та утворюють дуплексну структуру у разі об'єднання за придатних умов. Описані в іншому місці в даному документі та відомі з рівня техніки комплементарні послідовності dsRNA також можуть міститися у вигляді самокомплементарних ділянок однієї молекули нуклеїнової кислоти, на відміну від перебування в складі окремих олігонуклеотидів.

Зазвичай, довжина дуплексної структура становить 19-21 пару основ, наприклад довжина становить 19, 20 або 21 пару основ.

Подібним чином, довжина ділянки комплементарності цільовій послідовності становить 19-23 нуклеотиди, наприклад довжина становить 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-23, 20-22, 20-21, 21-22, 19, 20, 21, 22 або 23 нуклеотиди. У деяких варіантах здійснення ділянка комплементарності має довжину 21 нуклеотид. Середньому фахівцю в даній галузі також буде зрозуміло, що ділянка РНК, на яку здійснюється націлювання для розщеплення, найчастіше буде являти собою частину більшої молекули РНК, часто молекули mRNA. У відповідних випадках «частини» цільової mRNA являє собою неперервну послідовність цільової mRNA, яка має довжину, достатню для того, щоб дозволити їй бути субстратом для RNAi-спрямованого розщеплення (тобто розщеплення за допомогою RISC-шляху).

Фахівцю в даній галузі також буде зрозуміло, що дуплексна ділянка являє собою основну функціональну частину dsRNA, наприклад дуплексна ділянка довжиною приблизно 19-21 пару основ, наприклад 19-21, 19-20, 20-21, 19, 20 або 21 пару основ. У деяких варіантах здійснення дуплексна ділянка становить 19 пар основ.

dsRNA, описана в даному документі, може додатково включати один або більше одностричкових нуклеотидних липких кінців, наприклад 1 або 2 нуклеотиди. Нуклеотидний липкий кінець може містити аналог нуклеотиду/нуклеозиду, зокрема дезоксинуклеотиду/нуклеозиду, або складатися з нього. Липкий(і) кінець(кінці) може(можуть) розташовуватися у сенсовій нитці, антисенсовій нитці або будь-якій їх комбінації. Крім того, нуклеотид(и) липкого кінця може(можуть) знаходитись на 5'-кінці, 3'-кінці або обох кінцях однієї або обох з антисенсової або сенсової ниток dsRNA. У деяких варіантах здійснення dsRNA включає 2-нуклеотидний липкий кінець на 3'-кінці антисенсової нитки.

dsRNA можна синтезувати за допомогою стандартних способів, відомих з рівня техніки, які додатково описані нижче, наприклад з використанням автоматичного синтезатора ДНК, такого як комерційно доступні від, наприклад, Biosearch, Applied Biosystems™, Inc. Способи синтезу dsRNA для використання у фармацевтичній композиції є також відомими з рівня техніки.

Сполуки, що являють собою засіб на основі dsRNA, за даним винаходом можна одержувати з використанням двостадійної процедури. Спочатку окремі нитки молекули двониткової РНК одержують окремо. Потім нитки-складові відпаляють. Окремі нитки сполуки, що являє собою засіб на основі dsRNA, можна одержувати із використанням рідкофазного або твердофазного органічного синтезу або їх обох. Органічний синтез дає перевагу в тому, що можна легко

одержувати олігонуклеотидні нитки, що містять неприродні або модифіковані нуклеотиди. Однориткові олігонуклеотиди за даним винаходом можна одержувати із використанням рідкофазного або твердофазного органічного синтезу, або їх обох.

У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA за даним винаходом включає щонайменше дві нуклеотидні послідовності, послідовність сенсової нитки і послідовність антисенсової нитки. Сенсова нитка може містити нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, що складається з будь-якої з нуклеотидних послідовностей сенсової нитки будь-якого з дуплексів, що наведені в таблиці 2. Антисенсова нитка може містити нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, що складається з будь-якої з нуклеотидних послідовностей антисенсової нитки будь-якого з дуплексів, що наведені в таблиці 2. У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA не являє собою AD-66810.

У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA за даним винаходом містить сенсову нитку та антисенсову нитку, які наведені в таблиці 2, складається по суті з них або складається з них.

III. Засоби на основі модифікованої dsRNA

У певних варіантах здійснення РНК засобу на основі dsRNA за даним винаходом є немодифікованою та не передбачає, наприклад хімічних модифікацій або кон'югувань, відомих з рівня техніки та описаних в даному документі. В інших варіантах здійснення РНК засобу на основі dsRNA за даним винаходом є хімічно модифікованою для посилення стабільності або інших корисних характеристик. У деяких варіантах здійснення за даним винаходом по суті всі з нуклеотидів засобу на основі dsRNA за даним винаходом є модифікованими. У деяких варіантах здійснення за даним винаходом всі з нуклеотидів засобу на основі dsRNA або по суті всі з нуклеотидів засобу на основі dsRNA є модифікованими, тобто в нитці засобу на основі dsRNA наявними є не більше, ніж 5, 4, 3, 2 або 1 немодифікований нуклеотид.

Нуклеїнові кислоти, описані в даному винаході, можна синтезувати або модифікувати за допомогою способів загальноприйнятих в даній галузі, таких як ті, що описані в "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, способи з якого включені в даний документ за допомогою посилання. Модифікації включають, наприклад, кінцеві модифікації, наприклад 5'-кінцеві модифікації (фосфорилування, кон'югування, інвертовані зв'язки) або 3'-кінцеві модифікації (кон'югування, ДНК-нуклеотиди, інвертовані зв'язки тощо); модифікації основ, наприклад заміну стабілізуючими основами, дестабілізуючими основами або основами, які утворюють пару основ з розширеним спектром партнерів, видалення основи (нуклеотиди, позбавлені основ) або кон'юговані основи; модифікації цукрів (наприклад, в 2'-положенні або 4'-положенні) або заміну цукру або модифікації остову, зокрема модифікацію або заміну фосфодіестерних зв'язків. Конкретні приклади сполук, що являють собою засіб на основі dsRNA, застосовних у варіантах здійснення, описаних в даному документі, включають без обмеження РНК, що містять модифіковані остови або неприродні міжнуклеозидні зв'язки. Серед іншого, РНК, які мають модифіковані остови, включають такі, які не мають атома фосфору в остові. У контексті даного опису, а також як іноді згадується в рівні техніки, модифіковані РНК, які не мають атома фосфору в своєму міжнуклеозидному остові, також можуть вважатися олігонуклеозидами. У деяких варіантах здійснення засіб на основі модифікованої dsRNA буде мати атом фосфору в його міжнуклеозидному остові.

Модифіковані РНК-остови включають, наприклад, фосфотіоати, хіральні фосфотіоати, фосфодитіоати, фосфотриєстери, аміноалкілфосфотриєстери, метил- та інші алкілфосфонати, зокрема 3'-алкіленфосфонати та хіральні фосфонати, фосфінати, фосфорамідати, зокрема 3'-амінофосфорамідат та аміноалкілфосфорамідати, тіонофосфорамідати, тіоноалкілфосфонати, тіоноалкілфосфотриєстери та боранофосфати, що характеризуються нормальними 3'-5'-зв'язками, їх 2'-5'-зв'язані аналоги та ті, що характеризуються інвертованою полярністю, де суміжні пари нуклеозидних одиниць зв'язані наступним чином: 3'-5' до 5'-3' або 2'-5' до 5'-2'. Також включені різноманітні солі, змішані солі та форми вільних кислот.

Ілюстративні патенти США, в яких викладена ідея одержання згаданих вище зв'язків, які містять фосфор, включають без обмеження патенти США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029 і патентний документ США RE39464, кожен з яких включений в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких способів одержання.

Модифіковані РНК-остови, які не включають атом фосфору, передбачають остови, утворені

коротколанцюговими алкільними або циклоалкільними міжнуклеозидними зв'язками, змішаними гетероатомними й алкільними або циклоалкільними міжнуклеозидними зв'язками або одним або більше коротколанцюговими гетероатомними або гетероциклічними міжнуклеозидними зв'язками. Вони включають остови з морфоліновими зв'язками (частково утвореними з цукрової частини нуклеозиду); силосанові остови; сульфідні, сульфоксидні та сульфонові остови; формацетильні та тіоформацетильні остови; метиленформацетильні та тіоформацетильні остови; алкенвмісні остови; сульфаматні остови; метиленімінові та метиленгідразиніві остови; сульфонатні та сульфонамідні остови; амідні остови та інші, які містять суміш складових частин N, O, S і CH₂.

Ілюстративні патенти США, в яких викладена ідея одержання згаданих вище олігонуклеозидів, включають без обмеження патенти США №№ 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437 і 5677439, кожен з яких включений в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких способів.

Розглядаються придатні РНК-міметики для використання в засобах на основі dsRNA, представлених в даному документі, в яких як цукровий, так і міжнуклеозидний зв'язок, тобто остов нуклеотидних одиниць, замінені новими групами. Структурні одиниці у вигляді основ зберігаються для гібридизації з відповідною цільовою сполукою нуклеїнової кислоти. Одна така олігомерна сполука, в якій РНК-міметик, який, як було показано, має виняткові властивості гібридизації, називається пептидо-нуклеїновою кислотою (PNA). У сполуках PNA цукровий остов РНК замінений на амідовмісний остов, зокрема на аміноетилгліциновий остов. Нуклеїнові основи зберігаються і зв'язуються безпосередньо або опосередковано з атомами азоту азагрупи в амідній частині остова. Ілюстративні патенти США, в яких викладена ідея одержання сполук PNA, включають без обмеження патенти США №№ 5539082; 5714331 і 5719262, кожен з яких включений в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких способів. Додаткові сполуки PNA, придатні для використання в засобах на основі dsRNA за даним винаходом, описані, наприклад, у Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Деякі варіанти здійснення, описані в даному винаході, включають РНК з фосфотіоатними остовами й олігонуклеозиди з остовами з гетероатомами та, зокрема, --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[відомий як метилен(метиленіміно)- або MMI-остов], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- і --N(CH₃)--CH₂--CH₂--[де нативний фосфодіестерний остов наведений як --O--P--O--CH₂--] вказаного вище патенту США № 5489677 та амідні остови вказаного вище патенту США № 5602240. У деяких варіантах здійснення РНК, описані в даному документі, мають морфолінові структури остова відповідно до вищезгаданого патенту США № 5034506.

Модифіковані РНК також можуть містити один або більше заміщених цукрових фрагментів. Засоби на основі dsRNA, описані в даному документі, можуть включати в 2'-положенні одне з наступного: OH; F; O-, S- або N-алкіл; O-, S- або N-алкеніл; O-, S- або N-алкініл або O-алкіл-O-алкіл, де алкіл, алкеніл і алкініл можуть являти собою заміщений або незаміщений C₁-C₁₀-алкіл або C₂-C₁₀-алкеніл і -алкініл. Ілюстративні придатні модифікації включають O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ і O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, де n і m дорівнюють від 1 до приблизно 10. В інших варіантах здійснення dsRNA в 2'-положенні містять одне з наступного: нижчий C₁-C₁₀-алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкаріл, аралкіл, O-алкаріл або O-аралкіл, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкаріл, аміноалкіламіно, поліалкіламіно, заміщений силіл, групу, що розщеплює РНК, репортерну групу, інтеркалятор, групу для поліпшення фармакокінетичних властивостей засобу на основі dsRNA або групу для поліпшення фармакодинамічних властивостей засобу на основі dsRNA та інші замісники, які мають аналогічні властивості. У деяких варіантах здійснення модифікація включає 2'-метоксиетокси (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, також відомий як 2'-O-(2'-метоксиетил) або 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504), тобто алкокси-алкоксигрупу. Іншою ілюстративною модифікацією є 2'-диметиламінооксиетокси, тобто група O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, також відома як 2'-DMAOE, описана в прикладах у даному документі нижче, і 2'-диметиламінооксиетокси (також відома з рівня техніки як 2'-O-диметиламінооксиетил або 2'-DMAEOE), тобто 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂. Додаткові ілюстративні модифікації включають: 5'-Me-2'-F-нуклеотиди, 5'-Me-2'-OMe-нуклеотиди, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиди (як R-, так і S-ізомери в цих трьох родинах); 2'-алкоксиалкіл і 2'-NMA (N-метилацетамід).

Інші модифікації включають 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-амінопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) і 2'-фтор (2'-F). Подібні модифікації також можуть бути здійснені в інших положеннях у РНК засобу

на основі dsRNA, зокрема в 3'-положенні цукрового фрагмента в 3'-кінцевому нуклеотиді або в dsRNA із 2'-5'-зв'язками і в 5'-положенні 5'-кінцевого нуклеотиду. Засоби на основі dsRNA також можуть мати міметики цукрів, як, наприклад, циклобутилові фрагменти замість пентафуранозильного цукрового фрагменту. Ілюстративні патенти США, в яких викладена ідея одержання таких модифікованих цукрових структур, включають без обмеження патенти США №№ 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633 та 5700920, деякі з яких належать заявникам даної заявки. Вміст кожної з вищевказаних публікацій патентів включений в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких способів.

Засіб на основі dsRNA може також включати модифікації або заміщення нуклеїнової основи (яку часто в даній галузі називають просто як «основа»). Використовувані в даному документі «немодифіковані» або «природні» нуклеїнові основи включають у себе пуринові основи аденін (A) і гуанін (G), а також піримідинові основи тимін (T), цитозин (C) і урацил (U). Модифіковані нуклеїнові основи включають у себе інші синтетичні та природні нуклеїнові основи, такі як дезокситимін (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гідроксиметилцитозин, ксантин, гіпоксантин, 2-аміноаденін, 6-метильні та інші алкільні похідні аденіну та гуаніну, 2-пропільні та інші алкільні похідні аденіну та гуаніну, 2-тіоурацил, 2-тіотимін і 2-тіоцитозин, 5-галогенурацил і -цитозин, 5-пропінілурацил і -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин і -тимін, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тіоурацил, 8-галоген-, 8-аміно-, 8-тіол-, 8-тіоалкіл-, 8-гідроксил- та інші 8-заміщені аденіни та гуаніни, 5-галоген-, зокрема 5-бром-, 5-трифторметил та інші 5-заміщені урацили та цитозини, 7-метилгуанін і 7-метиладенін, 8-азагуанін і 8-азааденін, 7-дезазагуанін і 7-дезазааденін, а також 3-дезазагуанін і 3-дезазааденін. Додаткові нуклеїнові основи включають у себе ті, що розкриті в патенті США № 3687808, ті, що розкриті в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; ті, що розкриті в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, ті, що розкриті в *Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, а також ті, що розкриті в *Sanghvi, Y. S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Певні з цих нуклеїнових основ є особливо застосовними для збільшення афінності зв'язування олігомерних сполук, описаних у даному винаході. Вони включають 5-заміщені піримідини, 6-азапіримідини та N-2, N-6 і O-6-заміщені пурини, зокрема 2-амінопропіладенін, 5-пропінілурацил і 5-пропінілцитозин. Було показано, що заміщення на 5-метилцитозин збільшують стабільність дуплексу нуклеїнових кислот на 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), і вони являють собою ілюстративні заміщення основ, ще більш конкретно в комбінації з 2'-О-метоксиетильними модифікаціями цукрових фрагментів.

Ілюстративні патенти США, в яких викладено одержання певних зі згаданих вище модифікованих нуклеотидних основ, а також інших модифікованих нуклеотидних основ, включають без обмеження згадані вище патенти США №№ 3687808, 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672 і 7495088, кожен з яких включений в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких способів.

У деяких варіантах здійснення РНК засобу на основі dsRNA також може бути модифікована таким чином, щоб вона включала один або більше біциклічних цукрових фрагментів. «Біциклічний цукровий фрагмент» являє собою фуранозильне кільце, модифіковане шляхом формування містка між двома атомами. «Біциклічний нуклеозид» («BNA») являє собою нуклеозид, який має цукровий фрагмент, містить місток, що з'єднує два атоми вуглецю цукрового кільця, унаслідок чого утворюється біциклічна кільцева система. У певних варіантах здійснення місток з'єднує 4'-атом вуглецю і 2'-атом вуглецю в цукровому кільці. Таким чином, у деяких варіантах здійснення засіб за даним винаходом може містити одну або більше замкнених нуклеїнових кислот (LNA). Замкнена нуклеїнова кислота являє собою нуклеотид, який має модифікований рибозний фрагмент, де рибозний фрагмент містить додатковий місток, що з'єднує 2'- і 4'-атоми вуглецю. Інакше кажучи, LNA являє собою нуклеотид, що містить біциклічний цукровий фрагмент, що містить місток 4'-CH₂-O-2'. Ця структура ефективно «замикає» рибозу в структурній конформації 3'-ендо. Було показано, що додавання замкнених нуклеїнових кислот в засоби на основі dsRNA збільшує стабільність засобів на основі dsRNA в сироватці крові та знижує нецільові ефекти (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Приклади біциклічних нуклеозидів для використання в

полінуклеотидах за даним винаходом включають без обмеження нуклеозиди, які містять місток між 4'- і 2'-атомами рибозильного кільця. У певних варіантах здійснення засоби на основі антисенсових полінуклеотидів за даним винаходом містять один або більше біциклічних нуклеозидів, які містять місток 4'-2'.

5 Приклади таких біциклічних нуклеозидів з містком 4'-2' включають без обмеження 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (який також називається «конформаційно утруднений етилом» або «сEt») та 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (та його аналоги, див., наприклад, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (та його аналоги, див., наприклад, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (та його аналоги, див., наприклад, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (див., наприклад, публікацію патенту США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', де R являє собою H, C1-C12-алкіл або захисну групу (див., наприклад, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (див., наприклад, Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); та 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (і його аналоги, див., наприклад, патент США № 8278426). Вміст кожного з вищенаведеного має відношення до модифікованих нуклеїнових кислот і включений в даний документ за допомогою посилання.

15 Додаткові ілюстративні патенти США і публікації патентів США, в яких викладені ідеї одержання нуклеотидів замкнених нуклеїнових кислот, включають без обмеження наступні: патенти США №№ 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133; 7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; US 2008/0039618 і US 2009/0012281, які включені в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких способів.

20 Будь-який із вищезгаданих біциклічних нуклеозидів можна одержувати з однією або більше стереохімічними конфігураціями цукрових фрагментів, зокрема, наприклад, α-L-рибофуранозою та β-D-рибофуранозою (див. WO99/14226).

РНК засобу на основі dsRNA також може бути модифікована таким чином, щоб вона містила один або більше конформаційно утруднених етилом нуклеотидів. Використовуваний в даному документі «конформаційно утруднений етилом нуклеотид» або «сEt» являє собою замкнену нуклеїнову кислоту, яка містить біциклічний цукровий фрагмент, що містить місток 4'-CH(CH₃)-O-2'. У деяких варіантах здійснення конформаційно утруднений етилом нуклеотид перебуває в S-конформації, яка в даному документі називається «S-cEt».

30 Засіб на основі dsRNA за даним винаходом також може містити один або більше «конформаційно обмежених нуклеотидів» («CRN»). CRN являють собою аналоги нуклеотидів з лінкером, який з'єднує C2'- і C4'-атоми вуглецю рибози або C3'- і C5'-атоми вуглецю рибози. CRN замикає рибозне кільце в стабільну конформацію і збільшує афінність гібридизації з mRNA. Довжина лінкера є достатньою, щоб помістити атом кисню в положення, оптимальне для стабільності й афінності, що приводить до меншого «зморщування» рибозного кільця.

35 Ілюстративні публікації, в яких викладені ідеї одержання певних вищезгаданих CRN, включають без обмеження публікацію патенту США № 2013/0190383; і публікацію згідно з РСТ WO2013/036868, які включені в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких способів.

40 У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA за даним винаходом містить один або більше мономерів, які являють собою нуклеотиди за типом UNA (незамкнених нуклеїнових кислот). UNA являє собою незамкнену ациклічну нуклеїнову кислоту, в якій будь-який зі зв'язків у цукровому фрагменті був видалений з утворенням незамкненого «цукрового» залишку. В одному прикладі UNA також охоплює мономер, у якого були видалені зв'язки C1'-C4' (тобто ковалентний вуглець-кисень-вуглецевий зв'язок між атомами вуглецю C1' і C4'). В іншому прикладі був видалений зв'язок C2'-C3' (тобто ковалентний вуглець-вуглецевий зв'язок між атомами вуглецю C2' і C3') у цукровому фрагменті (див. Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008), та Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039, які включені в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно нуклеотидів за типом незамкненої нуклеїнової кислоти).

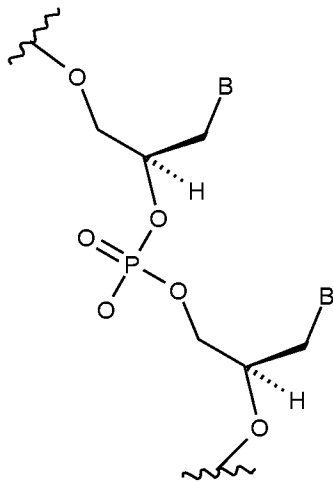
50 Ілюстративні публікації патентних документів США, в яких викладені ідеї одержання UNA, включають без обмеження патент США № 8314227 і публікації заявок на патент США №№ 2013/0096289; 2013/0011922 і 2011/0313020, які включені в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких способів.

55 Потенційно стабілізувальні модифікації на кінцях молекул РНК можуть включати в себе N-(ацетиламінокапроїл)-4-гідроксипролінол (Нур-С6-NHAc), N-(капроїл-4-гідроксипролінол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гідроксипролінол (Нур-NHAc), тимідин-2'-О-дезокситимідин (етер), N-(амінокапроїл)-4-гідроксипролінол (Нур-С6-аміно), 2-докозаноїл-уридин-3'-фосфат, інвертовану основу dT(idT) й інші. Розкриття цієї модифікації можна знайти в публікації згідно з РСТ № WO2011/005861.

60 У певних варіантах здійснення засіб на основі dsRNA модифікований таким чином, щоб він

включав один або більше аденозин-гліколь-нуклеїнових кислот («GNA»). Термін «GNA» стосується гліколевої нуклеїнової кислоти, що являє собою полімер, подібний ДНК або РНК, але відмінний від них складом свого «костова», оскільки він складається з повторюваних ланок гліцерину, з'єднаних фосфодіестерними зв'язками:

5



(R)-GXA

Опис аденозин-GNA можна знайти, наприклад, в Zhang, et al. (JACS 127(12):4174–75 (2005)).

10 Інші модифікації нуклеотидів засобу на основі dsRNA, розкритого в даному документі, включають 5'-фосфат або міметик 5'-фосфату, наприклад 5'-кінцевий фосфат або міметик фосфату в антисенсовій нитці засобу на основі dsRNA. Придатні міметики фосфатів розкриті, наприклад, у публікації патенту США № 2012/0157511, яка включена в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких модифікацій.

15 Додаткові засоби на основі модифікованої dsRNA, що націлюються на HBV, наведені, наприклад, в WO2016/077321, яка включена в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно модифікацій.

У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA містить модифіковану сенсову нитку та модифіковану антисенсову нитку, які наведені в таблиці 2, складається по суті з них або складається з них.

20 IV. Засоби на основі dsRNA, кон'юговані з лігандами

Засоби на основі dsRNA за даним винаходом можуть бути кон'юговані з лігандом. Ліганд може змінювати розподілення, націлювання або час життя засобу на основі dsRNA, в який вони включені. У переважних варіантах здійснення ліганд забезпечує посилену афінність щодо вибраної мішені, наприклад молекули, клітини або типу клітин, компартменту, наприклад компартменту клітини або органа, тканини, органа або ділянки тіла, наприклад, порівняно з молекулою, у якій такий ліганд відсутній. Переважні ліганди не будуть брати участь у спарюванні основ дуплексу в дуплексній нуклеїновій кислоті.

30 Олігонуклеотиди, кон'юговані з лігандами, за даним винаходом можуть бути синтезовані із використанням олігонуклеотиду, який несе підвішену реакційноздатну функціональну групу, як, наприклад, одержану в результаті приєднання зв'язувальної молекули до олігонуклеотиду (як описано нижче). Можна здійснювати реакцію цього реакційноздатного олігонуклеотиду безпосередньо з комерційно доступними лігандами, лігандами, які синтезуються такими, що несуть будь-яку з різноманітних захисних груп, або лігандами, які мають зв'язувальний фрагмент, приєднаний до них.

35 Стосовно олігонуклеотидів, кон'югованих з лігандами, і нуклеозидів, зв'язаних з конкретними послідовностями, що несуть молекули лігандів, за даним винаходом, олігонуклеотиди та олігонуклеозиди можуть бути зібрані на придатному синтезаторі ДНК з використанням стандартних попередників нуклеотидів або нуклеозидів або попередників кон'югатів нуклеотидів або нуклеозидів, які вже несуть зв'язувальний фрагмент, попередників кон'югатів нуклеотидів або нуклеозидів з лігандами, які вже несуть молекулу ліганду, або нуклеозидних структурних елементів, що несуть ліганд.

40 У разі використання попередників кон'югатів нуклеотидів, які вже несуть зв'язувальний фрагмент, синтез нуклеозидів, зв'язаних з конкретними послідовностями, зазвичай, завершується, а потім здійснюють реакцію молекули ліганду зі зв'язувальним фрагментом з

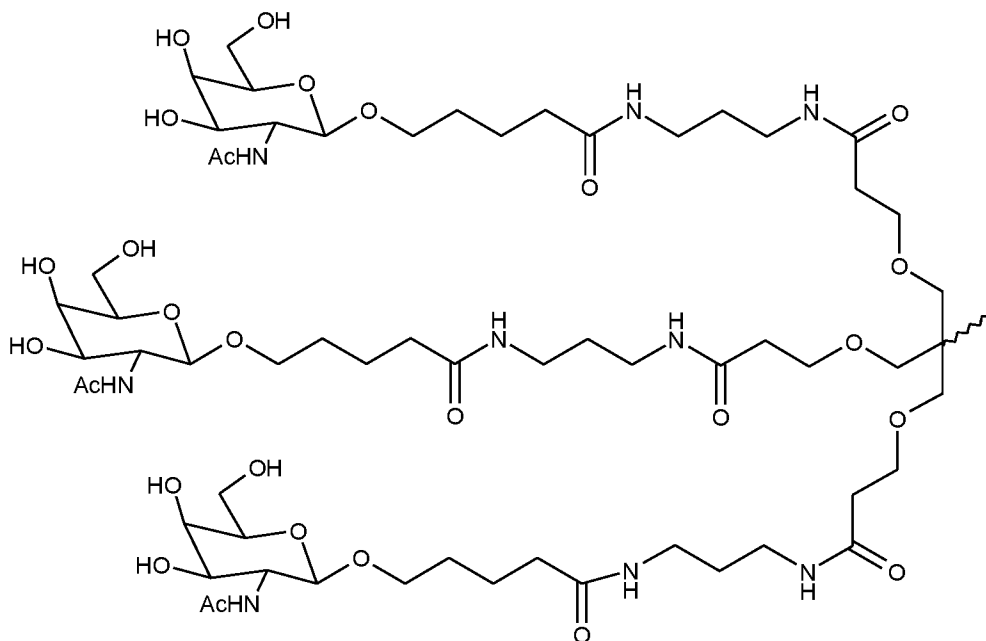
утворенням олігонуклеотиду, кон'югованого з лігандом. У деяких варіантах здійснення олігонуклеотиди або зв'язані нуклеозиди за даним винаходом синтезуються за допомогою автоматичного синтезатора із використанням фосфорамідитів, одержаних з кон'югатів нуклеозидів з лігандами, на додаток до стандартних фосфорамідитів і нестандартних фосфорамідитів, які є комерційно доступними і звичайним способом застосовуються в синтезі олігонуклеотидів.

Ілюстративні патенти США, в яких викладена ідея одержання кон'югатів РНК, включають без обмеження патенти США №№ 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717, 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241, 5391723; 5416203, 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928 та 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; 8106022, які включені в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких способів одержання.

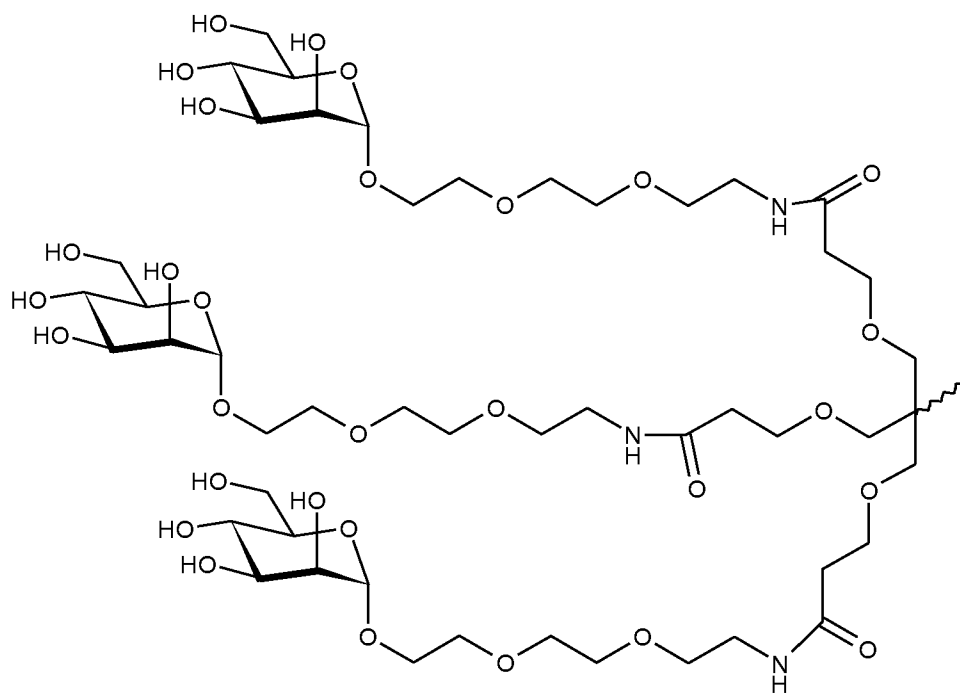
А. Вуглеводневі кон'югати

У переважних варіантах здійснення композицій і способів, розкритих у даному документі, олігонуклеотид засобу на основі dsRNA додатково містить вуглевод. Засіб на основі dsRNA, кон'югований з вуглеводом, є переважним для доставки нуклеїнових кислот *in vivo*, а також композицій, придатних для терапевтичного використання *in vivo*, описаного в даному документі. Використовуваний у даному документі термін «вуглевод» стосується сполуки, яка являє собою вуглевод *per se*, утворений з однієї або більше моносахаридних ланок, що мають щонайменше 6 атомів вуглецю (і які можуть бути лінійними, розгалуженими або циклічними), при цьому з кожним атомом вуглецю зв'язаний атом кисню, азоту або сірки; або сполуки, яка має як свою частину вуглеводний фрагмент, утворений з однієї або більше моносахаридних ланок, кожна з яких має щонайменше шість атомів вуглецю (і які можуть бути лінійними, розгалуженими або циклічними), при цьому з кожним атомом вуглецю зв'язаний атом кисню, азоту або сірки. Ілюстративні вуглеводи включають цукри (моно-, ди-, три- та олігосахариди, що містять приблизно 4, 5, 6, 7, 8 або 9 моносахаридних ланок) і полісахариди, такі як види крохмалю, глікоген, целюлоза та види полісахаридної камеді. Конкретні моносахариди включають цукри C5 і вище (наприклад, C5, C6, C7 або C8); ди- і трисахариди включають цукри, які мають дві або три моносахаридні ланки (наприклад, C5, C6, C7 або C8).

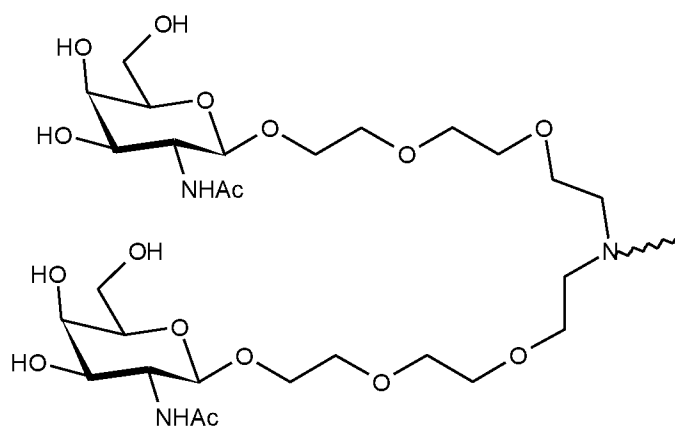
У деяких варіантах здійснення вуглеводний кон'югат для використання в композиціях і способах за даним винаходом являє собою моносахарид. У деяких варіантах здійснення вуглеводний кон'югат для використання в композиціях і способах за даним винаходом вибраний із групи, що складається з



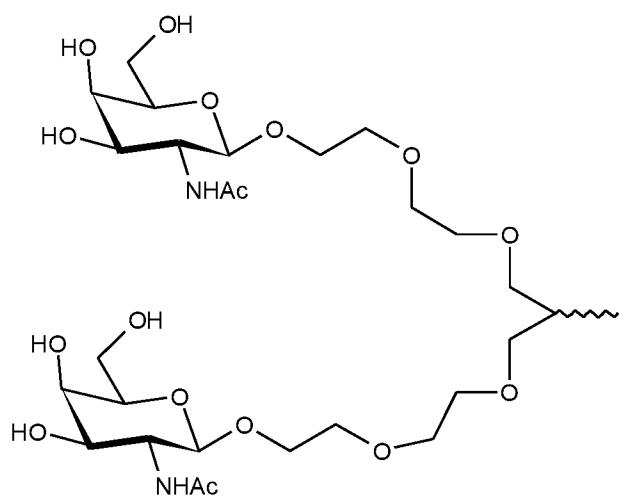
формули I,



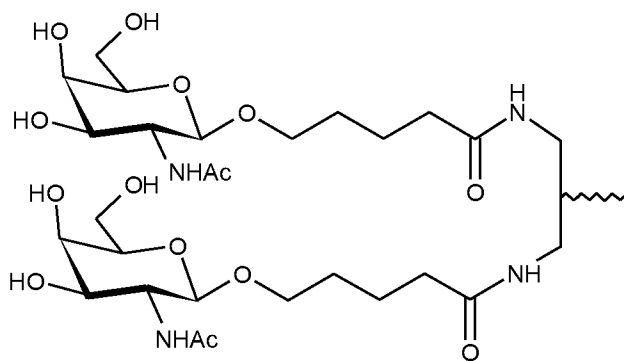
формули II,



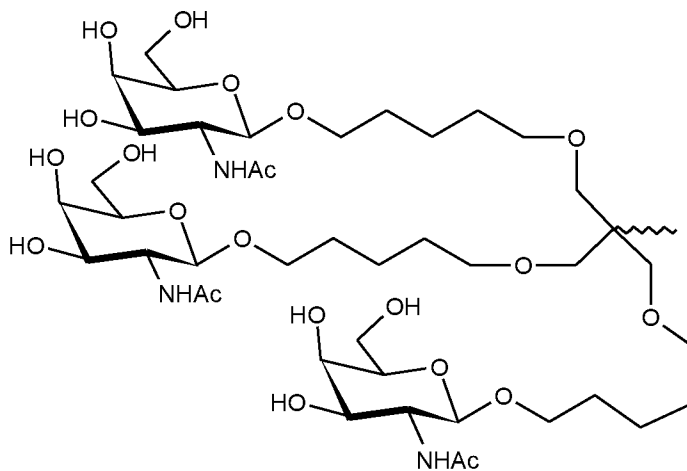
формули III,



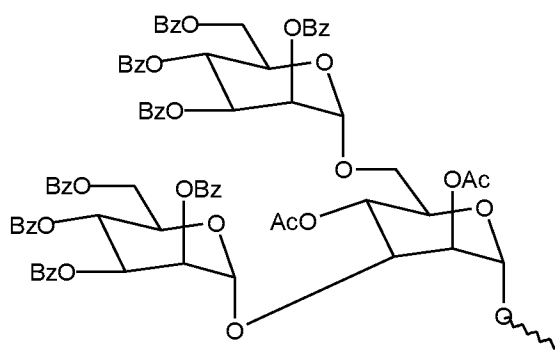
формули IV,



формули V,

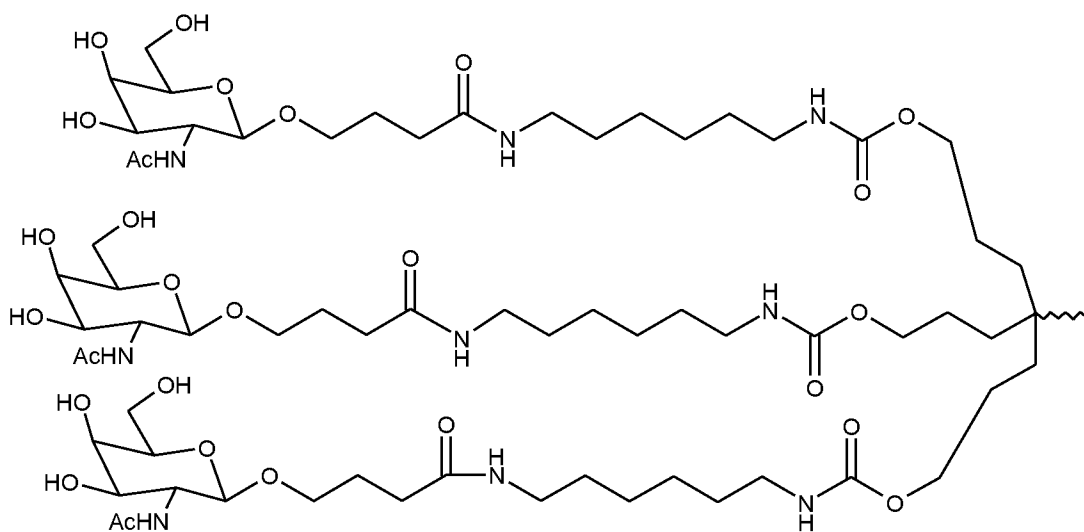


формули VI,

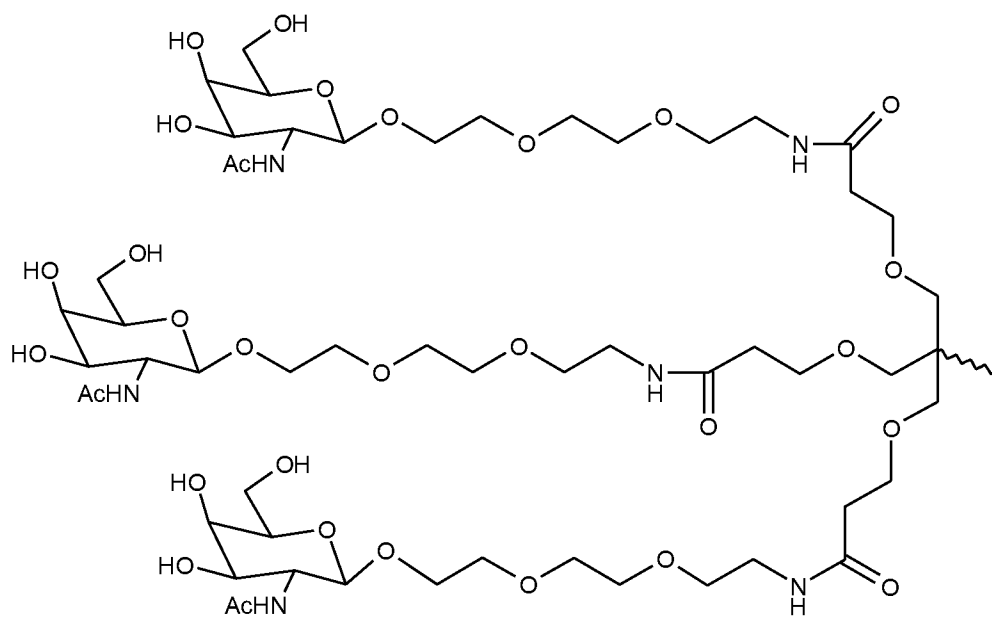


формули VII,

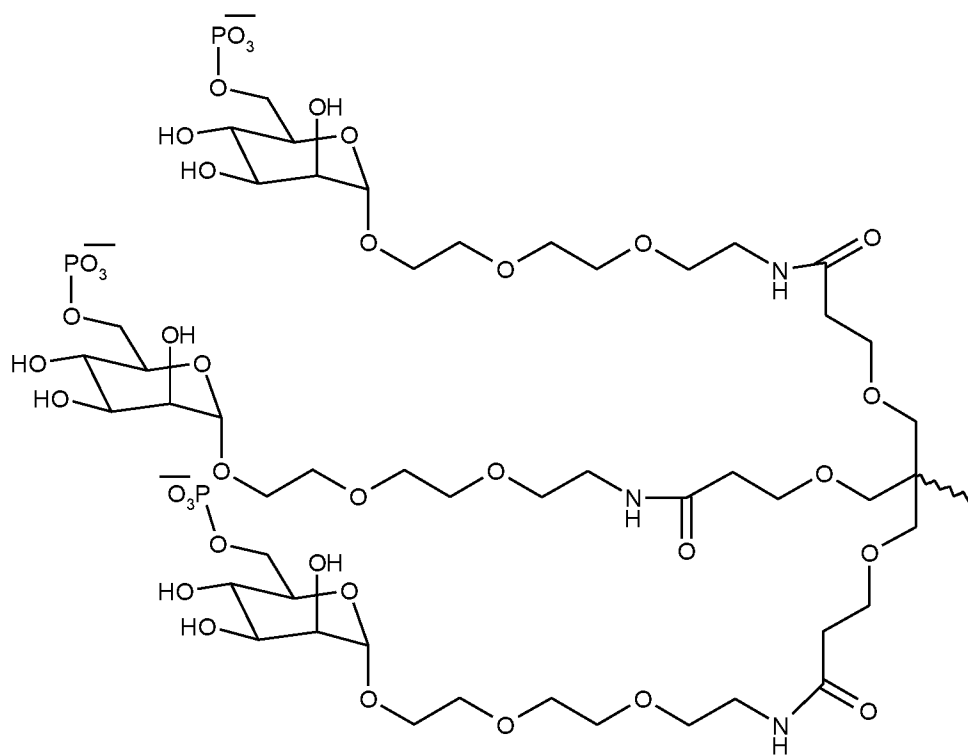
5



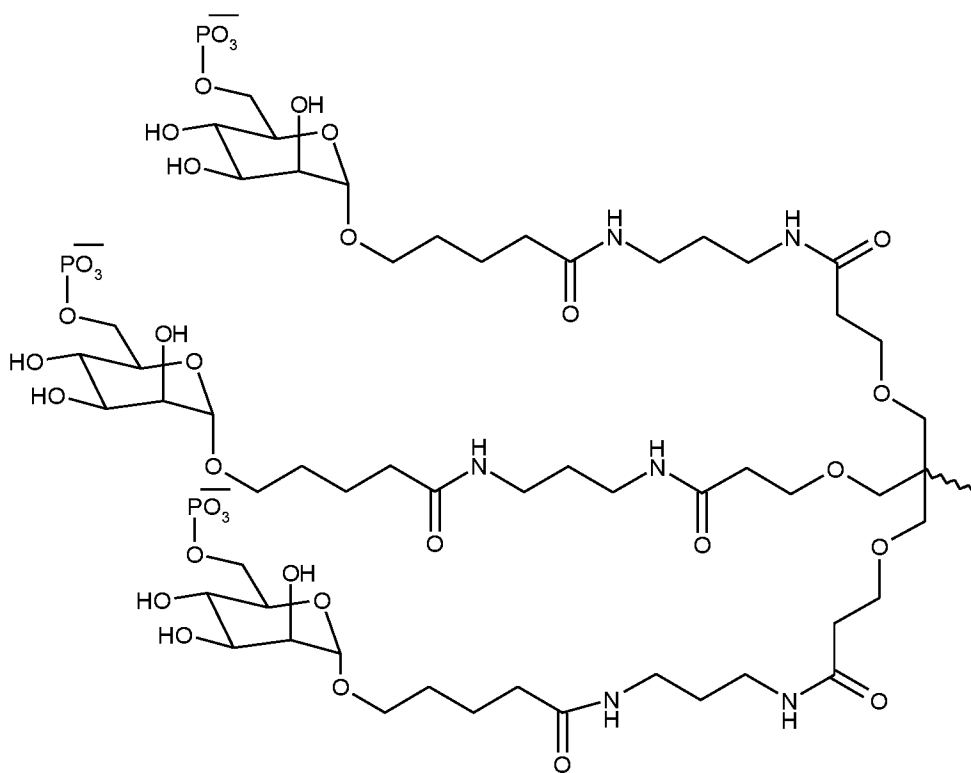
формули VIII,



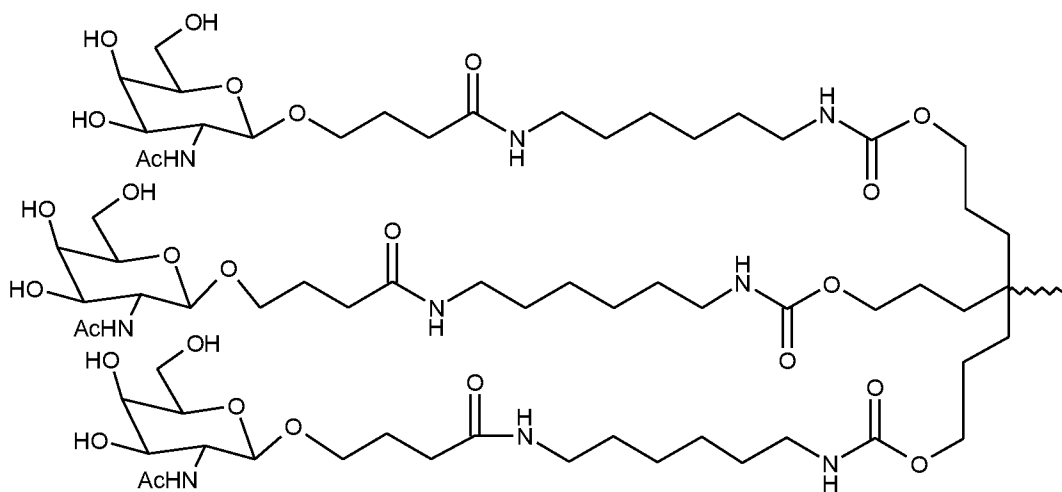
формули IX,



формули X,

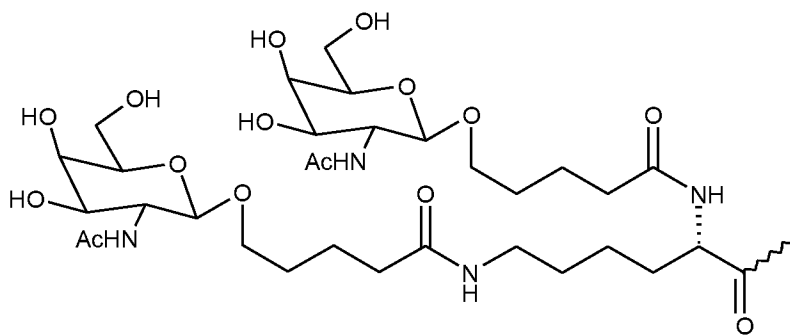


формули XI,

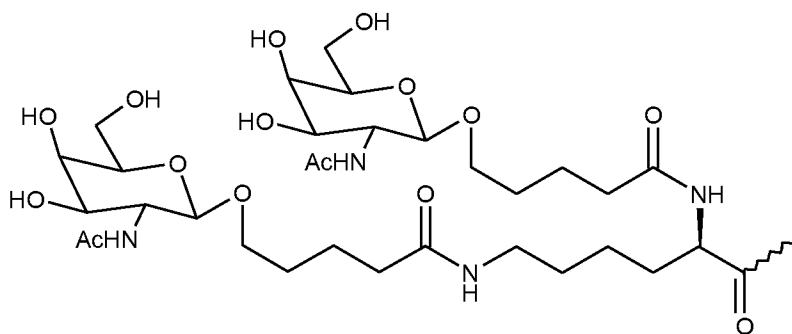


формули XII,

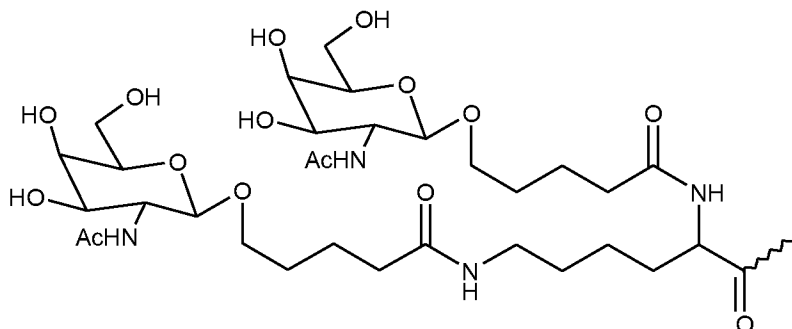
5



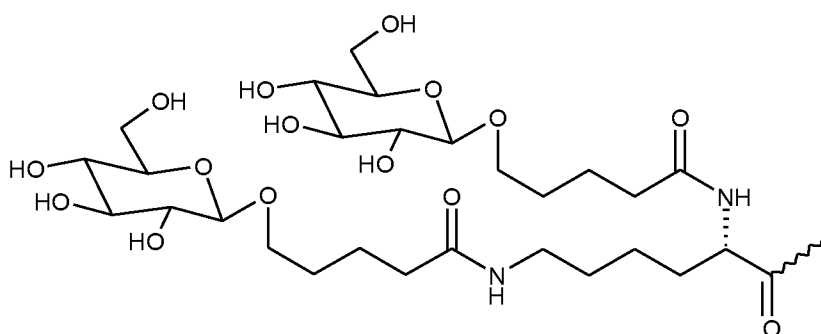
формули XIII,



формули XIV,

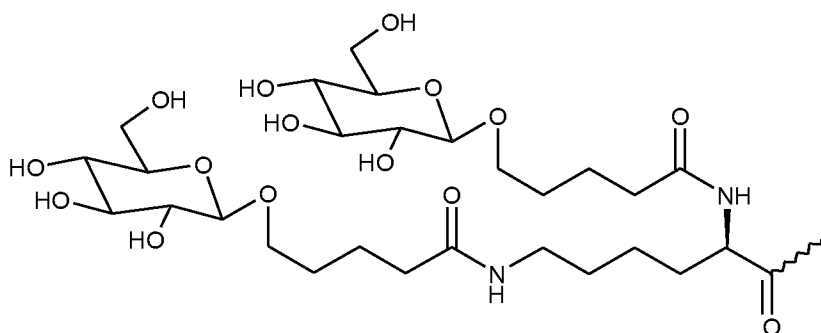


формули XV,

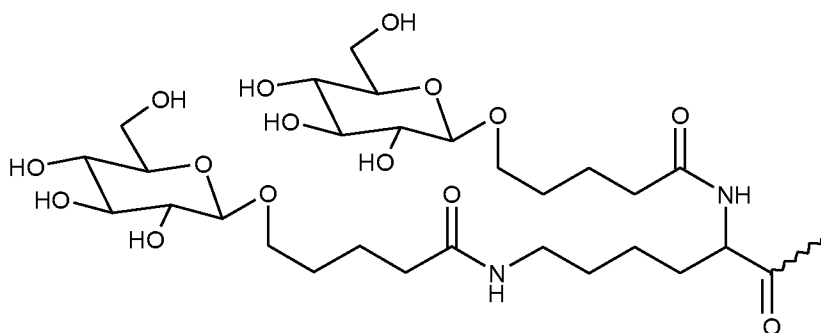


формули XVI,

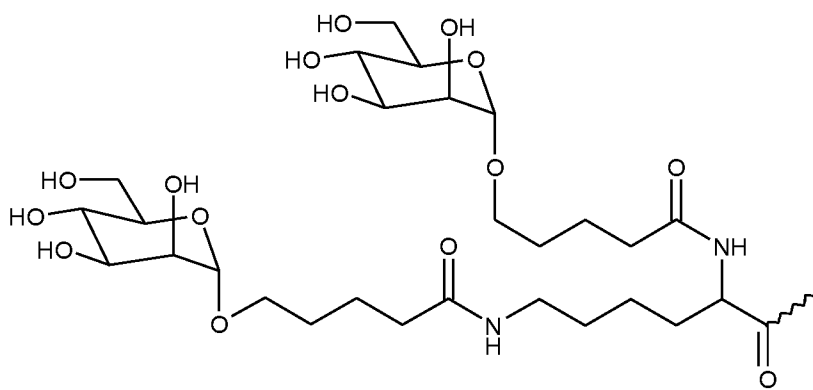
5



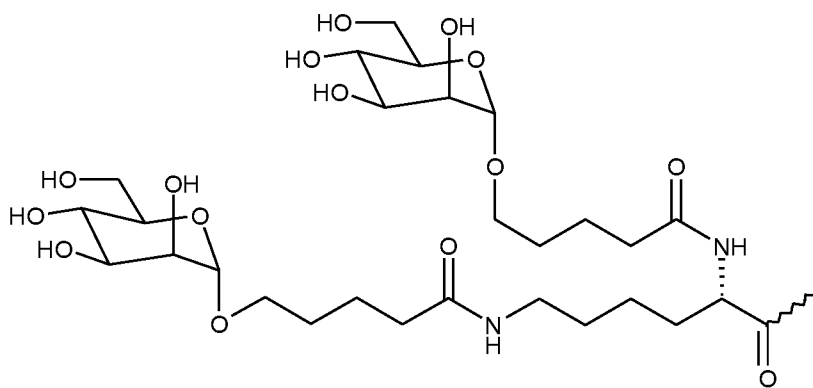
формули XVII,



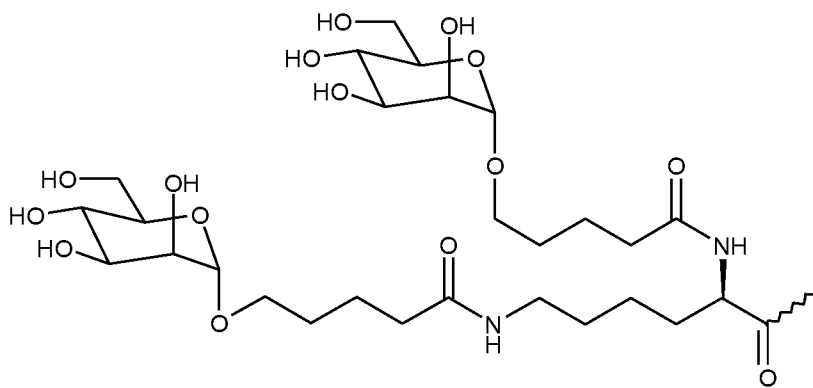
формули XVIII,



формули XIX,



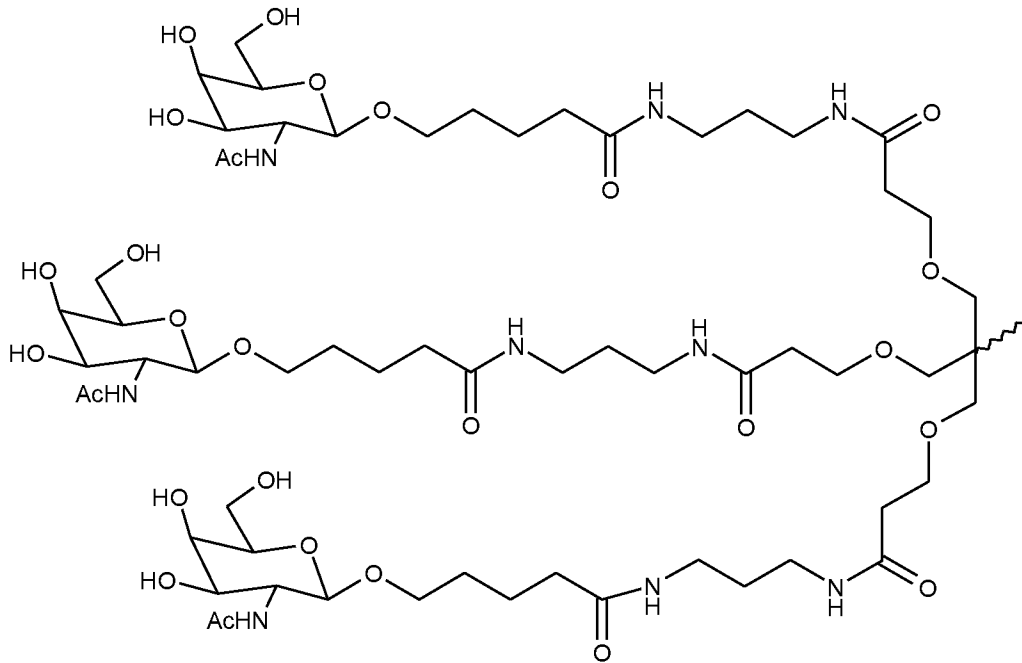
формули XX та



формули XXI.

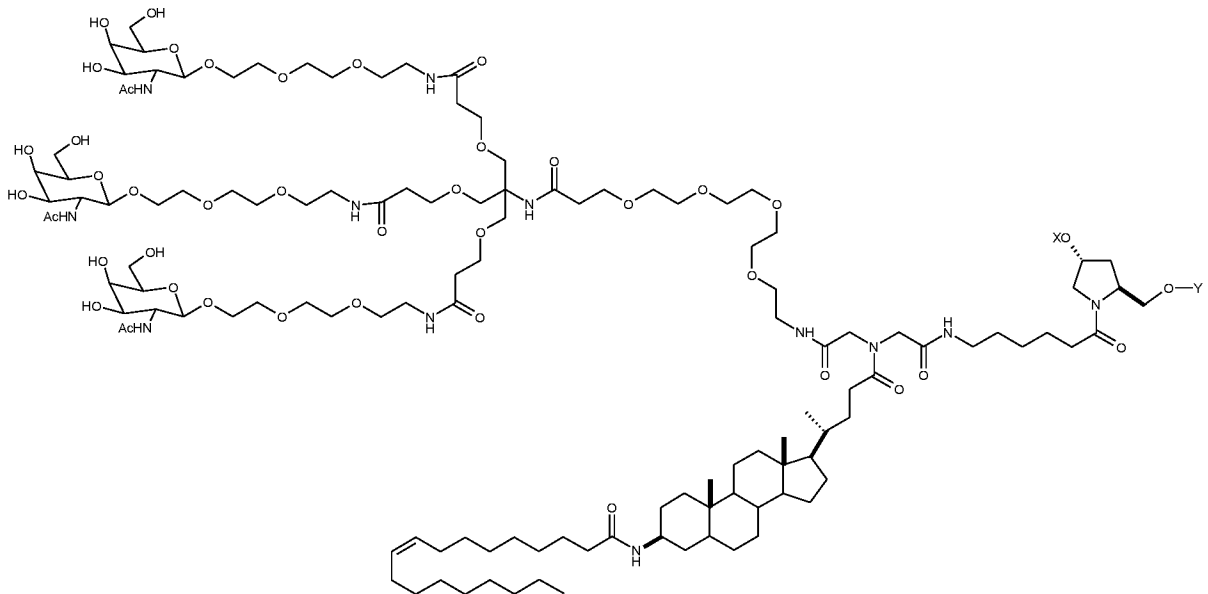
5

У деяких варіантах здійснення моносахаридом є N-ацетилгалактозамін (GalNAc). У деяких варіантах здійснення вуглевод містить декілька N-ацетилгалактозамінних ланок, таких як



формула I.

5 Інший ілюстративний вуглеводний кон'югат, який можна використовувати у варіантах здійснення, описаних у даному документі, включає без обмеження



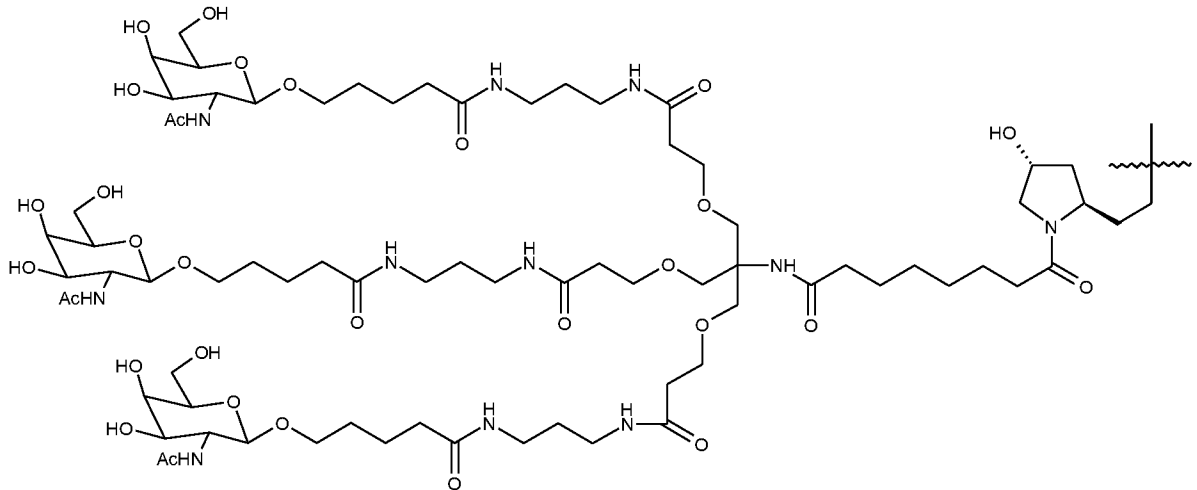
формулу XXII,

- 10 де якщо один із X або Y являє собою олігонуклеотид, то інший являє собою водень.
- У деяких варіантах здійснення за даним винаходом GalNAc або похідну GalNAc приєднані до засобу на основі dsRNA за даним винаходом через одновалентний лінкер. У деяких варіантах здійснення GalNAc або похідну GalNAc приєднані до засобу на основі dsRNA за даним винаходом через бівалентний лінкер. У деяких варіантах здійснення за даним винаходом GalNAc або похідну GalNAc приєднане до засобу на основі dsRNA за даним винаходом через
- 15 тривалентний лінкер. У деяких варіантах здійснення вуглеводний ліганд містить три N-ацетилгалактозамінні ланки, приєднані через тривалентний лінкер («GalNAc₃»).
- У деяких варіантах здійснення двонитковий засіб на основі dsRNA містить один GalNAc або похідну GalNAc, приєднані до засобу на основі dsRNA. У деяких варіантах здійснення
- 20 двонитковий засіб на основі dsRNA містить багато (наприклад, 2, 3, 4, 5 або 6) GalNAc або похідних GalNAc, кожне з яких незалежно приєднане до багатьох нуклеотидів двониткового

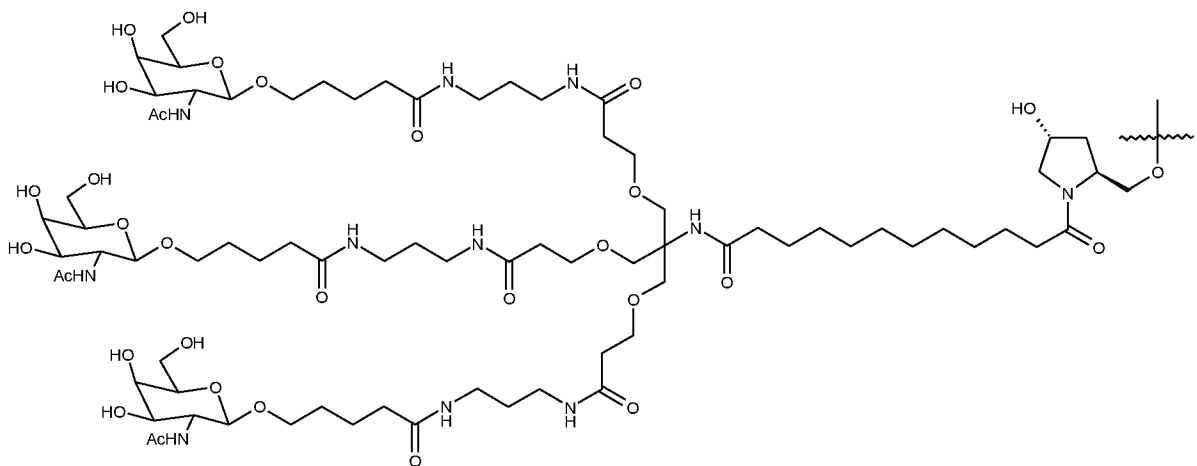
засобу на основі dsRNA через багато одновалентних лінкерів.

Додаткові вуглеводневі кон'югати, придатні для використання в даному винаході, включають ті, що описані в публікаціях згідно з РСТ №№ WO2014/179620 та WO2014/179627, які включені в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких кон'югатів.

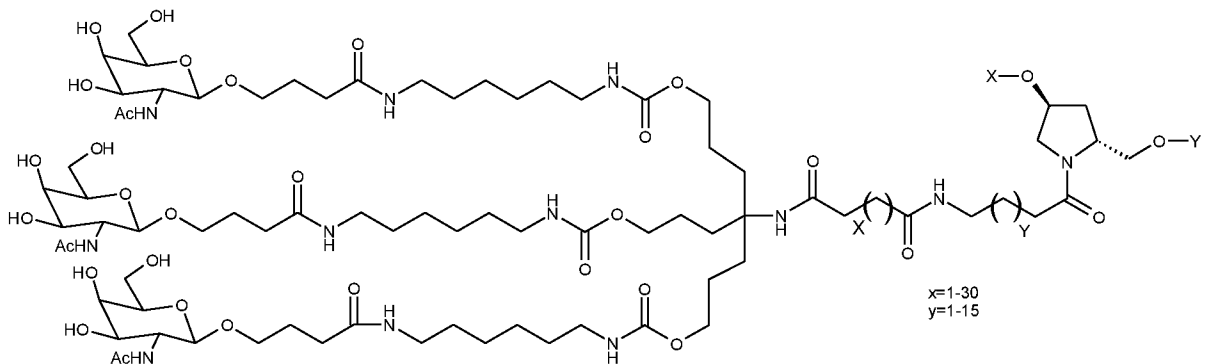
5 Необмежувальні приклади вуглеводневих кон'югатів засобу на основі dsRNA з лінкерами, які можна використовувати в композиціях та способах, розкритих у даному документі, включають без обмеження



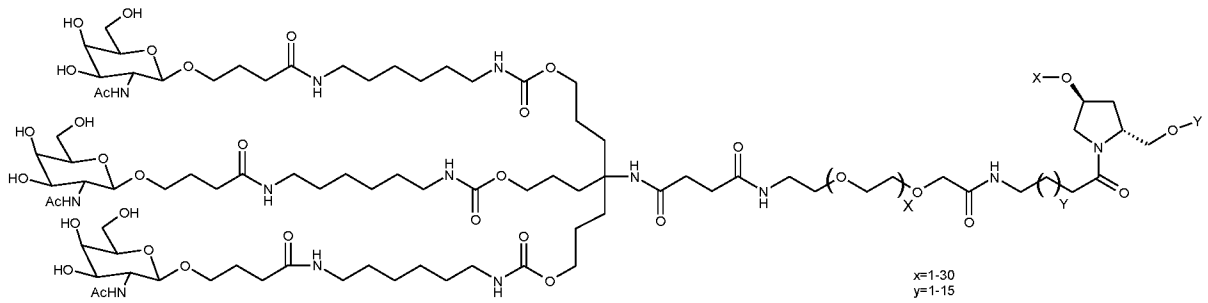
10 формулу XXIII,



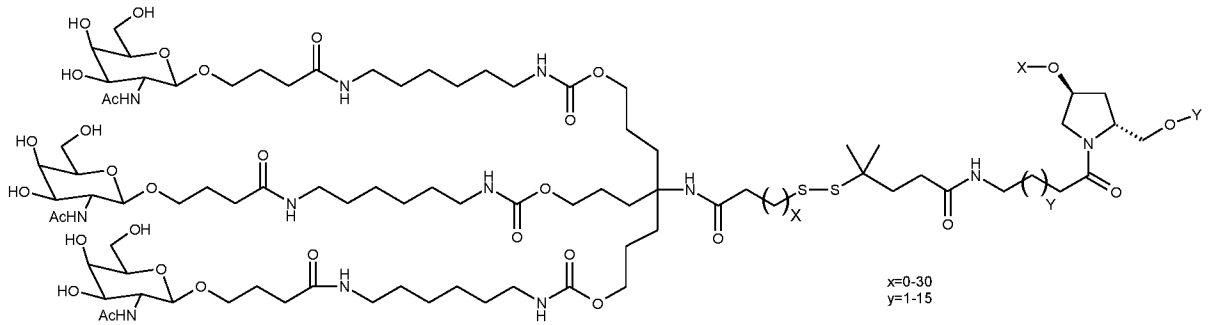
формулу XXIV,



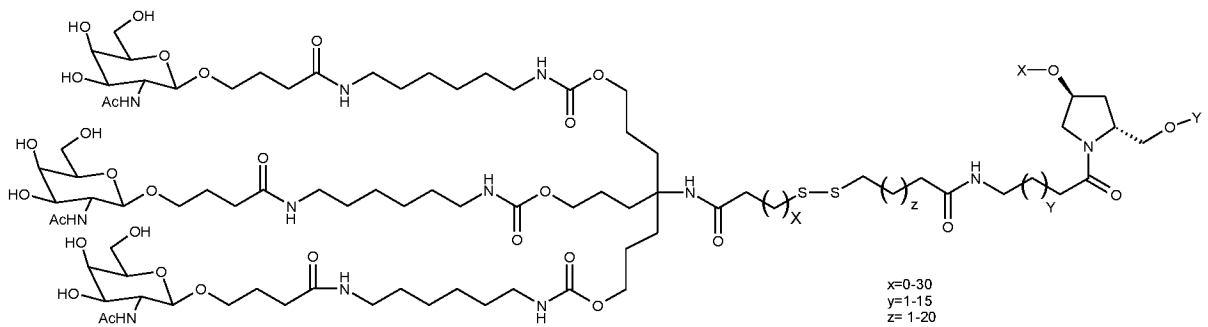
15 формулу XXV,



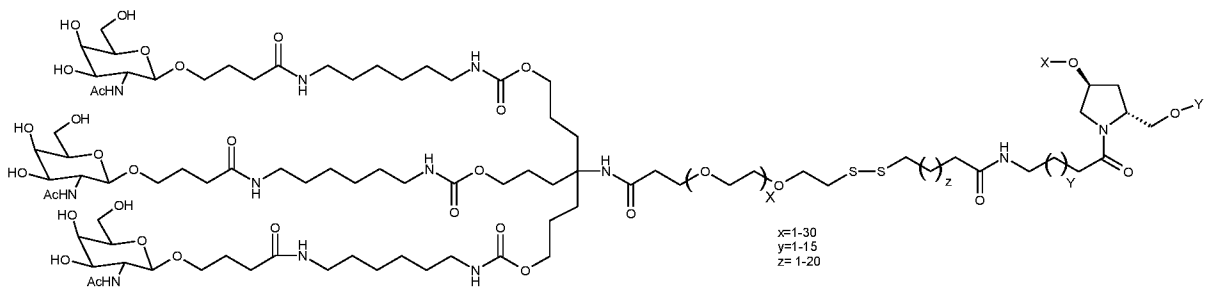
формулу XXVI,



5 формулу XXVII,

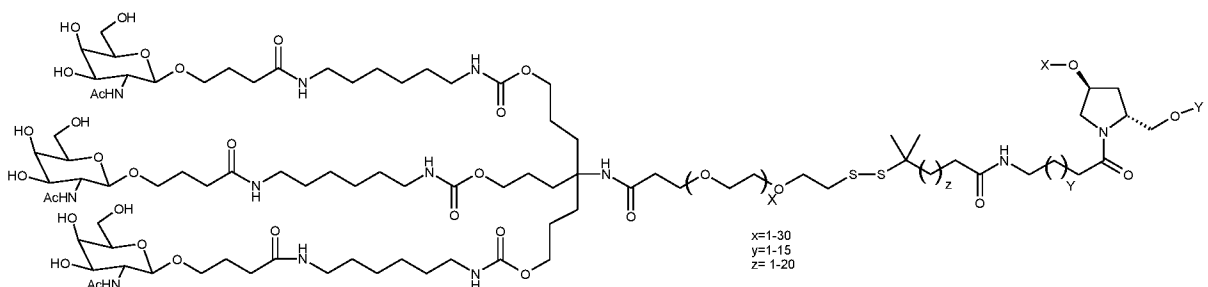


формулу XXVIII,



10

формулу XXIX та



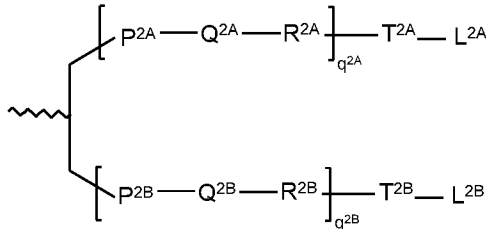
формулу XXX,

15

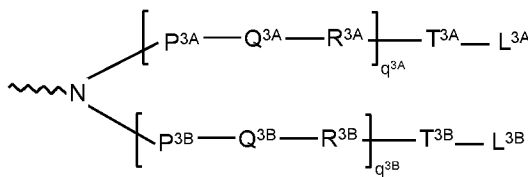
де якщо один із X або Y являє собою олігонуклеотид, то інший являє собою водень.

У деяких варіантах здійснення композицій та способів, розкритих у даному документі, ліганд являє собою одне або більше похідних «GalNAc» (N-ацетилгалактозаміну), приєднаних через бівалентний або тривалентний розгалужений лінкер.

5 У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA, розкритий у даному документі, кон'югований з бівалентним або тривалентним розгалуженим лінкером, вибраним із групи структур, продемонстрованих під будь-якою з формул (XXXI) – (XXXIV):

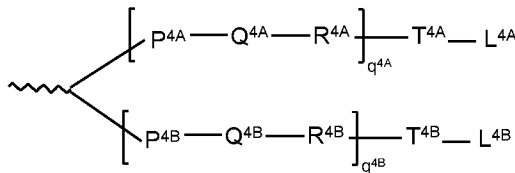


формула XXXI,

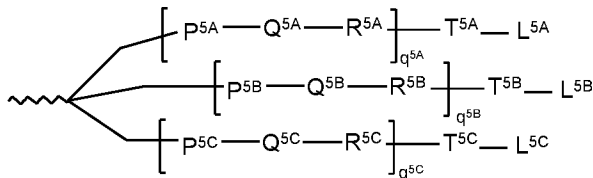


10

формула XXXII,



формула XXXIII або



формула XXXIV;

15

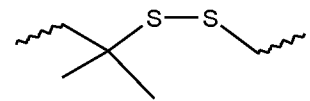
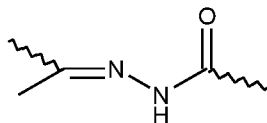
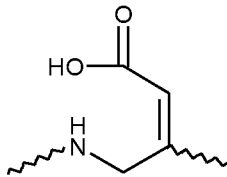
де

q2A, q2B, q3A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B і q5C у кожному випадку незалежно становлять 0-20, і де повторювана ланка може бути однаковою або відмінною;

20 кожен із P2A, P2B, P3A, P3B, P4A, P4B, P5A, P5B, P5C, T2A, T2B, T3A, T3B, T4A, T4B, T4A, T5B, T5C у кожному випадку незалежно є відсутнім, являє собою CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH2, CH2NH або CH2O;

Q2A, Q2B, Q3A, Q3B, Q4A, Q4B, Q5A, Q5B, Q5C, незалежно в кожному випадку відсутні, являють собою алкілен, заміщений алкілен, де одна або більше метиленових груп можуть перериватися або закінчуватися одним або кількома з O, S, S(O), SO2, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C або C(O);

25 кожен з R2A, R2B, R3A, R3B, R4A, R4B, R5A, R5B, R5C у кожному випадку незалежно є відсутнім, являє собою NH, O, S, CH2, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,

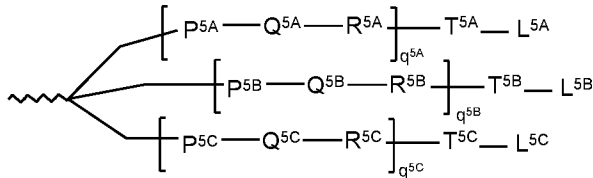




або гетероциклілі;

L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} і L^{5C} являють собою ліганд; тобто кожен з них у кожному випадку незалежно являє собою моносахарид (такий як GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олігосахарид або полісахарид; і R^a являє собою Н або бічний ланцюг амінокислоти. У разі засобів на основі dsRNA, що служать для інгібування експресії цільового гена, особливо застосовними є тривалентні лінкери, за допомогою яких кон'югують похідні GalNAc, такі як лінкери формули (XXXIV):

5



формула XXXIV,

10

де L^{5A} , L^{5B} і L^{5C} являють собою моносахарид, такий як похідну GalNAc.

Приклади придатних двовалентних і тривалентних розгалужених лінкерних груп, що кон'югують похідні GalNAc, включають без обмеження структури, наведені вище у вигляді формул I, VI, X, IX і XII.

15

В. Лінкери

У деяких варіантах здійснення кон'югат або ліганд, описані в даному документі, можуть бути приєднані до олігонуклеотиду засобу на основі dsRNA за допомогою різних лінкерів, які можуть бути розщеплюваними або нерозщеплюваними.

20

Термін «лінкер» або «лінкерна група» означає органічний фрагмент, який з'єднує дві частини сполуки, наприклад ковалентно зв'язує дві частини сполуки. Лінкери, зазвичай, містять прямий зв'язок або атом, такий як атом кисню або сірки, ланку, таку як NR8, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, або ланцюг з атомів, такий як без обмеження заміщений або незаміщений алкіл, заміщений або незаміщений алкеніл, заміщений або незаміщений алкініл, арилалкіл, арилалкеніл, арилалкініл, гетероарилалкіл, гетероарилалкеніл, гетероарилалкініл, гетероцикліалкіл, гетероцикліалкеніл, гетероцикліалкініл, арил, гетероарил, гетероцикліл, циклоалкіл, циклоалкеніл, алкіларилалкіл, алкіларилалкеніл, алкіларилалкініл, алкеніларилалкіл, алкеніларилалкеніл, алкеніларилалкініл, алкініларилалкіл, алкініларилалкеніл, алкініларилалкініл, алкілгетероарилалкіл, алкілгетероарилалкеніл, алкілгетероарилалкініл, алкенілгетероарилалкіл, алкенілгетероарилалкеніл, алкенілгетероарилалкініл, алкінілгетероарилалкіл, алкінілгетероарилалкеніл, алкінілгетероарилалкініл, алкілгетероцикліалкіл, алкілгетероцикліалкеніл, алкілгетероцикліалкініл, алкенілгетероцикліалкіл, алкенілгетероцикліалкеніл, алкенілгетероцикліалкініл, алкіларил, алкеніларил, алкініларил, алкілгетероарил, алкенілгетероарил, алкінілгетероарил, в якому один або більше метиленів можуть перериватися або закінчуватися O, S, S(O), SO₂, N(R8), C(O), заміщеним або незаміщеним арилом, заміщеним або незаміщеним гетероарилом, заміщеним або незаміщеним гетероциклічним радикалом; де R8 являє собою водень, ацил, аліфатичний або заміщений аліфатичний радикал. У деяких варіантах здійснення лінкер містить приблизно 1-24, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 або 8-16 атомів.

40

Розщеплювана лінкерна група являє собою групу, яка є достатньо стабільною поза клітиною, але яка після проникнення до цільової клітини розщеплюється з вивільненням двох частин, які утримуються лінкером разом. У деяких варіантах здійснення розщеплювана лінкерна група розщеплюється у щонайменше приблизно 10 разів, 20 разів, 30 разів, 40 разів, 50 разів, 60 разів, 70 разів, 80 разів, 90 разів або більше або у щонайменше приблизно 100 разів швидше у цільовій клітині або за першої еталонної умови (яка може, наприклад, бути вибрана для імітації або моделювання внутрішньоклітинних умов), ніж у крові суб'єкта або за другої еталонної умови (яка може, наприклад, бути вибрана для імітації або моделювання умов, наявних у крові або сироватці крові).

50

Розщеплювані лінкерні групи чутливі до засобів розщеплення, наприклад рН, окисно-відновлювального потенціалу або наявності руйнівальних молекул. Зазвичай, засоби для

розщеплення є більш поширеними або виявляються на вищих рівнях або мають вищі значення активності всередині клітин, ніж у сироватці крові або крові. Приклади таких руйнівальних засобів включають: окисно-відновні засоби, які вибирають для конкретних субстратів або які не мають специфічності до субстратів, зокрема, наприклад, окисні або відновні ферменти або відновні засоби, такі як меркаптани, присутні в клітинах, які можуть руйнувати лінкерну групу, розщеплювану в результаті зміни окисно-відновного потенціалу, шляхом відновлення; естерази; ендосоми або засоби, які можуть створювати кисле середовище, наприклад такі, що приводять до рН, який становить п'ять або нижче; і ферменти, які можуть гідролізувати або руйнувати лінкерну групу, розщеплювану кислотами, діючи як універсальна кислота, пептидази (які можуть бути субстрат-специфічними) і фосфатази.

Розщеплювана лінкерна група, така як дисульфідний зв'язок, може бути сприйнятливою до рН. рН сироватки крові людини становить 7,4, у той час як середній внутрішньоклітинний рН є трохи нижчим і перебуває в діапазоні приблизно 7,1-7,3. Ендосоми характеризуються більш кислим рН в діапазоні 5,5-6,0, а лізосоми характеризуються ще більш кислим рН, який становить близько 5,0. Деякі лінкери будуть містити розщеплювану лінкерну групу, яка розщеплюється за переважного значення рН, завдяки чому катіонний ліпід вивільняється з ліганду всередину клітини або у бажаний компартмент клітини.

Лінкер може містити розщеплювану лінкерну групу, яка розщеплюється конкретним ферментом. Тип розщеплюваної лінкерної групи, включеної до складу лінкера, може залежати від клітини, яка підлягає націлюванню. Наприклад, ліганд, що націлюється на печінку, може бути зв'язаний з катіонним ліпідом за допомогою лінкера, який містить естерну групу. Клітини печінки є багатими на естерази, і, таким чином, лінкер може розщеплюватися більш ефективно в клітинах печінки, ніж у типах клітин, які не є багатими на естерази. Інші типи клітин, багаті на естерази, включають клітини легені, кіркової речовини нирки і сім'яника.

Лінкери, які містять пептидні зв'язки, можна застосовувати у разі націлювання на інші типи клітин, багаті на пептидази, такі як клітини печінки та синовіоцити.

Зазвичай, придатність кандидатної розщеплюваної лінкерної групи можна оцінити за допомогою тестування здатності руйнівного засобу (або умови) розщеплювати кандидатну лінкерну групу. Крім того, бажаним також є тестування здатності кандидатної розщеплюваної лінкерної групи витримувати розщеплення в крові або у разі контакту з іншою тканиною, що не є мішенню. Таким чином, можна визначити відносну сприйнятливість до розщеплення між першою та другою умовою, де першу вибирають як показник розщеплення в цільовій клітині, а другу вибирають як показник розщеплення в інших тканинах або біологічних рідинах, наприклад у крові або сироватці крові. Оцінювання можна проводити в безклітинних системах, в клітинах, в культурі клітин, в культурі органу або тканин або у цілих тварин. Може бути корисним виконувати початкові оцінювання в умовах безклітинної системи або культури і підтверджувати їх шляхом додаткових оцінювань у цілих тварин. У переважних варіантах здійснення застосовні кандидатні сполуки розщеплюються щонайменше в приблизно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 або 100 разів швидше в клітині (або в умовах *in vitro*, вибраних для імітації внутрішньоклітинних умов) порівняно з кров'ю або сироваткою крові (або умовами *in vitro*, вибраними для імітації позаклітинних умов).

i. Лінкерні групи, розщеплювані в результаті зміни окисно-відновного потенціалу

У деяких варіантах здійснення розщеплювана лінкерна група являє собою лінкерну групу, розщеплювану в результаті зміни окисно-відновного потенціалу, яка розщеплюється в результаті відновлення або окиснення. Прикладом лінкерної групи, розщеплюваної в результаті відновлення, є дисульфідна лінкерна група (-S-S-). Для визначення того, чи є кандидатна розщеплювана лінкерна група придатною «лінкерною групою, розщеплюваною в результаті відновлення» або, наприклад, придатною для використання з конкретним фрагментом засобу на основі dsRNA і конкретним націлювальним засобом, можна звернутися до способів, описаних у даному документі. Наприклад, кандидата можна оцінювати шляхом інкубування з дитіотреїтолом (DTT) або іншим відновлювальним засобом із використанням реагентів, відомих з рівня техніки, які імітують швидкість розщеплення, яка спостерігалася б у клітині, наприклад цільовій клітині. Кандидати також можна оцінювати в умовах, які вибирають для імітації умов у крові або сироватці крові. У деяких варіантах здійснення кандидатні сполуки розщеплюються не більше, ніж на приблизно 10 % у крові. У деяких варіантах здійснення застосовні кандидатні сполуки руйнуються у щонайменше приблизно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 або у приблизно 100 разів швидше в клітині (або в умовах *in vitro*, вибраних для імітації внутрішньоклітинних умов) порівняно з кров'ю (або умовами *in vitro*, вибраних для імітації позаклітинних умов). Швидкість розщеплення кандидатних сполук можна визначити за допомогою стандартних аналізів ферментативної кінетики в умовах, вибраних для імітації

внутрішньоклітинного середовища, і порівняно з умовами, вибраними для імітації позаклітинного середовища.

ii. Фосфатні розщеплювані лінкерні групи

У деяких варіантах здійснення розщеплюваний лінкер містить фосфатну розщеплювану лінкерну групу. Фосфатна розщеплювана лінкерна група розщеплюється засобами, які руйнують або гідролізують фосфатну групу. Прикладом засобу, який розщеплює фосфатні групи в клітинах, є ферменти, такі як клітинні фосфатази. Прикладами фосфатних лінкерних груп є -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. У деяких варіантах здійснення фосфатна лінкерна група являє собою -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S- або -O-P(S)(H)-S-. У деяких варіантах здійснення фосфатна лінкерна група являє собою -O-P(O)(OH)-O-. Цих кандидатів можна оцінювати за допомогою способів, аналогічних описаним вище.

iii. Розщеплювані кислотою лінкерні групи

У деяких варіантах здійснення розщеплюваний лінкер містить розщеплювану кислотою лінкерну групу. Розщеплювана кислотою лінкерна група являє собою лінкерну групу, яка розщеплюється в кислих умовах. У деяких варіантах здійснення лінкерні групи, розщеплювані кислотами, розщеплюються в кислому середовищі з рН приблизно 6,5 або нижче (наприклад, приблизно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 або нижче) або за допомогою засобів, таких як ферменти, які можуть діяти як універсальна кислота. У клітині специфічні органели з низьким рН, такі як ендосоми та лізосоми, можуть забезпечувати середовище для розщеплення лінкерних груп, розщеплюваних кислотами. Приклади лінкерних груп, розщеплюваних кислотами, включають без обмеження гідразони, естери та естери амінокислот. Групи, розщеплювані кислотами, можуть мати загальну формулу -C=NN-, C(O)O або -OC(O). У деяких варіантах здійснення атом вуглецю, приєднаний до атому кисню естерної групи (алкоксигрупи), являє собою арильну групу, заміщену алкільну групу або третинну алкільну групу, таку як диметилпентил або трет-бутил. Цих кандидатів можна оцінювати за допомогою способів, аналогічних описаним вище.

iv. Естерні лінкерні групи

У деяких варіантах здійснення розщеплюваний лінкер містить розщеплювану естерну лінкерну групу. Розщеплювана естерна лінкерна група розщеплюється в клітинах під дією ферментів, таких як естерази й амідази. Приклади естерних розщеплюваних лінкерних груп включають без обмеження естерні похідні алкіленових, алкеніленових та алкініленових груп. Естерні розщеплювані лінкерні групи мають загальну формулу -C(O)O- або -OC(O)-. Цих кандидатів можна оцінювати за допомогою способів, аналогічних описаним вище.

v. Пептидні розщеплювані групи

У деяких варіантах здійснення розщеплюваний лінкер містить пептидну розщеплювану лінкерну групу. Пептидна розщеплювана лінкерна група розщеплюється в клітинах під дією ферментів, таких як пептидази та протеази. Пептидні розщеплювані лінкерні групи являють собою пептидні зв'язки, утворювані між амінокислотами з одержанням олігопептидів (наприклад, дипептидів, трипептидів тощо) і поліпептидів. Пептидні розщеплювані групи не включають амідну групу (-C(O)NH-). Амідна група може бути утворена між будь-якими алкіленами, алкеніленами або алкініленами. Пептидний зв'язок являє собою особливий тип амідного зв'язку, утворюваний між амінокислотами з одержанням пептидів і білків. Пептидна розщеплювана група, зазвичай, обмежена пептидним зв'язком (тобто амідним зв'язком), утвореним між амінокислотами з одержанням пептидів і білків, і не включає всю амідну функціональну групу. Пептидні розщеплювані лінкерні групи мають загальну формулу -NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, де RA і RB являють собою R-групи двох сусідніх амінокислот. Цих кандидатів можна оцінювати за допомогою способів, аналогічних описаним вище.

V. Доставка засобу на основі dsRNA

Доставку засобу на основі dsRNA за даним винаходом в клітину, наприклад у клітину в організмі суб'єкта, такого як суб'єкт-людина, можна здійснювати за допомогою різних способів. Наприклад, доставку можна здійснювати шляхом приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA за даним винаходом або *in vitro*, або *in vivo*. *In vivo* доставку також можна здійснювати безпосередньо шляхом уведення суб'єкту композиції, що містить засіб на основі dsRNA. Як альтернатива, доставку *in vivo* можна проводити опосередковано шляхом уведення одного або більше векторів, які кодуєть засіб на основі dsRNA і керують його експресією. Такі альтернативні варіанти додатково описані нижче.

Загалом будь-який спосіб доставки молекули нуклеїнової кислоти (*in vitro* або *in vivo*) може

бути пристосований для використання з засобом на основі dsRNA за даним винаходом (див., наприклад, Akhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 та WO94/02595, які включені в даний документ за допомогою посилання щодо ідей стосовно таких способів доставки). Що стосується доставки *in vivo*, то чинники, які враховують в контексті доставки молекули засобу на основі dsRNA, включають, наприклад, біологічну стабільність молекули, що доставляється, запобігання неспецифічним ефектам і накопичення молекули, що доставляється, у цільовій тканині.

Що стосується системного введення засобу на основі dsRNA для лікування захворювання, то РНК може бути модифікована або, як альтернатива, доставлена за допомогою системи доставки лікарського засобу; обидва способи служать для запобігання швидкому руйнуванню dsRNA ендо- та екзонуклеазами *in vivo*. Модифікація РНК або фармацевтичний носій або фармацевтичний наповнювач також може сприяти націлюванню композиції, що містить засіб на основі dsRNA, на цільову тканину та уникненню небажаних нецільових ефектів. Молекули засобу на основі dsRNA можуть бути модифікованими шляхом хімічного кон'югування, наприклад вуглеводневий кон'югат, описаний вище.

VI. Фармацевтичні композиції

Даний винахід також включає фармацевтичні композиції та склади, що включають засоби на основі dsRNA за даним винаходом. У деяких варіантах здійснення в даному документі передбачені фармацевтичні композиції, що містять засіб на основі dsRNA, описаний у даному документі, і фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтичні композиції, які містять засіб на основі dsRNA, застосовні для лікування захворювання або порушення, асоційованого з експресією або активністю гена HBV. Такі фармацевтичні композиції складають залежно від способу доставки. Одним прикладом є композицій, які складені для системного введення за допомогою доставки парентеральним шляхом, наприклад шляхом підшкірної (SC), внутрішньом'язової (IM) або внутрішньовенної (IV) доставки. У певних варіантах здійснення даний винахід передбачає композиції, які складають для органоспецифічної (наприклад, печінкової) внутрішньоартеріальної, внутрішньопухлинної, внутрішньошкірної, інтравіреальної ін'єкції, місцевого офтальмологічного, офтальмічного (краплі для очей) шляху введення, шляху введення через розпилення, місцевого офтальмологічного або інших місцевих шляхів доставки, введення за допомогою супозиторію або перорального введення. У переважних варіантах здійснення композиції вводять підшкірно.

Фармацевтичні композиції за даним винаходом можна вводити в дозах, достатніх для інгібування експресії гена HBV. У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA будуть вводити в дозі, що становить від приблизно 0,5 мг/кг до 50 мг/кг або від 0,3 мг/кг до 20 мг/кг, або від 3 мг/кг до 10 мг/кг на дозу або переважно від 3 мг/кг до 10 мг/кг на дозу. Наприклад, dsRNA можна вводити за приблизно 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг або 50 мг/кг на одну дозу. У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA вводять в дозі, що становить від 50 мг до 900 мг.

Композиції можна одержувати та упаковувати у фіксованій дозі для суб'єкта, незалежно від його маси. Ілюстративні рівні дозування можна підрахувати за допомогою множення дози на кілограм маси тіла на масу тіла середньостатистичного суб'єкта. Наприклад, вважають, що маса середньостатистичної дорослої людини, зазвичай, становить приблизно 70 кг.

Режим повторюваного введення доз може передбачати регулярне введення терапевтичної кількості засобу на основі dsRNA, як, наприклад, один раз на місяць, один раз на два місяці або один раз на три місяці. У переважних варіантах здійснення засіб на основі dsRNA вводять не частіше, ніж один раз на місяць. Після здійснення схеми первинного лікування засоби лікування можна вводити з меншою частотою.

Фармацевтичну композицію можна вводити протягом невизначеного періоду часу, наприклад суб'єкта з однією або більше ознаками або симптомами інфекції, спричиненої HBV, наприклад, визначуваним антигеном HBV або ДНК HBV, включаючи cccDNA HBV. У деяких варіантах здійснення проводять лікування засобом на основі dsRNA протягом дискретного або визначеного періоду часу і здійснюють функціональневилікування.

Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що на дози і часові рамки, необхідні для ефективного лікування суб'єкта, можуть впливати певні фактори, зокрема без обмеження тяжкість захворювання або порушення, види попереднього лікування, загальний стан здоров'я або вік суб'єкта та інші наявні захворювання. Крім того, лікування суб'єкта терапевтично ефективною кількістю композиції може передбачати курс лікування або декілька курсів лікування. Розрахунки ефективних доз і періодів напівжиття *in vivo* для окремих засобів на основі dsRNA, охоплених даним винаходом, можна проводити із використанням традиційних методологій або на основі *in vivo* тестування із використанням відповідної тваринної моделі, яка описана в іншому місці

даного документа.

A. Наповнювачі

«Фармацевтичний носій» або «фармацевтичний наповнювач» являє собою фармацевтично прийнятний розчинник, суспендувальний засіб або будь-яке інше фармакологічно інертне середовище-носіє для доставки однієї або більше нуклеїнових кислот в організм тварини. Такі засоби добре відомі з рівня техніки.

B. Інші компоненти

Композиції за даним винаходом можуть додатково містити інші допоміжні компоненти, що традиційно містяться у фармацевтичних композиціях, за рівнів використання, визначених у рівні техніки. Таким чином, наприклад, композиції можуть містити додаткові сумісні фармацевтично активні матеріали, такі як наприклад, протисвербіжні засоби, в'язучі засоби, місцеві анестетики або протизапальні засоби, або можуть містити додаткові матеріали, застосовні для фізичного складання композицій за даним винаходом у вигляді різних лікарських форм, такі як консерванти, антиоксиданти й стабілізатори. Однак, такі матеріали, за додавання, не повинні суттєво перешкоджати прояву видів біологічної активності компонентів композицій за даним винаходом. Склади можна піддавати стерилізації та за необхідності змішувати з допоміжними засобами, наприклад консервантами, стабілізаторами, змочувальними засобами, емульгаторами, солями для впливу на осмотичний тиск або буферами тощо, які не взаємодіють несприятливим чином з нуклеїною(ими) кислотою(ами) складу.

У деяких варіантах здійснення фармацевтичної композиції, наведені в даному винаході, включають (a) одну або більше сполук, що являють собою засіб на основі dsRNA, і (b) один або більше засобів, які діють за механізмом, відмінним від RNAi, і які застосовні під час лікування порушення, асоційованого з HBV порушення. Приклади таких засобів включають без обмеження протизапальний засіб, засоби проти стеатозу, протівірусний засіб та засіб проти фіброзу.

Крім того, інші речовини, зазвичай застосовувані для захисту печінки, такі як силімарин, також можна застосовувати в поєднанні із засобами на основі dsRNA, описаними в даному документі. Інші засоби, застосовні для лікування захворювань печінки, включають телбівудин, ентекавір та інгібітори протеаз, такі як телапревір та інші, розкриті, наприклад, у US2005/0148548, US2004/0167116, US2003/0144217 та US2004/0127488.

Токсичність і терапевтична ефективність таких сполук можуть бути визначені за допомогою стандартних фармацевтичних процедур на культурах клітин або експериментальних тваринах, наприклад, для визначення LD50 (доза, летальної для 50 % популяції) і ED50 (доза, терапевтично ефективною для 50 % популяції). Співвідношення доз, що обумовлюють токсичний і терапевтичний ефекти, являє собою терапевтичний індекс і його можна виразити як співвідношення LD50/ED50. У деяких варіантах здійснення переважними є сполуки, які характеризуються високими терапевтичними індексами.

Дані, одержані в аналізах на культурах клітин і в дослідженнях на тваринах, можна застосовувати при складанні діапазону доз для використання у людей. У даному винаході доза композицій, наведених у даному документі, зазвичай, входить у межі діапазону циркулювальних концентрацій, який включає ED50 зі слабкою токсичністю або без неї. Доза може варіювати в цьому діапазоні залежно від застосовної лікарської форми й використовуваного шляху введення. Для будь-якої сполуки, застосовуваної в способах, наведених у даному винаході, терапевтично ефективну дозу можна спочатку визначити за результатами аналізів на культурах клітин. Дозу можна складати в тваринних моделях з одержанням діапазону концентрацій сполуки або, за необхідності, поліпептидного продукту з цільовою послідовністю, що циркулюють у плазмі крові (наприклад, для досягнення зменшеної концентрації поліпептиду), яка включає IC50 (тобто концентрацію досліджуваної сполуки, за якої досягають напівмаксимального інгібування симптомів), що визначають у культурі клітин. Таку інформацію можна застосовувати для більш точного визначення доз, застосовних у людей. Рівні в плазмі крові можна вимірювати, наприклад, за допомогою високоефективної рідинної хроматографії.

Крім того для їх введення, обговореного вище, засоби на основі dsRNA, описані в даному документі, можна вводити в комбінації з іншими відомими засобами, ефективними під час лікування інфекції, спричиненої HBV. У кожному випадку лікар, що здійснює введення, може коригувати кількість і часові межі введення засобу на основі dsRNA, виходячи з результатів, спостережуваних у разі використання стандартних показників ефективності, відомих з рівня техніки або описаних у даному документі.

VII. Способи

Даний винахід також передбачає способи інгібування експресії HBV в клітині. Способи включають приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA, наприклад двонитковим засобом на основі dsRNA, за кількості, що є ефективною для інгібування експресії HBV в клітині,

з інгібуванням таким чином експресії HBV в клітині.

Приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA, наприклад дwonитковим засобом на основі dsRNA, можна здійснювати *in vitro* або *in vivo*. Приведення клітини в контакт *in vivo* із засобом на основі dsRNA передбачає приведення клітини в контакт або групи клітин в організмі суб'єкта, наприклад суб'єкта-людини, із засобом на основі dsRNA. Також можливі комбінації способів приведення клітини в контакт *in vitro* та *in vivo*. Приведення клітини в контакт може бути безпосереднім або опосередкованим, як обговорювалося вище. Більш того, приведення клітини в контакт можна виконувати за допомогою націлювального ліганду, зокрема будь-якого ліганду, описаного в даному документі або відомого з рівня техніки. У переважних варіантах здійснення націлювальний ліганд являє собою вуглеводний фрагмент, наприклад ліганд GalNAc₃, або будь-який інший ліганд, який спрямовує засіб на основі dsRNA до сайту, що становить інтерес.

У деяких варіантах здійснення способів за даним винаходом засіб на основі dsRNA вводять суб'єкту так, що засіб на основі dsRNA доставляється в специфічний сайт в організмі суб'єкта. Інгібування експресії гена HBV можна оцінювати за допомогою вимірювань рівня або зміни рівня mRNA HBV або білка HBV у зразку, одержаному з рідини або тканини з конкретного сайту в організмі суб'єкта. У переважних варіантах здійснення сайт вибирають з печінки та крові. Сайт також може являти собою підрозділ або підгрупу клітин або рідину, одержані з будь-якого із вказаних вище сайтів.

У деяких варіантах здійснення способи, розкриті в даному документі, є застосовними для лікування суб'єкта, що має інфекцію, спричинену HBV, наприклад суб'єкта, якому принесе користь зменшення експресії гена HBV або реплікації HBV. В одному аспекті даний винахід передбачає способи зниження рівня cccDNA вірусу гепатиту В у суб'єкта, інфікованого HBV. В іншому аспекті даний винахід передбачає способи зниження рівня антигена HBV, наприклад HBsAg або HBeAg, у суб'єкта, інфікованого HBV. В іншому аспекті даний винахід передбачає способи зниження вірусного навантаження HBV у суб'єкта, інфікованого HBV. Даний винахід також передбачає способи зниження рівня аланінамінотрансферази (ALT) або аспартатамінотрансферази (AST) у суб'єкта, інфікованого HBV (хоча тимчасове підвищення рівнів ALT або AST може бути асоційоване з виведенням вірусу). В одному аспекті даний винахід передбачає способи підвищення рівня антитіл до HBV у суб'єкта, інфікованого HBV. В іншому аспекті даний винахід передбачає способи лікування суб'єкта, що має інфекцію, спричинену HBV. В одному аспекті даний винахід передбачає способи лікування суб'єкта, що має асоційоване з HBV захворювання, наприклад інфекцію, спричинену вірусом гепатиту D, гепатит дельта, гострий гепатит В; гострий фульмінантний гепатит В; хронічний гепатит В; фіброз печінки; захворювання печінки на термінальній стадії або гепатоцелюлярну карциному. Також, оскільки інфекція, спричинена HDV, залежить від обов'язкових допоміжних функцій, що надаються HBV, для передачі, та суб'єкти, що мають інфекцію, спричинену HBV, також можуть мати інфекцію, спричинену HDV, у деяких варіантах здійснення способи лікування, описані в даному документі, є також застосовними для лікування суб'єкта, що має інфекцію, спричинену HDV, або асоційоване з HDV порушення, таке як інфекція, спричинена вірусом гепатиту В, інфекція, що являє собою хронічний гепатит В (CHB), інфекція, що являє собою хронічний гепатит В (CHB), цироз, печінкова недостатність та гепатоцелюлярна карцинома (HCC). У деяких варіантах здійснення способи (і шляхи використання) лікування за даним винаходом включають введення суб'єкту, наприклад людині, терапевтично ефективної кількості засобу на основі dsRNA за даним винаходом, що націлюється на ген HBV, або фармацевтичної композиції, що містить засіб на основі dsRNA за даним винаходом, що націлюється на ген HBV.

В одному аспекті даний винахід передбачає способи попередження щонайменше одного симптому у суб'єкта, що має інфекцію, спричинену HBV, наприклад наявність cccDNA HBV в сироватці крові або печінці; наявність ДНК HBV в сироватці крові; наявність антигена HBV в сироватці крові або печінці, наприклад HBsAg або HBeAg; підвищений рівень ALT; підвищений рівень AST; відсутність або низький рівень антитіл до HBV; враження печінки; цироз; гепатит дельта, гострий гепатит В; гострий фульмінантний гепатит В; хронічний гепатит В; фіброз печінки; захворювання печінки на термінальній стадії; гепатоцелюлярну карциному; подібний сироватковій хворобі синдром; анорексію; нудоту; блювання, слабку гарячку; міалгію; втомлюваність; порушені відчуття смакової гостроти та запаху (відраза до їжі та сигарет); біль у правому верхньому квадранті та епігастральний біль (періодичний, від легкого до помірного); енцефалопатію печінки; сонливість; порушення режиму сну; сплутаність свідомості; кому; асцит; шлунково-кишкову кровотечу; коагулопатію; розлиття жовчі; гепатомегалію (злегка збільшена, м'яка печінка); спленомегалію; еритему долонь; павукоподібну гемангіому; м'язову атрофію; павукоподібну ангіому; запалення кровоносних судин; варикозну кровотечу; периферійний набряк; гінекомастію; атрофію тестикул; порушення з боку черевних колатеральних вен (голова

медузи); рівні ALT вищі, ніж рівні AST; підвищені рівні гама-глутаміл-транспептидази (GGT) та лужної фосфатази (ALP), є не більшим, ніж 3-кратне значення ULN); злегка низькі рівні альбуміну; підвищені рівні заліза в сироватці крові; лейкопенію (тобто гранулоцитопенію); лімфоцитоз; підвищену швидкість осадження еритроцитів (ESR); скорочене виживання червоних клітин крові; гемоліз; тромбоцитопенію; пролонгацію міжнародного коефіцієнта нормалізації (INR); наявність в сироватці крові або печінці HBsAg, HBeAg, антитіло класу імуноглобуліна М (IgM) до корового білка гепатиту В (антитіло до HBc); антитіло до поверхневого білка гепатиту В (антитіло до HBs) або антитіло до е білка гепатиту В (антитіло до HBe) або ДНК HBV; підвищені рівні білірубину; гіперглобулінемію; наявність тканино-неспецифічних антитіл, таких як антитіла до гладеньких м'язів (ASMA) або антитіла до ядер (ANA) (10-20 %); наявність тканино-специфічних антитіл, таких як антитіла до щитовидної залози (10-20 %); підвищені рівні ревматоїдного фактору (RF); низький рівень тромбоцитів і лейкоцитів; лобулярний некроз з дегенеративними та регенеративними гепатоцелюлярними змінами та супутніми запаленнями або переважно центрилобулярний некроз, що виявляється чи не виявляється. Способи включають введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості засобу на основі dsRNA, наприклад dsRNA, або фармацевтичної композиції, що містить засіб на основі dsRNA, з попередженням таким чином щонайменше одного симптому у суб'єкта, що має порушення, який буде мати користь від зниження експресії гена HBV, такого як суб'єкт, що має інфекцію, спричинену HBV, або суб'єкт, що має інфекцію, спричинену як HBV, так і HDV.

В іншому аспекті даний винахід передбачає шляхи використання терапевтично ефективної кількості засобу на основі dsRNA за даним винаходом для лікування суб'єкта, наприклад суб'єкта, який буде мати користь від зниження або інгібування експресії гена HBV, такого як суб'єкт, що має інфекцію, спричинену HBV, або суб'єкт, що має інфекцію, спричинену як HBV, так і HDV.

У додатковому аспекті даний винахід передбачає шляхи використання засобу на основі dsRNA, наприклад dsRNA, за даним винаходом, що націлюється на ген HBV, або фармацевтичної композиції, що містить засіб на основі dsRNA, що націлюється на ген HBV, у виробництві лікарського препарату для лікування суб'єкта, наприклад суб'єкта, який буде мати користь від зниження експресії гена HBV або реплікації HBV, такого як суб'єкт, що має інфекцію, спричинену HBV, або суб'єкт, що має інфекцію, спричинену як HBV, так і HDV, та суб'єкт, що має порушення, за якого буде користь від зменшення експресії гена HBV, наприклад асоційоване з HBV захворювання.

В іншому аспекті даний винахід передбачає шляхи використання засобу на основі dsRNA, описаного в даному документі, для попередження щонайменше одного симптому у суб'єкта, що страждає від порушення, за якого буде користь від зниження або інгібування експресії гена HBV або реплікації HBV.

В додатковому аспекті даний винахід передбачає шляхи використання засобу на основі dsRNA, описаного в даному документі, у виробництві лікарського препарату для попередження щонайменше одного симптому у суб'єкта, що страждає від порушення, за якого буде користь від зниження або інгібування експресії гена HBV або реплікації HBV, такого як асоційоване з HBV захворювання.

У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA, що націлюється на HBV, вводять суб'єкту, що має інфекцію, спричинену HBV, або інфекцію, спричинену як HBV, так і HDV, або асоційоване з HBV захворювання так, що експресія одного або більше генів HBV, рівень сссDNA HBV, рівень антигена HBV, рівень вірусного навантаження HBV, рівень ALT або AST, наприклад, в клітині, тканині, крові або іншій тканині або рідині суб'єкта знижується або нормалізується на щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або більше в напрямку до нормального, коли засіб на основі dsRNA вводять суб'єкту.

Способи і шляхи використання за даним винаходом включають у деяких варіантах здійснення введення композиції, описаної в даному документі, так, що експресія цільового гена HBV є зниженою, як протягом приблизно 1 місяця. У деяких варіантах здійснення експресія цільового гена HBV є зниженою протягом більш тривалого періоду часу, наприклад щонайменше двох місяців, трьох місяців або довше. У деяких варіантах здійснення способи і шляхи використання за даним винаходом включають введення композиції, описаної в даному документі, що приводить до функціональноговиліковування.

Уведення dsRNA згідно зі способами і шляхами використання, описаними в даному документі, може привести до зниження тяжкості, ступеню прояву ознак, симптомів або рівня маркерів таких захворювань або порушень у пацієнта з інфекцією, спричиненою HBV, або інфекцією, спричиненою як HBV, так і HDV, або асоційованим з HBV захворюванням. Під «зниженням» у даному контексті розуміють клінічно значуще зниження такого рівня. Зниження

може становити, наприклад, на щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 98 % або до рівня, нижчого, ніж той, що можна виявити.

У деяких варіантах здійснення ефективність способів за даним винаходом можна відстежувати за допомогою виявлення або відстежування зниження щодо ступеню прояву симптому асоційованого з HBV захворювання. Такі симптоми можна оцінювати *in vitro* або *in vivo* з використанням будь-якого способу, відомих з рівня техніки.

Ефективність лікування захворювання можна оцінювати, наприклад, шляхом вимірювання прогресування захворювання, ремісії захворювання, тяжкості симптомів, зменшення болю, оцінки якості життя, дози лікарського препарату, необхідної для підтримання ефекту лікування, рівня маркера захворювання або будь-якого іншого вимірюваного параметра, відповідного вказаному захворюванню, лікування якого здійснюють. Контроль ефективності лікування шляхом вимірювання будь-кого з таких параметрів або будь-якої комбінації параметрів належить до компетенції фахівця в даній галузі. Наприклад, ефективність лікування СНВ можна оцінювати, наприклад, шляхом періодичного відстежування вірусного навантаження та рівнів трансамінази. Шляхом порівняння пізніших даних із вихідними даними лікар одержує показання того, чи є лікування ефективним. Контроль ефективності лікування шляхом вимірювання будь-кого з таких параметрів або будь-якої комбінації параметрів належить до компетенції фахівця в даній галузі. Стосовно введення засобу на основі dsRNA, що націлюється на HBV, або фармацевтичної композиції на його основі, «ефективний щодо» асоційованого з HBV захворювання означає, що введення клінічно придатним чином приводить до корисного ефекту у щонайменше статистично значущої частини пацієнтів, такого як поліпшення щодо симптомів, виліковування, зниження ступеню прояву захворювання, подовження життя, поліпшення якості життя або інший ефект, який, як правило, визначається як позитивний лікарями, компетентними в лікуванні інфекції, спричиненої HBV, або асоційованого з HBV захворювання та споріднених випадків.

Лікувальний ефект є очевидним, коли спостерігається клінічно значуще поліпшення одного або більше параметрів хворобливого стану або коли відсутнє погіршення або розвиток симптомів у тих випадках, коли вони, навпаки, прогнозувалися. Зазвичай, позитивна зміна вимірюваного показника захворювання щонайменше на 50 % і переважно щонайменше на 70 % або більше, може служити ознакою ефективного лікування. Про ефективність даного лікарського засобу, що являє собою засіб на основі dsRNA, або складу з таким лікарським засобом можна також робити висновок за допомогою експериментальної тваринної моделі даного захворювання, яка відома з рівня техніки. У разі використання експериментальної тваринної моделі ефективність лікування доведена в тому випадку, коли спостерігають статистично значуще зниження ознаки або ослаблення симптому.

Уведення засобу на основі dsRNA може знизити наявність сссDNA HBV в сироватці крові або печінці, наявність антигена HBV в сироватці крові або печінці, наприклад HBsAg або HBeAg; або нормалізувати рівні ALT або рівні AST, наприклад, в клітині, тканині, крові, сечі або іншому компартменті в організмі пацієнта на щонайменше 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % або 95 % або до рівня, нижчого, ніж той, що можна виявити аналізом, в напрямку до вищого рівня нормального значення для лабораторного значення або до нього.

Уведення засобу на основі dsRNA може сприяти виявленню або підвищенню наявності антитіл до HBV в сироватці крові або печінці, наприклад антитіл до HBsAg, наприклад, в клітині, тканині, крові, сечі або іншому компартменті в організмі пацієнта на щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або більше; або сприяти виявленню антитіл, якщо вони були невиявленними до лікування.

Завдяки ефектам інгібування щодо експресії HBV у деяких варіантах здійснення композиція за даним винаходом або фармацевтична композиція, одержана з неї, може підвищити якість життя.

Суб'єкти, які будуть мати користь від зниження або інгібування експресії гена HBV, являють собою тих, які мають інфекцію, спричинену HBV, або асоційоване з HBV захворювання або порушення, описані в даному документі.

Лікування суб'єкта, який буде мати користь від зниження або інгібування експресії гена HBV, включає терапевтичне і профілактичне лікування.

Даний винахід додатково передбачає способи і шляхи використання засобу на основі dsRNA або фармацевтичної композиції на його основі для лікування суб'єкта, який буде мати користь від зниження або інгібування експресії гена HBV, наприклад суб'єкта, що має асоційоване з HBV захворювання, в комбінації з іншими фармацевтичними або іншими терапевтичними способами, наприклад з відомими фармацевтичними препаратами або відомими терапевтичними способами, такими як, наприклад, такі, які застосовуються в даний час для лікування таких

порушень.

Наприклад, у деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA, що націлюється на один або більше генів HBV, вводять в комбінації з, наприклад, засобом, придатним для лікування асоційованого з HBV захворювання, описаного в даному документі. Наприклад, додаткові

5 терапевтичні засоби і терапевтичні способи, придатні для лікування суб'єкта, який буде мати користь від зниження експресії HBV, наприклад суб'єкта, що має асоційоване з HBV захворювання, включають засіб на основі dsRNA, що націлюється на різні частини геному HBV, протівірусний засіб, аналог нуклеотиду, аналог нуклеозиду, інгібітор зворотної транскриптази (наприклад, тенофовіру дизопроксилу фумарат (TDF), тенофовіру алафенамід, ламівудин, адефовіру дипівоксил, ентекавір (ETV), телбівудин, AGX-1009, емтрицитабін, клевудин,

10 ритонавір, дипівоксил, лобукавір, фамвір, FTC, N-ацетил-цистеїн (NAC), PC1323, терадигм-HBV, тимозин-альфа й ганцикловір), імуностимулятор (наприклад, пегільований інтерферон альфа-2а (PEG-IFN- α 2а), інтерферон альфа-2b, рекомбінантний людський інтерлейкін-7 та агоніст Toll-подібного рецептора 7 (TLR7)), терапевтичну вакцину (наприклад, GS-4774, DV-601 та TG1050),

15 інгібітор вірусного проникнення (наприклад, мірклудекс), олігонуклеотид, що інгібує секрецію або вивільнення HbsAg (наприклад, REP 9AC), інгібітор збирання капсиду (наприклад, Bay41-4109 та NVR-1221), інгібітор сссDNA (наприклад, IHVR-25) або інші терапевтичні засоби або процедури, наприклад трансплантанти печінки або хіміотерапевтичні засоби, для лікування асоційованого з HBV захворювання або будь-які комбінації вищенаведеного.

20 Суб'єкту, якому вводять засіб на основі dsRNA за даним винаходом, можна додатково вводити один або більше інших терапевтичних засобів, які діють відмінним від RNAi механізмом і які є застосовними під час лікування інфекції, спричиненої HBV. Ілюстративні терапевтичні засоби, які можна використовувати в комбінованій терапії за даним винаходом, включають імуномодулятори, які стимулюють імунну систему за допомогою, наприклад, посилення активності Т-хелперних клітин, дозрівання В-лімфоцитів, інгібування пригнічувачів Т-клітин та посилення експресії HLA I типу. Придатні імуномодулятори включають інтерферони, які характеризуються різноманітними властивостями, що включають протівірусні, імуномодуляторні та антипроліферативні ефекти.

Наприклад, в даний час лікування хронічного гепатиту В представляє собою терапію

30 інтерфероном, який вводять суб'єктам, у яких є задокументована інфекція, спричинена HBV, протягом щонайменше шести місяців, підвищений рівень печінкових ферментів (AST та ALT) та вірусу в крові, що активно ділиться (HBeAg- або ДНК-HBV-позитивні тести). Терапія інтерфероном- α надає довготривалу, стабільну ремісію захворювання у приблизно 35 % тих, що мають хронічний гепатит В, з нормалізацією рівня печінкових ферментів та втратою трьох маркерів активної інфекції (HBeAg, ДНК HBV та HbsAg). Суб'єктів з гострою інфекцією, спричиненою HBV, цирозом на термінальній стадії або іншими основними медичними

35 проблемами, зазвичай, не лікують інтерфероном.

Крім того, терапія інтерфероном для пацієнтів з асоційованим з HBV цирозом значно знижує розмір гепатоцелюлярної карциноми (HCC), особливо у пацієнтів з більшою кількістю ДНК HBV

40 у сироватці крові. У пацієнтів з HBeAg-позитивним компенсованим цирозом вірологічна та біохімічна ремісія після терапії інтерфероном пов'язана з поліпшеним виживанням. У пацієнтів з хронічною інфекцією, спричиненою HBV, виведення HBeAg після лікування інтерфероном- α асоційоване з поліпшеними клінічними результатами. Вважається, що стандартна тривалість терапії складає 16 тижнів. Пацієнти, які демонструють низький рівень реплікації вірусу в кінці стандартної схеми лікування, отримують найбільшу користь від подовженого лікування.

45

У деяких варіантах здійснення способи за даним винаходом включають введення інгібітору зворотної транскриптази суб'єкту, що має інфекцію, спричинену HBV, або асоційоване з HBV захворювання. У деяких варіантах здійснення способи за даним винаходом включають

50 введення інгібітора зворотної транскриптази й імуностимулятора суб'єкту, що має інфекцію, спричинену HBV, або асоційоване з HBV захворювання.

Засіб на основі dsRNA та додатковий терапевтичний засіб або засіб лікування можна вводити в той самий час або в тій самій комбінації, наприклад парентерально, або додатковий

55 терапевтичний засіб можна вводити як частину окремої композиції або в окремі моменти часу або за допомогою іншого способу, відомого з рівня техніки або описаного в даному документі.

Даний винахід також передбачає способи використання засобу на основі dsRNA або композиції, що містить засіб на основі dsRNA, описаний у даному документі, для зниження або інгібування експресії HBV в клітині. У ще додаткових аспектах передбачається використання засобу на основі dsRNA або композиції, що містить засіб на основі dsRNA, описаний в даному документі, для виробництва лікарського препарату для зниження або інгібування експресії гена

60 HBV в клітині. У ще інших аспектах даний винахід передбачає засіб на основі dsRNA або

композицію, що містить засіб на основі dsRNA, розкритий у даному документі, для використання для зниження або інгібування реплікації HBV в клітині. У ще додаткових аспектах передбачається використання засобу на основі dsRNA або композиції, що містить засіб на основі dsRNA, розкритий у даному документі, для виробництва лікарського препарату для

5 зниження або інгібування реплікації HBV в клітині. Способи і шляхи використання передбачають приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA, який розкритий у даному документі, і підтримання клітини протягом часу, достатнього для досягнення руйнування mRNA-транскрипту гена HBV, з інгібуванням таким чином експресії гена HBV або з інгібуванням реплікації HBV в клітині.

10 У вищезгаданих способах і шляхах використання клітину можна приводити в контакт *in vitro* або *in vivo*, тобто клітина може бути в організмі суб'єкта.

Клітина, придатна для лікування з використанням способів, розкритих у даному документі, може являти собою будь-яку клітину, яка експресує ген HBV, наприклад клітину, інфіковану HBV, клітину, що містить вектор експресії, що містить геном HBV або частину гена HBV, або

15 трансгенну мишу, що експресує ген HBV. Клітина, придатна для використання в способах і шляхах використання, розкритих у даному документі, може являти собою клітину ссавця, наприклад клітину примата (таку як клітина людини або клітина примата, відмінного від людини, наприклад клітина мавпи або клітина шимпанзе) або відмінну від клітини примата (таку як клітина миші, клітина пацюка або клітина іншого ссавця). У певних варіантах здійснення клітина

20 являє собою клітину, яка може бути інфікована HBV. У певних варіантах здійснення клітина являє собою клітину людини, наприклад клітину печінки людини.

Експресія гена HBV може бути інгібована в клітині на щонайменше 80 %, 85 %, 90 % або 95 % або більше, наприклад до рівня, нижчого ніж той, який можна виявити конкретним аналізом.

25 Реплікація HBV може бути інгібована в клітині на щонайменше 80 %, 85 %, 90 % або 95 % або більше, наприклад до рівня, нижчого ніж той, який можна виявити конкретним аналізом.

Способи і шляхи використання *in vivo*, розкриті в даному документі, можуть включати введення суб'єкту композиції, яка включає засіб на основі dsRNA, при цьому засіб на основі dsRNA включає нуклеотидну послідовність, яка є комплементарною щонайменше частині РНК-транскрипту гена HBV ссавця, що підлягає лікуванню. Якщо організм, який підлягає лікуванню, являє собою людину, композицію можна вводити за допомогою будь-якого із способів, відомих з

30 рівня техніки, включаючи без обмеження підшкірне, внутрішньовенне або внутрішньом'язове введення. У деяких варіантах здійснення композиції вводять за допомогою підшкірної ін'єкції. У деяких варіантах здійснення засіб на основі dsRNA складають так, щоб вводити повну дозу за допомогою однієї ін'єкції. У деяких варіантах здійснення даний винахід передбачає композиції, які складають для органоспецифічної (наприклад, печінкової) внутрішньоартеріальної, внутрішньопухлинної, внутрішньошкірної, інтравітреальної ін'єкції, місцевого офтальмологічного, офтальмологічного (краплі для очей) шляху введення, шляху введення через розпалення, місцевого офтальмологічного або інших місцевих шляхів доставки, введення за

40 допомогою супозиторію або перорального введення.

В одному аспекті даний винахід також передбачає способи для інгібування експресії гена HBV у ссавця, наприклад людини. Даний винахід також передбачає композицію, що містить засіб на основі dsRNA, який націлюється на ген HBV в клітині ссавця, для використання під час інгібування експресії гена HBV у ссавця. В іншому аспекті даний винахід передбачає

45 використання засобу на основі dsRNA, який націлюється на ген HBV в клітині ссавця, для виробництва лікарського препарату для інгібування експресії гена HBV у ссавця.

Способи і шляхи використання включають введення ссавцю, наприклад людині, композиції, що включає засіб на основі dsRNA, який націлюється на ген HBV в клітині ссавця, і підтримку дози для ссавця протягом часу, достатнього для досягнення руйнування mRNA-транскрипту гена HBV, з інгібуванням таким чином експресії гена HBV у ссавця.

50

У певних варіантах здійснення зниження в експресії гена можна оцінювати в зразку периферичної крові суб'єкта, якому вводиться засіб на основі dsRNA, за допомогою будь-яких способів, відомих з рівня техніки, наприклад qRT-PCR, описаної в даному документі. Зниження ступеню продукування білка можна оцінювати за допомогою будь-яких способів, відомих з рівня

55 техніки, та за допомогою способів, наприклад ELISA або вестерн-блотингу, описаних у даному документі. Клінічно прийнятні способи для визначення рівнів експресії гена і білка, застосовують, як придатні. У певних варіантах здійснення зразок пункційної біопсії печінки служить матеріалом тканини, який використовують для відстежування зниження експресії гена або білка HBV. У деяких варіантах здійснення зразок крові служить матеріалом тканини, який

60 використовують для відстежування зниження експресії гена або білка HBV.

У деяких варіантах здійснення підтвердження RISC-опосередкованого розщеплення мішені *in vivo* з подальшим введенням засобу на основі dsRNA здійснюють за допомогою проведення 5'-RACE або модифікацій протоколів, відомих з рівня техніки (Lasham A et al., (2010) *Nucleic Acid Res.*, 38 (3) p-e19) (Zimmermann et al. (2006) *Nature* 441: 111-4).

5 Даний винахід додатково проілюстрований наступними прикладами, які не слід тлумачити як обмежувальні.

ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД 1

СИНТЕЗ ЗАСОБУ НА ОСНОВІ dsRNA

10 Джерело реагентів

Там, де джерело реагенту конкретно не вказано, такий реагент можна одержати у будь-якого постачальника реагентів для молекулярної біології за стандартом якості/чистоти для використання в молекулярній біології.

Конструювання засобу на основі dsRNA

15 Як описано в WO/2016/077321, вибір конструкцій dsRNA, що націлюються на HBV, проводили за допомогою двох основних факторів: а) ефективності та б) необхідності залучати засоби зі спарюванням, близьким до ідеального, та більшим за 90 % покриттям фракцій величезного числа загальнодоступних послідовностей HBV всіх відомих генотипів (від А до Н). Вибір координат для засобу на основі РНК проводили щодо референтної послідовності геному HBV з NCBI під NC_003977.1 (№ доступу в GenBank GI:21326584 (SEQ ID NO:1)).
20 Конструювали, синтезували та проводили скринінг *in vitro* першого набору засобів на основі РНК, що передбачають модифікації структури-активності, зокрема різноманітні 2'-О-метил- та 2'-фтор-заміщені мотиви, відцентровані на двох суміжних ділянках геному HBV, які кодують поверхневий антиген (HbSAg) та полімерази HBV. Також конструювали, синтезували та
25 проводили скринінг *in vitro* другого набору засобів, що націлюються на додаткові ділянки в геномі HBV, зокрема положення 1581-1599 SEQ ID NO:1, ділянку, яка кодує HbSAg, полімерази та ген Х. Вибрані послідовності піддавали додатковій хімічній модифікації і тестуванню. Ці дуплексні конструкції представлені в WO2016/077321 (повний зміст якої включений у даний документ за допомогою посилання); докладний перелік немодифікованих нуклеотидних
30 послідовностей сенсової та антисенсової ниток HBV представлений в таблицях 3, 6, 12, 22 та 25 в WO2016/077321 та докладний перелік модифікованих нуклеотидних послідовностей сенсової та антисенсової ниток HBV представлений в таблицях 4, 7, 13, 23 та 26 в WO2016/077321. Результати з аналізу шляхом скринінгу, проведеного з цими засобами, також описані в тому документі.

35 За допомогою цих досліджень ідентифікували дуплекс AD-66810, що має антисенсову нитку з модифікованою нуклеотидною послідовністю 5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:13) і сенсову нитку з модифікованою нуклеотидною послідовністю 5'-gsusguGfcAfCfUfucgсиисаса-3' (SEQ ID NO:29), де а, с, g та u являють собою 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат та 2'-
40 О-метилуридин-3'-фосфат відповідно; Af, Cf, Gf та Uf являють собою 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат та 2'-фторуридин-3'-фосфат відповідно; і s являє собою фосфотіоатний зв'язок; та де N-ацетилгалактозаміновий фрагмент, N-[трис(GalNAc-алкіл)-амідодеканоїл]-4-гідроксипролінол (також відомий як (Нур-(GalNAc-алкіл)3) або вказаний у даному документі як L96) ковалентно прив'язаний до 3'-кінця сенсової
45 нитки.

Додаткове дослідження, описане в даному документі, проводили для ідентифікації ефективності та специфічності молекул засобу на основі dsRNA, і воно базувалося на попередньо ідентифікованій послідовності AD-66810, що націлюється на Х-транскрипт вірусу гепатиту В людини (HBV; U95551). Для досягнення цієї мети конструювали, синтезували та
50 тестували щодо активності *in vitro* ряд хімічно модифікованих засобів на основі dsRNA з використанням аналізу на основі репортера Dual-Luc та лінії клітин HepG2.2.15. Всі сполуки кон'югували з триантенарним лігандом у вигляді N-ацетилгалактозаміну (GalNAc) (L96), ковалентно прив'язаним до 3'-кінця сенсової нитки.

Синтез засобу на основі dsRNA

55 Послідовності сенсової й антисенсової нитки HBV синтезували в 1-мікромольному масштабі на синтезаторі Mermade 192 (BioAutomation) з використанням хімії фосфорамідатів за опосередкування твердої основи. Тверда основа являла собою скляну основу із заданим розміром пор (500 Å), навантажену спеціально розробленим лігандом GalNAc, або універсальну тверду основу (AM Biochemical). Допоміжні реагенти для синтезу, 2'-F та 2'-О-метил-РНК та
60 дезоксифосфорамідити, одержували від Thermo-Fisher™ (Мілуокі, штат Вісконсин, США) та

Hongene (Китай). 2'F, 2'-O-метил, GNA (глікольнуклеїнові кислоти), 5'-фосфат та модифікації видалення азотистої основи вводили з використанням відповідних фосфорамідитів. Синтез окремих ниток, кон'югованих із GalNAc на 3'-кінці, здійснювали на модифікованій GalNAc CPG-основі. Спеціально розроблену універсальну тверду CPG-основу застосовували для синтезу окремих антисенсових ниток. Час зв'язування для всіх фосфорамідитів (100 мМ в ацетонітрилі) становив 5 хвилин з використанням 5-етилтіо-1Н-тетразолу (ЕТТ) як активатора (0,6 М в ацетонітрилі). Фосфотіоатні зв'язки утворювали з використанням 50 мМ розчину 3-((диметиламінометиліден)аміно)-3Н-1,2,4-дитіазол-3-тіону (DDTT, одержаного від Chemgenes (Вілмінгтон, штат Массачусетс, США)) у безводному ацетонітрилі/піридині (1:1 об'єм/об'єм). Час окиснення становив 3 хвилини. Всі послідовності синтезували з видаленням зрештою групи DMT («без DMT»).

Після завершення твердофазного синтезу олігорибонуклеотиди відщеплювали від твердої основи, і з них видаляли захисні групи в запечатаних планшетах із 96 глибокими лунками з використанням 200 мкл реагенту, що являє собою водний метиламін, при 60 °С протягом 20 хвилин. Наприкінці стадії відщеплення та видалення захисних груп планшета для синтезу дозволяли нагрітися до кімнатної температури, і його вміст осаджували шляхом додавання 1 мл суміші ацетонітрил:етанол (9:1). Планшети охолоджували при -80 °С протягом 2 годин, і надосадову рідину обережно зливали за допомогою багатоканальної піпетки. Осад з олігонуклеотидами ресуспендували в 20 мМ буфера NaOAc та знесолювали з використанням колонки для ексклюзивної хроматографії HiTrap™ на 5 мл (GE Healthcare™) на системі AKTA Purifier, обладнаній пристроєм автоматичної подачі зразків A905 та колектором фракцій Frac 950. Знесолені зразки збирали в 96-лункові планшети. Зразки з кожної послідовності аналізували за допомогою LC-MS для підтвердження ідентичності, УФ-випромінювання (260 нм) для кількісного визначення, а вибраний набір зразків за допомогою ІЕХ-хроматографії для визначення чистоти.

Гібридизацію окремих ниток HBV здійснювали на автоматичному пристрої Тесал для маніпуляції з рідинами. Еквімолярну суміш сенсових та антисенсових окремих ниток об'єднували та забезпечували гібридизацію в 96-лункових планшетах. Після об'єднання окремих комплементарних ниток 96-лунковий планшет щільно запечатували та нагрівали в печі при 100°C протягом 10 хвилин, і йому дозволяли повільно досягти кімнатної температури протягом періоду 2-3 години. Концентрацію кожного дуплекса нормалізували до 10 мкМ в 1X PBS.

Абревіатури для мономерів модифікованих нуклеотидів, розкритих у даному документі, продемонстровані в таблиці 1. В таблиці 2 продемонстровано AD-66810 та засоби на основі dsRNA HBV, синтезовані з використанням способів, наведених вище.

Таблиця 1

Скорочення нуклеотидних мономерів, використовувани в представленні модифікованих послідовностей нуклеїнової кислоти

Слід розуміти, що, якщо не зазначено інше, ці мономери, якщо вони присутні в олігонуклеотиді, зв'язані між собою 5'-3'-фосфодіестерними зв'язками.

Скорочення	Нуклеотид(и)
A	аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфотіоат
As	аденозин-3'-фосфотіоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфотіоат
Cs	цитидин-3'-фосфотіоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфотіоат
Gs	гуанозин-3'-фосфотіоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфотіоат

Таблиця 1

Ts	5-метилуридин-3'-фосфотіоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфотіоат
Us	уридин-3'-фосфотіоат
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфотіоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфотіоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфотіоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотіоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфотіоат
s	фосфотіоатний зв'язок
L96	N-[трис(GalNAc-алкіл)-амідодеканол]-4-гідроксипролінол (або «Нур-(GalNAc-алкіл)3»)
(Agn)	аденозин-гліколь-нуклеїнова кислота (GNA)
(Asn)	аденозин-серинол-нуклеїнова кислота (SNA)
(Gsn)	гуанозин-серинол-нуклеїнова кислота (SNA)
dA	2'-дезоксиаденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксиаденозин-3'-фосфотіоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксцитидин-3'-фосфотіоат
dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфотіоат
dT	2'-дезокситимідин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимідин-3'-фосфотіоат
dU	2'-деоксиуридин
dUs	2'-деоксиуридин-3'-фосфотіоат

Таблиця 2

Модифіковані нуклеотидні послідовності кон'югованого з GalNAc засобу на основі dsRNA HBV

ID дуплексу	Сенсова послідовність (5'-3')	SEQ ID	Антисенсова послідовність (5'-3')	SEQ ID
AD-66810	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu	13
AD-192282	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfdCacsusu	14
AD-192289	gsusgugdAcdTucgcuucacaL96	11	usdGsuga(Asn)gcgaadGudGcacacsusu	15
AD-81890	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu	16
AD-81892	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gcgaaguGfcAfcacsusu	17
AD-192290	gsusgugdCdTucgcuucacaL96	12	usdGsuga(Asn)gcgaadGudGcacacsusu	15
AD-192283	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdAfcacsusu	18
AD-192291	gsusgugdAcdTucgcuucacaL96	11	usdGsugaa(Gsn)cgaadGudGcacacsusu	19
AD-192277	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu	20
AD-192284	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gcgaaguGfcAfdCacsusu	21
AD-192292	gsusgugdCdTucgcuucacaL96	12	usdGsugaa(Gsn)cgaadGudGcacacsusu	19
AD-192285	gsusgugdAcdTucgcuucacaL96	11	usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcacacsusu	22
AD-192293	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu	23
AD-192279	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)dCfGfaaguGfcAfcacsusu	24
AD-192286	gsusgugdCdTucgcuucacaL96	12	usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcacacsusu	22
AD-192294	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu	25
AD-192280	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gdCGfaaguGfcAfcacsusu	26
AD-192287	gsusgugdAcdTucgcuucacaL96	11	usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcdAcacsusu	27

Модифіковані нуклеотидні послідовності кон'югованого з GalNAc засобу на основі dsRNA HBV

ID дуплексу	Сенсова послідовність (5'-3')	SEQ ID	Антисенсова послідовність (5'-3')	SEQ ID
AD-192281	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	10	usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu	28
AD-192288	gsusgugcadCdTucgcuucacaL96	12	usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcdAcacsusu	27

ПРИКЛАД 2

СКРИНІНГ ДУПЛЕКСІВ ЗАСОБУ НА ОСНОВІ dsRNA IN VITRO

Аналіз за допомогою люциферази Dual-Glo®

5 Клітини Cos7 (ATCC®, Манассас, штат Вірджинія, США) вирощували майже до злиття за 37 °C в атмосфері 5 % CO₂ в DMEM (ATCC), з додаванням 10 % FBS, потім вивільняли з планшета шляхом обробки трипсином. Здійснювали трансфекцію клітин Cos7 дwonитковими засобами та psiCHECK2-HBV (вектор експресії, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує частину консенсусної послідовності HBV дикого типу; SEQ ID NO:5) або дwonитковими засобами та векторами psiCHECK2, що експресують нуклеотидну послідовність генотипу А, С, Е або F HBV (SEQ ID NO:6, 7, 8 або 9, відповідно) за допомогою додавання 5 мкл дуплексів РНК та 5 мкл плазмиди psiCHECK2-HBV (або psiCHECK2-HBV генотипу А, С, Е або F) на лунку, а також 5 мкл Opti-MEM® плюс 0,1 мкл Lipofectamine™ RNAiMax на лунку (Invitrogen™, Карлсбад, штат Каліфорнія, США, № за каталогом 13778-150) та потім інкубували за кімнатної температури протягом 15 хвилин. Суміш потім додавали до клітин, які ресуспендували в 35 мкл свіжого повного середовища. Трансфеговані клітини інкубували за 37 °C в атмосфері 5 % CO₂.

Через сорок вісім годин здійснювали трансфекцію засобів на основі dsRNA та плазмиди psiCHECK2; вимірювали активність люциферази світляка (контроль трансфекції) та Renilla (злита з цільовою послідовністю HBV). Спочатку середовище відділяли від клітин. Потім вимірювали активність люциферази світляка шляхом додавання 20 мкл реагенту на основі люциферази Dual-Glo® в кількості, рівній щодо об'єму культурального середовища, в кожен лунку та перемішували. Суміш інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин, потім вимірювали люмінесценцію (500 нм) на Spectramax® (Molecular Devices) з виявленням сигналу люциферази світляка. Активність люциферази Renilla вимірювали шляхом додавання 20 мкл реагенту Dual-Glo® Stop & Glo® кімнатної температури, його додавали в кожен лунку та планшети інкубували протягом 10-15 хвилин, потім знову вимірювали люмінесценцію з визначенням сигналу люциферази Renilla. Реагент Dual-Glo® Stop & Glo® гасить сигнал люциферази світляка та не перериває реакцію люмінесценції люциферази Renilla. Активність засобу на основі dsRNA визначали шляхом нормалізації сигналу Renilla (HBV) щодо сигналу світляка (контрольного) в межах кожної лунки. Абсолютне значення активності засобу на основі dsRNA потім оцінюють стосовно клітин, щодо яких здійснювали трансфекцію з тим самим вектором, але не обробляли засобом на основі dsRNA або обробляли засобом на основі dsRNA, що не націлюється. Всі реакції трансфекції здійснювали за n=2 або більше.

35 Результати цих аналізів з використанням засобів, зазначених в таблиці 2, представлені в таблиці 3.

Скринінг HepG2.2.15 та PLC in vitro

40 Клітини HepG2.2.15 та PLC (клітини гепатоми людини; ATCC® CRL-8024) вирощували майже до злиття при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂ в середовищах DMEM або EMEM (ATCC), з додаванням, відповідно, 10 % FBS (ATCC), потім вивільняли з планшета шляхом обробки трипсином. Зворотну трансфекцію здійснювали шляхом додавання 5 мкл дуплексів засобу на основі dsRNA на лунку в 96-лунковий планшет разом з 14,8 мкл Opti-MEM® плюс 0,2 мкл Lipofectamine™ RNAiMax на лунку Invitrogen™, Карлсбад, штат Каліфорнія, США, № за каталогом 13778-150) та інкубували за кімнатної температури протягом 15 хвилин. Потім додавали вісім мікролітрів повного середовища для росту без антибіотика, що містить 2 x 10⁴ клітин HepG2.2.15 або PLC. Клітини інкубували протягом 24, 48 та 72 годин до очищення РНК.

45 Результати цих аналізів з використанням засобів, зазначених в таблиці 2, представлені в таблиці 4.

Виділення тотальної РНК з використанням набору для виділення тотальної РНК MagMAX-96 (Applied Biosystem, Форер Сіті, штат Каліфорнія, США, № випуску: AM1830):

50 Клітини збирали і лізували в 140 мкл лізувального/зв'язувального розчину, потім перемішували протягом 1 хвилини при 850 об./хв. за допомогою Eppendorf™ Thermomixer (швидкість перемішування була однаковою протягом всього процесу). Дванадцять мікролітрів

магнітних гранул та суміш підсилювача лізування/зв'язування додавали до лізату клітин та перемішували протягом 5 хвилин. Магнітні гранули фіксували за допомогою магнітного стенда і надосадову рідину видаляли без зміщення гранул. Після вилучення надосадової рідини магнітні гранули промивали за допомогою розчину 1 для промивання (з додаванням ізопропанолу) та перемішували протягом 1 хвилини. Гранули знову фіксували і надосадову рідину видаляли. Потім гранули промивали за допомогою 150 мкл розчину 2 для промивання (з додаванням етанолу), фіксували та видаляли надосадову рідину. Потім додавали п'ятдесят мкл суміші ДНКаз (буфера ДНКазі MagMax turbo та Turbo ДНКазі) до гранул та перемішували їх протягом проміжку часу, що становив від 10 до 15 хвилин. Після перемішування додавали 100 мкл розчину для повторного зв'язування РНК та перемішували протягом 3 хвилин. Надосадову рідину видаляли та магнітні гранули промивали знову за допомогою 150 мкл розчину 2 для промивання, та перемішували протягом 1 хвилини, та повністю видаляли надосадову рідину. Магнітні гранули перемішували протягом 2 хвилин до висушування, потім елюювали РНК за допомогою 50 мкл води.

15 Синтез cDNA із використанням набору для зворотної транскрипції cDNA з великою ємністю ABI (Applied Biosystems, Фостер Сіті, штат Каліфорнія, США, № за каталогом 4368813)

Майстер-мікс із 2 мкл 10X буфера, 0,8 мкл 25X dNTP, 2 мкл випадкових праймерів, 1 мкл зворотної транскриптази, 1 мкл інгібітору РНКазі та 3,2 мкл H₂O на реакцію додавали до 10 мкл тотальної РНК. cDNA одержували з використанням термоциклера Bio-Rad® C-1000 або S-1000 (Геркулес, штат Каліфорнія, США) за допомогою наступних стадій: 25°C 10 хв., 37°C 120 хв., 85°C 5 с, зберігання при 4°C.

ПЛР у реальному часі

25 Два мкл cDNA додавали до майстер-міксу, що містить 0,5 мкл зонду TaqMan до людського GAPDH (Applied Biosystems, № за каталогом 4319413E), 1 мкл зонду TaqMan®, специфічного до SORF2, та 5 мкл майстер-міксу із зондом Lightcycler 480 (Roche, № за каталогом 04887301001) на лунку в 384-лункових планшетах (Roche, № за каталогом 04887301001). ПЛР у реальному часі здійснювали в системі для ПЛР у режимі реального часу LightCycler480 (Roche), із використанням DDct(RQ)-аналізу. Для розрахунку відносної кратної зміни дані в реальному часі аналізували з використанням способу DDct і нормалізували щодо аналізів, виконаних з клітинами, щодо яких здійснювали трансфекцію, за допомогою AD-1955, або клітинами з імітацією трансфекції.

Для розрахунку відносної кратної зміни дані в реальному часі аналізували з використанням способу DDct і нормалізували щодо аналізів, виконаних з клітинами, щодо яких здійснювали трансфекцію, за допомогою контрольного засобу на основі dsRNA, що не націлюється.

35 ПРИКЛАД 3

ТРАНСФЕКЦІЯ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ dsRNA, КОН'ЮГОВАНИХ З GALNAC, ЩО НАЦІЛЮЮТЬСЯ НА HBV, В СИСТЕМІ DUAL-LUC

40 Сайленсинг mRNA HBV, що ішов після трансфекції кожного з кон'югованих засобів на основі dsRNA, продемонстрований в таблиці 3. Кожний засіб на основі dsRNA тестували шляхом трансфекції в клітини Cos7 за концентрацій засобу на основі dsRNA, що становили 50 нМ, 10 нМ та 0,1 нМ. За заснованими на скринінгу результатами 7 з 20 засобів на основі dsRNA продемонстрували ефективність, порівнювану з вихідним AD-66810.

Таблиця 3

Результати скринінгу за допомогою Dual-Luc-аналізу кон'югованих засобів на основі dsRNA HBV, трансфікованих за 50 нМ, 10 нМ або 1 нМ

ID дуплексу	Середнє значення±SD залишкової кількості засобу на основі dsRNA HBV (%) ^a		
	50 нМ	10 нМ	0,1 нМ
AD-66810	43,18±5,33	43,83±3,07	108,98±13,64
AD-192282	51,82±2,45	58,09±12,10	121,63±7,49
AD-192289	71,82±12,28	84,84±6,00	115,35±16,01
AD-81890	47,09±3,36	53,70±7,58	112,10±15,95
AD-81892	62,70±1,42	55,04±6,21	107,79±14,23
AD-192290	78,23±5,63	77,77±6,00	98,24±4,13
AD-192283	54,62±3,97	46,70±9,86	113,80±21,17
AD-192291	73,97±6,80	64,32±5,52	111,71±10,18

Результати скринінгу за допомогою Dual-Luc-аналізу кон'югованих засобів на основі dsRNA HBV, трансфікованих за 50 нМ, 10 нМ або 1 нМ

ID дуплексу	Середнє значення±SD залишкової кількості засобу на основі dsRNA HBV (%) ^a		
	50 нМ	10 нМ	0,1 нМ
AD-192277	43,08±1,58	34,82±4,23	103,32±12,95
AD-192284	70,20±5,87	54,10±3,08	119,01±12,73
AD-192292	70,91±13,89	65,99±3,57	102,58±8,12
AD-192285	86,15±7,45	91,39±8,92	116,62±8,93
AD-192293	48,05±0,45	46,38±6,26	120,84±10,62
AD-192279	51,29±6,93	38,35±2,50	114,22±10,41
AD-192286	89,16±12,87	88,74±4,44	118,16±12,97
AD-192294	54,36±5,03	41,89±5,61	114,19±11,55
AD-192280	49,20±7,13	57,22±14,47	116,35±6,87
AD-192287	81,73±14,38	84,10±10,24	127,11±12,61
AD-192281	38,74±4,01	38,45±4,54	120,99±7,00
AD-192288	85,37±9,30	86,14±5,32	118,09±9,30

Скорочення: ID = ідентифікаційний номер; SD = середньоквадратичне відхилення.

^a Частка залишкової відносної експресії HBV (порівняно з контрольним трансфікованими клітинами) 48 годин після трансфекції набору засобів на основі dsRNA HBV для скринінгу.

ПРИКЛАД 4

ТРАНСФЕКЦІЯ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ dsRNA, КОН'ЮГОВАНИХ З GALNAC, ЩО НАЦІЛЮЮТЬСЯ НА HBV, В КЛІТИНИ HepG2.2.15

- 5 Сайленсинг mRNA HBV (mRNA PORF1 та SORF2, визначених з використанням прямого та зворотного праймерів та зонду TaqMan) в клітинах HepG2.2.15, що шов після трансфекції кожного з кон'югованих засобів на основі dsRNA, продемонстрований в таблиці 4. Загалом, більш стійкий сайленсинг вірусних транскриптів PORF1 та SORF2 спостерігали в клітинах HepG2.2.15 порівняно із сайленсингом, який спостерігали в системі з надлишковою експресією Dual-Luc, з 10 засобами на основі dsRNA, що характеризувались порівнюваною ефективністю з вихідною молекулою вихідного AD-66810. Подібну активність засобу на основі dsRNA спостерігали щодо mRNA PORF1 та SORF2, що й очікували через те, що цільові сайти засобу на основі dsRNA наявні в обох транскриптах.

Таблиця 4

Результати скринінгу кон'югованих засобів на основі dsRNA HBV, трансфікованих за 50 нМ, 10 нМ або 1 нМ, з використанням HepG2.2.15

ID дуплексу	% Залишкового PORF1 (10 нМ) ^a		% Залишкового PORF1 (0,1 нМ) ^a		% Залишкового SORF2 (10 нМ) ^a		% Залишкового SORF2 (0,1 нМ) ^a	
	Залишкового	SD	Залишкового	SD	Залишкового	SD	Залишкового	SD
AD-66810	22,9	0,2	114,3	22,4	22,2	0,3	110,0	19,3
AD-192282	29,7	2,2	84,9	1,2	28,5	1,3	79,9	1,6
AD-192289	71,1	13,7	83,8	9,9	72,7	16,2	92,1	10,8
AD-81890	34,2	7,1	85,5	19,6	33,7	9,1	93,4	26,6
AD-81892	32,9	0,1	82,2	8,5	28,1	2,6	79,9	9,0
AD-192290	72,9	19,3	86,0	7,6	63,3	9,2	92,9	12,7
AD-192283	38,7	18,5	82,0	18,7	31,0	14,5	80,2	12,9

Результати скринінгу кон'югованих засобів на основі dsRNA HBV, трансфікованих за 50 нМ, 10 нМ або 1 нМ, з використанням HepG2.2.15

ID дуплексу	% Залишкового PORF1 (10 нМ) ^a	SD	% Залишкового PORF1 (0,1 нМ) ^a	SD	% Залишкового SORF2 (10 нМ) ^a	SD	% Залишкового SORF2 (0,1 нМ) ^a	SD
AD-192291	62,9	16,1	80,2	17,6	54,0	13,3	86,2	20,1
AD-192277	33,9	15,4	74,2	17,4	29,0	11,9	76,9	15,7
AD-192284	33,4	8,5	82,4	6,5	25,9	8,2	78,6	2,7
AD-192292	52,2	5,3	80,1	0,9	47,1	6,2	84,4	7,8
AD-192285	85,5	1,0	85,8	10,6	73,1	8,5	84,8	2,9
AD-192293	26,9	1,8	79,1	21,9	24,0	1,7	79,7	16,3
AD-192279	27,2	4,5	81,0	11,1	22,7	4,7	77,8	13,7
AD-192286	91,6	2,5	92,4	5,8	80,3	4,7	93,1	4,6
AD-192294	25,7	2,1	78,2	4,3	23,1	1,5	78,6	10,8
AD-192280	39,7	11,8	83,9	20,8	30,1	8,6	83,0	8,9
AD-192287	66,1	1,2	81,1	7,5	59,3	6,3	80,9	7,5
AD-192281	28,1	8,0	79,6	11,3	23,2	5,2	78,9	4,6
AD-192288	73,1	0,2	95,4	14,5	62,5	7,6	104,4	13,3

Скорочення: SD = середньоквадратичне відхилення.

^a Частка залишкової відносної експресії HBV (порівняно з контрольним трансфікованими клітинами) 24 години після трансфекції набору засобів на основі dsRNA HBV для скринінгу.

Базуючись на вищенаведених аналізах, вибирали для подальших аналізів дуплекс AD-81890.

ПРИКЛАД 5

5 ОЦІНЮВАННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕ AD-81890 В АДЕНО-АСОЦІЙОВАНІЙ МИШАЧІЙ МОДЕЛІ HBV, ЩО ІШЛО ЗА ОДНОРАЗОВОЮ ПІДШКІРНОЮ ІН'ЕКЦІЄЮ

10 Фармакологічні властивості AD-81890 аналізували в адено-асоційованій мишачій моделі HBV (HBV-AAV). AAV8-HBV (SignaGen Laboratories) розводили в 1×PBS до кінцевої концентрації 2×10^{12} GC/мл. Самцям мишей C57BL/6, віком 6-8 тижнів, вводили внутрішньовенно через латеральну хвостову вену 2×10^{11} GC/миша у фіксованому об'ємі 100 мкл.

AD-81890 розводили стерильним 1×PBS та вводили у змінюваному об'ємі 10 мкл/г. Тварини отримали одноразову SC дозу AD-81890, що становила 0,3, 1 або 3 мг/кг, та кров збирали в дні -24, -2, 0, 14, 21, 33, 47, 59 та 74 після введення дози з ретроорбітального синуса, як описано в таблиці 5.

15

Схема дослідження за участю AAV-HBV одноразового введення дози AD-81890

Група	Сполука	Доза в день 0 (мг/кг)	Кіль-ть тварин	Моменти часу збору сироватки крові
1	PBS	0	9	Дні -24, -2, 0, 14, 21, 33, 47, 59, 74
2	AD-81890	0,3	9 ^a	
3		1	9	
4		3	9	

Скорочення: Кіль-ть = кількість; PBS = забуферений фосфатом сольовий розчин;

^an = 8 тварин в день 47; n = 6 в день 59; n = 5 в день 72, тварин піддавали евтаназії через поранення внаслідок боротьби.

Після збирання, крові дозволяли згортатися протягом 30 хвилин та потім центрифугували в мікроцентрифузі протягом 10 хв. за 13000 об./хв. та 4 °С. Сироватку крові аспігували та зберігали за - 20 °С.

Рівні білка поверхневого антигена вірусу гепатиту В визначали шляхом ELISA (BioTang, Уолтем, штат Массачусетс, США). Використовували білок HBsAg від US Biologics (Мемфіс, штат Теннессі, США) для одержання стандартної кривої. Зразки сироватки крові розводили в 1 × PBS (Gibco, Гейтерсберг, штат Меріленд, США) 1:2000 або 1:500 та аналізували з використанням протоколу для ELISA з незначними модифікаціями. Якщо коротко, 50 мкл/лунка розведеної сироватки крові або стандартного розчину поміщали в планшет та інкубували протягом 1 год. при 37 °С. Після такого інкубування в кожну лунку додавали 50 мкл/лунка ферментного кон'югату та планшет інкубували при 37 °С протягом 30 хв. Планшет промивали 3 рази за допомогою 300 мкл/лунка 1 × буфера для промивання, потім промокали допоки не видаляли всю рідину з лунок, додавали 100 мкл/лунка субстрату та планшети інкубували при 37 °С протягом 30 хв. Наприкінці додавали додаткові 100 мкл/лунка стоп-розчину та вимірювали поглинання за довжини хвилі 450 нм. В будь-якому випадку, коли підрахований рівень HBsAg потрапляв нижче нижнього граничного значення кількісного визначення (LLOQ) аналізу, значення записували як LLOQ (тобто 313 нг/мл).

Середні значення±SD концентрації HBsAg у сироватці крові у HBV-AAV-мишей після одноразової дози AD-81890 підшкірно (SC) продемонстровані на фігурі 2A. Середні значення±SD рівнів HBsAg у сироватці крові у HBV-AAV-мишей щодо початкового значення продемонстровані на фігурі 2B. Одноразова SC ін'єкція AD-81890 за концентрації 0,3, 1 або 3 мг/кг привела до ефективного та стабільного зниження концентрацій HBsAg в сироватці крові у HBV-AAV-мишей з максимальним значенням зниження 92 %, яке спостерігали на день 7 у групі, якій вводили найбільшу дозу (3 мг/кг) AD-81890. Максимальний рівень зниження підтримувався в групі, якій вводили найбільшу дозу, до дня 33, після чого рівні HBsAg починали повертатися в напрямку до початкового значення (фігура 2B). Проміжні значення зниження концентрацій HBsAg в сироватці крові спостерігали в групах, яким вводили дозу AD-81890 в 0,3 мг/кг та 1 мг/кг, з максимальним значенням зниження в день 7, яке становило 23 % та 72 % відповідно. Рівні HBsAg в групах, яким вводили дозу AD-81890 як 0,3 мг/кг, так і 1 мг/кг, поверталися до початкових рівнів до часу закінчення аналізу (день 74).

ПРИКЛАД 6

ОЦІНЮВАННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕ AD-81890 В АДЕНО-АСОЦІЙОВАНІЙ МИШАЧІЙ МОДЕЛІ HBV, ЩО ІШЛО ЗА БАГАТЬМА ПІДШКІРНІМИ ІН'ЄКЦІЯМИ

Фармакологічні властивості AD-81890 аналізували в адено-асоційованій мишачій моделі HBV (HBV-AAV). AAV8-HBV (SignaGen Laboratories) розводили в 1 × PBS до кінцевої концентрації 2×10¹² GC/мл. Самцям мишей C57BL/6, віком 6-8 тижнів, вводили внутрішньовенно через латеральну хвостову вену 2×10¹¹ GC/миша у фіксованому об'ємі 100 мкл.

Кожен з AD-66810 та AD-81890 розводили стерильним 1X DPBS та вводили у змінюваному об'ємі 10 мкл/г. Тварини отримували AD-66810 в концентрації 1 мг/кг, введений Q2Wx6, або одноразову дозу AD-81890 в концентрації 9 мг/кг або більше доз AD-81890 в концентрації 1 або 3 мг/кг, введених Q2Wx6 або QMx3. Сироватку крові збирали у тварин в декілька моментів часу, як описано в таблиці 6. Кров збирали з ретроорбітальних синусів, як описано в таблиці 6.

Таблиця 6

Схема дослідження за участю AAV-HBV багаторазового введення дози AD-81890

Група	Сполука	Доза в день 0 (мг/кг)	Схема введення	N=	Збирання сироватки крові
1	PBS	0	Q2Wx6	6	День -55, -27, -13, 0, 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98, 111, 126
2	AD-66810	1	Q2Wx6	6	
3	AD-81890	1	Q2Wx6	6	
4			QMx3	6	
5		3	Q2Wx6	6	
6			QMx3	6	
7			9	QMx1	

Зразки крові обробляли та проводили аналіз шляхом ELISA, як описано в попередньому прикладі. Результати продемонстровані в таблиці 7 нижче. Результати із значеннями середньоквадратичного відхилення продемонстровані на фігурі 3.

5

Таблиця 7

Результати дослідження за участю AAV-HBV багаторазового введення дози AD-81890, виражені як середня Log-кратна зміна

Засіб на основі dsRNA	мг/кг	Схема введення	Дні													
			-55	-27	-13	0	14	28	42	56	70	84	98	111	125	140
PBS	-	Q2Wx6	-0,04	-0,09	-0,05	0,00	0,06	-0,01	-0,11	-0,03	0,03	0,00	-0,03	-0,01	0,04	0,00
AD-66810	1	Q2Wx6	0,02	-0,05	0,00	0,00	-0,74	-0,77	-1,41	-1,84	-1,91	-2,12	-1,78	-1,29	-0,97	-0,81
AD-81890	1	Q2Wx6	0,02	-0,04	0,06	0,00	-0,59	-0,76	-0,89	-1,02	-1,13	-1,23	-0,95	-0,95	-0,39	-0,13
	1	QMx3	0,06	0,01	0,06	0,00	-0,51	-0,32	-0,73	-0,51	-0,79	-0,63	-0,45	-0,20	-0,11	0,09
	3	Q2Wx6	0,03	-0,04	0,02	0,00	-1,30	-1,73	-2,49	-2,57	-2,61	-2,77	-2,03	-1,59	-1,16	-0,53
	3	QMx3	-0,02	0,00	0,03	0,00	-1,30	-1,06	-1,56	-1,32	-1,75	-1,53	-1,15	-0,75	-0,38	-0,30
	9	QMx1	0,06	-0,03	0,00	0,00	-2,71	-2,60	-2,03	-1,16	-0,81	-0,45	-0,29	-0,07	-0,04	-0,01

Спостерігали дозозалежний рівень HBsAg у сироватці крові в мишачій моделі AAV8-HBV після введення AD-81890. Максимальне значення зниження HBsAg, що становило приблизно 2,7 log₁₀ спостерігали після одноразового введення дози AD-81890, що становила 9 мг/кг, або q2w x 6 введення 3 мг/кг. Тварини, що отримували 3 мг/кг q2w x 6, мали стабільне значення зниження HBsAg, що становило більше, ніж 2 log₁₀, загалом протягом близька 8 тижнів.

Ці дослідження in vivo продемонстрували, що AD-81890 є ефективним для зниження значення HBsAg в сироватці крові в мишачій моделі HBV-AAV.

ПРИКЛАД 7

СПЕЦИФІЧНИЙ НЕЦІЛЬОВИЙ АНАЛІЗ AD-81890

Для оцінки ефективності нецільової активності антисенсової нитки AD-81890 використовували комбінацію біоінформатичних способів in silico та способів in vitro.

Біоінформатика

Набір засобів на основі dsRNA, що націлюються на ген «Х» вірусу гепатиту В (HBV) підтипу ауw (ID нуклеотидів в GenBank U95551; GeneID в NCBI: 7276; SEQ ID NO:49) з використанням спеціалізованих R- та Python-скриптів. Кільцевий геном HBV U95551 має довжину, що становить 3182 основи, та CDS-ділянка гена «Х» кодується положеннями 1376-1840 за записом в NCBI. Деталі конструювання засобу на основі dsRNA та спосіб скринінгу представлені вище та в WO2016/077321.

Скринінг з трансфекцією засобів на основі dsRNA кон'югованих з GalNAc, щодо нецільового виявлення в клітинах HepG2.2.15

Для вимірювання нецільового інгібування тестували відповідь ендогенно експресованих транскриптів за допомогою qPCR в лінії клітин-гепатоцитів HepG2.2.15. Клітини, трансфекували

в 96-лунковому планшеті (2 x 10⁴ клітин на лунку) за допомогою AD-81890 за концентрацій, які знаходились в діапазоні від 50 нМ до 5 фМ з використанням Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher). Через 24 години РНК виділяли з клітин з використанням набору для ізолювання тотальної РНК MagMAX™-96 (ThermoFisher); та одержували cDNA з використанням набору для зворотної транскрипції cDNA з великою ємністю ABI (ThermoFisher). Зразки аналізували щодо інгібування mRNA HBV та ефективності нецільового сайленсингу. Для кількісного підрахунку шляхом qPCR оцінювали експресію HBV з використанням двох різних спеціалізованих аналізів TaqMan, з використанням PORF-1 та SORF-2, які розпізнають різні ділянки вірусних транскриптів HBV.

Для оцінки нецільового сайленсингу для кількісного підрахунку використовували зонди TaqMan, специфічні до кожного з потенційних елементів, що не є мішенями (таблиця 8). qPCR проводили з використанням пристрою для ПЛР у реальному часі LightCycler 480 (Roche).

Таблиця 8

Потенційні послідовності, що не є мішенями для AD-81890

ID нецільової послідовності	Бал нецільового впливу	Неправильно спарені положення ^a	Номер доступу ^b	Цільовий ген
AD-81890 (Off-1)	3	19, 16, 13	NM_001040455.1	SIDT2
AD-81890 (Off-2)	3,4	14, 11, 10	NM_020861.1	ZBTB2

^a неспарені положення, визначені щодо антисенсової нитки в напрямку 5'-3', таким чином, положення 1 відповідає комплементарності основи з крайнім у 5'-кінці нуклеотидом антисенсової нитки AD-81890.

^b У випадку, коли декілька ID RefSeq пов'язані з тим самим цільовим геном та нецільовим профілем, зазначені обидва ID.

Для визначення надлишку цільового (HBV) та потенційного нецільового інгібування генів, визначали відносні рівні РНК шляхом нормалізації до експресії РНК людського GAPDH в тому самому зразку. Результати порівнювали з неспецифічними трансфікованими контрольними засобами на основі dsRNA, та помилка виражена, як середньоквадратичне відхилення. IC50 AD-81890 становило 0,803 нМ щодо транскрипту-мішені PORF1 та 0,766 нМ щодо транскрипту-мішені SORF2. Не спостерігали значного цільового нокдауну щодо транскриптів SIDT2 та ZBTB2 навіть за найвищої концентрації AD-81890.

Надлишок нецільового інгібування за допомогою AD-81890 оцінювали за допомогою дозозалежних скринінгів для 2 потенційних елементів, що не є мішенями, з ендогенно експресованих транскриптів в HepG2.2.15. AD-81890 не інгібував експресію SIDT2 або ZBTB2 за будь-яких з протестованих доз, в той час як інгібування HBV було дозозалежним. Апроксимація інформації щодо залежності від доз з використанням чотирьох-параметричної моделі апроксимації (XLfit) дає в результаті значення IC50, які становлять 803 пМ та 766 пМ для PORF-1 або SORF-2 відповідно.

ПРИКЛАД 8

АНАЛІЗ IN VITRO СПЕЦИФІЧНОСТІ AD-81890 З ВИКОРИСТАННЯМ RNA-SEQ В КЛІТИНАХ HepG2.2.15

Вимірювали вплив хімічних модифікацій засобу на основі dsRNA шляхом порівняння AD-66810 та AD-81890 в лінії клітин HepG2.2.15, що експресує HBV, з використанням зміни рівнів експресії по всьому транскриптому за допомогою RNA-Seq. Молекули AD-66810 та AD-81890 характеризувались однаковою нуклеотидною послідовністю, але відрізнялись заміщенням на гліколь-нуклеїнову кислоту (GNA) в положенні 6 з 5'-кінця молекули антисенсової нитки (див. таблицю 2).

Клітини HepG2.2.15, лінія клітин, одержана з HepG2, стабільно трансфектовані цілим геномом HBV, розводили культуральним середовищем до кінцевої концентрації, що становила 187500 клітин/мл, та 80 мкл переносили за допомогою піпетки в 96-лункові планшети, покриті колагеном (BD Bioscoat, № за каталогом 356407) з одержанням кінцевої концентрації, що становила 15000 клітин/лунка.

Стокові концентрації засобу на основі dsRNA розводили в 1X DPBS до наступних концентрацій: 1000 нМ або 100 нМ. RNAiMAX (ThermoFisher, № за каталогом 13778150) розводили за допомогою Opti-MEM (ThermoFisher, № за каталогом 31985062) в концентрації, що

становила 0,3 мкл RNAiMAX/10 мкл Opti-MEM, та інкубували протягом 5 хвилин за кімнатної температури. Після інкубації додавали 10 мкл/лунка в кожну лунку 96-лункових планшетів, покритих колагеном (BD Bioscoat, № за каталогом 356407), разом з 10 мкл/лунка придатного розведення засобу на основі dsRNA, обережно перемішували та інкубували протягом 20 хвилин за кімнатної температури. 80 мкл одержаної суспензії клітин додавали в кожну лунку з одержанням кінцевої щільності клітин 15000 клітин/лунка та кінцевих концентрацій засобу на основі dsRNA, що становили 100 нМ та 10 нМ. Клітини інкубували в інкубаторі з температурою 37 °C з 5 % CO₂ протягом 16-22 годин. Клітини розміщали таким чином, щоб для кожного експериментального стану було по 16 лунок та експеримент проводили двічі.

Для виділення РНК використовували набір для виділення тотальної РНК ThermoFisher RNAqueous-96 так, як зазначено в протоколі. Якщо коротко, після 16-22 годин надосадову рідину аспігували з кожної лунки, додавали 100 мкл/лунка 1X DPBS, щоб змити залишкове середовище, потім аспігували. Додавали 200 мкл лізувального/зв'язувального розчину в кожну лунку в ряду 1 та ряду 5 кожного планшета, перемішували за допомогою піпетки декілька разів та переносили до наступного ряду так, щоб 4 лунки/стан були об'єднані для забезпечення належного відновлення РНК. Це обумовлювало чотири репліки на стан. 100 мкл 100 % етанолу додавали в кожну лунку культурального планшета, що містить лізати, перемішували декілька разів та переносили в лунки планшета для фільтрування. За допомогою ряду стадій центрифугування (1900xg, 1 хвилина) зразки промивали за допомогою забезпеченого розчину для промивання, обробляли за допомогою реагентів ДНКаз та елюювали в 100 мкл води, що не містить нуклеаз. Концентрацію РНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 8000 (ThermoFisher).

РНК додатково обробляли за допомогою ДНКазі TURBO (Ambion). Кожен зразок РНК (≤10 мкг РНК/зразок) перемішували з 2 мкл ДНКазі, 10 мкл 10X буфера та водою, що не містить нуклеаз, до загального об'єму, що становив 100 мкл, потім інкубували за 37 °C протягом 30 хвилин. Після обробки ДНКазою РНК додатково очищали за допомогою набору для очищення RNeasy MinElute (Qiagen), як зазначено в протоколі. РНК елюювали в 30 мкл води, що не містить нуклеаз, та концентрацію РНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 8000. РНК зберігали за -80 °C. Цю РНК далі використовували для одержання бібліотеки cDNA за допомогою набору TruSeq Stranded Total RNA Library Prep (Illumina) та секвенували на настільному секвенаторі NextSeq500 (Illumina), все згідно інструкцій виробника. Проводили два повтори експерименту.

Щодо клітин HepG2.2.15 здійснювали трансфекцію в чотирьох екземплярах за допомогою 10 або 100 нМ AD-66810 або AD-81890 та культивували поруч з необробленими контролями протягом 24 г. РНК, виділену за допомогою набору Purelink RNA (ThermoFisher), використовували для одержання бібліотеки cDNA за допомогою набору TruSeq Stranded Total RNA Library Prep з використанням Ribo-Zero Human/Mouse/Rat для виснаження за rRNA (Illumina) та секвенували на настільному секвенаторі NextSeq500 (Illumina), все згідно інструкцій виробника. Загалом було об'єднано 40 зразків для проточної камери NextSeq 500/550 High Output вер. 2 (75 циклів) (Illumina). Проводили два повтори експерименту.

Необроблені ріди RNA-Seq фільтрували за допомогою мінімальних середніх балів якості, що становили 25, та мінімальної залишкової довжини, що становила 36, з використанням fastq-mcf. Відфільтровані ріди вирівнювали одночасно до геномів людини (hg19/GRCh37) та HBV (ID нуклеотидів в GenBank U95551; GeneID в NCBI : 7276) з використанням STAR (версія 2.4.2a). Через кільцеву структуру геному HBV 46 пар основ повторювались на кінці лінеаризованої версії послідовності HBV для того, щоб дозволити рідам картувати точку розриву. Однозначно вирівняні ріди, що картувалися як екзони, підраховували за допомогою featureCounts (версія 1.5.0. Всі зразки характеризувались >5М картованими рідами. Аналіз диференційної експресії генів проводили в R (версія 3.4.1) з використанням пакету DESeq2 (версія 1.16.1). Проводили багаторазове калібрування тесту з одержанням відрегульованих р-значень за допомогою DESeq2 з використанням способу, описаного в Benjamini & Hochberg, 1995.

Графіки MA використовували для візуалізації як ефектів цільового нокадауну HBV, так і нецільових ефектів. Аналіз хімічних властивостей GNA в зниженні глобальних нецільових ефектів обмежували генами, що пригнічені (\log_2 -кратна зміна < 0). Активовані гени (\log_2 -кратна зміна > 0) вважали другорядними ефектами. Оцінку нецільових ефектів обмежували найнижчою (10 нМ) дозою, через те, що був досягнутий нокадаун HBV, близький до максимального. Для порівняння транскриптомного шуму, ідентифікували гени, що були значно пригнічені (відрегульоване р-значення < 0,05) з AD-66810 та/або AD-81890. Надлишкове пригнічення візуалізували за допомогою коробкового графіку з \log_2 -кратною зміною (фігура 4) зі статистичними відмінностями між AD-66810 та AD-81890, оціненими з використанням

двостороннього двозразкового t-критерію Велча (таблиця 9).

Таблиця 9

Статистичне тестування генів, що є значно пригніченими

exp	доза	середнє значення.AD-66810.IFC	середнє значення.AD-81890.IFC	t.статистичне значення	p.значення	d.o.f.	N
1	10 нМ	-0,353	-0,171	-16,1	3,14E-52	1003	523
1	100 нМ	-0,350	-0,102	-25,6	7,35E-123	1743	908
2	10 нМ	-0,334	-0,154	-13,4	5,28E-37	757	391
2	100 нМ	-0,314	-0,179	-13,1	1,35E-37	1693	858

exp: повтор експерименту; середнє значення.AD-66810.IFC: середнє значення \log_2 -кратної зміни значно пригнічених генів з AD-66810 та/або AD-81890; середнє значення.AD-81890.IFC: середнє значення \log_2 -кратної зміни значно пригнічених генів з AD-81890 та/або AD-66810; t.статистичне значення: t-статистичне значення з двостороннього двозразкового t-критерію Велча; p.значення: p-значення з двостороннього двозразкового t-критерію Велча; d.o.f.: кількість ступенів свободи; N: число генів, значно пригнічених ($p < 0,05$), з AD-66810 та/або AD-81890.

5 Спостерігали стійке зниження нецільового ефекту з використанням AD-81890 порівняно з AD-66810 в обох повторях експерименту (фігура 4, таблиця 9). За 10 нМ AD-81890 демонстрував зниження на 52 % (повтор 1) або 54 % (повтор 2) середнього значення \log_2 -кратної зміни значно пригнічених генів порівняно з AD-66810 (таблиця 9). За 100 нМ AD-81890 демонстрував зниження на 71 % (повтор 1) або 43 % (повтор 2) середнього значення \log_2 -кратної зміни порівняно з AD-66810 (таблиця 9). У всіх випадках спостережуване значення
10 зниження \log_2 -кратної зміни було високо статистично значущим. Таким чином, AD-81890 характеризувався по суті нижчими рівнями транскриптомного шуму.

ПРИКЛАД 9

ОЦІНЮВАННЯ ГЕПАТОТОКИЧНОСТІ, СПЕЦИФІЧНОЇ ДО ЛЮДИНИ, В РХВ-МИШАХ

15 РХВ-миша являє собою химерну мишу з гуманізованою печінкою, яку у великій мірі повторно заселили людськими гепатоцитами (PhoenixBio). Миша являє собою мишей з активатором плазмінотому типу урокінази (uPA)/з важким комбінованим імунodefіцитом (SCID), яким трансплантували гепатоцити людини (миші uPA/SCID з гуманізованою печінкою) (Mercer et al., Nat. Med. 7:927-933, 2001). Повідомляється, що миші uPA/SCID з гуманізованою печінкою
20 характеризуються індексом заміщення (RI), відсотком гепатоцитів людини в печінці, що становить більше, ніж 70 %. Мишей можна використовувати як модель для прогнозування метаболізму лікарських засобів, фармакокінетики та гепатотоксичності у людини (Naritomi et al., Drug Metab Pharmacokinet. 33:31-39, 2018).

25 Дослідження проводили на РХВ-мишах для порівняння гепатотоксичності AD-66810 та AD-81890. Мишам вводили дози в дні: 0, 21, 28, 35 та 42 з використанням 12, 36 або 100 мг/кг AD-66810, AD-81890 або PBS (контроль) за допомогою підшкірної ін'єкції (n=4 на групу). Спостереження за загальним станом та вимірювання маси тіла проводили двічі на тиждень до дня 49. Кров збирали за допомогою способу забору крові через ретроорбітальний синус двічі на тиждень і сироватку крові готували із використанням стандартних способів. Проводили
30 термінальний забір крові, і тварин умертвляли шляхом серцевої пункції та знекровлення. Розтин проводили після знекровлення. Печінку відбирали і зважували. Зразки печінки розподіляли для зберігання в розчині RNAlater (Ambion), у формаліні до введення парафіну, і швидко заморожували.

35 В усіх тварин зберігалась маса тіла більша, ніж 80 % від початкових рівнів протягом усього періоду дослідження. Крім того, найнижчі середні арифметичні значення маси тіла в групах, які обробляли сполукою, були вищими, ніж у контрольної групи, яку обробляли PBS.

Рівні людського альбуміну в сироватці крові в крові відстежували протягом усього дослідження. У всіх тварин, що вижили, підтримувалась концентрація h-Alb у крові понад 7,0 мг/мл протягом прижиттєвої фази дослідження.

40 Ферменти печінки відстежували протягом усього дослідження. Зокрема, відстежували рівні ALT, AST, ALP, GGT, TBIL і TG протягом усього дослідження. Рівні ферментів, виміряні на 49 день для мишей, які отримували AD-66810, AD-81890 або PBS, наведені в таблиці 10 нижче. На

фігурах 5A і 5B продемонстровані рівні ALT з плином часу після введення AD-66810 (фігура 5A) або AD-81890 (фігура 5B) щодо введення PBS.

Таблиця 10

Рівні ферментів в печінці

Група	Засіб на основі dsRNA	Доза (мг/кг)	Рівень ALT (од./л)	Рівень AST (од./л)	Рівень ALP (од./л)	Рівень GGT (од./л)	Рівень TBIL (од./л)	Рівень TG (од./л)
1	AD-66810	12	391	261	407	17	0,3	102
2	AD-66810	36	505	293	398	22	0,2	85
3	AD-66810	100	611	338	392	26	0,3	83
4	AD-81890	12	293	210	375	13	0,3	95
5	AD-81890	36	267	198	376	11	0,3	112
6	AD-81890	100	330	237	410	14	0,2	103
7	PBS	0	139	146	329	10	0,2	110

5 Для обох протестованих груп, оброблених сполукою, у рівнях ALT, AST, ALP та GGT продемонстроване збільшення порівняно з контрольною групою. Крім того, продемонстрована дозозалежна зміна рівнів ALT, AST та GGT у групі, яку обробляли AD-66810.

Під час розтину не виявили специфічних для протестованих сполук результатів ні в одній із груп. У порівнянні з контрольною групою не було чітких змін у відносних (печінка/маса тіла) значеннях маси печінки тварин у групах, які обробляли сполукою.

ЕКВІВАЛЕНТИ

Фахівцям у даній галузі будуть зрозумілі, або вони будуть здатні визначити, використовуючи лише проведення стандартних експериментів, багато еквівалентів конкретних варіантів здійснення та способів, описаних у даному документі. Передбачається, що такі еквіваленти охоплені обсягом наступної формули винаходу.

Хоча конкретні варіанти здійснення були проілюстровані та описані, буде легко зрозуміти, що різні варіанти здійснення, описані вище, можуть бути об'єднані для забезпечення додаткових варіантів здійснення, і що в них можуть бути внесені різні зміни, не відступаючи від суті та обсягу даного винаходу.

Усі фігури, патенти США, публікації заявок на видачу патентів США, заявки на видачу патентів США, іноземні патенти, заявки на видачу іноземних патентів і непатентні публікації, на які посилаються в даному описі або які перелічені в інформаційному листку заявки, включаючи попередню заявку на патент США № 62/718314, подану 13 серпня 2018 року, включені в даний документ за допомогою посилання в усій своїй повноті, якщо не зазначено інше. Аспекти варіантів здійснення за необхідності можуть бути модифіковані для реалізації ідей різних патентів, заявок і публікацій із забезпеченням одержання додаткових варіантів здійснення.

Ці та інші зміни можна здійснювати щодо варіантів здійснення з урахуванням вищенаведеного докладного опису. Загалом, у представленій далі формулі винаходу застосовувані терміни не повинні бути витлумачені як такі, що обмежують формулу винаходу конкретними розкритими в описі й формулі винаходу варіантами здійснення, при цьому вона повинна бути витлумачена як така, що включає всі можливі варіанти здійснення разом із повним обсягом еквівалентів, до яких застосовна така формула винаходу. Відповідно, формула винаходу не обмежена даним розкриттям.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Альнілам Фармацевтікалс, Інк.

Ядав, Васант Р.

Майер, Мартін А.

Мільштейн, Стюарт

Шлегель, Марк К.

<120> КОМПОЗИЦІЇ ЗАСОБУ НА ОСНОВІ dsRNA ВІРУСУ ГЕПАТИТУ В (HBV) ТА СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 930385.410WO

<140> PCT
 <141> 2019-08-12

5 <150> US 62/718,314
 <151> 2018-08-13

<160> 49

10 <170> FastSEQ для Вiндовс Версiя 4.0

<210> 1
 <211> 3215
 <212> ДНК

15 <213> Вiрус гепатиту В

<220>
 <223> NC_003977.1, Вiрус гепатиту В, повний геном

20 <400> 1

ctccacaaca	ttccaccaag	ctctgctaga	tcccagagtg	aggggcctat	attttcctgc	60
tggtggtcc	agttccgga	cagtaaacc	tgttccgact	actgcctcac	ccatatacgtc	120
aatcttctcg	aggactggg	accctgcacc	gaacatggag	agcacaacat	caggattcct	180
aggacccctg	ctcgtgttac	aggcgggggt	tttcttggtg	acaagaatcc	tcacaataacc	240
25 acagagtcta	gactcgtggt	ggacttctct	caattttcta	gggggagcac	ccacgtgtcc	300
tggcaaaaat	tcgcagtccc	caacctccaa	tcactacca	acctcttgtc	ctccaacttg	360
tcctggctat	cgctggatgt	gtctgcggcg	ttttatcata	ttcctcttca	tcctgctgct	420
atgcctcatc	ttcttggttg	ttcttctgga	ctaccaaggt	atggtgcccg	tttgtcctct	480
acttcagga	acatcaacta	ccagcacggg	acatgcaga	acctgcacga	ttcctgctca	540
30 agaacctct	atgtttccct	cttggtgctg	tacaaaacct	tcggacggaa	actgcacttg	600
tattcccatc	ccatcactct	gggctttcgc	aagattccta	tgggagtggg	cctcagtcctg	660
tttctcctgg	ctcagtttac	tagtgccatt	tgttcagtg	ttcgtagggc	tttccccac	720
tgtttggtct	tcagctatat	ggatgatgtg	gtattggggg	ccaagtctgt	acaacatctt	780
gagtcccttt	ttacctctat	taccaatttt	cttttgtctt	tgggtataca	tttgaaccct	840
35 aataaaacca	aacgttgggg	ctactccctt	aacttcatgg	gatatgtaat	tgggaagtgg	900
ggacttttac	cgcaggaaca	tattgtacaa	aaactcaagc	aatgttttctg	aaaattgcct	960
gtaaatagac	ctattgattg	gaaagtatgt	caaagaattg	tgggtctttt	gggctttgct	1020
gcccttttta	cacaatgtgg	ctatcctgcc	ttgatgcctt	tatatgcatg	tatacaatct	1080
aagcaggctt	tcactttctc	gccaaacttac	aaggcctttc	tgtgtaaaca	atatctaaac	1140
40 ctttaccctg	ttgccgggca	acggtcagg	ctctgccaa	tgtttgetga	cgcaaccccc	1200
acgggttggg	gcttggccat	aggccatcgg	cgcagtcgtg	gaacctttgt	ggctcctctg	1260
ccgatccata	ctgcggaact	cctagcagct	tgttttgtctc	gcagccgggtc	tggagcga	1320
cttatcggaa	ccgacaactc	agttgtctct	tctcggaaat	acacctcctt	tccatggctg	1380
ctaggctgtg	ctgccaaactg	gatcctgcgc	gggacgtcct	ttgtctacgt	cccgtcggcg	1440
45 ctgaatcccg	cggacgacc	gtctcggggc	cgtttggggc	tctaccgtcc	ccttcttcat	1500
ctgccgttcc	ggccgaccac	ggggcgcacc	tctctttacg	cggctcctcc	gtctgtgcct	1560
tctcatctgc	cggaccgtgt	gcacttgcct	tcacctctgc	acgtagcatg	gagaccaccg	1620
tgaacgcca	ccaggtcttg	cccaaggctt	tacacaagag	gactcttgga	ctctcagcaa	1680
tgtcaacgac	cgaccttgag	gcatacttca	aagactgttt	gtttaaagac	tgggaggagt	1740
50 tgggggagga	gattaggtta	aaggctcttg	tactaggagg	ctgtaggcat	aaattggtct	1800
gttcaccagc	accatgcaac	tttttccctt	ctgcctaate	atctcatggt	catgtcctac	1860
tgttcaagcc	tccaagctgt	gccttgggtg	gctttggggc	atggacattg	accctgataa	1920
agaatttgga	gcttctgtgg	agttactctc	ttttttgcct	tctgacttct	ttccttctat	1980
tcgagatctc	ctcgacaccg	cctctgctct	gtatcgggag	gccttagagt	ctccggaaca	2040
55 ttgttcacct	caccatacag	cactcaggca	agctattctg	tgttgggggtg	agttgatgaa	2100
tctggccacc	tgggtgggaa	gtaatttgga	agaccagca	tccagggaa	tagtagtcag	2160
ctatgtcaat	gttaatatgg	gcctaaaaat	tagacaacta	ttgtggtttc	acatttctctg	2220
ccttactttt	ggaagagaaa	ctgtccttga	gtatttgggtg	tcttttggag	tgtggattc	2280
cactcctccc	gcttacagac	caccaaagtc	ccctatctta	tcaaaccttc	cggaaactac	2340
60 tgttgttaga	cgacgaggca	ggtcccctag	aagaagaact	ccctcgcctc	gcagacgaag	2400
gtctcaatcg	ccgcgtcga	gaagatctca	atctcgggaa	tctcaatggt	agtatccctt	2460

UA 127745 C2

	ggactcataa	ggtgggaaac	tttactgggc	tttattcttc	tactgtacct	gtctttaatc	2520	
	ctgattggaa	aactccctcc	tttcctcaca	ttcatttaca	ggaggacatt	attaatagat	2580	
	gtcaacaata	tgtgggccct	ctgacagtta	atgaaaaaag	gagattaaaa	ttaattatgc	2640	
	ctgctagggt	ctatcctaac	cttaccaaat	atltgcccct	ggacaaaggc	attaaacctg	2700	
5	attatcctga	atatgcagtt	aatcattact	tcaaaactag	gcattattta	catactctgt	2760	
	ggaaggctgg	cattctatat	aagagagaaa	ctacacgcag	cgccctcatt	tgtgggtcac	2820	
	catattcttg	ggaacaagag	ctacagcatg	ggaggttggg	cttccaaacc	tcgacaaggc	2880	
	atggggacga	atctttctgt	tcccaatcct	ctgggattct	ttcccgatca	ccagttggac	2940	
	cctgcgttcg	gagccaactc	aaacaatcca	gattgggact	tcaaccccaa	caaggatcac	3000	
10	tggccagagg	caaatcaggt	aggagcggga	gcatttggtc	cagggttcac	cccaccacac	3060	
	ggaggccttt	tggggtggag	ccctcaggct	cagggcatat	tgacaacact	gcccagcagca	3120	
	cctcctcctg	cctccaccaa	tcggcagtca	ggaagacagc	ctactcccat	ctctccacct	3180	
	ctaagagaca	gtcatcctca	ggccatgcag	tggaa			3215	
15	<210>	2						
	<211>	3215						
	<212>	ДНК						
	<213>	Штучна послідовність						
20	<220>							
	<223>	Зворотна комплементарна послідовність для SEQ ID NO:1						
	<400>	2						
25	ttccactgca	tggcctgagg	atgactgtct	cttagagggtg	gagagatggg	agtaggctgt	60	
	cttcctgact	gccgattggg	ggaggcagga	ggagggtgctg	ctggcagtggt	tgtcaatatg	120	
	ccctgagcct	gagggctcca	ccccaaaagg	cctccgtgtg	gtgggggtgaa	ccctgacca	180	
	aatgctccc	ctcctactg	atltgcccct	ggccagtgat	ccttgttggg	ggtgaagtcc	240	
	caatctggat	tgtttgagtt	ggctccgaac	gcaggggtcca	actggtgatc	gggaaagaat	300	
	cccagaggat	tgggaacaga	aagattcgtc	cccatgcctt	gtcgaggttt	ggaagaccaa	360	
30	cctcccatgc	tgtagctctt	gttcccaaga	atatggtgac	ccacaaaatg	aggcgctgcg	420	
	tgtagtttct	ctcttatata	gaatgccagc	cttccacaga	gtatgtaaat	aatgcctagt	480	
	tttgaagtaa	tgattaactg	catattcagg	ataatacggg	ttaatgcctt	tgtccaaggg	540	
	caaataattg	gtaaggttag	gatagaacct	agcaggcata	attaatttta	atctcctttt	600	
	ttcattaact	gtcagagggc	ccacatattg	ttgacatcta	ttaataatgt	cctcctgtaa	660	
35	atgaatgtga	ggaaaggagg	gagttttcca	atcaggatta	aagacaggta	cagtagaaga	720	
	ataaagccca	gtaaagtttc	ccaccttatg	agtccaaggg	ataactaacat	tgagattccc	780	
	gagattgaga	tcttctgcca	cgcggcgatt	gagaccttcg	tctgagaggc	gagggagttc	840	
	ttcttctagg	ggacctgcct	cgctcgtctaa	caacagtagt	ttccggaagt	gttgataaga	900	
	taggggcatt	tgggtgctg	taagcgggag	gagtgccaat	ccacactcca	aaagacacca	960	
40	aatactcaag	gacagtttct	cttccaaaag	taaggcagga	aatgtgaaac	cacaatagtt	1020	
	gtctaatttt	taggcccata	ttaacattga	catagctgac	tactaattcc	ctggatgctg	1080	
	ggtcttccaa	attaacttcc	accaggtgg	ccagattcat	caactcacc	caacacagaa	1140	
	tagcttgctt	gagtgctgta	tgggtgaggt	aacaatgttc	cggagactct	aaggcctccc	1200	
	gatacagagc	agaggcggg	tcgaggagat	ctcgaataga	aggaaagaag	tcagaaggca	1260	
45	aaaaagagag	taactccaca	gaagctccaa	attctttata	cgggtcaatg	tccatgcccc	1320	
	aaagccacc	aaggcacagc	ttggaggctt	gaacagtagg	acatgaacat	gagatgatta	1380	
	ggcagagggg	aaaaagttgc	atgggtgctg	tgaacagacc	aatttatgcc	tacagcctcc	1440	
	tagtacaag	acctttaacc	taatctctc	ccccactcc	tcccagtctt	taacaaaca	1500	
	gtctttgaag	tatgcctcaa	ggtcggctgt	tgacattgct	gagagtcca	gagtcctctt	1560	
50	gtgtaagacc	ttgggcaaga	cctggtgggc	gttcacgggtg	gtctccatgc	tacgtgcaga	1620	
	ggtgaagcga	agtgcacacg	gtccggcaga	tgagaaggca	cagacgggga	gaccgcgtaa	1680	
	agagaggtgc	gccccgtggg	cggccggaac	ggcagatgaa	gaaggggacg	gtagaggccc	1740	
	aaacggcccc	gagacgggtc	gtccgcggga	ttcagcggcg	acgggacgta	gacaaaggac	1800	
	gtcccgcgca	ggatccagtt	ggcagcacag	cctagcagcc	atggaaagga	ggtgtatttc	1860	
55	cgagagagga	caactgagtt	gtcggttccg	ataagtttcg	ctccagaccg	gctgagagca	1920	
	aaacaagctg	ctaggagttc	cgcagtatgg	atcggcagag	gagccacaaa	ggttccacgc	1980	
	atgcgccgat	ggcctatggc	caagcccaaa	cccgtggggg	ttgcgtcagc	aaacacttgg	2040	
	cagagacctg	accgttgccg	ggcaacgggg	ttaaagttta	gatattgttt	acacagaaag	2100	
	gccttgtaag	ttggcgagaa	agtgaaagcc	tgcttagatt	gtatacatgc	atataaaggc	2160	
60	atcaaggcag	gatagccaca	ttgtgtaaaa	ggggcagcaa	agcccaaaag	accacaaatt	2220	
	ctttgacata	ctttccaatc	aataggtcta	tttacaggca	attttcgaaa	acattgcttg	2280	

UA 127745 C2

	agttttt	gta caaatatg	tctc	gtcgcg	gtaaa	gtaccccaac	ttccaattac	atatcccatg	2340
	aagttaagg	agtagcccca	acgtttggtt	ttattagggt	tcaa	aatgtat	acccaaagac	2400	
	aaaagaaaat	tggtaataga	ggtaaaaagg	gactcaagat	g	ttgtacaga	cttggccccc	2460	
	aataccacat	catccatata	gctgaaagcc	aaacagtg	gg	aaagccct	acgaaccact	2520	
5	gaacaaatgg	cactagtaaa	ctgagccagg	agaaacggac	tgaggccca	tccc	catagga	2580	
	atcttgcgaa	agcccaggat	gatgggatgg	gaatacaagt	gcagtttccg	tccga	agggt	2640	
	ttgtacagca	acaagagggga	aacatagagg	ttccttgagc	aggaatcgtg	caggttctgc	2700		
	atgggtcccgt	gctggtagtt	gatgttccctg	gaagtagagg	acaaacggggc	aacatacctt	2760		
	ggtagtccag	aagaaccaac	aagaagatga	ggcatagcag	caggatgaag	aggaatatga	2820		
10	taaaacgccg	cagacacatc	cagcgatagc	caggacaagt	tggaggacaa	gaggttgggtg	2880		
	agtgattgga	ggttggggac	tgcgaat	ttt	ggccaggaca	cgtgggtgct	ccccctagaa	2940	
	aattgagaga	agtccaccac	gagtctagac	tctgtggtat	tgtgaggatt	cttgtcaaca	3000		
	agaaaaacc	cgctgtaac	acgagcaggg	gtcctaggaa	tctgatggt	gtgctctcca	3060		
	tgttcgggtgc	aggttccccca	gtcctcgaga	agattgacga	tatgggtgag	gcagtagtcg	3120		
15	gaacaggggtt	tactgttccg	gaactggagc	caccagcagg	aaaatatagg	cccctcactc	3180		
	tgggatctag	cagagcttgg	tggaatg	ttg	ggag		3215		
	<210>	3							
	<211>	3215							
20	<212>	ДНК							
	<213>	Вірус гепатиту В							
	<220>								
25	<223>	AB014381.1, геномна ДНК вірусу гепатиту В, повна послідовність, ізолят 22Y04HCC							
	<220>								
	<221>	інша ознака							
	<222>	(1)...(3215)							
30	<223>	n = A,T,C або G							
	<400>	3							
	ctccaccaca	ttccaccaag	ctctgctaca	ccccagagta	aggggcctat	actttcctgc	60		
	tgggtggctcc	agttccggaa	cagtaaacc	tgttccgact	actgcctctc	ccatatacgtc	120		
35	aatcttctcg	aggactggg	accctgcacc	gaacatggag	aacacaacat	caggattcct	180		
	aggaccctg	ctcgtgttac	aggcggggtt	tttcttggtg	acaagaatcc	tcacaatacc	240		
	acagagtcta	gactcgtggt	ggacttctct	caat	tttcta	gggggagcac	ccacgtgtcc	300	
	tggccaaaat	tcgcagtc	caacctccaa	tactcacca	acctcttg	ctccaattt	360		
	tcttggtat	cgctggatgt	gtctgcggcg	ttttatcata	ttcctcttca	tctgctgct	420		
40	atgctcctc	ttcttgttgg	ttcttctgga	ctaccaagg	atg	ttgccc	tttgcctct	480	
	acttccagga	acatcaacta	ccagcacggg	accatgcaag	acctgcacga	ttcctgctca	540		
	aggcacctct	atgtttccct	cttgttgc	tacaaaacct	tcggacggaa	actgcacttg	600		
	tattcccatc	ccatcatcct	gggtttcgc	aagattccta	tgggagtg	cctcagtc	660		
	tttctcctg	ctcagtttac	tagtgccatt	tg	ttcagtg	ttcgtagggc	ttccccccac	720	
45	tgtttgctt	tcagttatat	ggatgatgtg	gtattggggg	ccaagtctgt	acaacatcct	780		
	gagtccttt	ttaccgctgt	taccaat	ttt	gtcct	tgggtataca	tttgaaccct	840	
	aataaaacca	aacgttggg	ttactccctt	aacttcatgg	gatatgtaat	tggaagt	900		
	ggtactttac	cgcaagacca	tattgtacta	aaaatcaagc	aatgttttcg	aaaactgcct	960		
	gtaa	atagac	ctattgattg	gaaagtatgt	cagagaattg	tgggtctttt	gggctttgct	1020	
50	gcccctttta	cacaatgtgg	ctatcctgcc	ttaatgcctt	tatatgcatg	tatacaatct	1080		
	aagcaggtct	tcactttctc	gccaaacttac	aaggcctttc	tgtgtaaaca	atatctgaac	1140		
	ctttacccc	gtgcccggca	acggtcaggt	ctctgccaa	gttttgctga	cgcaaccccc	1200		
	actggatggg	gcttggctat	tggccatcgc	cgcatgcgtg	gaacctttgt	ggctcctctg	1260		
	ccgatccata	ctgcggaact	cctagcagct	tg	tttgc	gcagccgggc	tggagcgaaa	1320	
55	ctgatcggaa	cggacaactc	tgttgttctc	tctcggaat	acacctcctt	tccatggctg	1380		
	ctaggggtgtg	ctgccaactg	gatcctgcgc	gggacgtcct	ttgtttacgt	cccgtcggcg	1440		
	ctgaatccc	cgacgacc	atctcggggc	cg	tttgggtc	tctaccgtcc	ccttcttcat	1500	
	ctgcccgttc	ggccgaccac	ggggcgcacc	tctctttacg	cggtctcccc	gtctgtgct	1560		
	tctcatctgc	cggaccgtgt	gcacttgc	tcacctctgc	acgtcgc	atg	gagaccaccg	1620	
60	tgaacgcccc	ccaggtctt	cccaaggtct	tata	taagag	gactctt	gga	ctctcagcaa	1680
	tg	caacgac	cgacctgag	gcatacttca	aagactg	ttt	gtttaaggac	tgggaggagt	1740

	tgggggagga	gattaggtta	atgatctttg	tactaggagg	ctgtaggcat	aaattgggtct	1800
	gttcaccagc	accatgcaac	tttttcacct	ctgcctaate	atctcatggt	catgtcctac	1860
	tgttcaagcc	tccaagctgt	gccttgggtg	gctttaggac	atggacattg	acccatataa	1920
	agaatttggg	gcttctgtgg	agttactctc	ttttttgcct	tctgactttt	ttccttctat	1980
5	tcgagatctc	ctcgacaccg	cctctgctct	gtatcggggg	gccttagagt	ctccggaaca	2040
	ttgttcacct	caccatacag	cactcagaca	agccattctg	tgttgggggtg	agttgatgaa	2100
	tctggccacc	tgggtgggaa	gtaatttggg	agaccagca	tccaggggat	tagtagtcag	2160
	ctatgtcaat	gttaatatgg	gcctaaaaat	cagacaacta	ctgtggtttc	acatttctctg	2220
	tcttactttt	ggaagagaaa	ctgttcttga	gtatttgggtg	tcttttggag	tgtggattc	2280
10	cactcctcct	gcttacagac	catcaaatgc	ccctatctta	tcaacacttc	cggaaactac	2340
	tgttgtaga	cgacgaggca	ggtcccctag	aagaagaact	ccctcgctc	gcagacgaag	2400
	gtctcaatcg	ccgctcgca	gaagatctca	atctcgggaa	cctcaatggt	agtatccctt	2460
	ggactcataa	ggtgggaaac	tttactgggc	tttattcttc	tactgtacct	gtctttaatc	2520
	ctgagtggca	aactccctct	tttctcata	ttcatttgca	ggaggacatt	attaatagat	2580
15	gtcaacaata	tgtgggccct	cttacagtta	atgaaaaaag	gagattaaaa	ttaattatgc	2640
	ctgctaggtt	ctatcctaac	cttaccaaat	atttgcctt	ggacaaaggc	attaaccat	2700
	attatccgga	acatgcagtt	aatcattact	tcaaaactag	gcattattta	catactctgt	2760
	ggaaggcngg	cattctatat	aagagagaaa	ctacacgcag	cgctcattt	tgtgggtcac	2820
	catattcttg	ggaacaagag	ctacagcatg	ggaggttggt	cttccaaacc	tcgacaaggc	2880
20	atggggacaa	atctttctgt	tcccaatcct	ctgggattct	ttcccgatca	ccagttggac	2940
	cctgcgttcg	gagccaactc	aaacaatcca	gattgggact	tcaaccccaa	caaggatcac	3000
	tggccagagg	caaatcaggt	aggagcggga	gcattcgggc	cagggttcac	cccaccacac	3060
	ggcggctctt	tgggggtggg	ccctcaggct	cagggcacat	tgacaacagt	gccagtagca	3120
	cctcctctctg	cctccaccaa	tcggcagtc	ggaagacagc	ctactcccat	ctctccacct	3180
25	ctaagagaca	gtcatctca	ggccatgcag	tggaa			3215

<210> 4

<211> 3215

<212> ДНК

30 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Зворотна комплементарна послідовність для SEQ ID NO:3

35 <220>

<221> інша ознака

<222> (1)...(3215)

<223> n = A,T,C або G

40 <400> 4

	ttccactgca	tggcctgagg	atgactgtct	cttagagggtg	gagagatggg	agtaggctgt	60
	cttctgact	gccgattggt	ggaggcagga	ggagggtgcta	ctggcactgt	tgtcaatgtg	120
	ccctgagcct	gagggctcca	ccccaaaaga	ccgccgtgtg	gtgggggtgaa	ccctggccc	180
	aatgctccc	ctcctacctg	atttgcctct	ggccagtgat	ccttgttggg	gttgaagtcc	240
45	caatctggat	tgtttgagtt	ggctccgaac	gcagggtcca	actggtgatc	gggaaagaat	300
	cccagaggat	tgggaacaga	aagatttgtc	cccatgcctt	gtcgaggttt	ggaagaccaa	360
	cctcccatgc	tgtagctctt	gttcccaaga	atatggtgac	ccacaaaatg	aggcgtgctg	420
	tgtagtttct	ctcttatata	gaatgcngc	cttccacaga	gtatgtaaat	aatgcctagt	480
	tttgaagtaa	tgattaactg	catgttccgg	ataatatggt	ttaatgcctt	tgtccaagg	540
50	caaataattg	gtaaggttag	gatagaacct	agcaggcata	attaatttta	atctcctttt	600
	ttcattaact	gtaagagggc	ccacatattg	ttgacatcta	ttaataatgt	cctcctgcaa	660
	atgaatatga	ggaagagagg	gagtttgcca	ctcaggatta	aagacaggta	cagtagaaga	720
	ataaagccca	gtaaagtttc	ccaccttatg	agtccaagg	ataactaacat	tgaggttccc	780
	gagattgaga	tcttctgca	cgcgccgatt	gagaccttcg	tctgagaggc	gagggagtcc	840
55	ttcttctagg	ggacctgcct	cgctcgtctaa	caacagtagt	ttccggaagt	gttgataaga	900
	taggggcatt	tgatggtctg	taagcaggag	gagtgccaat	ccacactcca	aaagacacca	960
	aatactcaag	aacagtttct	cttccaaaag	taagacagga	aatgtgaaac	cacagtagtt	1020
	gtctgatttt	taggcccata	ttaacattga	catagctgac	tactaattcc	ctggatgctg	1080
	ggtcttccaa	attacttccc	accaggtgg	ccagattcat	caactcacc	caacacagaa	1140
60	tggcttgtct	gagtgctgta	tggtaggggtg	aacaatgttc	cggagactct	aaggcctccc	1200
	gatacagagc	agaggcgggtg	tcgaggagat	ctcgaataga	aggaaaaaag	tcagaaggca	1260

	aaaaagagag	taactccaca	gaagctccaa	attctttata	tgggtcaatg	tccatgtcct	1320
	aaagccacc	aaggcacagc	ttggaggctt	gaacagtagg	acatgaacat	gagatgatta	1380
	ggcagagggtg	aaaaagttgc	atgggtgctgg	tgaacagacc	aattttatgcc	tacagcctcc	1440
5	tagtacaaag	atcattaacc	taatctcctc	ccccactcc	tcccagtcct	taaacaaca	1500
	gtctttgaag	tatgcctcaa	ggtcggtcgt	tgacattgct	gagagtccaa	gagtcctctt	1560
	atataagacc	ttgggcaaga	cctgggtggg	gttcacgggtg	gtctccatgc	gacgtgcaga	1620
	ggtgaagcga	agtgcacacg	gtccggcaga	tgagaaggca	cagacgggga	gaccgcgtaa	1680
	agagagggtc	gccccgtggt	cggccgggaac	ggcagatgaa	gaaggggacg	gtagagacct	1740
	aaacggcccc	gagatgggtc	gtccgcggga	ttcagcgccg	acgggacgta	aacaaaggac	1800
10	gtcccgcgca	ggatccagtt	ggcagcacac	cctagcagcc	atggaaagga	ggtgtatttc	1860
	cgagagagaa	caacagagtt	gtccgttccg	atcagtttcg	ctccagaccg	gctgagagca	1920
	aaacaagctg	ctaggagttc	cgcagtatgg	atcggcagag	gagccacaaa	ggttccacgc	1980
	atgcggcgat	ggccaatagc	caagccccat	ccagtggggg	ttgctgcagc	aaacacttgg	2040
	cagagacctg	accgttgccg	ggcaacgggg	taaaggttca	gatattgttt	acacagaaag	2100
15	gccttgtaag	ttggcgagaa	agtgaaagcc	tgcttagatt	gtatacatgc	atataaaggc	2160
	attaaggcag	gatagccaca	ttgtgtaaaa	ggggcagcaa	agcccaaaag	acccacaatt	2220
	ctctgacata	ctttccaatc	aataggtcta	tttacaggca	gttttcgaaa	acattgcttg	2280
	atTTTTtagta	caatatggtc	ttgcggtaaa	gtaccccaac	ttccaattac	atatcccatg	2340
	aagttaaggg	agtaaccca	acgtttggtt	ttattagggt	tcaaattgat	acccaaagac	2400
20	aaaagaaaat	tggtaacagc	ggtaaaaagg	gactcaagat	gttgtacaga	cttggcccc	2460
	aataccacat	catccatata	actgaaagcc	aaacagtggg	ggaaagccct	acgaaccact	2520
	gaacaaatgg	cactagtaaa	ctgagccagg	agaaacggac	tgaggccac	tcccatagga	2580
	atcttgcgaa	agcccaggat	gatgggatgg	gaatacaagt	gcagtttccg	tccgaagggt	2640
	ttgtacagca	acaagagggg	aacatagagg	tgcttgagc	aggaatcgtg	caggtcttgc	2700
25	atggtcccgt	gctggtagtt	gatgttctctg	gaagtagagg	acaaacgggc	aacatacctt	2760
	ggtagtccag	aagaaccaac	aagaagatga	ggcatagcag	caggatgaag	aggaatatga	2820
	taaaacggcg	cagacacatc	cagcgatagc	caggacaaat	tggaggacaa	gaggttggtg	2880
	agtgttgga	ggttggggac	tgcgaaatTTT	ggccaggaca	cgtgggtgct	ccccctagaa	2940
	aattgagaga	agtccaccac	gagtctagac	tctgtggtat	tgtgaggatt	cttgtcaaca	3000
30	agaaaaacc	cgctgtaac	acgagcaggg	gtcctaggaa	tcctgatggt	gtgttctcca	3060
	tgttcggtgc	aggttcccc	gtcctcgaga	agattgacga	tatgggagag	gcagtagteg	3120
	gaacaggggt	tactgttccg	gaactggagc	caccagcagg	aaagtatagg	ccccttactc	3180
	tgggggtgtag	cagagcttgg	tggaatgtgg	tggag			3215
35	<210>	5					
	<211>	1200					
	<212>	ДНК					
	<213>	Штучна послідовність					
40	<220>						
	<223>	Плазміда psiCHECK2-HBV					
	<400>	5					
45	ctccasaaca	ttccassaag	ctctgcaaga	tcccagagtc	aggggcctgt	atTTTtctgc	60
	tgggtggctcc	agttcagga	cagtgaaccc	tgttccgact	attgcctctc	ccatatacgtc	120
	aatcttctcg	aggactgggg	accctgcacc	gaacatggag	aacatcacat	caggattcct	180
	aggaccctg	ctcgtgttac	aggcggggtt	tttcttggtg	acaaaaatcc	tcacaatacc	240
	acagagtcta	gactcgtggt	ggacttctct	caatTTTtcta	gggggagcac	ccgtgtgtcc	300
	tggccaaaat	tcgcagtccc	caacctccaa	tcactacca	acctcctgtc	ctccaacttg	360
50	tcctggctat	cgttggatgt	gtctgcggcg	TTTTatcatc	ttcctcttca	tcctgctgct	420
	atgcctcatc	ttcttgttgg	ttcttctgga	ctatcaaggt	atgTTTgccc	tttgtcctct	480
	aattccagga	tcatcaacca	ccagcacggg	accatgcaaa	acctgcacga	ctcctgctca	540
	aggaacctct	atgTTTccct	catgTTTgctg	tacaaaacct	tcggacggaa	attgcacctg	600
	tattcccatc	ccatcatctt	gggctTTTcgc	aaaataccta	tgggagtggg	cctcagtcctg	660
55	tttctcttgg	ctcagTTTtac	tagtgccatt	tgttcagtg	ttcgtagggc	tttccccac	720
	tgtctggctt	tcagttatat	ggatgatgtg	gtattggggg	ccaagtctgt	acagcatctt	780
	gagtcctttt	ataccgctgt	taccaatTTT	ctTTTgtctt	tgggtataca	tttaaacct	840
	aacaaaacaa	aaagatgggg	ttattcccta	aacttcatgg	gTtatgtaat	tggaaagtTtg	900
	gggacattgc	cacaggaaca	tattgtacaa	aaaatcaaac	aatgTTTtag	aaaacttct	960
60	gttaacaggc	ctattgattg	gaaagtatgt	caacgaattg	tgggtctTTT	gggctTTTgct	1020
	gccccTTTta	cacaatgtgg	ttatcctgct	ttaatgcctt	tgtatgcatg	tatacaagct	1080

	aaacaggctt ttacttttctc gccaacttac aaggcctttc tctgtaaaca atacatgaac	1140
	ctttaccccc ttgctcggca acggccaggt ctgtgccaag tgtttgctga cgcaaccccc	1200
	<210> 6	
5	<211> 681	
	<212> ДНК	
	<213> Вірус гепатиту В	
	<220>	
10	<223> HBV, генотип А	
	<400> 6	
	atggagaaca tcacatcagg attcctagga cccctgctcg tgttacaggc ggggtttttc	60
	ttggtgacaa gaatcctcac aataccgag agtctagact cgtggtggac ttctctcaat	120
15	tttctagggg gatcaccggt gtgtcttggc caaaattcgc agtccccaac ctccaatcac	180
	tcaccaacct cctgtcctcc aatttgtcct ggctatcgct ggatgtgtct gcggcgtttt	240
	atcatattcc tcttcatcct gctgctatgc ctcatcttct tattggttct tctggattat	300
	caaggtatgt tgcccgtttg tcctctaatt ccaggatcaa caacaaccag tacgggacca	360
	tgcaaacct gcacgactcc tgctcaaggc aactctatgt ttccctcatg ttgctgtaca	420
20	aaacctacgg atggaattg cacctgtatt cccatcccat cgtcctgggc tttcgcaaaa	480
	tacctatggg agtgggcctc agtccgtttc tcttggctca gtttactagt gccatttggt	540
	cagtggttcg tagggctttc cccactggt tggctttcag ctatatggat gatgtggtat	600
	tgggggcaaa gtctgtacag catcgtgagt ccctttatac cgctgttacc aattttcttt	660
	tgtctctggg tatacattha a	681
25	<210> 7	
	<211> 681	
	<212> ДНК	
	<213> Вірус гепатиту В	
30	<220>	
	<223> HBV, генотип С	
	<400> 7	
35	atggagaaca саасатсagg attcctagga cccctgctcg tgttacaggc ggggtttttc	60
	ttggtgacaa gaatcctcac aataccacag agtctagact cgtggtggac ttctctcaat	120
	tttctagggg gagcaccac gtgtcctggc caaaattcgc agtccccaac ctccaatcac	180
	tcaccaacct cttgtcctcc aatttgtcct ggctatcgct ggatgtgtct gcggcgtttt	240
	atcatattcc tcttcatcct gctgctatgc ctcatcttct tgttggttct tctggactac	300
40	caaggtatgt tgcccgtttg tcctctaact ccaggaacat caactaccag cacgggacca	360
	tgcaagacct gcacgattcc tgctcaagga acctctatgt ttccctcttg ttgctgtaca	420
	aaaccttcgg acggaactg cacttgtatt cccatcccat catcctgggc tttcgcaaga	480
	ttcctatggg agtgggcctc agtccgtttc tcttggctca gtttactagt gccatttggt	540
	cagtggttcg tagggctttc cccactggt tggctttcag ttatatggat gatgtggtat	600
45	tgggggcaaa gtctgtacaa catcttgagt ccctttttac ctctattacc aattttcttt	660
	tgtctttggg tatacatttg a	681
	<210> 8	
	<211> 681	
50	<212> ДНК	
	<213> Вірус гепатиту В	
	<220>	
	<223> HBV, генотип Е	
55	<400> 8	
	atggaaagca tcacatcagg attcctagga cccctgctcg tgttacaggc ggggtttttc	60
	ttggtgacaa aatcctcac aataccgag agtctagact cgtggtggac ttctctcaat	120
	tttctagggg gagctccggt gtgtcttggc caaaattcgc agtccccaac ctccaatcac	180
60	tcaccaacct cttgtcctcc aatttgtcct ggctatcgct ggatgtgtct gcggcgtttt	240
	atcatcttcc tcttcatcct gctgctatgc ctcatcttct tgttggttct tctggactat	300

	caaggtatgt tgcccgtttg tcctctaatt ccaggatcat caaccaccag tacgggaccc	360
	tgccgaacct gcacgactct tgctcaagga acctctatgt ttccctcatg ttgctgttca	420
	aaaccttcgg acggaattg cacttgatt cccatcccat catcatgggc tttcggaaaa	480
	ttcctatggg agtgggcctc agcccgtttc tcctggctca gtttactagt gccatttggt	540
5	cagtggttcg cgggctttc cccactgtc tggctttcag ttatatggat gatgtggtat	600
	tgggggcaa gtctgtacaa catcttgagt ccctttatac ctctgttacc aattttcttt	660
	tgtctttggg tatacattta a	681
	<210> 9	
10	<211> 681	
	<212> ДНК	
	<213> Вірус гепатиту В	
	<220>	
15	<223> HBV, генотип F	
	<400> 9	
	atggасаааа tcacatcagg actcctagga cccctgctcg tgttacaggc ggtgtgtttc	60
	ttgttgасаа ааатсстсас аатасасаg агтсtagact cgtgggtggac ttctctcaat	120
20	tttctagggg gactaccgg gtgtcctggc caaaattcgc agtccccaac ctccaatcac	180
	ttaccaacct cctgtcctcc aacttgctct ggctatcgtt ggatgtgtct gcggcgtttt	240
	atcatcttcc tcttcatect gctgctatgc ctcatcttct tgttggttct tctggactat	300
	caaggtatgt tgcccgtttg tcctctaact ccaggatcca cgaccaccag cacgggacca	360
	tgcaaaacct gcacaactct tgctcaagga acctctatgt ttccctcctg ttgctgttcc	420
25	aaaccctcgg acggaactg cacctgtatt cccatcccat catcttgggc tttaggaааа	480
	tacctatggg agtgggcctc agcccgtttc tcctggctca gtttactagt gcaatttggt	540
	cagtgggtcg tagggctttc cccactgtc tggcttttag ttatatggat gatctggtat	600
	tgggggcaa atctgtgcag catcttgagt ccctttatac cgctgttacc aattttctgt	660
	tatctgtggg tatccattta a	681
30	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> РНК	
	<213> Штучна послідовність	
35	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид (сенсовий)	
	<400> 10	
40	gugugсасии сгсиисаса	19
	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
45	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид (сенсовий)	
50	<400> 11	
	gugugсасти сгсиисаса	19
	<210> 12	
	<211> 19	
55	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид (сенсовий)	
60	<400> 12	

	gugugcactu cgsuucasa	19
	<210> 13	
	<211> 21	
5	<212> РНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
10	<223> Антисенсова послідовність AD-66810	
	<400> 13	
	ugugaagcga agucsasacu u	21
	<210> 14	
15	<211> 21	
	<212> РНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
20	<223> Антисенсова послідовність AD-192282	
	<400> 14	
	ugugaagcga agucsasacu u	21
25	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> РНК	
	<213> Штучна послідовність	
30	<220>	
	<223> Антисенсова послідовність AD-192289	
	<400> 15	
35	ugugaagcga agucsasacu u	21
	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> РНК	
40	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Антисенсова послідовність AD-81890	
	<400> 16	
45	ugugaagcga agucsasacu u	21
	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> РНК	
50	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Антисенсова послідовність AD-81892	
55	<400> 17	
	ugugaagcga agucsasacu u	21
	<210> 18	
	<211> 21	
60	<212> РНК	
	<213> Штучна послідовність	

	<220>		
	<223> Антисенсова послідовність AD-192283		
5	<400> 18		
	ugugaagcga agucsasacu u		21
	<210> 19		
	<211> 21		
10	<212> РНК		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Антисенсова послідовність AD-192291		
15	<400> 19		
	ugugaagcga agucsasacu u		21
	<210> 20		
20	<211> 21		
	<212> РНК		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
25	<223> Антисенсова послідовність AD-192277		
	<400> 20		
	ugugaagcga agucsasacu u		21
30	<210> 21		
	<211> 21		
	<212> РНК		
	<213> Штучна послідовність		
35	<220>		
	<223> Антисенсова послідовність AD-192284		
	<400> 21		
40	ugugaagcga agucsasacu u		21
	<210> 22		
	<211> 21		
	<212> РНК		
45	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Антисенсова послідовність AD-192285		
	<400> 22		
50	ugugaagcga agucsasacu u		21
	<210> 23		
	<211> 21		
	<212> РНК		
55	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Антисенсова послідовність AD-192293		
60	<400> 23		
	ugugaagcga agucsasacu u		21

	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> РНК	
5	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Антисенсова послідовність AD-192279	
10	<400> 24	
	ugugaagcga agucsasacu u	21
	<210> 25	
	<211> 21	
15	<212> РНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Антисенсова послідовність AD-192294	
20	<400> 25	
	ugugaagcga agucsasacu u	21
	<210> 26	
25	<211> 21	
	<212> РНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
30	<223> Антисенсова послідовність AD-192280	
	<400> 26	
	ugugaagcga agucsasacu u	21
35	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> РНК	
	<213> Штучна послідовність	
40	<220>	
	<223> Антисенсова послідовність AD-192287	
	<400> 27	
45	ugugaagcga agucsasacu u	21
	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> РНК	
	<213> Штучна послідовність	
50	<220>	
	<223> Антисенсова послідовність AD-192281	
	<400> 28	
55	ugugaagcga agucsasacu u	21
	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> РНК	
60	<213> Штучна послідовність	

	<220>		
	<223> Синтетичний олігонуклеотид (сенсовий)		
	<400> 29		
5	gugugcasuu cgsuucasa		19
	<210> 30		
	<211> 19		
	<212> ДНК		
10	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Синтетичний олігонуклеотид (сенсовий)		
	<400> 30		
15	gugugcactu cgsuucasa		19
	<210> 31		
	<211> 19		
20	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Синтетичний олігонуклеотид (сенсовий)		
25	<400> 31		
	gugugcactu cgsuucasa		19
	<210> 32		
30	<211> 832		
	<212> БІЛОК		
	<213> Вірус гепатиту В		
	<220>		
35	<223> Білок Р HBV (YP_009173866)		
	<400> 32		
	Met Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Arg Leu Leu Leu Leu Asp Asp		
	1 5 10 15		
40	Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly		
	20 25 30		
	Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val		
	35 40 45		
45	Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser		
	50 55 60		
	Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro His Trp Lys Thr Pro Ser Phe Pro		
	65 70 75 80		
	Asn Ile His Leu His Gln Asp Ile Ile Lys Lys Cys Glu Gln Phe Val		
	85 90 95		
50	Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Gln Leu Ile Met Pro		
	100 105 110		
	Ala Arg Phe Tyr Pro Lys Val Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly		
	115 120 125		
	Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr		
55	130 135 140		
	Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg		
	145 150 155 160		
	Glu Thr Thr His Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu		
	165 170 175		
60	Gln Asp Leu Gln His Gly Ala Glu Ser Phe His Gln Gln Ser Ser Gly		
	180 185 190		

UA 127745 C2

Ile Leu Ser Arg Pro Pro Val Gly Ser Ser Leu Gln Ser Lys His Arg
195 200 205
Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Ser Gln Gln Gly His Leu Ala Arg Arg
210 215 220
5 Gln Gln Gly Arg Ser Trp Ser Ile Arg Ala Gly Phe His Pro Thr Ala
225 230 235 240
Arg Arg Pro Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Asn
245 250 255
10 Phe Ala Ser Lys Ser Ala Ser Cys Leu His Gln Ser Pro Val Arg Lys
260 265 270
Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser Thr Phe Glu Lys His Ser Ser Ser Gly
275 280 285
His Ala Val Glu Phe His Asn Leu Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln
290 295 300
15 Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser
305 310 315 320
Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser Leu Ile Val Asn Leu Leu Glu
325 330 335
20 Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro
340 345 350
Arg Thr Pro Ser Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn
355 360 365
Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe
370 375 380
25 Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn
385 390 395 400
Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser
405 410 415
30 Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala
420 425 430
Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala
435 440 445
Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Leu Asn Asn Gln His Gly Thr Met
450 455 460
35 Pro Asp Leu His Asp Tyr Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu
465 470 475 480
Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro
485 490 495
40 Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met Gly Val Gly Leu Ser Pro
500 505 510
Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg
515 520 525
Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Tyr Met Asp Asp Val Val Leu
530 535 540
45 Gly Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr
545 550 555 560
Asn Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys
565 570 575
50 Arg Trp Gly Tyr Ser Leu Asn Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Cys Tyr
580 585 590
Gly Ser Leu Pro Gln Glu His Ile Ile Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe
595 600 605
Arg Lys Leu Pro Ile Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg
610 615 620
55 Ile Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr
625 630 635 640
Pro Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe
645 650 655
60 Thr Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn
660 665 670
Leu Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala

UA 127745 C2

		675				680					685					
	Asp	Ala	Thr	Pro	Thr	Gly	Trp	Gly	Leu	Val	Met	Gly	His	Gln	Arg	Met
		690					695					700				
5	Arg	Gly	Thr	Phe	Ser	Ala	Pro	Leu	Pro	Ile	His	Thr	Ala	Glu	Leu	Leu
	705					710					715					720
	Ala	Ala	Cys	Phe	Ala	Arg	Ser	Arg	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Ile	Gly	Thr
					725					730					735	
	Asp	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Ser	Arg	Lys	Tyr	Thr	Ser	Phe	Pro	Trp	Leu
				740					745					750		
10	Leu	Gly	Cys	Ala	Ala	Asn	Trp	Ile	Leu	Arg	Gly	Thr	Ser	Phe	Val	Tyr
			755					760						765		
	Val	Pro	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	Ala	Asp	Asp	Pro	Ser	Arg	Gly	Arg	Leu
		770					775					780				
	Gly	Leu	Ser	Arg	Pro	Leu	Leu	Arg	Leu	Pro	Phe	Arg	Pro	Thr	Thr	Gly
15	785					790					795					800
	Arg	Thr	Ser	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Pro	Ser	Val	Pro	Ser	His	Leu	Pro
					805					810					815	
	Asp	Arg	Val	His	Phe	Ala	Ser	Pro	Leu	His	Val	Ala	Trp	Arg	Pro	Pro
				820					825					830		
20	<210> 33															
	<211> 389															
	<212> БІЛОК															
	<213> Вірус гепатиту В															
25	<220>															
	<223> Білок S HBV (YP_009173869)															
	<400> 33															
30	Met	Gly	Gln	Asn	Leu	Ser	Thr	Ser	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp
	1				5					10					15	
	His	Gln	Leu	Asp	Pro	Ala	Phe	Arg	Ala	Asn	Thr	Ala	Asn	Pro	Asp	Trp
				20					25					30		
	Asp	Phe	Asn	Pro	Asn	Lys	Asp	Thr	Trp	Pro	Asp	Ala	Asn	Lys	Val	Gly
35			35					40					45			
	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Leu	Gly	Phe	Thr	Pro	Pro	His	Gly	Gly	Leu	Leu
		50					55					60				
	Gly	Trp	Ser	Pro	Gln	Ala	Gln	Gly	Ile	Leu	Gln	Thr	Leu	Pro	Ala	Asn
	65				70						75					80
40	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Thr	Asn	Arg	Gln	Ser	Gly	Arg	Gln	Pro	Thr	Pro
					85					90					95	
	Leu	Ser	Pro	Pro	Leu	Arg	Asn	Thr	His	Pro	Gln	Ala	Met	Gln	Trp	Asn
				100					105					110		
	Ser	Thr	Thr	Phe	His	Gln	Thr	Leu	Gln	Asp	Pro	Arg	Val	Arg	Gly	Leu
45			115					120					125			
	Tyr	Phe	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Val	Asn	Pro	Val	Leu
		130					135					140				
	Thr	Thr	Ala	Ser	Pro	Leu	Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Ile	Gly	Asp	Pro
		145				150					155					160
50	Ala	Leu	Asn	Met	Glu	Asn	Ile	Thr	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu
					165					170					175	
	Val	Leu	Gln	Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro
				180						185				190		
	Gln	Ser	Leu	Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Thr
55			195					200					205			
	Thr	Val	Cys	Leu	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser	Asn	His	Ser
		210						215					220			
	Pro	Thr	Ser	Cys	Pro	Pro	Thr	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu
		225				230					235					240
60	Arg	Arg	Phe	Ile	Ile	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe
					245					250					255	

UA 127745 C2

Ser Ala Gly Pro Cys Ala Leu Arg Phe Thr Ser Ala Arg Arg Met Glu
65 70 75 80
Thr Thr Val Asn Ala His Gln Ile Leu Pro Lys Val Leu His Lys Arg
85 90 95
5 Thr Leu Gly Leu Ser Ala Met Ser Thr Thr Asp Leu Glu Ala Tyr Phe
100 105 110
Lys Asp Cys Leu Phe Lys Asp Trp Glu Glu Leu Gly Glu Glu Ile Arg
115 120 125
10 Leu Lys Val Phe Val Leu Gly Gly Cys Arg His Lys Leu Val Cys Ala
130 135 140
Pro Ala Pro Cys Asn Phe Phe Thr Ser Ala
145 150

<210> 37
15 <211> 212
<212> БІЛОК
<213> Вірус гепатиту В

<220>
20 <223> Білок PreC HBV (YP_009173857.1)

<400> 37
Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr
1 5 10 15
25 Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile
20 25 30
Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu
35 40 45
Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser
50 55 60
30 Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His
65 70 75 80
His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr
85 90 95
35 Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp
100 105 110
Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln
115 120 125
40 Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val
130 135 140
Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala
145 150 155 160
Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr
165 170 175
45 Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro
180 185 190
Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg
195 200 205
50 Glu Ser Gln Cys
210

<210> 38
<211> 843
<212> БІЛОК
55 <213> Вірус гепатиту В

<220>
<223> Білок pol HBV (BAA32913.1)

<400> 38
60 Met Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Lys Leu Leu Leu Leu Asp Asp

UA 127745 C2

	1			5				10			15					
	Glu	Ala	Gly	Pro	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Pro	Arg	Leu	Ala	Asp	Glu	Gly
				20				25			30					
5	Leu	Asn	Arg	Arg	Val	Ala	Glu	Asp	Leu	Asn	Leu	Gly	Asn	Leu	Asn	Val
			35					40			45					
	Ser	Ile	Pro	Trp	Thr	His	Lys	Val	Gly	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55				60					
	Ser	Thr	Val	Pro	Val	Phe	Asn	Pro	Glu	Trp	Gln	Thr	Pro	Ser	Phe	Pro
		65				70					75				80	
10	His	Ile	His	Leu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ile	Asn	Arg	Cys	Gln	Gln	Tyr	Val
				85						90					95	
	Gly	Pro	Leu	Thr	Val	Asn	Glu	Lys	Arg	Arg	Leu	Lys	Leu	Ile	Met	Pro
				100					105					110		
	Ala	Arg	Phe	Tyr	Pro	Asn	Leu	Thr	Lys	Tyr	Leu	Pro	Leu	Asp	Lys	Gly
15			115					120			125					
	Ile	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Pro	Glu	His	Ala	Val	Asn	His	Tyr	Phe	Lys	Thr
		130					135				140					
	Arg	His	Tyr	Leu	His	Thr	Leu	Trp	Lys	Ala	Gly	Ile	Leu	Tyr	Lys	Arg
		145				150					155				160	
20	Glu	Thr	Thr	Arg	Ser	Ala	Ser	Phe	Cys	Gly	Ser	Pro	Tyr	Ser	Trp	Glu
				165						170					175	
	Gln	Glu	Leu	Gln	His	Gly	Arg	Leu	Val	Phe	Gln	Thr	Ser	Thr	Arg	His
				180					185					190		
	Gly	Asp	Lys	Ser	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser	Ser	Gly	Ile	Leu	Ser	Arg	Ser
25			195					200			205					
	Pro	Val	Gly	Pro	Cys	Val	Arg	Ser	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Arg	Leu	Gly
			210				215				220					
	Leu	Gln	Pro	Gln	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Lys	Ser	Gly	Arg	Ser
				225		230					235				240	
30	Gly	Ser	Ile	Arg	Ala	Arg	Val	His	Pro	Thr	Thr	Arg	Arg	Ser	Phe	Gly
				245						250					255	
	Val	Glu	Pro	Ser	Gly	Ser	Gly	His	Ile	Asp	Asn	Ser	Ala	Ser	Ser	Thr
				260					265					270		
	Ser	Ser	Cys	Leu	His	Gln	Ser	Ala	Val	Arg	Lys	Thr	Ala	Tyr	Ser	His
35			275					280					285			
	Leu	Ser	Thr	Ser	Lys	Arg	Gln	Ser	Ser	Ser	Gly	His	Ala	Val	Glu	Leu
			290				295				300					
	His	His	Ile	Pro	Pro	Ser	Ser	Ala	Thr	Pro	Gln	Ser	Lys	Gly	Pro	Ile
				305		310					315				320	
40	Leu	Ser	Cys	Trp	Trp	Leu	Gln	Phe	Arg	Asn	Ser	Lys	Pro	Cys	Ser	Asp
				325						330				335		
	Tyr	Cys	Leu	Ser	His	Ile	Val	Asn	Leu	Glu	Asp	Trp	Gly	Pro	Cys	
				340					345				350			
	Thr	Glu	His	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Arg	Ile	Pro	Arg	Thr	Pro	Ala	Arg
45			355					360					365			
	Val	Thr	Gly	Gly	Val	Phe	Leu	Val	Asp	Lys	Asn	Pro	His	Asn	Thr	Thr
			370				375				380					
	Glu	Ser	Arg	Leu	Val	Val	Asp	Phe	Ser	Gln	Phe	Ser	Arg	Gly	Ser	Thr
				385		390					395				400	
50	His	Val	Ser	Trp	Pro	Lys	Phe	Ala	Val	Pro	Asn	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr
				405						410				415		
	Asn	Leu	Leu	Ser	Ser	Asn	Leu	Ser	Trp	Leu	Ser	Leu	Asp	Val	Ser	Ala
				420				425					430			
	Ala	Phe	Tyr	His	Ile	Pro	Leu	His	Pro	Ala	Ala	Met	Pro	His	Leu	Leu
55			435					440					445			
	Val	Gly	Ser	Ser	Gly	Leu	Pro	Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Ser	Thr
			450				455					460				
	Ser	Arg	Asn	Ile	Asn	Tyr	Gln	His	Gly	Thr	Met	Gln	Asp	Leu	His	Asp
				465		470					475				480	
60	Ser	Cys	Ser	Arg	His	Leu	Tyr	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Tyr	Lys	Thr
				485						490				495		

UA 127745 C2

Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe
 500 505 510
 Arg Lys Ile Pro Met Gly Val Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln
 515 520 525
 5 Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys
 530 535 540
 Leu Ala Phe Ser Tyr Met Asp Asp Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val
 545 550 555 560
 10 Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser
 565 570 575
 Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser
 580 585 590
 Leu Asn Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Ser Trp Gly Thr Leu Pro Gln
 595 600 605
 15 Asp His Ile Val Leu Lys Ile Lys Gln Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val
 610 615 620
 Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu
 625 630 635 640
 20 Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro
 645 650 655
 Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr
 660 665 670
 Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala
 675 680 685
 25 Arg Gln Arg Ser Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala Asp Ala Thr Pro Thr
 690 695 700
 Gly Trp Gly Leu Ala Ile Gly His Arg Arg Met Arg Gly Thr Phe Val
 705 710 715 720
 30 Ala Pro Leu Pro Ile His Thr Ala Glu Leu Leu Ala Ala Cys Phe Ala
 725 730 735
 Arg Ser Arg Ser Gly Ala Lys Leu Ile Gly Thr Asp Asn Ser Val Val
 740 745 750
 Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala
 755 760 765
 35 Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Val Pro Ser Ala Leu
 770 775 780
 Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Tyr Arg Pro
 785 790 795 800
 40 Leu Leu His Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr
 805 810 815
 Ala Val Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe
 820 825 830
 Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
 835 840
 45
 <210> 39
 <211> 400
 <212> БІЛОК
 <213> Вірус гепатиту В
 50
 <220>
 <223> Білок оболонки HBV (BAA32914.1)
 <400> 39
 55 Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu
 1 5 10 15
 Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
 20 25 30
 60 Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
 35 40 45
 Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly

UA 127745 C2

	50					55					60						
	Pro	Gly	Phe	Thr	Pro	Pro	His	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Trp	Ser	Pro	Gln	
	65					70					75					80	
5	Ala	Gln	Gly	Thr	Leu	Thr	Thr	Val	Pro	Val	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	
					85					90					95		
	Thr	Asn	Arg	Gln	Ser	Gly	Arg	Gln	Pro	Thr	Pro	Ile	Ser	Pro	Pro	Leu	
				100					105				110				
	Arg	Asp	Ser	His	Pro	Gln	Ala	Met	Gln	Trp	Asn	Ser	Thr	Thr	Phe	His	
			115					120					125				
10	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Pro	Arg	Val	Arg	Gly	Leu	Tyr	Phe	Pro	Ala	Gly	
		130					135					140					
	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Thr	Thr	Ala	Ser	Pro	
	145				150						155					160	
	Ile	Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Pro	Ala	Pro	Asn	Met	Glu	
15				165						170				175			
	Asn	Thr	Thr	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Gln	Ala	Gly	
				180					185					190			
	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Ser	
			195				200					205					
20	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Thr	Cys	Pro	Gly	
		210					215					220					
	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser	Asn	His	Ser	Pro	Thr	Ser	Cys	Pro	
	225					230					235					240	
	Pro	Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg	Phe	Ile	Ile	
25				245						250				255			
	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	
				260					265					270			
	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	
			275					280					285				
30	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Ile	Pro	Ala	Gln	Gly	
		290					295					300					
	Thr	Ser	Met	Phe	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp	Gly	Asn	
	305					310					315					320	
	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Ala	Arg	Phe	Leu	
35				325						330				335			
	Trp	Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Arg	Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	
				340					345					350			
	Phe	Val	Gln	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Trp	Leu	Ser	Val	
			355				360						365				
40	Ile	Trp	Met	Met	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Asn	Ile	Leu	Ser	
		370					375					380					
	Pro	Phe	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	Cys	Leu	Trp	Val	Tyr	Ile	
	385					390					395					400	
45	<210>	40															
	<211>	210															
	<212>	БІЛОК															
	<213>	Вірус гепатиту В															
50	<220>																
	<223>	Білок X HBV (BAA32912.1)															
	<400>	40															
55	Met	Gly	Leu	Gly	Tyr	Trp	Pro	Ser	Pro	His	Ala	Trp	Asn	Leu	Cys	Gly	
	1				5					10					15		
	Ser	Ser	Ala	Asp	Pro	Tyr	Cys	Gly	Thr	Pro	Ser	Ser	Leu	Phe	Cys	Ser	
				20					25					30			
	Gln	Pro	Val	Trp	Ser	Glu	Thr	Asp	Arg	Asn	Gly	Gln	Leu	Cys	Cys	Ser	
			35					40					45				
60	Leu	Ser	Glu	Ile	His	Leu	Leu	Ser	Met	Ala	Ala	Arg	Val	Cys	Cys	Gln	
		50					55					60					

UA 127745 C2

Leu Asp Pro Ala Arg Asp Val Leu Cys Leu Arg Pro Val Gly Ala Glu
 65 70 75 80
 Ser Arg Gly Arg Pro Ile Ser Gly Pro Phe Gly Ser Leu Pro Ser Pro
 85 90 95
 5 Ser Ser Ser Ala Val Pro Ala Asp His Gly Ala His Leu Ser Leu Arg
 100 105 110
 Gly Leu Pro Val Cys Ala Phe Ser Ser Ala Gly Pro Cys Ala Leu Arg
 115 120 125
 Phe Thr Ser Ala Arg Arg Met Glu Thr Thr Val Asn Ala His Gln Val
 10 130 135 140
 Leu Pro Lys Val Leu Tyr Lys Arg Thr Leu Gly Leu Ser Ala Met Ser
 145 150 155 160
 Thr Thr Asp Leu Glu Ala Tyr Phe Lys Asp Cys Leu Phe Lys Asp Trp
 165 170 175
 15 Glu Glu Leu Gly Glu Glu Ile Arg Leu Met Ile Phe Val Leu Gly Gly
 180 185 190
 Cys Arg His Lys Leu Val Cys Ser Pro Ala Pro Cys Asn Phe Phe Thr
 195 200 205
 Ser Ala
 20 210

 <210> 41
 <211> 389
 <212> БІЛОК
 25 <213> Вірус гепатиту В

 <220>
 <223> Білок S великий HBV (P03138.3)

 30 <400> 41
 Met Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp
 1 5 10 15
 His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp
 20 25 30
 35 Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
 35 40 45
 Ala Gly Ala Phe Gly Leu Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu
 50 55 60
 Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Gln Thr Leu Pro Ala Asn
 65 70 75 80
 Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro
 85 90 95
 Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asn Thr His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn
 100 105 110
 45 Ser Thr Thr Phe His Gln Thr Leu Gln Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu
 115 120 125
 Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Leu
 130 135 140
 Thr Thr Ala Ser Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro
 145 150 155 160
 Ala Leu Asn Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu
 165 170 175
 Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro
 180 185 190
 55 Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr
 195 200 205
 Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser
 210 215 220
 Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu
 225 230 235 240
 60 Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe

UA 127745 C2

245 250 255
 Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu
 260 265 270
 5 Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met
 275 280 285
 Thr Thr Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys
 290 295 300
 Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala
 305 310 315 320
 10 Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu
 325 330 335
 Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr
 340 345 350
 15 Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu
 355 360 365
 Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys
 370 375 380
 Leu Trp Val Tyr Ile
 385
 20
 <210> 42
 <211> 183
 <212> БІЛОК
 <213> Вірус гепатиту В
 25
 <220>
 <223> Коровий білок HBV (P03146.1)
 <400> 42
 30 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30
 35 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45
 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60
 Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala
 65 70 75 80
 40 Ser Arg Asp Leu Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
 85 90 95
 Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
 100 105 110
 45 Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 115 120 125
 Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 130 135 140
 Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr
 145 150 155 160
 50 Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
 165 170 175
 Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
 180
 55 <210> 43
 <211> 3182
 <212> ДНК
 <213> Вірус гепатиту В
 60 <220>
 <223> Геном вірусу гепатиту В (штам ayw)

	<400> 43					
	aattccactg	catggcctga	ggatgagtgt	ttctcaaagg	tggagacagc	ggggtaggct 60
	gccttcctga	ctggcgattg	gtggaggcag	gaggcgatt	tgctggcaaa	gtttgtagta 120
5	tgccctgagc	ctgagggctc	caccccaaaa	ggcctccgtg	cggtgggggtg	aaaccagcc 180
	cgaatgctcc	agctcctacc	ttgttggcgt	ctggccaggt	gtccttggtg	ggattgaagt 240
	cccaatctgg	atthgcggtg	tttgcctctga	aggctggatc	caactgggtgg	tcgggaaaga 300
	atcccagagg	attgctggtg	gaaagattct	gccccatgct	gtagatcttg	ttcccaagaa 360
	tatggtgacc	cacaaaatga	ggcgctatgt	gttgtttctc	tcttatataa	tatacccgcc 420
10	ttccatagag	tgtgtaaata	gtgtctagtt	tggaagtaat	gattaactag	atgttctgga 480
	taataaggtt	taataccctt	atccaatggt	aaatatttgg	taacctttgg	ataaaacctg 540
	gcaggcataa	tcaattgcaa	tcttcttttc	tcattaactg	tgagtgggcc	tacaaactgt 600
	tcacattttt	tgataatgtc	ttggtgtaaa	tgtatattag	gaaaagatgg	tgttttccaa 660
	tgaggattaa	agacaggtac	agtagaagaa	taaagcccag	taaagttccc	caccttatga 720
15	gtccaaggaa	tactaacatt	gagattcccc	agattgagat	cttctgcgac	gcggcgattg 780
	agaccttcgt	ctgcgaggcg	agggagttct	tcttctaggg	gacctgcctc	gtcgtctaac 840
	aacagtagtc	tccggaagtg	ttgataggat	aggggcattt	ggtggtctat	aagctggagg 900
	agtgcgaatc	cacactccga	aagacaccaa	atactctata	actgtttctc	ttccaaaagt 960
	gagacaagaa	atgtgaaacc	acaagagttg	cctgaacttt	aggcccatat	tagtgttgac 1020
20	ataactgact	actaggtctc	tagacgctgg	atcttccaaa	ttaacaccca	cccaggtagc 1080
	tagagtcatt	agttccccc	agcaaagaat	tgcttgccctg	agtgcagtat	ggtgaggtga 1140
	acaatgctca	ggagactcta	aggcttcccg	atacagagct	gaggcggtat	ctagaagatc 1200
	tcgtactgaa	ggaaagaagt	cagaaggcaa	aaacgagagt	aactccacag	tagctccaaa 1260
	ttctttataa	gggtcgatgt	ccatgcccc	aagccaccca	aggcacagct	tggaggcttg 1320
25	aacagtagga	catgaacaag	agatgattag	gcagaggtga	aaaagttgca	tgggtgctggt 1380
	gcgcagacca	atthatgcct	acagcctcct	agtacaaaga	cctttaaact	aatctcctcc 1440
	cccaactcct	cccagctctt	aaacaacacg	tctttgaagt	atgcctcaag	gtcggctcgtt 1500
	gacattgctg	agagttccaag	agtcctctta	tgtaagacct	tgggcaatat	tgggtggcg 1560
	ttcacggtgg	tctccatgcg	acgtgcagag	gtgaagcga	gtgcacacgg	tccggcagat 1620
30	gagaaggcac	agacggggag	tccgcgtaaa	gagaggtgcg	ccccgtggtc	ggtcggaacg 1680
	gcagacggag	aaggggacga	gagagtccca	agcgaccccg	agaagggctg	tccgcaggat 1740
	tcagcgcgca	cgggacgtaa	acaaaggacg	tcccgcgcag	gatccagttg	gcagcacagc 1800
	ctagcagcca	tggaaacgat	gtatattttg	gggataggac	aacagagtta	tcagtcccga 1860
	taatgthtgc	tccagacctg	ctgcgagcaa	aacaagcggc	taggagttcc	gcagtatgga 1920
35	tcggcagagg	agccgaaaag	gttccacgca	tgcgctgatg	gcccattgacc	aagccccagc 1980
	cagtgggggt	tgcgtcagca	aacacttggc	acagacctgg	ccgttgccgg	gcaacggggg 2040
	aaaggttcag	gtattgttta	cacagaaagg	ccttgtaagt	tggcgagaaa	gtgaaagcct 2100
	gcttagattg	aatacatgca	tacaaaggca	tcaacgcagg	ataaccacat	tgtgtaaaaag 2160
	gggcagcaaa	acccaaaaaga	cccacaattc	gthgacatac	tttccaatca	ataggcctgt 2220
40	taataggaag	ttttctaaaa	cattctttga	ttttttgtat	gatgtgttct	tgtggcaagg 2280
	acccataaca	tccaatgaca	taaccataa	aatthtagaga	gtaaccccat	ctctttgtht 2340
	tgthtagggt	taaathgtata	cccaaagaca	aaagaaaatt	gghaacagcg	gtaaaaaggg 2400
	actcaagatg	ctgtacagac	ttggccccca	ataccacatc	atccatataa	ctgaaagcca 2460
	aacagthggg	gaaagcccta	cgaaccactg	aacaaatggc	actagthaac	tgagccagga 2520
45	gaaacgggct	gaggcccact	cccataggaa	ttttccgaaa	gcccaggatg	atgggatggg 2580
	aatacaggtg	caatttccgt	cgaaggtht	ggtacagcaa	caggagggat	acatagaggt 2640
	tccttgagca	gtagthcatgc	aggtccggca	tggthcccgth	ctggthttht	aggatcctgg 2700
	aathtagagga	caaacgggca	acatacctth	athgtccaga	agaaccaaca	agaagatgag 2760
	gcatagcagc	aggatgaaaga	ggaagatgat	aaaacgcccg	agacacatcc	agcgataacc 2820
50	aggacaagth	ggaggacaag	aggtthgtga	gtgathggag	gthggggact	gcgaattht 2880
	gccaaagacac	acggtagtht	cccctagaaa	athgagagaa	gtccaccacg	agthctagact 2940
	ctgcggtatt	gtgaggatth	thgtcaacaa	gaaaaacccc	gcctgthaca	cgagaagggg 3000
	thcttaggaat	cctgatgthga	thttctccat	gthcagcgca	gggtccccaa	thctcgagaa 3060
	gathgacgat	aagggagagg	cagthagthcag	aacagggtht	actgthcctg	aactggagcc 3120
55	accagcaggg	aaatacaggc	ctctcactct	gggatctthg	agagthtthgt	ggaagthttht 3180
	gg					3182

<210> 44

<211> 3182

60 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Зворотна комплементарна послідовність для SEQ ID NO: 16

5	<400> 44						
	ccacaacctt	ccaccaaaact	ctgcaagatc	ccagagtgag	aggcctgtat	ttccctgctg	60
	gtggctccag	ttcaggaaca	gtaaaccctg	ttctgactac	tgccctctccc	ttatcgtcaa	120
	tcttctcgag	gattggggac	cctgcgctga	acatggagaa	catcacatca	ggattcctag	180
	gacccttct	cggtttacag	gcggggtttt	tcttgttgac	aagaatcctc	acaataccgc	240
10	agagtctaga	ctcgtgggtg	acttctctca	atcttctagg	gggaactacc	gtgtgtcttg	300
	gccaaaattc	gcagtcccca	acctccaatc	actcaccaac	ctcttgcctc	ccaacttgtc	360
	ctggttatcg	ctggatgtgt	ctgcggcggt	ttatcatctt	cctcttcac	ctgctgctat	420
	gcctcatctt	cttggtgggt	cttctggact	atcaagggtat	gttgcccggt	tgctctctaa	480
	ttccaggatc	ctcaacaacc	agcacgggac	catgccggac	ctgcatgact	actgctcaag	540
15	gaacctctat	gtatecctcc	tggtgctgta	ccaaaccttc	ggacggaaat	tgcacctgta	600
	ttcccatccc	atcatcctgg	gctttcggaa	aattcctatg	ggagtgggccc	tcagcccgtt	660
	tctcctggct	cagtttacta	gtgccatttg	ttcagtggtt	cgtagggcctt	tccccactg	720
	tttggctttc	agttatatgg	atgatgtggt	attggggggcc	aagtctgtac	agcatcttga	780
	gtcccttttt	accgctgtta	ccaattttct	tttgtctttg	ggtatacatt	taaaccctaa	840
20	caaaacaaag	agatgggggt	actctctaaa	ttttatgggt	tatgtcattg	gatgttatgg	900
	gtccttgcca	caagaacaca	tcatacaaaa	aatcaaagaa	tgttttagaa	aacttcctat	960
	taacaggcct	attgattgga	aagtatgtca	acgaattgtg	ggtcttttgg	gttttgctgc	1020
	cccttttaca	caatgtgggt	atcctgcggt	gatgcctttg	tatgcatgta	ttcaatctaa	1080
	gcaggctttc	actttctcgc	caacttaca	ggcctttctg	tgtaaacaat	acctgaacct	1140
25	ttaccccggt	gccgggcaac	ggccaggctc	gtgccaaagt	tttgctgacg	caacccccac	1200
	tggtcggggc	ttggtcatgg	gccatcagcg	catgcgtgga	accttttcgg	ctcctctgcc	1260
	gatccatact	gcggaactcc	tagccgcttg	tttgcctcgc	agcaggctcg	gagcaaacat	1320
	tatcgggact	gataactctg	ttgtcctatc	ccgcaaatat	acatcgtttc	catgggtgct	1380
	aggctgtgct	gccaactgga	tcctgcgcgg	gacgtccttt	gtttacgtcc	cgtcggcgct	1440
30	gaatcctgcg	gacgaccctt	ctcggggctc	cttgggactc	tctcgtcccc	ttctccgtct	1500
	gccgttccga	ccgaccacgg	ggcgcacctc	tctttacgcg	gactccccgt	ctgtgecttc	1560
	tcactctgccc	gaccgtgtgc	acttcgcttc	acctctgcac	gtcgcattga	gaccaccgtg	1620
	aacgccacc	aaatattgcc	caaggctctt	cataagagga	ctcttggact	ctcagcaatg	1680
	tcaacgaccg	accttgaggc	atacttcaaa	gactgtttgt	ttaaagactg	ggaggagtgt	1740
35	ggggaggaga	ttagggttaa	ggcttttgta	ctaggaggct	gtaggcataa	attgggtctgc	1800
	gcaccagcac	catgcaactt	tttcacctct	gcctaatact	ctcttgttca	tgctcctactg	1860
	ttcaagcctc	caagctgtgc	cttgggtggc	tttggggcat	ggacatcgac	ccttataaag	1920
	aatttgagc	tactgtggag	ttactctcgt	ttttgccttc	tgacttcttt	ccttcagtac	1980
	gagatcttct	agataccgcc	tcagctctgt	atcgggaagc	cttagagtct	cctgagcatt	2040
40	gttcacctca	ccatactgca	ctcaggcaag	caattctttg	ctggggggaa	ctaatacttc	2100
	tagctacctg	ggtgggtggt	aatttggaa	atccagcgtc	tagagacct	gtagttagtt	2160
	atgtcaacac	taatattggc	ctaaagttca	ggcaactctt	gtggtttcc	atctcttgct	2220
	tcacttttgg	aagagaaaca	ggtatagagt	atcttggctc	tttcggagtg	tggtatcgca	2280
	ctcctccagc	ttatagacca	ccaaatgccc	ctatcctatc	aacacttccg	gagactactg	2340
45	ttgttagacg	acgaggcagg	ttccctagaa	gaagaactcc	ctcgcctcgc	agacgaaggt	2400
	ctcaatcgcc	gcgtcgcaga	agatctcaat	ctcgggaatc	tcaatgttag	tattccttgg	2460
	actcataagg	tggggaactt	tactgggctt	tattcttcta	ctgtacctgt	ctttaaactct	2520
	cattgaaaa	caccatcttt	tcctaata	catttacacc	aagacattat	caaaaaatgt	2580
	gaacagtttg	taggcccact	cacagttaat	gagaaaagaa	gattgcaatt	gattatgcct	2640
50	gccaggtttt	atccaaaggt	taccaaata	ttaccattgg	ataaggggat	taaaccctat	2700
	tatccagaac	atctagttaa	tcattacttc	caaactagac	actatttaca	cactctatgg	2760
	aaggcgggta	tattatataa	gagagaaaca	acacatagcg	cctcattttg	tgggtcacca	2820
	tattcttggg	aacaagatct	acagcatggg	gcagaatctt	tccaccagca	atcctctggg	2880
	attctttccc	gaccaccagt	tggatccagc	cttcagagca	aacaccgcaa	atccagattg	2940
55	ggacttcaat	ccaacaagg	acacctggcc	agacgccaac	aaggtaggag	ctggagcatt	3000
	cgggttgggt	ttcaccacc	cgcacggagg	ccttttgggg	tggagccctc	aggctcaggg	3060
	catactacaa	actttgccag	caaatccgcc	tcctgcctcc	accaatcgcc	agtcaggaag	3120
	gcagcctacc	ccgctgtctc	cacctttgag	aaacactcat	cctcaggcca	tgtagtgtaa	3180
60	tt						3182

<210> 45

<211> 389
 <212> БІЛОК
 <213> Вірус гепатиту В

5 <220>
 <223> Білок S HBV (P03142.4)

<400> 45

10	Met	Gly	Thr	Asn	Leu	Ser	Val	Pro	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Leu	Pro	Asp
	1				5					10					15	
	His	Gln	Leu	Asp	Pro	Ala	Phe	Gly	Ala	Asn	Ser	Thr	Asn	Pro	Asp	Trp
				20					25					30		
	Asp	Phe	Asn	Pro	Ile	Lys	Asp	His	Trp	Pro	Ala	Ala	Asn	Gln	Val	Gly
			35				40					45				
15	Val	Gly	Ala	Phe	Gly	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Pro	His	Gly	Gly	Ile	Leu
		50					55					60				
	Gly	Trp	Ser	Pro	Gln	Ala	Gln	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr	Val	Ser	Thr	Ile
	65				70						75				80	
	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Thr	Asn	Arg	Gln	Ser	Gly	Arg	Gln	Pro	Thr	Pro
20					85					90					95	
	Ile	Ser	Pro	Pro	Leu	Arg	Asp	Ser	His	Pro	Gln	Ala	Met	Gln	Trp	Asn
				100					105					110		
	Ser	Thr	Ala	Leu	His	Gln	Ala	Leu	Gln	Asp	Pro	Arg	Val	Arg	Gly	Leu
			115					120					125			
25	Tyr	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Val	Asn	Pro	Ala	Pro
		130					135					140				
	Asn	Ile	Ala	Ser	His	Ile	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg	Thr	Gly	Asp	Pro
	145				150						155				160	
	Val	Thr	Ile	Met	Glu	Asn	Ile	Thr	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu
30				165						170					175	
	Val	Leu	Gln	Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro
			180					185					190			
	Gln	Ser	Leu	Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Ser
			195				200					205				
35	Pro	Val	Cys	Leu	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser	Asn	His	Ser
		210					215					220				
	Pro	Thr	Ser	Cys	Pro	Pro	Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu
					230						235				240	
	Arg	Arg	Phe	Ile	Ile	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe
40				245							250				255	
	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu
			260						265				270			
	Ile	Pro	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr
			275				280						285			
45	Thr	Pro	Ala	Gln	Gly	Asn	Ser	Lys	Phe	Pro	Ser	Cys	Cys	Thr	Lys	
		290				295						300				
	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala
					310						315				320	
	Phe	Ala	Lys	Tyr	Leu	Trp	Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Arg	Phe	Ser	Trp	Leu
50				325							330				335	
	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Phe	Val	Gln	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr
			340						345				350			
	Val	Trp	Leu	Ser	Ala	Ile	Trp	Met	Met	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu
			355				360						365			
55	Tyr	Ser	Ile	Val	Ser	Pro	Phe	Ile	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	Cys
		370					375					380				
	Leu	Trp	Val	Tyr	Ile											
																385

60 <210> 46
 <211> 185

<212> БІЛОК
 <213> Вірус гепатиту В

<220>

5 <223> Коровий білок HBV (P03149.1)

<400> 46

	Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Glu	Leu	Leu
	1				5					10					15	
10	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Val	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp
				20					25					30		
	Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	Tyr	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	His	Cys
				35				40					45			
15	Ser	Pro	His	His	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu
		50					55					60				
	Leu	Met	Thr	Leu	Ala	Thr	Trp	Val	Gly	Asn	Asn	Leu	Gln	Asp	Pro	Ala
	65					70					75				80	
	Ser	Arg	Asp	Leu	Val	Val	Asn	Tyr	Val	Asn	Thr	Asn	Met	Gly	Leu	Lys
					85					90					95	
20	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Trp	Phe	His	Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg
				100					105						110	
	Glu	Thr	Val	Leu	Glu	Tyr	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr
			115					120					125			
25	Pro	Pro	Ala	Tyr	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro
			130				135					140				
	Glu	Thr	Thr	Val	Val	Arg	Arg	Arg	Asp	Arg	Gly	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg
	145					150					155				160	
	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg
					165					170					175	
30	Arg	Ser	Gln	Ser	Arg	Glu	Ser	Gln	Cys							
				180					185							

<210> 47

<211> 3200

35 <212> ДНК
 <213> Вірус гепатиту В

<220>

40 <223> Повна послідовність ДНК вірусу гепатиту В (підтип adw)

<400> 47

	ttccactgcc	ttgcaccaag	ctctgcagga	tcccagagtc	aggggtctgt	atcttcctgc		60
	tggtggtccc	agttcaggaa	cagtaaacc	tgctccgaat	attgcctctc	acatctcgtc		120
45	aatctccgcg	aggactggg	accctgtgac	gatcatggag	aacatcacat	caggattcct		180
	aggaccctg	ctcgtgttac	aggcggggt	tttcttggtg	acaagaatcc	tcacaatacc		240
	gcagagtcta	gactcgtggt	ggacttctct	caattttcta	gggggatcac	ccgtgtgtct		300
	tggcaaaaat	tcgcagtccc	caacctccaa	tcactcacca	acctcctgtc	ctccaatttg		360
	tcttggttat	cgctggatgt	gtctgcggcg	ttttatcata	ttcctcttca	tcctgctgct		420
50	atgcctcatc	ttcttattgg	ttcttctgga	ttatcaaggt	atgttgcccg	tttgtcctct		480
	aattccagga	tcaacaaca	ccagtacggg	accatgcaaa	acctgcacga	ctcctgctca		540
	aggcaactct	aagtttccct	catgttgctg	tacaaaacct	acggatggaa	attgcacctg		600
	tattcccatc	ccatcgtcct	gggctttcgc	aaaataccta	tgggagtggg	cctcagtccg		660
	tttctcttgg	ctcagtttac	tagtgccatt	tgttcagtgg	ttcgtagggc	tttccccac		720
55	tgtttggtct	tcagctatat	ggatgatgtg	gtattggggg	ccaagtctgt	acagcatcgt		780
	gagtccttt	ataccgctgt	taccaatfff	ctttgtctc	tgggtataca	tttaaacct		840
	aacaaaaca	aaagatggg	ttattcccta	aacttcatgg	gctacataat	tggagttgg		900
	ggaactttgc	cacaggatca	tattgtacaa	aagatcaaac	actgttttag	aaaacttct		960
	gttaacaggc	ctattgattg	gaaagtatgt	caaagaattg	tgggtctttt	gggctttgct		1020
60	gctccattta	cacaatgtgg	atatcctgcc	ttaatgcctt	tgtatgcatg	tatacaagct		1080
	aaacaggctt	tcactttctc	gccaaacttac	aaggcctttc	taagtaaaca	gtacatgaac		1140

	ctttaccccc	ttgctcggca	acggcctggt	ctgtgccaaag	tgtttgctga	cgcaaccccc	1200
	actggctggg	gcttagccat	aggccatcag	cgcatgcgtg	gaacctttgt	ggctcctctg	1260
	ccgatccata	ctgcggaact	cctagccgct	tgttttgctc	gcagccgggtc	tggagcaaag	1320
	ctcatcggaa	ctgacaattc	tgtcgtcctc	tcgcggaaat	atacatcatt	tccatggctg	1380
5	ctaggetgta	ctgccaaactg	gacccctcgc	gggacgtcct	ttgtttacgt	cccgtcggcg	1440
	ctgaatcccc	cggacgacct	ctctcggggc	cgcttgggac	tctctcgtcc	ccttctccgt	1500
	ctgccgttcc	agccgaccac	ggggcgcacc	tctcttttacg	cggtctcccc	gtctgtgcct	1560
	tctcatctgc	cggtcctgtg	gcacttcgct	tcacctctgc	acgttgcatg	gcgaccaccg	1620
	tgaacgcccc	tcagatcctg	ccaaggtct	tacataagag	gactcttgga	ctcccagcaa	1680
10	tgtcaacgac	cgaccttgag	gcctacttca	aagactgtgt	gtttaaggac	tgggaggagt	1740
	tggggaggga	gattaggtta	atgatctttg	tattaggagg	ctgtaggcat	aaattgggtct	1800
	gcgaccagc	accatgcaac	tttttcacct	ctgcctaate	atctcttgta	catgtcccac	1860
	tgttcaagcc	tccaagctgt	gccttgggtg	gctttggggc	atggacattg	acccttataa	1920
	agaatttggg	gctactgtgg	agttactctc	gtttttgcct	tctgacttct	ttccttccgt	1980
15	acgagatctc	ctagacaccg	cctcagctct	gtatcgagaa	gccttagagt	ctcctgagca	2040
	ttgctcacct	caccatactg	cactcaggca	agccattctc	tgctgggggg	aattgatgac	2100
	tctagctacc	tgggtgggta	ataatttgca	agatccagca	tccagagatc	tagtagtcaa	2160
	ttatgttaat	actaacatgg	gtttaaagat	caggcaacta	ttgtggtttc	atatactctg	2220
	ccttactttt	ggaagagaga	ctgtacttga	atatttggtc	tctttcggag	tgtggattcg	2280
20	cactcctcca	gcctatagac	caccaaagtc	ccctatctta	tcaaacacttc	cggaaactac	2340
	tgttgtaga	cgacgggacc	gaggcaggtc	ccctagaaga	agaactccct	cgctcgcag	2400
	acgcagatct	caatcgccgc	gtcgcagaag	atctcaatct	cgggaatctc	aatgttagta	2460
	ttccttgacc	tcataaggtc	ggaaacttta	cggggcttta	ttcctctaca	gtacctatct	2520
	ttaatcctga	atggcaact	ccttcctttc	ctaagattca	tttacaagag	gacattatta	2580
25	ataggtgtca	acaatttgtg	ggcctctca	ctgtaaata	aaagagaaga	ttgaaattaa	2640
	ttatgcctgc	tagattctat	cctaccaca	ctaaatattt	gcccttagac	aaaggaatta	2700
	aacctatta	tccagatcag	gtagttaatc	attacttcca	aaccagacat	tatttacata	2760
	ctctttggaa	ggctggatt	ctatataaga	gggaaaccac	acgtagcga	tcattttgcy	2820
	ggtcaccata	ttcttgggaa	caagagctac	agcattcgca	aaggcatggg	gacgaatctt	2880
30	tctgttccca	accctctggg	attccttccc	gatcatcagt	tggaccctgc	attcggagcc	2940
	aactcaaca	atccagattg	ggacttcaac	cccatcaagg	accactggcc	agcagccaac	3000
	caggtaggag	tgggagcatt	cgggccaggg	ctcaccctc	cacacggcgg	tattttgggg	3060
	tggagccctc	aggctcaggg	catattgacc	acagtgtcaa	caattcctcc	tcctgcctcc	3120
	accaatcggc	agtcaggaag	gcagcctact	cccatctctc	cacctctaag	agacagtcac	3180
35	cctcaggcca	tgcagtgga					3200

<210> 48

<211> 3200

<212> ДНК

40 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Зворотна комплементарна послідовність для SEQ ID NO: 47

45 <400> 48

	ttccactgca	tggcctgagg	atgactgtct	cttagagggtg	gagagatggg	agtaggctgc	60
	cttctgact	gccgattggg	ggaggcagga	ggaggaattg	ttgacactgt	ggccaatatg	120
	ccctgagcct	gagggtccca	ccccaaaata	ccgccgtgtg	gaggggtgag	ccctggccccg	180
	aatgctccca	ctcctacctg	gttggctgct	ggccagtggt	ccttgatggg	gttgaagtcc	240
50	caatctggat	ttgttgagtt	ggctccgaat	gcagggtcca	actgatgac	gggaaggaat	300
	cccagagggg	tgggaacaga	aagattcgtc	cccatgcctt	tgcgaatgct	gtagctcttg	360
	ttcccaagaa	tatggtgacc	cgcaaaatga	tgcgctacgt	gtggtttccc	tcttatatag	420
	aataccagcc	ttccaaagag	tatgtaaata	atgtctgggt	tggaaagta	gattaactac	480
	ctgatctgga	taataagggt	taattccttt	gtctaagggc	aaatatttag	tgtgggtagg	540
55	atagaatcta	gcaggcataa	ttaatttcaa	tcttctcttt	tcatctacag	tgagagggcc	600
	cacaaattgt	tgacacctat	taataatgtc	ctcttgtaaa	tgaatcttag	gaaaggaagg	660
	agtttgccat	tcaggattaa	agataggtac	tgtagaggaa	taaagccccg	taaagtttcc	720
	gaccttatga	gtccaaggaa	tactaacatt	gagattcccc	agattgagat	cttctgcgac	780
	gcggcgattg	agatctgcgt	ctgcgaggcg	agggagttct	tcttctaggg	gacctgcctc	840
60	ggccccgtcg	tctaacaaca	gtagtttccg	gaagtgttga	taagataggg	gcatttgggtg	900
	gtctataggc	tggaggagtg	cgaatccaca	ctccgaaaga	gaccaaata	tcaagtacag	960

	tctctcttcc	aaaagtaagg	caagatatat	gaaaccacaa	tagttgcctg	atctttaaac	1020
	ccatgttagt	attaacataa	ttgactacta	gatctctgga	tgctggatct	tgcaaattat	1080
	taccaccca	ggtagctaga	gtcatcaatt	ccccccagca	gagaatggct	tgccctgagtg	1140
	cagtatgggtg	aggtgagcaa	tgctcaggag	actctaaggc	ttctcgatac	agagctgagg	1200
5	cggtgtctag	gagatctcgt	acggaaggaa	agaagtcaga	aggcaaaaac	gagagtaact	1260
	ccacagtagc	tccaaattct	ttataaggg	caatgtccat	gccccaaagc	cacccaaggc	1320
	acagcttggg	ggcttgaaca	gtgggacatg	tacaagagat	gatttaggcag	aggtgaaaaa	1380
	gttgcatggt	gctgggtgcg	agaccaat	atgcctacag	cctcctaata	caaagatcat	1440
	taacctaate	tctccccca	actcctccca	gtccttaaac	acacagtctt	tgaagttaggc	1500
10	ctcaaggtcg	gtcgttgaca	ttgctgggag	tccaagagtc	ctcttatgta	agaccttggg	1560
	caggatctga	tgggcgttca	cgggtgctcg	catgcaacgt	gcagaggtga	agcgaagtgc	1620
	acacggaccg	gcagatgaga	aggcacagac	ggggagaccg	cgtaaagaga	ggtgctcccc	1680
	gtggtcggct	ggaacggcag	acggagaagg	ggacgagaga	gtcccaagcg	gccccgagag	1740
	gggtcgtccg	cgggattcag	cgccgacggg	acgtaaacia	aggacgtccc	gcgaaggatc	1800
15	cagttggcag	tacagcctag	cagccatgga	aatgatgtat	atctccgaga	gaggacgaca	1860
	gaattgtcag	ttccgatgag	ctttgctcca	gaccggctgc	gagcaaaaaca	agcggctagg	1920
	agttccgag	tatggatcgg	cagaggagcc	acaaaggttc	cacgcatgcg	ctgatggcct	1980
	atggctaagc	cccagccagt	gggggttgcg	tcagcaaaaca	cttggcacag	accaggccgt	2040
	tgccgagcaa	cggggtaaag	gttcatgtac	tgtttactta	gaaaggcctt	gtaagttggc	2100
20	gagaaagtga	aagcctgttt	agcttgata	catgcataca	aaggcattaa	ggcaggatat	2160
	ccacattgtg	taaatggagc	agcaaagccc	aaaagaccca	caattctttg	acatactttc	2220
	caatcaatag	gctgtttaac	aggaagtttt	ctaaaacagt	gtttgatctt	ttgtacaata	2280
	tgatcctgtg	gcaaagttcc	ccaacttcca	attatgtagc	ccatgaagtt	tagggaataa	2340
	ccccatcttt	ttgttttggt	agggtttaaa	tgtataacca	gagacaaaag	aaaattggta	2400
25	acagcgggat	aaagggactc	acgatgctgt	acagacttgg	cccccaatac	cacatcatcc	2460
	atatagctga	aagccaaaca	gtgggggaaa	gccctacgaa	ccactgaaca	aatggcacta	2520
	gtaaactgag	ccaagagaaa	cggactgagg	cccactccca	taggtatttt	gcgaaagccc	2580
	aggacgatgg	gatgggaata	caggtgcaat	ttccatccgt	aggttttgta	cagcaacatg	2640
	agggaaactt	agagttgcct	tgagcaggag	tcgtgcaggt	tttgcatggt	cccgtactgg	2700
30	ttgtttgtga	tcttggaaat	agaggacaaa	cgggcaacat	accttgataa	tccagaagaa	2760
	ccaataagaa	gatgaggcat	agcagcagga	tgaagaggaa	tatgataaaa	cgccgcagac	2820
	acatccagcg	ataaccagga	caaattggag	gacaggaggt	tggtgagtga	ttggaggttg	2880
	gggactgcca	atthttggcca	agacacacgg	gtgatcccc	tagaaaattg	agagaagtcc	2940
	accacgagtc	tagactctgc	ggtattgtga	ggattcttgt	caacaagaaa	aacccccgct	3000
35	gtaacacgag	caggggtcct	aggaatcctg	atgtgatgtt	ctccatgatc	gtcacagggt	3060
	ccccagtcct	cgcgagatt	gacgagatgt	gagaggcaat	attcggagca	gggtttactg	3120
	ttcctgaact	ggagccacca	gcaggaagat	acagaccctt	gactctggga	tcttgcagag	3180
	cttggtgcaa	ggcagtgga					3200
40	<210>	49					
	<211>	3182					
	<212>	ДНК					
	<213>	Вірус гепатиту В					
45	<220>						
	<223>	Вірус гепатиту В підтип ауw, повний геном					
	<400>	49					
50	aattccacaa	cctttcacca	aactctgcaa	gatcccagag	tgagaggcct	gtatttccct	60
	gctgggtggct	ccagttcagg	agcagtaaac	cctgttccga	ctactgcctc	tcccttatcg	120
	tcaatcttct	cgaggattgg	ggaccctgcg	ctgaacatgg	agaacatcac	atcaggattc	180
	ctaggacccc	ttctcgtggt	acaggcgggg	tttttcttgt	tgacaagaat	cctcacaata	240
	ccgagagtc	tagactcgtg	gtggacttct	ctcaatthtc	taggggggaa	taccgtgtgt	300
	cttggccaaa	attcgcagtc	cccaacctcc	aatcactcac	caacctcctg	tcttccaact	360
55	tgtcctgggt	atcgtctggat	gtgtctgagg	cgthttatca	tcttctctt	catcctgctg	420
	ctatgectca	tcttcttgtt	ggttcttctg	gactatcaag	gtatgttggc	cgthttgctt	480
	ctaattccag	gatcctcaac	caccagcacg	ggaccatgcc	gaacctgcat	gactactgct	540
	caaggaacct	ctatgtatcc	ctcctgttgc	tgtaccaaac	cttcggacgg	aaattgcacc	600
	tgtattccca	tcccatcatc	ctgggctttc	ggaaaattcc	tatgggagtg	ggcctcagcc	660
60	cgthttctct	ggctcagtht	actagtgcca	thttgttcagt	ggttcgtagg	gctthtcccc	720
	actgthttggc	thttcagtht	atggatgatg	tggtattggg	ggccaagtct	gtacagcatc	780

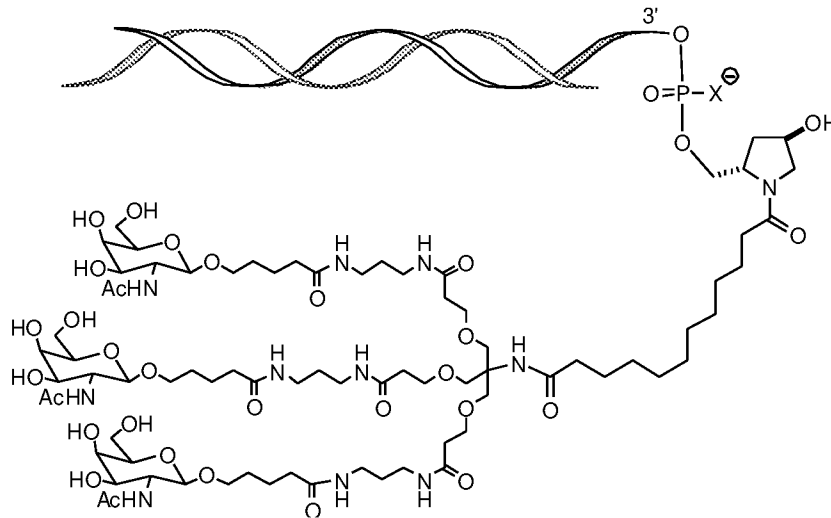
	ttgagtcctt	ttttaccgct	gttaccaatt	ttctttttgtc	tttgggtata	catttaaacc	840
	ctaacaaaac	aaagagatgg	ggttactctc	tgaattttat	gggttatgtc	attggaagtt	900
	atgggtcctt	gccacaagaa	cacatcatac	aaaaaatcaa	agaatgtttt	agaaaacttc	960
5	ctattaacag	gcctattgat	tggaaagtat	gtcaacgaat	tgtgggtcct	ttgggttttg	1020
	ctgccccatt	tacacaatgt	ggttatcctg	cgttaatgcc	cttgtatgca	tgtattcaat	1080
	ctaagcaggc	tttcactttc	tcgccaaact	acaaggcctt	tctgtgtaaa	caataacctga	1140
	acctttacc	cgttgcccg	caacggccag	gtctgtgcca	agtgtttgct	gacgcaacc	1200
	ccactggctg	gggcttggtc	atgggccatc	agcgcgtgcg	tggaaccttt	tcggctcctc	1260
	tgccgatcca	tactgcgga	ctcctagccg	cttgttttgc	tcgcagcagg	tctggagcaa	1320
10	acattatcgg	gactgataac	tctgttgccc	tctcccgcaa	atatacatcg	tatccatggc	1380
	tgctaggctg	tgctgccaac	tggatcctgc	gcgggacgtc	ctttgtttac	gtcccgtcgg	1440
	cgctgaatcc	tgcggacgac	ccttctcggg	gtcgcttggg	actctctcgt	ccccttctcc	1500
	gtctgccggt	ccgaccgacc	acggggcgca	cctctcttta	cgcgactcc	ccgtctgtgc	1560
	cttctcatct	gccggaccgt	gtgcacttgc	cttcacctct	gcacgtcgca	tggagaccac	1620
15	cgatgaacgc	caccgaatgt	tgcccaagg	cttacataag	aggactcttg	gactctctgc	1680
	aatgtcaacg	accgaccttg	aggcatactt	caaagactgt	ttgtttaaag	actgggagga	1740
	gttgggggag	gagattagat	taaaggctct	tgtactagga	ggctgtaggc	ataaattggt	1800
	ctgctcacca	gcacatgca	actttttcac	ctctgcctaa	tcatctcttg	ttcatgtcct	1860
	actgttcaag	cctccaagct	gtgccttggg	tggctttggg	gcatggacat	cgacccttat	1920
20	aaagaatttg	gagctactgt	ggagttactc	tcgtttttgc	cttctgactt	ctttccttca	1980
	gtacgagatc	ttctagatac	cgccctcagc	ctgtatcggg	aagccttaga	gtctcctgag	2040
	cattgttcac	ctcaccatac	tgcactcagg	caagcaattc	tttgctgggg	ggaactaatg	2100
	actctagcta	cctgggtggg	tgtaatttg	gaagatccag	catctagaga	cctagtagtc	2160
	agttatgtca	acactaatat	gggcctaaag	ttcaggcaac	tcttgtgggt	tcacatttct	2220
25	tgtctcactt	ttggaagaga	aaccgttata	gagtatttgg	tgtctttcgg	agtgtggatt	2280
	cgactcctc	cagcttatag	accacaaat	gcccctatcc	tatcaacact	tccggaaact	2340
	actgttggtt	gacgacgag	caggtcccct	agaagaagaa	ctccctcgcc	tcgcagacga	2400
	aggtctcaat	tcgccgctcg	cagaagatct	caatctcggg	aacctcaatg	ttagtattcc	2460
	ttggactcat	aagggtggga	actttactgg	tctttattct	tctactgtac	ctgtctttaa	2520
30	tcctcattgg	aaaacacat	cttttcctaa	tatacattta	caccaagaca	ttatcaaaaa	2580
	atgtgaacag	ttttagggcc	cacttacagt	taatgagaaa	agaagattgc	aattgattat	2640
	gcctgctagg	ttttatccaa	aggttaccaa	atatttacca	ttggataagg	gtattaaacc	2700
	ttattatcca	gaacatctag	ttaatcatta	cttccaaact	agacactatt	tacacactct	2760
	atggaaggcg	ggtatattat	ataagagaga	aacaacacat	agcgcctcat	tttgtgggtc	2820
35	accatattct	tgggaacaag	atctacagca	tggggcagaa	tctttccacc	agcaatcctc	2880
	tgggattcct	tcccgaccac	cagttggatc	cagccttcag	agcaaacaca	gcaaatccag	2940
	attgggactt	caatcccaac	aaggacacct	ggccagacgc	caacaaggta	ggagctggag	3000
	cattcgggct	gggtttcacc	ccaccgcacg	gaggcctttt	gggggtggagc	cctcaggctc	3060
	agggcatact	acaaactttg	ccagcaaatc	cgctcctgct	ctccaccaat	cgccagacag	3120
40	gaaggcagcc	taccccgctg	tctccacctt	tgagaaacac	tcatcctcag	gccatgcagt	3180
	gg						3182

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 45 1. Засіб на основі дwonиткової рибонуклеїнової кислоти (dsRNA) для інгібування експресії гена вірусу гепатиту В (HBV) або інгібування реплікації HBV в клітині, що містить сенсову нитку й антисенсову нитку, які утворюють дwonиткову ділянку, де сенсова нитка містить 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO: 10) і антисенсова нитка містить 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 16);
- 50 де a, c, g та u являють собою 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат та 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, відповідно; Af, Cf, Gf та Uf являють собою 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат та 2'-фторуридин-3'-фосфат, відповідно;
- 55 (Agn) являє собою аденозин-гліколь-нуклеїнову кислоту (GNA); s являє собою фосфотіоатний зв'язок; і L96 являє собою N-[трис(GalNAc-алкіл)-амідодеканоїл]-4-гідроксипролінол.
2. Засіб на основі dsRNA за п. 1, де щонайменше одна нитка містить 3'-липкий кінець, що складається зі щонайменше 1 нуклеотиду, або 3'-липкий кінець, що складається із 2
- 60 нуклеотидів.

3. Засіб на основі dsRNA за п. 1 або 2, де довжина двониткової ділянки становить 19-21 пару нуклеотидів або кожна нитка незалежно має 19-23 нуклеотиди.

4. Засіб на основі dsRNA за будь-яким із пп. 1-3, де L96 кон'югований на 3'-кінці сенсової нитки, як показано на наступному схематичному зображенні:



5

де X являє собою O або S.

5. Засіб на основі dsRNA за п. 4, де X являє собою O.

6. Засіб на основі dsRNA за будь-яким із пп. 1-5, де засіб на основі dsRNA інгібує експресію вірусу гепатиту В (HBV) в клітині.

10 7. Клітина, що містить засіб на основі dsRNA за будь-яким із пп. 1-6.

8. Фармацевтична композиція, що містить засіб на основі dsRNA за будь-яким із пп. 1-6 та фармацевтичний наповнювач.

15 9. Спосіб інгібування експресії гена вірусу гепатиту В (HBV) або інгібування реплікації HBV в клітині *in vitro*, при цьому спосіб передбачає приведення клітини в контакт із засобом на основі dsRNA за будь-яким із пп. 1-6 або фармацевтичною композицією за п. 8 з інгібуванням таким чином експресії або реплікації гена HBV в клітині.

10. Спосіб зниження рівня антигену вірусу гепатиту В (HBV) або зниження вірусного навантаження HBV у суб'єкта, інфікованого HBV, який включає введення суб'єктові засобу на основі dsRNA за будь-яким із пп. 1-6.

20 11. Спосіб за п. 10, де антиген HBV являє собою HBsAg або HBeAg.

12. Спосіб за п. 10 або 11, де суб'єкт є HBeAg-позитивним.

13. Спосіб за п. 10 або 11, де суб'єкт є HBeAg-негативним.

25 14. Спосіб за будь-яким із пп. 10-13, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять у дозі, що становить від 0,01 до 10 мг/кг, від 0,5 до 50 мг/кг або від 3 до 10 мг/кг; або у фіксованій дозі, що становить від 50 до 200 мг або від 50 до 900 мг.

15. Спосіб за будь-яким із пп. 10-14, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять підшкірно.

16. Спосіб за будь-яким із пп. 10-15, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять у кількості двох або більше доз.

30 17. Спосіб за будь-яким із пп. 10-16, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять один раз на місяць, один раз на два місяці, один раз на три місяці або не більше одного разу на місяць.

18. Спосіб за будь-яким із пп. 10-17, який додатково включає введення суб'єкту одного або більше додаткових терапевтичних засобів.

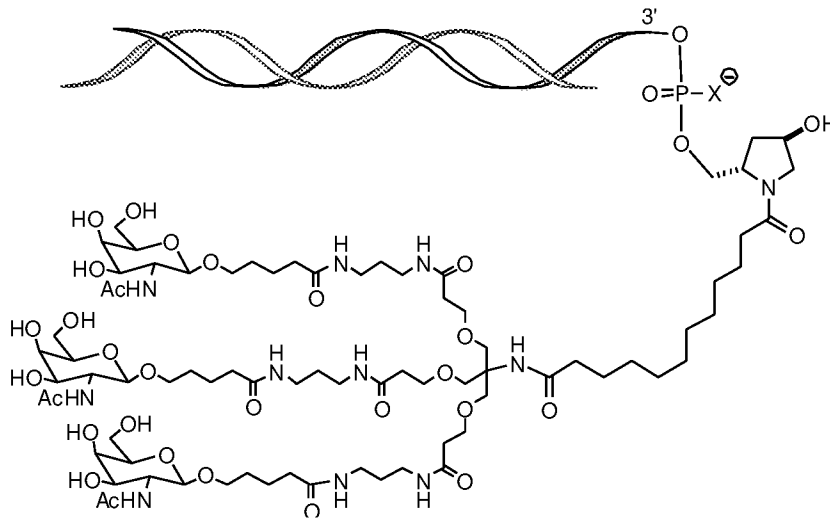
35 19. Спосіб за п. 18, де додатковий терапевтичний засіб являє собою протівірусний засіб, інгібітор зворотної транскриптази, імуностимулятор, терапевтичну вакцину, інгібітор вірусного проникнення, олігонуклеотид, що інгібує секрецію або вивільнення HbsAg, інгібітор збирання капсиду або інгібітор утворення ковалентно замкненої кільцевої (ccc) ДНК HBV або комбінацію будь-яких з вищенаведених.

40 20. Спосіб за п. 19, де додатковий терапевтичний засіб являє собою тенофовіру дизопроксилу фумарат (TDF), тенофовіру алафенамід, ламівудин, адефовіру дипівоксил, ентекавір (ETV), телбівудин, AGX-1009, пегільований інтерферон альфа-2а (PEG-IFN- α 2а), інтерферон альфа-2b, рекомбінантний людський інтерлейкін-7 або агоніст Toll-подібного рецептора 7 (TLR7).

21. Спосіб за будь-яким із пп. 10-20, де суб'єкт також має інфекцію, спричинену вірусом гепатиту D (HDV).

22. Спосіб за будь-яким із пп. 10-20, де суб'єкт також має гепатит дельта, гострий гепатит В; гострий фульмінантний гепатит В; хронічний гепатит В; фіброз печінки; захворювання печінки на термінальній стадії або гепатоцелюлярну карциному.
- 5 23. Спосіб зниження рівня антигену вірусу гепатиту В (HBV) або зниження вірусного навантаження HBV у суб'єкта, інфікованого HBV, який включає введення суб'єктові фармацевтичної композиції за п. 8.
24. Спосіб за п. 23, де антиген HBV являє собою HBsAg або HBeAg.
25. Спосіб за п. 23 або 24, де суб'єкт є HBeAg-позитивним.
- 10 26. Спосіб за п. 23 або 24, де суб'єкт є HBeAg-негативним.
27. Спосіб за будь-яким із пп. 23-26, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять у дозі, що становить від 0,01 до 10 мг/кг, від 0,5 до 50 мг/кг або від 3 до 10 мг/кг; або у фіксованій дозі, що становить від 50 до 200 мг або від 50 до 900 мг.
28. Спосіб за будь-яким із пп. 23-27, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять підшкірно.
- 15 29. Спосіб за будь-яким із пп. 23-28, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять у кількості двох або більше доз.
30. Спосіб за будь-яким із пп. 23-29, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять один раз на місяць, один раз на два місяці, один раз на три місяці або не більше одного разу на місяць.
31. Спосіб за будь-яким із пп. 23-30, що додатково включає введення суб'єкту одного або більше додаткових терапевтичних засобів.
- 20 32. Спосіб за п. 31, де додатковий терапевтичний засіб являє собою противірусний засіб, інгібітор зворотної транскриптази, імуностимулятор, терапевтичну вакцину, інгібітор вірусного проникнення, олігонуклеотид, що інгібує секрецію або вивільнення HbsAg, інгібітор збирання капсиду або інгібітор утворення ковалентно замкненої кільцевої (ccc) ДНК HBV або комбінацію будь-яких з вищенаведених.
- 25 33. Спосіб за п. 32, де додатковий терапевтичний засіб являє собою тенофовіру дизопроксилу фумарат (TDF), тенофовіру алафенамід, ламівудин, адефовіру дипівоксил, ентекавір (ETV), телбівудин, AGX-1009, пегильований інтерферон альфа-2а (PEG-IFN- α 2а), інтерферон альфа-2b, рекомбінантний людський інтерлейкін-7 або агоніст Toll-подібного рецептора 7 (TLR7).
- 30 34. Спосіб за будь-яким із пп. 23-33, де суб'єкт також має інфекцію, спричинену вірусом гепатиту D (HDV).
35. Спосіб за будь-яким із пп. 23-33, де суб'єкт також має гепатит дельта, гострий гепатит В; гострий фульмінантний гепатит В; хронічний гепатит В; фіброз печінки; захворювання печінки на термінальній стадії або гепатоцелюлярну карциному.
- 35 36. Спосіб лікування суб'єкта, що має інфекцію, спричинену вірусом гепатиту В (HBV), або асоційоване з вірусом гепатиту В (HBV) захворювання або порушення, який включає введення суб'єктові засобу на основі dsRNA за будь-яким із пп. 1-6.
37. Спосіб за п. 36, де асоційоване з HBV порушення являє собою хронічний гепатит та суб'єкт є HBeAg-позитивним.
- 40 38. Спосіб за п. 36, де асоційоване з HBV порушення являє собою хронічний гепатит та суб'єкт є HBeAg-негативним.
39. Спосіб за будь-яким із пп. 36-38, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять у дозі, що становить від 0,01 до 10 мг/кг, від 0,5 до 50 мг/кг або від 3 до 10 мг/кг; або у фіксованій дозі, що становить від 50 до 200 мг або від 50 до 900 мг.
40. Спосіб за будь-яким із пп. 36-39, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять підшкірно.
- 45 41. Спосіб за будь-яким із пп. 36-40, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять у кількості двох або більше доз.
42. Спосіб за будь-яким із пп. 36-41, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять один раз на місяць, один раз на два місяці, один раз на три місяці або не більше одного разу на місяць.
43. Спосіб за будь-яким із пп. 36-42, що додатково включає введення суб'єкту одного або 50 більше додаткових терапевтичних засобів.
44. Спосіб за п. 43, де додатковий терапевтичний засіб являє собою противірусний засіб, інгібітор зворотної транскриптази, імуностимулятор, терапевтичну вакцину, інгібітор вірусного проникнення, олігонуклеотид, що інгібує секрецію або вивільнення HbsAg, інгібітор збирання капсиду або інгібітор утворення ковалентно замкненої кільцевої (ccc) ДНК HBV або комбінацію 55 будь-яких з вищенаведених.
45. Спосіб за п. 44, де додатковий терапевтичний засіб являє собою тенофовіру дизопроксилу фумарат (TDF), тенофовіру алафенамід, ламівудин, адефовіру дипівоксил, ентекавір (ETV), телбівудин, AGX-1009, пегильований інтерферон альфа-2а (PEG-IFN- α 2а), інтерферон альфа-2b, рекомбінантний людський інтерлейкін-7 або агоніст Toll-подібного рецептора 7 (TLR7).

46. Спосіб за будь-яким із пп. 36-45, де асоційоване з HBV захворювання являє собою інфекцію, спричинену вірусом гепатиту D (HDV).
47. Спосіб за будь-яким із пп. 36-45, де асоційоване з HBV захворювання являє собою гепатит дельта, гострий гепатит В; гострий фульмінантний гепатит В; хронічний гепатит В; фіброз печінки; захворювання печінки на термінальній стадії або гепатоцелюлярну карциному.
- 5 48. Спосіб лікування суб'єкта, що має інфекцію, спричинену вірусом гепатиту В (HBV), або асоційоване з вірусом гепатиту В (HBV) захворювання або порушення, який включає введення суб'єктові фармацевтичної композиції за п. 8.
49. Спосіб за п. 48, де асоційоване з HBV порушення являє собою хронічний гепатит, та суб'єкт є HBeAg-позитивним.
- 10 50. Спосіб за п. 48, де асоційоване з HBV порушення являє собою хронічний гепатит, та суб'єкт є HBeAg-негативним.
51. Спосіб за будь-яким із пп. 48-50, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять у дозі, що становить від 0,01 до 10 мг/кг, від 0,5 до 50 мг/кг або від 3 до 10 мг/кг; або у фіксованій дозі, що становить від 50 до 200 мг або від 50 до 900 мг.
- 15 52. Спосіб за будь-яким із пп. 48-51, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять підшкірно. 53. Спосіб за будь-яким із пп. 48-52, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять у кількості двох або більше доз.
54. Спосіб за будь-яким із пп. 48-53, де засіб на основі dsRNA суб'єкту вводять один раз на місяць, один раз на два місяці, один раз на три місяці або не більше одного разу на місяць.
- 20 55. Спосіб за будь-яким із пп. 48-54, що додатково включає введення суб'єкту одного або більше додаткових терапевтичних засобів.
56. Спосіб за п. 55, де додатковий терапевтичний засіб являє собою противірусний засіб, інгібітор зворотної транскриптази, імуностимулятор, терапевтичну вакцину, інгібітор вірусного проникнення, олігонуклеотид, що інгібує секрецію або вивільнення HbsAg, інгібітор збирання капсиду або інгібітор утворення ковалентно замкненої кільцевої (ccc) ДНК HBV або комбінацію будь-яких з вищенаведених.
- 25 57. Спосіб за п. 56, де додатковий терапевтичний засіб являє собою тенофовіру дизопроксилу фумарат (TDF), тенофовіру алафенамід, ламівудин, адефовіру дипівоксил, ентекавір (ETV), телбівудин, AGX-1009, пегильований інтерферон альфа-2а (PEG-IFN-α2а), інтерферон альфа-2b, рекомбінантний людський інтерлейкін-7 або агоніст Toll-подібного рецептора 7 (TLR7).
- 30 58. Спосіб за будь-яким із пп. 48-57, де асоційоване з HBV захворювання являє собою інфекцію, спричинену вірусом гепатиту D (HDV).
59. Спосіб за будь-яким із пп. 48-57, де асоційоване з HBV захворювання являє собою гепатит дельта, гострий гепатит В; гострий фульмінантний гепатит В; хронічний гепатит В; фіброз печінки; захворювання печінки на термінальній стадії або гепатоцелюлярну карциному.
- 35 60. Засіб на основі двониткової рибонуклеїнової кислоти (dsRNA) для інгібування експресії гена вірусу гепатиту В (HBV) або інгібування реплікації HBV в клітині, що містить сенсову нитку й антисенсову нитку, які утворюють двониткову ділянку, де сенсова нитка містить 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO: 10) і антисенсова нитка містить 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 16);
- 40 де a, c, g та u являють собою 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат та 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, відповідно;
- Af, Cf, Gf та Uf являють собою 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат та 2'-фторуридин-3'-фосфат, відповідно;
- 45 (Agn) являє собою аденозин-гліколь-нуклеїнову кислоту (GNA);
- s являє собою фосфотіоатний зв'язок; і
- L96 являє собою N-[трис(GalNAc-алкіл)-амідодеканоїл]-4-гідроксипролінол, де
- 50 L96 кон'югований на 3'-кінці сенсової нитки, як показано на наступному схематичному зображенні:



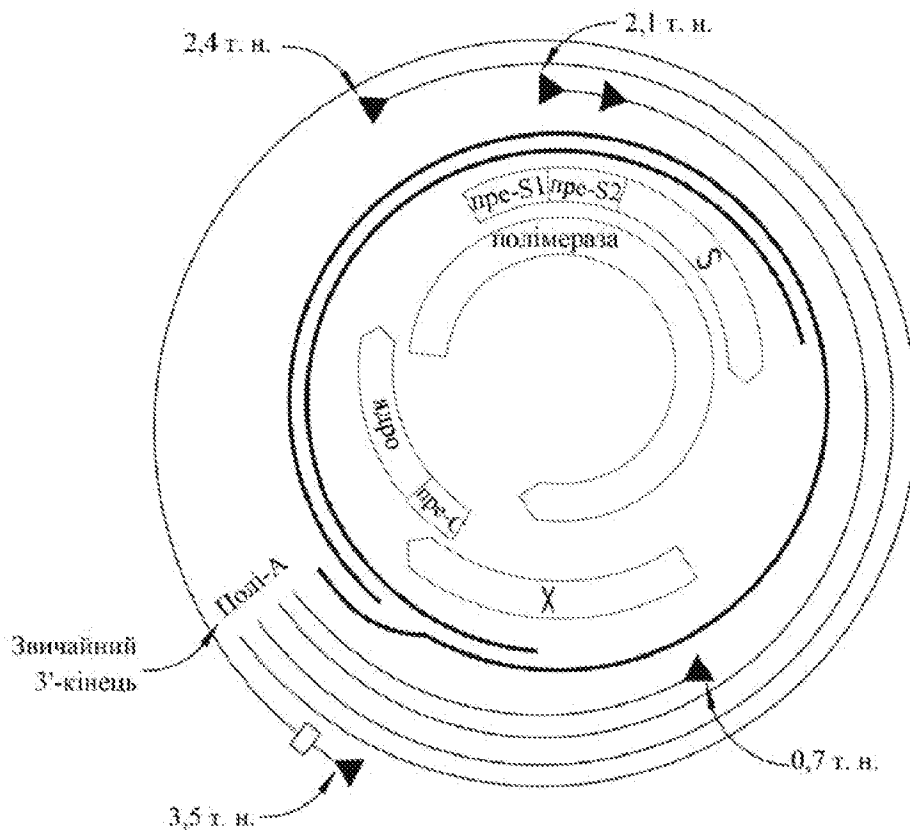
і де X являє собою O.

61. Спосіб лікування суб'єкта, що має інфекцію, спричинену вірусом гепатиту В (HBV), або асоційоване з вірусом гепатиту В (HBV) захворювання або порушення, який включає введення суб'єктові засобу на основі dsRNA за п. 60.

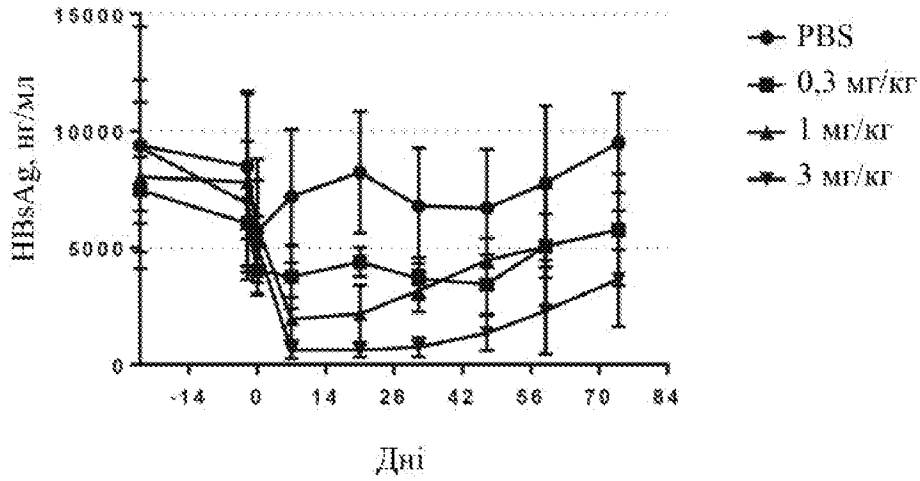
62. Спосіб за п. 61, де асоційоване з HBV захворювання являє собою інфекцію, спричинену вірусом гепатиту D (HDV).

63. Набір для інгібування експресії гена вірусу гепатиту В (HBV) або інгібування реплікації HBV в клітині, що містить:

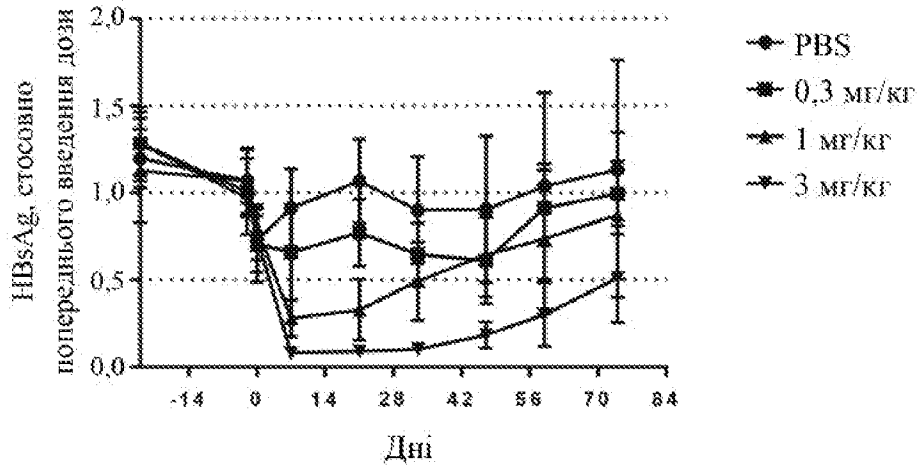
- а) засіб на основі dsRNA за будь-яким із пп. 1-6 або фармацевтичну композицію за п. 8; і
- б) інструкції із використання.



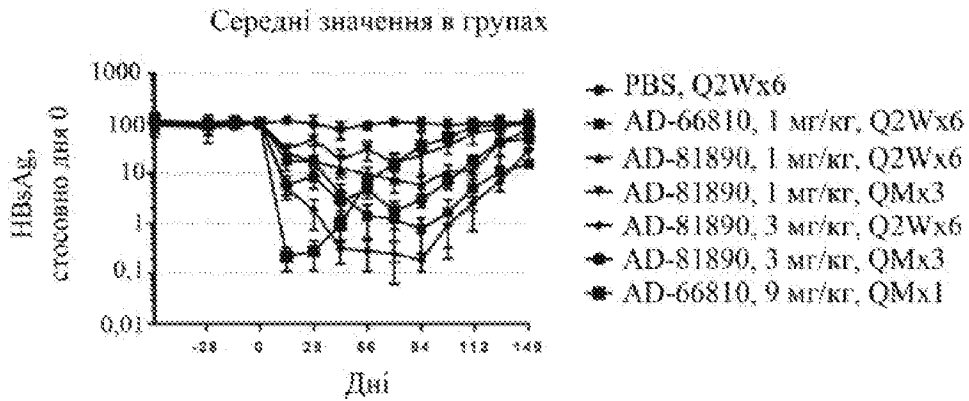
Фіг.1



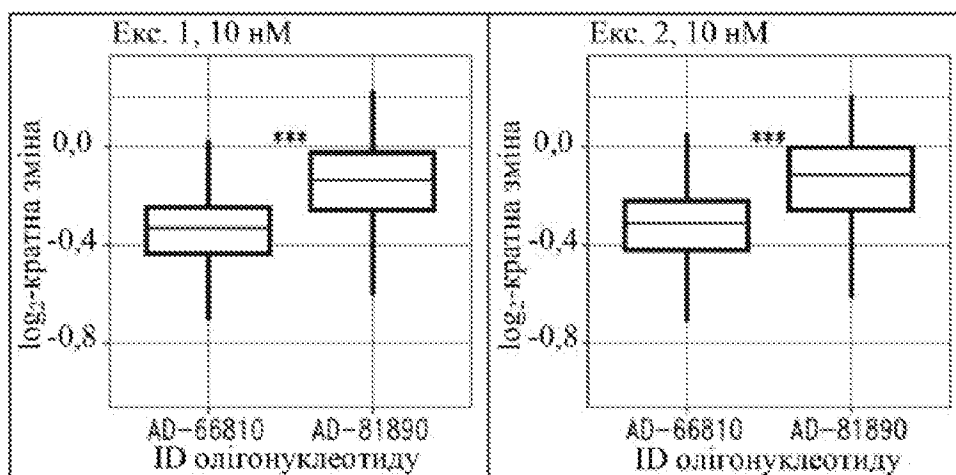
Фіг.2А



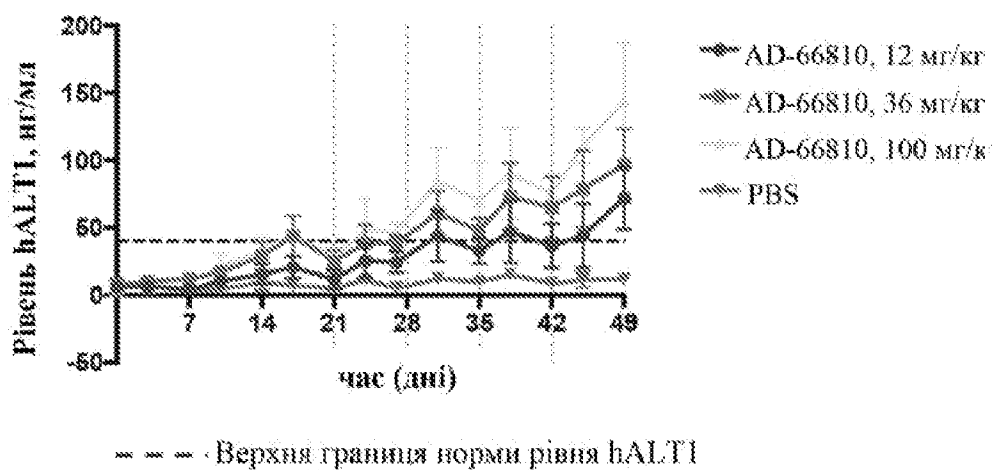
Фіг.2В



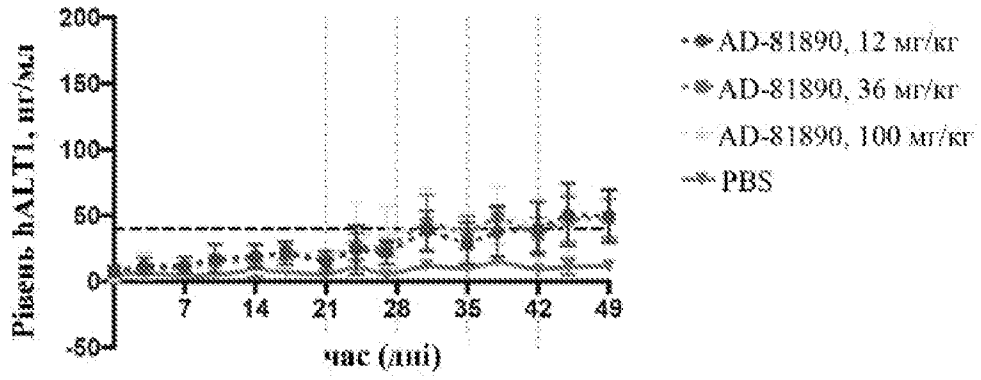
Фіг.3



Фіг.4



Фіг.5А



--- Верхня границя норми рівня hALT1

Фіг.5В