

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-533472

(P2019-533472A)

(43) 公表日 令和1年11月21日 (2019. 11. 21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010. 01)	C 1 2 N 15/113 1 0 0	4 C 0 8 4
A 6 1 P 31/20 (2006. 01)	C 1 2 N 15/113 Z N A	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-524363 (P2019-524363)
 (86) (22) 出願日 平成29年11月13日 (2017. 11. 13)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年6月20日 (2019. 6. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/061348
 (87) 国際公開番号 W02018/089914
 (87) 国際公開日 平成30年5月17日 (2018. 5. 17)
 (31) 優先権主張番号 62/420, 801
 (32) 優先日 平成28年11月11日 (2016. 11. 11)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/558, 770
 (32) 優先日 平成29年9月14日 (2017. 9. 14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 507042604
 ヤンセン バイオファーマ インク.
 アメリカ合衆国 94080 カリフォル
 ニア州 サウス サン フランシスコ グ
 ランド アベニュー 260-イー 2階
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100110663
 弁理士 杉山 共永
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

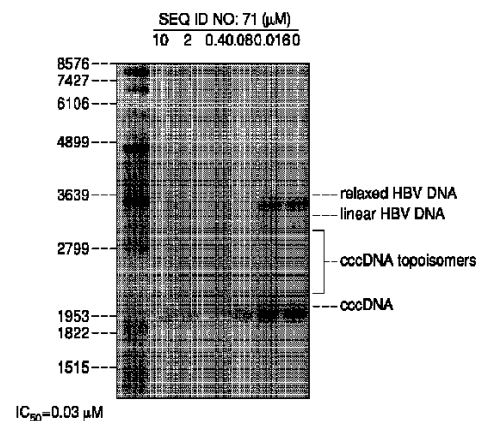
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HBV CCC DNAのオリゴヌクレオチド標的化戦略

(57) 【要約】

本開示は、B型肝炎ウイルス (HBV) の共有結合型閉環状 (ccc) DNAを標的とするオリゴヌクレオチド組成物を提供する。また、HBV感染症及び/又はHBV関連障害、例えば、慢性B型肝炎感染症、肝不全又は肝硬変、及び肝細胞癌を有すると診断された、又は疑われる対象を治療するための方法も開示される。

FIG. 2A



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 100 の HBV cccDNA ゲノム配列内の複数のヌクレオチドに相補的である配列を含む、オリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

前記オリゴヌクレオチドが、前記 HBV cccDNA ゲノムのエンハンサー I 領域内の少なくとも 12 ヌクレオチドに相補的である、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

HBV cccDNA ゲノムのヌクレオチド位置 967 ~ ヌクレオチド位置 1322 に対応するゲノム領域に存在する少なくとも 12 ヌクレオチドに相補的である配列を含む、オリゴヌクレオチド。

10

【請求項 4】

前記オリゴヌクレオチドの前記配列が、配列番号 1 ~ 65 からなる群から選択される、請求項 3 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

前記オリゴヌクレオチドが、第 2 のヌクレオチドに対するホスホロチオエート (PS) 結合を有する少なくとも 1 つの第 1 のヌクレオチドを含有し、前記第 1 のヌクレオチドが、F 及び O - アルキルからなる群から選択される置換で 2' 位において修飾され、前記 O - アルキルが、任意にアルコキシで置換されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 6】

シトシン核酸塩基を有する前記オリゴヌクレオチドの各ヌクレオチドが、2' - O - Me、5 - メチルシトシン (5mC) であるように修飾され、各他のヌクレオチドが、2' 位において O - Me 修飾 (mA、mG 及び mU) を含むように修飾され、各ヌクレオチドが、ヌクレオチド間にホスホロチオエート (PS) 結合を含有する、請求項 5 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

前記オリゴヌクレオチドの前記配列が、配列番号 66 ~ 72 及び 74 ~ 82 からなる群から選択される、請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

前記オリゴヌクレオチドが、第 2 のヌクレオチドに対するチオホスホロアミダート (NPS) 結合を有する少なくとも 1 つの第 1 のヌクレオチドを含有し、前記第 1 のヌクレオチドが、F 及び O - アルキルからなる群から選択される置換で 2' 位において修飾され、前記 O - アルキルが、任意にアルコキシで置換されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 9】

シトシン核酸塩基を有する前記オリゴヌクレオチドの各ヌクレオチドが、2' - O - Me、5 - メチルシトシン (5mC) を含むように修飾され、各他のヌクレオチドが、2' 位において O - Me 修飾 (mA、mG 及び mU) を含むように修飾され、各ヌクレオチドが、ヌクレオチド間にチオホスホロアミダート (NPS) 結合を含有する、請求項 8 に記載のオリゴヌクレオチド。

40

【請求項 10】

前記オリゴヌクレオチドの前記配列が、配列番号 73 である、請求項 9 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチドに共役された少なくとも 1 つの標的化部分を更に含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

前記オリゴヌクレオチドに共役された前記標的化部分が、GalNAc、パルミトイル及びトコフェロール誘導体からなる群から選択される、請求項 11 に記載のオリゴヌクレ

50

オチド。

【請求項 13】

前記オリゴヌクレオチドの前記配列が、配列番号 80 ~ 82 からなる群から選択される、請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含む、医薬組成物。

【請求項 15】

H B V の治療を必要とする対象において前記治療を行う方法であって、有効量の請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド又は請求項 14 に記載の医薬組成物を、前記対象に投与することを含む、方法。

10

【請求項 16】

前記オリゴヌクレオチドの前記配列が、配列番号 1 ~ 82 からなる群から選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記オリゴヌクレオチドの投与が、前記対象における H B e A g レベル、H B s A g レベル又は H B V D N A レベルのうちの少なくとも 1 つの減少をもたらす、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記オリゴヌクレオチドの投与が、前記対象における H B V c c c D N A の低減をもたらす、請求項 15 に記載の方法。

20

【請求項 19】

抗ウイルス剤、ヌクレオチド類似体、ヌクレオシド類似体、逆転写酵素阻害剤、免疫調節物質、治療ワクチン、ウイルス侵入阻害剤、カプシド阻害剤、s i R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及び c c c D N A 阻害剤からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上の追加の治療剤を、別個に、連続的に又は同時に前記対象に投与することを更に含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

H B V の前記治療に使用するための、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2016 年 11 月 11 日出願の米国出願第 62 / 420, 801 号及び 2017 年 9 月 14 日出願の同第 62 / 558, 770 号の利益及び優先権を主張するものであり、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

(発明の分野)

40

本開示は、B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus、H B V) の共有結合型閉環状 (covalently closed circular、c c c) D N A を標的とするオリゴヌクレオチド組成物、並びに H B V 感染症及び / 又は H B V 関連障害、例えば、慢性 B 型肝炎感染症を有すると診断された、又は疑われる対象を治療するために、それを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

本開示の背景の以下の説明は、単に本開示を理解する助けとして提供され、そのような開示が本開示の先行技術であることを容認することを意図するものではない。

【0004】

H B V は、複製プロセスにおいて逆転写酵素を利用する数少ない D N A ウイルスのうち

50

の1つであり、この複製プロセスは、核へのウイルスゲノムの侵入、脱殻、及び輸送を含む複数の段階を伴う。最初に、HBVゲノムの複製は、RNA中間体の生成を伴い、中間体は次いで逆転写されてDNAウイルスゲノムを産生する。HBVで細胞を感染させると、ウイルスゲノム弛緩型環状DNA (relaxed circular DNA、rcDNA) は、細胞核内に輸送され、ウイルスmRNAの転写テンプレートとして機能するエピソーム二本鎖の共有結合型閉環状DNA (cccDNA) に変換される。転写及び核輸出後、細胞質ウイルスプレゲノムRNA (pgRNA) は、HBVポリメラーゼ及びカプシドタンパク質とアセンブルされてヌクレオカプシドを形成し、その中で、ポリメラーゼ触媒による逆転写により、マイナス鎖DNAが得られ、これはその後、プラス鎖DNAにコピーされて、子孫rcDNAゲノムを形成する。次いで、成熟ヌクレオカプシドは、ウイルスエンベロープタンパク質と共にパッケージ化され、ビリオン粒子として退出するか、又は細胞内cccDNA増幅経路を通してcccDNAリザーバを増幅するために核に移送される。cccDNAは、HBV複製サイクルの必須成分であり、感染及びウイルス持続の確立に関与する。

10

20

30

40

50

【0005】

世界中の少なくとも2億5千万人が、逆転写を通して複製する肝変性DNAウイルスである、B型肝炎ウイルス(HBV)に慢性的に感染している。慢性感染は、終末期肝疾患のリスクを大幅に増加させる。現在の療法は、共有結合型閉環状(ccc)DNAと呼ばれる細胞内ウイルス複製中間体の難治性のために、完全な治癒を達成することはめったにない。感染時に、cccDNAは、入ってくるビリオン中のタンパク質結合した弛緩型環状(RC)DNAゲノムから、宿主細胞核内のプラスミド様のエピソームとして生成される。cccDNAは、全てのウイルスRNA、したがって新しいビリオンのテンプレートとして機能する。cccDNAは、急性HBV感染から回復した患者において数十年間にわたって持続し得る。

【0006】

蓄積する証拠は、ヌクレオシド(ヌクレオチド)類似体(NA)又はインターフェロン(interferon、IFN)などの現在の抗ウイルス治療単独では、cccDNAの持続性のために、ほとんどの慢性B型肝炎(chronic hepatitis B、CHB)患者を治癒できないことを実証している。NAは、ウイルスポリメラーゼを直接阻害することによってHBV複製を抑制する一方で、IFNは、HBV感染症に対する宿主免疫を強化する。ウイルスのリバウンドは、抗ウイルス治療の中止後に起こることが多い。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、cccDNAを標的とする新規抗ウイルス剤の必要性があるか、又はそれ故にcccDNAを含有する肝細胞は、慢性HBV感染を治癒するために必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、オリゴヌクレオチド及びその医薬組成物を対象とする。オリゴヌクレオチドは、配列番号100のHBV cccDNAゲノム配列内の複数のヌクレオチドに相補的である配列を含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、HBV cccDNAゲノム内の少なくとも12ヌクレオチドに相補的である配列を含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、HBV cccDNAゲノムのエンハンサーI領域内で少なくとも12ヌクレオチドに相補的である。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、HBV cccDNAゲノムのヌクレオチド位置967～ヌクレオチド位置1322に対応する領域に存在する、少なくとも12ヌクレオチドに相補的である配列を含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号1～65のうちのいずれか1つである。

【0009】

実施形態では、開示されるオリゴヌクレオチドは、第2のヌクレオチドに対するホスホ

ロチオエート（PS）結合又はチオホスホロアミダート（NPS）結合を有する少なくとも1つの第1のヌクレオチドを含有する。実施形態では、第1のヌクレオチドは、フッ素（F）又はO-アルキル、例えばO-メチル（O-Me）、O-エチル（O-Et）等を含む置換で、2'位において更に修飾される。O-アルキルは、アルコキシ、例えばO-メチル（O-Me）、O-エチル（O-Et）等で更に置換されてもよい。実施形態では、シトシン核酸塩基を有する任意の第1のヌクレオチドは、メチルシトシンであるように更に修飾される。

【0010】

実施形態では、開示されるオリゴヌクレオチドの各ヌクレオチドは、2'位におけるO-メチル置換と共に、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（PS）結合又はチオホスホロアミダート（NPS）結合を含有し、シトシン核酸塩基を有する任意のヌクレオチドは、メチルシトシン核酸塩基を含むように更に修飾される。実施形態では、配列番号1~65を有するオリゴヌクレオチドの各ヌクレオチドは、2'位におけるO-メチル置換と共に、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（PS）結合又はチオホスホロアミダート（NPS）結合を含有し、シトシン核酸塩基を有する任意のヌクレオチドは、メチルシトシン核酸塩基を含むように更に修飾される。実施形態では、オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号66~79のうちのいずれか1つである。

10

【0011】

実施形態では、開示されるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに共役された少なくとも1つの標的化部分を含有するように修飾される。オリゴヌクレオチドに共役された標的化部分は、GalNAc、パルミトイル又はトコフェロール誘導体であってもよい。実施形態では、配列番号1~79を有するオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに共役された少なくとも1つの標的化部分を含有するように修飾される。実施形態では、オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号80~82のうちのいずれか1つである。

20

【0012】

実施形態では、医薬組成物は、HBVcccDNAゲノム内の少なくとも12ヌクレオチドに相補的である配列を有する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、HBVcccDNAゲノムのエンハンサーI領域内で少なくとも12ヌクレオチドに相補的である。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、HBVcccDNAゲノムのヌクレオチド位置967~ヌクレオチド位置1322に対応する領域に存在する、少なくとも12ヌクレオチドに相補的である配列を含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドの少なくとも1つの第1のヌクレオチドは、第2のヌクレオチドに対するホスホロチオエート（PS）結合又はチオホスホロアミダート（NPS）結合、及び2'位においてフッ素（F）又はO-アルキル（任意にアルコキシで更に置換された）置換を含有するように修飾され、任意のシトシン核酸塩基は、メチルシトシンであるように更に修飾される。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの3'及び/又は5'末端で共役されたGalNAc、パルミトイル又はトコフェロール誘導体などの標的化部分で修飾される。実施形態では、医薬組成物中のオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号1~82のうちのいずれか1つである。

30

【0013】

本開示は、B型肝炎ウイルス（HBV）感染症の治療を必要とする対象において、治療する方法を更に対象とする。本方法は、有効量の本開示のオリゴヌクレオチド又はその医薬組成物を対象に投与することを含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号1~82のうちのいずれか1つである。実施形態では、オリゴヌクレオチドの投与は、対象におけるHBsAgレベル、HBsAgレベル又はHBV DNAレベルのうちの少なくとも1つの減少をもたらす。実施形態では、オリゴヌクレオチドの投与は、対象におけるHBVcccDNAの低減をもたらす。

40

【0014】

本開示の方法は、抗ウイルス剤、ヌクレオチド類似体、ヌクレオシド類似体、逆転写酵素阻害剤、免疫調節物質、治療ワクチン、ウイルス侵入阻害剤、カプシド阻害剤、siR

50

NA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びcccDNA阻害剤からなる群から選択される1種又は2種以上の追加の治療剤を、別個に、連続的に又は同時に対象に投与することを更に含む。

【0015】

加えて、本開示は、HBVの治療に使用するための開示されたオリゴヌクレオチドを対象とする。

【0016】

一態様では、本開示は、配列番号1～82又はその修飾からなる群から選択される配列を含むオリゴヌクレオチドを提供する。本開示はまた、配列番号1～82のうちのいずれかの相補的配列又はその修飾を含むオリゴヌクレオチドも提供する。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVcccDNAゲノムのエンハンサーI領域内にあるHBVDNA配列(すなわち、HBVゲノムのヌクレオチド位置960と1330とを含めてそれらの間に位置する標的ヌクレオチド配列)を標的とする。

【0018】

いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置969と位置987との間のどこかに位置するHBVDNA配列を標的とする。ある特定の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置1094と位置1116との間のどこかに位置するHBVDNA配列を標的とする。いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置1136と位置1155との間のどこかに位置するHBVDNA配列を標的とする。いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置1174と位置1194との間のどこかに位置するHBVDNA配列を標的とする。他の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置1194と位置1216との間のどこかに位置するHBVDNA配列を標的とする。いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置1297と位置1315との間のどこかに位置するHBVDNA配列を標的とする。

20

【0019】

一態様では、本開示は、HBV感染症若しくはHBV関連障害の治療、及び/又はHBV感染症若しくはHBV関連障害の徴候若しくは症状の治療を必要とする対象において治療するための方法を提供し、治療有効量の少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを対象に投与することを含み、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは、配列番号1～82からなる群から選択される配列を含む。

30

【0020】

一態様では、本開示は、HBVcccDNAを配列番号1～82のうちのいずれか1つの配列を有するオリゴヌクレオチドと接触させることを含む、HBVcccDNAにおけるDループ形成を誘導するための方法を提供する。別の態様では、本開示は、ヌクレオチド位置900～1310(エンハンサーI領域)からなるHBVcccDNAゲノムの標的領域を、HBVcccDNAの標的領域に対して少なくとも90%相補的であるオリゴヌクレオチドと接触させることを含む、HBVcccDNAにおけるDループ形成を誘導するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドは、HBVcccDNAとハイブリダイズして、抗原性Dループ構造の形成を誘導する。いくつかの実施形態では、Dループ形成の誘導は、先天性免疫を刺激する。

40

【0021】

一態様では、本開示は、HBVcccDNAゲノムのエンハンサーI付近又はその中の複数のヌクレオチドに相補的である配列を含むオリゴヌクレオチドを提供し、ここでエンハンサーIは、配列番号100のHBVcccDNAゲノム配列のヌクレオチド位置900～ヌクレオチド位置1310に対応する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレ

50

オチドは、HBV cccDNAゲノムのエンハンサーI領域内で少なくとも15ヌクレオチドに相補的である。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、HBV cccDNAゲノムのエンハンサーI領域内で少なくとも19ヌクレオチドに相補的である。

【0022】

別の態様では、本開示は、HBV cccDNAゲノムのヌクレオチド位置960～ヌクレオチド位置1330に対応するゲノム領域に存在する少なくとも15ヌクレオチドに相補的である配列を含むオリゴヌクレオチドを提供し、ここでHBV cccDNAゲノム配列は、配列番号100である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、HBV cccDNAゲノムのヌクレオチド位置960～ヌクレオチド位置1330に対応するゲノム領域に存在する、少なくとも19ヌクレオチドに相補的である配列を含む。追加的に又は代替的に、いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号1～82からなる群から選択される。追加的に又は代替的に、上記実施形態のうちのいずれかにおいて、オリゴヌクレオチドは、第2のヌクレオチドへのPS結合を有する少なくとも1つの第1のヌクレオチドを含み、当該第1のヌクレオチドは、F及びO-アルキルからなる群から選択される置換で2'位において修飾され、当該O-アルキルは、任意にアルコキシで置換される。追加的に又は代替的に、上記の実施形態のうちのいずれかにおいて、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオチドは、PS結合によってオリゴヌクレオチドの他のヌクレオチドに結合され、O-Meで2'位において修飾される。

10

【0023】

別の態様では、本開示は、HBVを治療する必要がある対象において治療する方法であって、有効量の本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドのうちのいずれかを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、HBV cccDNAゲノムのエンハンサーI領域内で少なくとも15ヌクレオチドに相補的である。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、HBV cccDNAゲノムのヌクレオチド位置960～ヌクレオチド位置1330に対応するゲノム領域に存在する、少なくとも19ヌクレオチドに相補的である配列を含む。追加的に又は代替的に、いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号1～82からなる群から選択される。

20

【0024】

ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの投与は、対象におけるHBsAgレベル、HBsAgレベル又はHBV DNAレベルのうちの少なくとも1つの減少をもたらす。追加的に又は代替的に、いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの投与は、対象におけるHBV cccDNAの肝臓レベルの低減をもたらす。オリゴヌクレオチドは、経口、局所、全身、静脈内、皮下、経皮、髄腔内、鼻腔内、腹腔内、肝内又は筋肉内投与され得る。

30

【0025】

追加的に又は代替的に、いくつかの実施形態では、本方法は、抗ウイルス剤、ヌクレオチド類似体、ヌクレオシド類似体、逆転写酵素阻害剤、免疫調節物質、治療ワクチン、ウイルス侵入阻害剤、カプシド阻害剤、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びcccDNA阻害剤からなる群から選択される1種又は2種以上の追加の治療剤を、別個に、連続的に又は同時に対象に投与することを更に含む。

40

【0026】

別の態様では、本開示は、HBVの治療に使用するためのオリゴヌクレオチドを提供し、ここでオリゴヌクレオチドは、HBV cccDNAゲノムのエンハンサーI付近又はその中の複数のヌクレオチドに相補的である配列を含み、エンハンサーIは、配列番号100のHBV cccDNAゲノムのヌクレオチド位置900～ヌクレオチド位置1310に対応する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、HBV cccDNAゲノムのヌクレオチド位置960～ヌクレオチド位置1330に対応するゲノム領域に存在する、少なくとも15ヌクレオチドに相補的である配列を含む。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号1～82からなる群から選択される。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 2 7 】

【図 1】HBV ゲノムの物理的マップを示す。HBV ゲノムは、長さがおおよそ 3 2 0 0 ヌクレオチドであり、エンハンサー I 領域のヌクレオチド配列は、位置 9 0 0 で始まり、位置 1 3 1 0 で終わる。

【図 2 A】様々な濃度の配列番号 7 1 で治療された HBV 感染した PHH のサザンプロット結果を示す。

【図 2 B】様々な濃度の配列番号 7 1 で治療された HBV 感染した PHH の q P C R 結果を示す。

【図 2 C】様々な濃度の配列番号 7 1 で治療された HBV 感染した PHH の c c c D N A レベルの低減率 % を示す。

【図 2 D】様々な濃度の配列番号 7 5、配列番号 7 2 及び配列番号 7 0 で治療された HBV 感染した PHH のサザンプロット結果を示す。図 2 A ~ 図 2 D において、PHH を 0 日目に HBV に感染させ、4 日目に示された c c c D N A 標的化オリゴヌクレオチドで治療した。1 1 日目に H i r t D N A 抽出法を使用して、PHH から HBV c c c D N A を抽出した。

【図 3 A】投与後 2 4 時間、7 2 時間、又は 1 6 8 時間のマウスにおける、配列番号 7 1 及び配列番号 8 0 (配列番号 7 1 は 3 ' G a l N A c を有する) のインビボ肝臓濃度を示す。

【図 3 B】マウスにおける配列番号 7 1 及び配列番号 8 0 の肝臓 C m a x 及び肝臓半減期を示す。図 3 A ~ 図 3 B について、1 0 m g / k g の示されたオリゴヌクレオチドを、C 5 7 B 1 / 6 雌マウス (n = 3) に皮下送達した。

【図 4 A】配列番号 7 1 及び配列番号 7 2 で治療された HBV 感染した PHH が、I F N 活性化遺伝子発現の増加を呈したことを示す。

【図 4 B】配列番号 7 1、配列番号 7 2、P B S (陰性対照) 及びレシキモド (R 8 4 8) (陽性対照) と接触させた P B M C (HBV 陰性ドナー由来) において観察されたサイトカイン誘導のレベルを示す。

【図 5 A】コンセンサス HBV ゲノム配列 (配列番号 1 0 0) を示す。

【図 5 B】コンセンサス HBV ゲノム配列 (配列番号 1 0 0) を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 8 】

現在の抗ウイルス療法は、細胞質 HBV ゲノム複製を阻害するが、これらの療法は、ウイルス転写をテンプレートとし、ウイルス持続性を維持するゲノム形態である核 HBV c c c D N A に直接影響を及ぼさないため、治癒的ではない。したがって、c c c D N A 調節を直接標的とする新規アプローチが非常に望ましい。c c c D N A を直接標的とする小分子薬物又は治療用抗体の開発は困難である。

【 0 0 2 9 】

本開示は、HBV c c c D N A の発現及び / 又は活性を低減することができるオリゴヌクレオチド組成物を提供する。本開示のオリゴヌクレオチドは、HBV c c c D N A 分子のエンハンサー I 領域において、又はその付近の標的配列にハイブリダイズし、それによってエンハンサー I 領域において、又はその付近に D ループを生成する。理論に束縛されるものではないが、c c c D N A 分子における D ループ構造の生成は、対象における DNA 編集及び DNA 修復機構のための合図として機能し得、おそらく HBV c c c D N A の崩壊につながり得 (K a s a m a t s u , H . ; R o b b e r s o n , D . L . ; V i n o g r a d , J . , P r o c N a t l A c a d S c i . 6 8 (9) : 2 2 5 2 - 2 2 5 7 (1 9 7 1) , S e b e s t a , M . e t a l . , D N A R e p a i r 1 2 (9) : 6 9 1 - 6 9 8 (2 0 1 3))、また宿主 RNA ポリメラーゼ II による HBV c c c D N A の転写に干渉し得る。いくつかの実施形態では、D ループ構造の生成は、HBV c c c D N A に感染した対象における先天性免疫認識を刺激する。

【 0 0 3 0 】

定義

本明細書で使用する時、数字に関して「約」という用語は、一般に、特に明記しない限り、又は文脈から明らかでない限り（そのような数が、可能な値の0%未満又は100%超である場合を除いて）、1%、5%又は10%の範囲内でいずれかの方向（より大きい、又はそれ未満）に収まる数を含むと解釈される。

【0031】

本明細書で使用する時、対象への薬剤、薬物、又は化合物の「投与」は、対象に化合物を導入又は送達して、その意図される機能を実行する任意の経路を含む。投与は、経口、鼻腔内、髄腔内、非経口的（静脈内、筋肉内、腹腔内、若しくは皮下）、局所的、肝内、経皮的、又は本明細書に記載される任意の他の経路を含む、任意の好適な経路によって実行することができる。投与は、自己投与及び他者による投与を含む。

10

【0032】

本明細書で使用する時、核酸配列に関して「増幅させる」又は「増幅」という用語は、試料中の核酸配列の集団の表現を増加させる方法を指す。核酸増幅法、例えばPCR、等温法、ローリングサークル法等は、当業者に周知である。例えば、Saiki, 「Amplification of Genomic DNA」 in PCR Protocols, Innis et al., Eds., Academic Press, San Diego, Calif. 1990, pp 13-20, Wharam et al., Nucleic Acids Res. 2001 Jun 1; 29(11): E54-E54, Hafner et al., Biotechniques 2001 Apr; 30(4): 852-6, 858, 860の諸所を参照されたい。増幅反応においてインビトロで生成された特定の核酸配列のコピーは、「アンプリコン」又は「増幅産物」と呼ばれる。

20

【0033】

本明細書で使用する時、用語「相補的」又は「相補性」は、ポリヌクレオチド（すなわち、オリゴヌクレオチド又は標的核酸などのヌクレオチドの配列）に関して、塩基対合則を指す。本明細書で使用する時、核酸配列の相補体は、1つの配列の5'末端が他方の3'末端と対になるように核酸配列と位置合わせされると、「逆平行会合」であるオリゴヌクレオチドを指す。例えば、配列「5'-A-G-T-3'」は、配列「3'-T-C-A-5'」に相補的である。天然に存在する核酸中に通常見られないある特定の塩基は、本明細書に記載の核酸に含まれてもよい。これらには、例えば、イノシン、7-デアザグアニン、ロックド核酸（LNA）、及びペプチド核酸（PNA）が挙げられる。相補性は、完全である必要はなく、安定な二本鎖は、ミスマッチ塩基対、変性又は不一致塩基を含有してもよい。核酸技術の当業者は、例えば、オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドの塩基組成及び配列、イオン強度及びミスマッチ塩基対の頻度を含む多くの変数を経験的に考慮して、二本鎖の安定性を判断することができる。相補配列はまた、DNA配列又はその相補配列に相補的なRNA配列であり得、またcDNAでもあり得る。

30

【0034】

本明細書で使用する時、「対照」は、比較目的のために実験で使用される代替的な試料である。対照は、「陽性」又は「陰性」であり得る。例えば、実験の目的が、特定の種類の疾患の治療のための治療剤の有効性の相関を決定することである場合、陽性対照（所望の治療効果を呈することが知られている化合物又は組成物）及び陰性対照（治療を受けないか又はプラセボを受ける対象又は試料）が、典型的に用いられる。

40

【0035】

本明細書で使用する時、「Dループ（変位ループ）」は、HBVの二本鎖cccDNA分子を本開示のオリゴヌクレオチドと接触させることによって生成される、B型肝炎ウイルスゲノムの新たに形成された三本鎖領域を指し、cccDNA分子の2つの鎖が、伸張のために分離され、本開示のオリゴヌクレオチドに対応する第3の鎖によって隔てられている。第3の鎖は、cccDNAの鎖のうちの1つに相補的であり、それと対合する塩基配列を有し、したがって領域内の他の相補的なcccDNA鎖を変位させる。変位された鎖は、「D」のループを形成する。

50

【0036】

本明細書で使用する時、用語「有効量」は、所望の治療効果及び／又は予防効果、例えば、本明細書に記載される疾患若しくは病態、又は本明細書に記載される疾患若しくは病態に関連する1つ若しくは2つ以上の兆候若しくは症状の減少をもたらす量を指す。治療用途又は予防用途の文脈において、対象に投与される組成物の量は、その組成物、疾患の程度、種類、及び重症度、並びに個体の特性、例えば一般的な健康、年齢、性別、体重及び薬物に対する耐性などに応じて変化する。当業者であれば、これらの因子及び他の因子に応じて適当な用量を決定することができるであろう。組成物はまた、1つ又は2つ以上の追加の治療用化合物と組み合わせて投与することもできる。本明細書に記載される方法において、治療組成物は、本明細書に記載される疾患又は病態の1つ又は2つ以上の兆候又は症状を有する対象に投与されてもよい。本明細書で使用する時、組成物の「治療有効量」とは、疾患又は病態の生理学的効果が改善又は排除される組成物レベルを指す。治療有効量は、1回又は2回以上の投与で与えることができる。

10

【0037】

本明細書で使用する時、「B型肝炎ウイルス」又は「HBV」は、ヘパドナウイルス（Hepadnaviridae）科に属する周知の非カニクイザル、肝臓-トロピックDNAウイルスを指す。HBVゲノムは、オーバーラップするリーディングフレームを有する、部分的に二本鎖の環状DNAである。C、X、P及びSと呼ばれるHBVゲノムによってコードされる4つの既知の遺伝子が存在する（図1を参照）。コアタンパク質は、遺伝子C（HBcAg）によってコードされる。HBeAg（エンベロープ抗原）は、プレコア（pre-C）タンパク質のタンパク質分解処理によって産生される。HBV DNAポリメラーゼは、遺伝子Pによってコードされる。遺伝子Sは、表面抗原（HBsAg）をコードする。HBsAg遺伝子は、遺伝子を3つの領域、pre-S1、pre-S2、及びSに分割する、3つの「開始」（ATG）コドンフレーム内に含有する1つの長いオープンリーディングフレームである。これらの複数の開始コドンのために、大（L）、中（M）及び小（S）と呼ばれる3つの異なるサイズのポリペプチド（それぞれ、pre-S1 + pre-S2 + S、pre-S2 + S、又はS）が産生される。遺伝子Xは、血液中のHBsAgが、抗HBsAg抗体を隔離することを可能にし、感染性ウイルス粒子が免疫検出を逃れることを可能にする、デコイタンパク質をコードする。A～Hと指定された、HBVの8つの遺伝子型が同定されており、各々が明確な地理的分布を有する。用語「HBV」は、HBVの8つの遺伝子型（A～H）のうちのいずれかを含む。本明細書で使用する時、用語「HBV」はまた、HBVゲノムの天然に存在するDNA配列の変動を指す。

20

30

【0038】

本明細書で使用する時、用語「B型肝炎ウイルス関連疾患」又は「HBV関連疾患」は、急性B型肝炎、急性劇症性B型肝炎、慢性肝炎B、肝不全、末期肝疾患、肝硬変、及び肝細胞癌を含む、HBV感染及び／若しくは複製によって引き起こされるか、又はそれに関連する疾患若しくは障害を指す。

【0039】

本明細書で使用する時、用語「ハイブリダイズ」は、2本の実質的に相補的な核酸鎖（少なくとも14～25ヌクレオチドにわたって少なくとも約65%相補的、少なくとも約75%、又は少なくとも約90%相補的）が、適切にストリンジェントな条件下で互いにアニーリングし、相補的塩基対間の水素結合の形成によって二本鎖又はヘテロ二本鎖を形成するプロセスを指す。ハイブリダイゼーションは、典型的にかつ好ましくは、プローブ長の核酸分子、好ましくは15～100ヌクレオチド長、より好ましくは18～50ヌクレオチド長で実施される。核酸ハイブリダイゼーションの手法は当該技術分野において周知である。例えば、Sambrook, et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.を参照されたい。ハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション強度（すな

40

50

わち、核酸間の会合の強度)は、核酸間の相補性の程度、使用する条件のストリンジェンシー、及び形成されたハイブリッドの熱融点(T_m)などの因子によって影響される。当業者は、少なくとも所望のレベルの相補性を有する配列が安定的にハイブリダイズする一方で、より低い相補性を有するものがハイブリダイズしないように、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを推定及び調節する方法を理解している。ハイブリダイゼーション条件及びパラメータの例については、例えば、Sambrook, et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., Ausubel, F.M. et al. 1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Secaucus, N.J.を参照されたい。いくつかの実施形態では、特定のハイブリダイゼーションは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で起こる。標的核酸に特異的なオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド(例えば、プローブ又はプライマー)は、好適な条件下で標的核酸に「ハイブリダイズ」する。

10

【0040】

本明細書で使用する時、用語「個体」、「患者」、又は「対象」は、個々の生物、脊椎動物、哺乳動物、又はヒトであり得る。好ましい実施形態では、個体、患者又は対象は、ヒトである。

20

【0041】

オリゴヌクレオチドの文脈における用語「修飾」としては、(a)末端修飾、例えば、5'末端修飾又は3'末端修飾、(b)塩基の置換又は除去を含む、核酸塩基(又は「塩基」)修飾、(c)2'、3'及び/又は4'位における修飾を含む、糖修飾、並びに(d)ホスホジエステル結合の修飾又は置換を含む、主鎖修飾、が挙げられるが、これらに限定されない。

【0042】

用語「修飾ヌクレオチド」は、一般に、塩基、糖、及びホスホジエステル結合又はヌクレオチドリノ酸を含む主鎖部分のうちの1つ又は2つ以上の化学構造に対する修飾を有するヌクレオチドを指す。

30

【0043】

本明細書で使用する時、「オリゴヌクレオチド」は、主に同一のモノマー単位を定義された間隔で含む主鎖上に核酸塩基の配列を有する分子を指す。塩基は、オリゴヌクレオチドの塩基に相補的である塩基の配列を有する核酸と結合することができるよう、主鎖上に配置される。最も一般的なオリゴヌクレオチドは、糖リン酸単位の主鎖を有する。2'位にヒドロキシル基を有しないオリゴデオキシリボヌクレオチドと、2'位にヒドロキシル基を有するオリゴリボヌクレオチドとの区別を行うことができる。オリゴヌクレオチドはまた、ヒドロキシル基の水素が有機基、例えば、アリル基で置換される誘導体も含み得る。プライマー又はプローブとして機能する方法のオリゴヌクレオチドは、一般に、少なくとも約10~15ヌクレオチド長であり、より好ましくは少なくとも約14~25ヌクレオチド長であるが、より短い又はより長いオリゴヌクレオチドが、本方法で使用されてもよい。正確なサイズは、多くの因子に依存し、これは次に、オリゴヌクレオチドの最終的な機能又は使用に依存する。オリゴヌクレオチドは、例えば、化学合成、DNA複製、プラスミド若しくはファージDNAの制限エンドヌクレアーゼ消化、逆転写、PCR、又はこれらの組み合わせを含む任意の方法で生成されてもよい。オリゴヌクレオチドは、例えば、メチル基、ビオチン若しくはジゴキシゲニン部分、蛍光タグの付加によって、又は放射性ヌクレオチドを使用することによって修飾されてもよい。

40

【0044】

本明細書で使用する時、用語「プライマー」は、標的核酸鎖に相補的であるプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下に置かれたとき、すなわち、異なるヌクレオチドリノ酸及び適切な緩衝液中のポリメラーゼ(「緩衝剤」は、pH、イオン強度、補因子等

50

を含む)の存在下、及び好適な温度で、核酸配列合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを指す。プライマーのヌクレオチドのうちの1つ又は2つ以上は、例えば、メチル基、ビオチン又はジゴキシゲニン部分、蛍光タグを付加することによって、又は放射性ヌクレオチドを使用することによって修飾され得る。プライマー配列は、テンプレートの正確な配列を反映する必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチド断片は、プライマーの5'末端に取り付けられてもよく、プライマー配列の残部は、鎖に対して実質的に相補的である。本明細書で使用する時、用語プライマーは、ペプチド核酸プライマー、ロック核酸プライマー、ホスホロチオエート修飾プライマー、標識プライマー等を含む、合成され得る全ての形態のプライマーを含む。本明細書で使用する時、用語「フォワードプライマー」は、dsDNAのアンチセンス鎖にアニーリングするプライマーを意味する。「逆プライマー」は、dsDNAのセンス鎖にアニーリングする。

10

【0045】

本明細書で使用する時、「プローブ」は、ハイブリダイゼーションを介して標的核酸と相互作用する核酸を指す。プローブは、標的核酸配列に完全に相補的であってもよく、又は部分的に相補的であってもよい。相補性のレベルは、一般にプローブの機能に基づく多くの因子に依存する。プローブは、標識若しくは非標識であり得るか、又は当該技術分野において周知の多くの方法のうちのいずれかで修飾され得る。プローブは、標的核酸に特異的にハイブリダイズし得る。プローブは、DNA、RNA又はRNA/DNAハイブリッドであってもよい。プローブは、オリゴヌクレオチド、人工染色体、断片化人工染色体、ゲノム核酸、断片化ゲノム核酸、RNA、組み換え核酸、断片化組み換え核酸、ペプチド核酸(PNA)、ロック核酸、環状複素環のオリゴマー、又は核酸の複合体であってもよい。プローブは、修飾された核酸塩基、修飾された糖部分、及び修飾されたヌクレオチド間結合を含み得る。プローブは、典型的には、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、50、60、75、100ヌクレオチド以上の長さである。

20

【0046】

本明細書で使用する時、用語「試料」は、患者から得られた臨床試料を指す。好ましい実施形態では、試料は、生体源(すなわち、「生体試料」)、例えば組織、又は対象から収集された体液から得られる。試料源としては、糞便、粘液、痰(処理済又は未処理)、気管支肺胞洗浄液(bronchial alveolar lavage、BAL)、気管支洗浄(bronchial wash、BW)、血液、体液、脳脊髄液(cerebrospinal fluid、CSF)、尿、血漿、血清、又は組織(例えば、生検材料)が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0047】

本明細書で使用する時、用語「センス鎖」は、機能性タンパク質のコード配列の少なくとも一部を含む、二本鎖DNA(double-stranded DNA、dsDNA)の鎖を意味する。「アンチセンス鎖」は、センス鎖の逆相補体であるdsDNAの鎖を意味する。

【0048】

本明細書で使用する時、用語「別個の」治療用使用は、異なる経路による、同時又は実質的に同時の、少なくとも2つの活性成分の投与を指す。

【0049】

本明細書で使用する時、用語「連続的な」治療用使用は、異なる時間における少なくとも2つの活性成分の投与を指し、投与経路は、同一であるか又は異なっている。より具体的には、連続的な使用は、他の開始剤(複数可)の投与前の活性成分のうちの1つの全投与を指す。したがって、他の活性成分(複数可)を投与する前に、数分間、数時間、又は数日間にわたって活性成分のうちの1つを投与することが可能である。この場合、同時治療は行われない。

40

【0050】

本明細書で使用する時、用語「同時」治療用使用は、少なくとも2つの活性成分を同じ経路で同時に、又は実質的に同時に投与することを指す。

【0051】

本明細書で使用する時、用語「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は

50

、少なくとも以下のようにストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を指す。50%ホルムアミド、5×SSC、50mM NaH₂PO₄、pH6.8、0.5% SDS、0.1mg/mL超音波処理済みサケ精子DNA、及び5×デンハルト溶液中、42で一晩のハイブリダイゼーション；2×SSC、0.1% SDSによる45での洗浄；及び0.2×SSC、0.1% SDSによる45での洗浄。別の例では、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、20個の連続ヌクレオチドにわたって3つ以上の塩基が異なる、2つの核酸のハイブリダイゼーションを可能にしてはならない。

【0052】

本明細書で使用する時、用語「実質的に相補的」は、2つの配列がストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることを意味する。当業者であれば、実質的に相補的な配列は、その全長に沿ってハイブリダイズする必要がないことを理解するであろう。具体的には、実質的に相補的な配列は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で標的配列にハイブリダイズする塩基の連続配列に対して3'又は5'に配置される、標的配列にハイブリダイズしない連続配列の塩基を含んでよい。

10

【0053】

本明細書で使用する時、用語「標的配列」は、試料中に存在し、本開示のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、関心対象の核酸配列を指す。いくつかの実施形態では、標的配列は、HBV cccDNA分子のエンハンサーI領域に、又はその付近にある。更なる実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドに対する標的配列のハイブリダイゼーションは、宿主DNA修復機序によるHBV cccDNA分子の破壊をもたらす。

20

【0054】

本明細書で使用する時、「治療する」又は「治療」は、ヒトなどの対象における疾患又は病態（例えば、HBV感染症及び/又はHBV関連障害）の治療を網羅し、(i)疾患若しくは病態の発生を低減するか、若しくは疾患若しくは病態を阻害すること、すなわち、その発達を停止すること、(ii)疾患若しくは病態を緩和すること、すなわち、疾患若しくは病態の退行を引き起こすこと、(iii)疾患若しくは病態の進行を遅延させること、及び/又は(iv)疾患若しくは病態の1つ若しくは2つ以上の症状の発生を阻害、緩和、遅延させるか、若しくは進行を遅延させること、を含む。いくつかの実施形態では、治療は、HBV感染症及び/又はHBV関連障害の完全な治癒をもたらす。

30

【0055】

HBV感染症又はHBV関連障害は、HBV遺伝子型A、HBV遺伝子型B、HBV遺伝子型C、HBV遺伝子型D、HBV遺伝子型E、HBV遺伝子型F、HBV遺伝子型G、又はHBV遺伝子型Hなどの1つ又は2つ以上のHBV遺伝子型によって引き起こされ得る。いくつかの実施形態では、HBV関連障害は、慢性肝炎B、肝不全、肝硬変、又は肝細胞癌である。ある特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0056】

本方法のいくつかの実施形態では、対象は、正常な対照対象と比較して、上昇したHBV cccDNAのレベルを示す。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドによる治療は、対象におけるHBV cccDNAのレベルを低減する。追加的に又は代替的に、本方法のいくつかの実施形態では、対象は、正常な対照対象と比較して、上昇したHBV cccDNAの肝臓レベルを示す。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドによる治療は、対象におけるHBV cccDNAの肝臓レベルを低減する。上記の実施形態のうちのいずれにおいても、HBV cccDNAレベルは、オリゴヌクレオチドの投与後約1時間～約80時間低減される。

40

【0057】

HBV感染症及び/又はHBV関連障害の症状としては、肝HBV cccDNAの存在、血清及び/又は肝HBV抗原（例えば、HBsAg及び/又はHBeAg）の存在、ALTの上昇、ASTの上昇、抗HBV抗体の非存在又は低レベル、肝傷害、肝硬変、デルタ肝炎、急性B型肝炎、急性B型劇症肝炎、慢性B型肝炎、肝線維症、末期肝疾患、肝

50

細胞癌、血清病様症候群、食欲不振、悪心、嘔吐、微熱、筋肉痛、易疲労感、味覚力及び嗅覚異常（食物及びタバコへの嫌悪感）、右上腹部及び心窩部痛（断続的、軽度から中程度）、肝性脳症、傾眠、睡眠パターン障害、精神錯乱、昏睡、腹水、消化管出血、凝固障害、黄疸、肝腫大（ゆっくりと拡大、軟肝臓）、脾腫、手掌紅斑、くも状母斑、筋消耗、くも状血管腫、血管炎、静脈りゅう出血、末梢性浮腫、女性化乳房、精巣萎縮、腹部側副静脈（メズサの頭）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（alanine aminotransferase、ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartate aminotransferase、AST）の高レベル（1000～2000 IU/mLの範囲内）、AST値より高いALT値、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（gamma-glutamyl transpeptidase、GGT）及び/又はアルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase、ALP）濃度の上昇、アルブミン濃度の低下、血清鉄濃度の上昇、白血球減少（すなわち、顆粒球減少）、リンパ球増加、赤血球沈降速度（erythrocyte sedimentation rate、ESR）の上昇、赤血球寿命の短縮、溶血、血小板減少症、国際標準化比（international normalized ratio、INR）の延長、血清HBV DNAの存在、アミノトランスフェラーゼの上昇（ULNの5倍未満）、ビリルビン濃度の上昇、プロトロンビン時間（prothrombin time、PT）の延長、高グロブリン血症、抗平滑筋抗体（anti-smooth muscle antibodies、ASMA）又は抗核抗体（antinuclear antibodies、ANA）などの組織非特異的抗体の存在、甲状腺に対する抗体などの組織特異的抗体の存在、リウマチ因子（rheumatoid factor、RF）の濃度上昇、高ビリルビン血症、血小板数及び白血球数の低値、ALT値より高いAST値、変性及び新生肝細胞の変化を伴う小葉性炎症、及び大部分の小葉中心壊死が挙げられるが、これらに限定されない。「治療」はまた、治療を受けていない場合に予想される生存期間と比較して、生存期間を延長させることを意味し得る。

10

20

【0058】

本明細書に記載される疾患又は病態の治療の様々な様式は、完全な治療を含むが、完全な治療に満たず、ある程度の生物学的又は医学的に関連する結果が達成される「実質的」を意味することが意図されることも理解されたい。治療は、慢性疾患の治療のための継続的な長期治療であっても、急性状態の治療のための単回又は数回の投与であってもよい。

【0059】

本開示のオリゴヌクレオチド組成物

本開示は、HBV cccDNAの発現及び/又は活性を低減することができるオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物を提供する。本開示のオリゴヌクレオチドは、HBV cccDNA分子のエンハンサーI領域において、又はその付近の標的配列にハイブリダイズし、それによってエンハンサーI領域において、又はその付近にDループを生成する。図1は、エンハンサーI領域のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド位置900で始まり、ヌクレオチド位置1310で終わることを示し、図5A～図5Bは、コンセンサスHBVゲノム配列であることを示す。

30

【0060】

本開示のオリゴヌクレオチドは、HBV cccDNAの標的領域に対して少なくとも90%相補的であるオリゴヌクレオチドを有する、ヌクレオチド位置900～1310（エンハンサーI領域）からなるHBV cccDNAゲノムの領域を標的とする。

40

【0061】

いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、エンハンサーI領域内にあるHBV DNA配列（すなわち、HBVゲノムのヌクレオチド位置900と1310とを含めて、それらの間に位置する標的ヌクレオチド配列）を標的とする。

【0062】

いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、エンハンサーI領域の上流の50塩基対以下、45塩基対以下、40塩基対以下、35塩基対以下、30塩基対以下、25塩基対以下、20塩基対以下、15塩基対以下、10塩基対以下、又は5塩基対以下であるHBV DNA配列を標的とする。ある特定の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、エンハンサーI領域の下流の50塩基対以下、45塩基対以下、40塩基

50

対以下、35塩基対以下、30塩基対以下、25塩基対以下、20塩基対以下、15塩基対以下、10塩基対以下、又は5塩基対以下であるHBV DNA配列を標的とする。

【0063】

いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置969と位置987との間のどこかに位置するHBV DNA配列を標的とする。ある特定の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置1094と位置1116との間のどこかに位置するHBV DNA配列を標的とする。いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置1136と位置1155との間のどこかに位置するHBV DNA配列を標的とする。いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置1174と位置1194との間のどこかに位置するHBV DNA配列を標的とする。他の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置1194と位置1216との間のどこかに位置するHBV DNA配列を標的とする。いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、HBVゲノムの位置1297と位置1315との間のどこかに位置するHBV DNA配列を標的とする。

10

【0064】

本開示のオリゴヌクレオチドの例を表1に提示する。

【0065】

【表 1 - 1】

表 1

配列番号	核酸塩基配列(5' - 3')
1	AAGCCCCAGCCAGUGGGGGUU
2	CCAAGCCCCAGCCAGUGGG
3	CUUGUAAGUUGGCGAGAAAG
4	UACUUUCCAAUCAUAGGC
5	CCUAUUGAUUGGAAAGU
6	GCCUAUUGAUUGGAAAGUA
7	UGAACCUUUACCCCGUUGCC
8	UGCGUCAGCAAACACUUGGC
9	GCGUCAGCAAACACUUGGCA
10	UCUCGCCAACUUACAAGGCC
11	AUUGAUUGGAAAGU
12	GCCAAGUGUUUGCUGACGC
13	GCUCGCAGCCGGUCUGGAG
14	ACUUUCCAAUCAU
15	GGCAACGGGGUAAAGGUUCA
16	GCCGGGCAACGGGGUAAAGG
17	GCGUCAGCAAACACUUGGC
18	CCACGCAUGCGCUGAUGGCC
19	CCAGCCAGUGGGGGUUGCGUC
20	GCCCCCAGCCAGUGGGGGUU
21	AAGCCCCAGCCAGUGGGGG
22	AGCCAGUGGGGGUUGCGUC
23	UUCCACGCAUGCGCUGAUGG
24	AAAGGUUCCACGCAUGCGCA
25	UUCCGCAGUAUGGAUCGGC
26	CGCAGUAUGGAUCGGCAGAGG
27	AGGAGUUCCGCAGUAUGGAUC
28	GGCUGCGAGCAAAACAAGC
29	CCGGCUGCGAGCAAAACAAGC
30	CCGGCUGCGAGCAAAACAA
31	CCAGACCGGCUGCGAGCAAAA
32	CUCCAGACCGGCUGCGAGC
33	GCUCCAGACCGGCUGCGAGC
34	CCGGCUGCGAGCAAAACAAG
35	UUUGCUCCAGACCGGCUGCG
36	UGCUCAGACCGGCUGCGAG
37	ACCGGCUGCGAGCAAAACAA
38	GUUGCCGGGCAACGGGGUAA
39	UUGCCGGGCAACGGGGUAAA
40	GCCGGGCAACGGGGUAAAGG
41	CCGGGCAACGGGGUAAAGGU
42	CGGGCAACGGGGUAAAGGUU
43	CAGUGGGGGUUGCGUCAGCA
44	AGUGGGGGUUGCGUCAGCAA
45	GUGGGGGUUGCGUCAGCAAA
46	UGGGGGUUGCGUCAGCAAAC

10

20

30

40

【表 1 - 2】

(表 1 の続き)

配列番号	核酸塩基配列(5' - 3')
47	GGGGGUUGCGUCAGCAAACA
48	GGGGUUGCGUCAGCAAACAC
49	GGUUGCGUCAGCAAACACUU
50	UCGCCAACUUACAAGGCCUU
51	CUCGCCAACUUACAAGGCCU
52	UUCUCGCCAACUUACAAGGC
53	UUUCUCGCCAACUUACAAGG
54	CUUUCUCGCCAACUUACAAG
55	ACUUUCUCGCCAACUUACAA
56	UGAACCUUUACCCCGUUGC
57	CCUUUACCCCGUUGCCCGGC
58	GAUCCAUAUCUGCGGAACUCCU
59	GCUUGUUUUGCUCGCAGCC
60	GCUUGUUUUGCUCGCAGCCGG
61	UUGUUUUGCUCGCAGCCGG
62	UUUUGCUCGCAGCCGGUCU
63	UUUUGCUCGCAGCCGGUCUGG
64	GCUCGCAGCCGGUCUGGAGC
65	CUUGUUUUGCUCGCAGCCGG

10

20

【0067】

ある特定の実施形態では、配列番号 1 ~ 65 は、例えば、本開示に記載されるように修飾される。

【0068】

本開示のオリゴヌクレオチドのいくつかの実施形態では、配列番号 1 ~ 65 のうちのいずれかの 1 つ若しくは 2 つ以上の核酸塩基又はその相補体は、アデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T)、シトシン (C)、ウラシル (U)、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、6 - メチル並びにアデニン及びグアニンの他のアルキル誘導体、2 - プロピル並びにアデニン及びグアニンの他のアルキル誘導体、3' - アミノ - 2' - デオキシ - 2, 6 - ジアミノプリン、2 - チオウラシル、2 - チオチミン及び 2 - チオシトシン、5 - ハロウラシル及びシトシン、5 - プロピニル (- C - C - CH₃) ウラシル及びシトシン並びにピリミジン塩基、6 - アゾウラシル、シトシン及びチミンの他のアルキニル誘導体、5 - ウラシル (偽性ウラシル)、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシル並びに他の 8 - 置換アデニン及びグアニン、5 - ハロ、特に 5 - プロモ、5 - トリフルオロメチル並びに 5 - 置換ウラシル及びシトシン、7 - メチルグアニン及び 7 - メチルアデニン、2 - F - アデニン、2 - アミノ - アデニン、8 - アザグアニン及び 8 - アザアデニン、7 - デアザグアニン及び 7 - デアザアデニン並びに 3 - デアザグアニン及び 3 - デアザアデニン、7 - デアザグアノシン、2 - アミノピリジン及び 2 - ピリドンの中から選択される修飾核酸塩基で置換され得る。

30

40

【0069】

本開示のオリゴヌクレオチドのいくつかの実施形態では、配列番号 1 ~ 65 のうちのいずれかの 1 つ若しくは 2 つ以上の核酸塩基又はその相補体は、三環式ピリミジン、例えばフェノキサジンシチジン (1H - ピリミド [5, 4 - b] [1, 4] ベンゾキサジン - 2 (3H) - オン)、フェノチアジンシチジン (1H - ピリミド [5, 4 - b] [1, 4] ベンゾチアジン - 2 (3H) - オン)、G - クランプ、例えば置換フェノキサジンシチジン (例えば、9 - (2 - am - オエルホキシ) - H - ピリミド [5, 4 - b] [1, 4])

50

ベンゾキサン - 2 (3 H) - オン)、カルバゾールシチジン (2 H - ピリミド [4 , 5 - b] インドール - 2 - オン)、ピリドインドールシチジン (H - ピリド [3 , 2 , 5] ピロロ [2 , 3 - d] ピリミジン - 2 - オン)の中から選択される修飾核酸塩基で置換され得る。

【 0 0 7 0 】

追加的に又は代替的に、いくつかの実施形態では、配列番号 1 ~ 6 5 のうちのいずれかの 1 つ若しくは 2 つ以上の核酸塩基の糖又はその相補体は、2' - OH (リボース) ヌクレオシド、2' - O - メチル化 (2' - O - Me) ヌクレオシド、2' - O - メトキシエチル (2' - MOE) ヌクレオシド、2' - リボ - F ヌクレオシド、2' - アラビノ - F ヌクレオシド、2' - Me ヌクレオシド、及び 2' - Me - 2' - F ヌクレオシドから選択される修飾糖で置換され得る。いくつかの実施形態では、配列番号 1 ~ 6 5 のうちのいずれかの 1 つ若しくは 2 つ以上の核酸塩基の糖又はその相補体は、2' - F 及び 2' - O - アルキルのの中から選択される修飾糖で置換されてもよく、当該 O - アルキルは、任意にアルコキシで置換されている。

10

【 0 0 7 1 】

追加的に又は代替的に、いくつかの実施形態では、配列番号 1 ~ 6 5 のうちのいずれかの 1 つ若しくは 2 つ以上の核酸塩基又はその相補体の元の主鎖結合は、ホスホジエステルサブユニット間結合、チオホスフェートサブユニット間結合、ホスホロアミダートサブユニット間結合、及びチオホスホロアミダートサブユニット間結合の中から選択される代替的なサブユニット間連結で置き換えられてもよい。

20

【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチドのうちの 1 つ又は 2 つ以上は、糖環の 2' 位の修飾又はヌクレオチド間サブユニット結合の修飾を含む。例えば、いくつかの実施形態は、1 つ又は 2 つ以上の 2' - F 又は 2' - O - アルキルを含み、当該 O - アルキルは、任意にアルコキシで置換され、例えば、いくつかの実施形態は、2' - OMe 及び / 又は 2' - F 修飾を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド間サブユニット結合のうちの 1 つ又は 2 つ以上は、チオホスフェート結合である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド間サブユニット結合のうちの 1 つ又は 2 つ以上は、ホスホロアミダート結合である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド間サブユニット結合のうちの 1 つ又は 2 つ以上は、チオホスホロアミダート結合である。

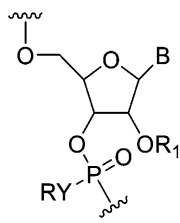
30

【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドを含む。例えば、本開示の化合物は、式 (I) のヌクレオチドを含み得、

【 0 0 7 4 】

【 化 1 】



(I) 、

40

式中、R は、H 又は正に荷電された対イオンであり、B は、各場合において独立して、天然若しくは未修飾の核酸塩基又は修飾核酸塩基であり、Y は、O 又は S であり、R₁ は、- (CR')₂ O CR'₃ であり、R' は、各場合において独立して、H 又は F である。

【 0 0 7 5 】

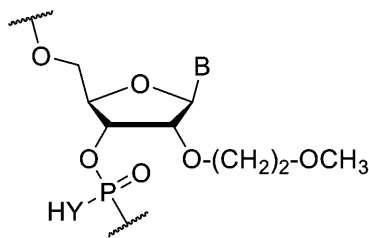
式 (I) のヌクレオチドでは、R₁ は、- (CR')₂ O CR'₃ である。いくつかの実施形態では、R' は、各場合において H である。他の実施形態では、少なくとも 1 つの R' は、F であり、例えば、1、2、3、4、5、6 又は 7 つの R' は、F である。いくつかの実施形態では、CR'₃ は、1、2 又は 3 つの F 部分を含有する。例えば、実施

50

形態では、 R_1 は、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ (又はMOE)、 $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CF}_2\text{CF}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CF}_2\text{CF}_2\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CHFCH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CHFCH}_2\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CHFCH}_2\text{OCFH}_2$ 、 $-\text{CHFCH}_2\text{OCHF}_2$ 、及び $-\text{CH}_2\text{CHFCH}_3$ からの群から選択される。実施形態では、式 I のヌクレオチドは、次のものである

【0076】

【化2】



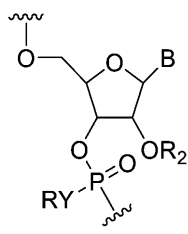
10

【0077】

実施形態では、本開示の化合物は、少なくとも1つの式 (II) のヌクレオチドを含み、

【0078】

【化3】



(II)、

20

式中、YはS又はOであり、RはH又は正に荷電された対イオンであり、Bは核酸塩基であり、 R_2 は、 $-\text{CR}'_3$ 、 $-\text{CR}'_2\text{OCR}'_3$ 、 $-(\text{CR}'_2)_3\text{OCR}'_3$ 、若しくは $-(\text{CR}'_2)_{1-2}\text{CR}'_3$ であり、又は、 R_2 は、 $-(\text{CR}'_2)_2\text{OCR}'_3$ であり、YはOであり、 R' は、各場合において独立してH又はFである。

30

【0079】

式 (II) のヌクレオチドでは、 R_2 は、 $-\text{CR}'_3$ 、 $-(\text{CR}'_2)_{1-3}\text{OCR}'_3$ 、又は $-(\text{CR}'_2)_{1-2}\text{CR}'_3$ である。いくつかの実施形態では、 R_2 は、 $-\text{CR}'_3$ 又は $-\text{CR}'_2\text{CR}'_3$ である。いくつかの実施形態では、 R' は、各場合においてHである。他の実施形態では、少なくとも1つの R' は、Fであり、例えば、1、2、3、4又は5つの R' は、Fである。いくつかの実施形態では、 CR'_3 は、1、2又は3つのF部分を含有する。例えば、実施形態では、 R_1 は、 $-\text{CH}_3$ (又はMe)、 $-\text{CFH}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 CF_3 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CFH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CHF}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCFH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CFH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CFH}_2\text{OCFH}_2$ 、 $-\text{CFH}_2\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{CFH}_2\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CHF}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CHF}_2\text{OCFH}_2$ 、 $-\text{CHF}_2\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{CHF}_2\text{OCF}_3$ 、 $-(\text{CR}'_2)_3\text{OCR}'_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (又はEt)、 $-\text{CFH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CHF}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CF}_3\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CFH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CFH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CFH}_2\text{CFH}_2$ 、 $-\text{CFH}_2\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CFH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CHF}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CHF}_2\text{CFH}_2$ 、 $-\text{CHF}_2\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHF}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $\text{CHFCH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CHFCH}_2\text{OCH}_3$ 、 $\text{CHFCH}_2\text{CFH}_2$ 、 $\text{CHFCH}_2\text{CHF}_2$ 及び $\text{CH}_2\text{CHFCH}_3$ からの群から選択される。実施形態では、 R_1 は、-

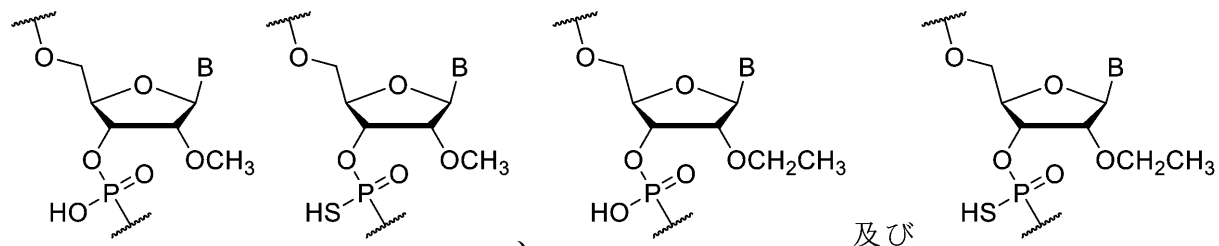
40

50

CH_3 (又は Me) 又は $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (又は Et) である。実施形態では、式 I I のヌクレオチドは、次のものからなる群から選択される

【0080】

【化4】



10

【0081】

式 (I) 又は (II) の化合物では、 Y は、 O 又は S であり得る。いくつかの実施形態では、 Y は、少なくとも 1 回 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 回等) の場合において S である。他の実施形態では、 Y は、少なくとも 1 回の場合において S であり、少なくとも別の場合において O である。他の実施形態では、 Y は、各場合において S である。いくつかの実施形態では、 Y は、少なくとも 1 回 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 回等) の場合において O である。

20

【0082】

開示されるオリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの式 (I) のヌクレオチドを含む。実施形態では、開示されるオリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 個の式 (I) のヌクレオチドを含む。実施形態では、開示されるオリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 個の式 (II) のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2 ~ 40 個のヌクレオチド、例えば、8 ~ 26 個のヌクレオチド、又はそれらの間の整数のヌクレオチドを含む。

30

【0083】

2 つ以上の式 (I) のヌクレオチドが含まれる実施形態では、ヌクレオチドは同じであっても異なってもよい。いくつかの実施形態では、1 つ又は 2 つ以上の式 (II) のヌクレオチドが含まれ、それらは同じであっても異なってもよい。例えば、いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの式 (I) のヌクレオチドと、少なくとも 1 つの式 (II) のヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの R_1 が MOE である、少なくとも 1 つの式 (I) のヌクレオチドと、 R_2 が Me 又は Et である、少なくとも 1 つの式 (II) のヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 2 つの式 (I) 及び式 (II) の交互のヌクレオチドを含む。例えば、交互の 2' 修飾 (例えば、 $\text{Me} - \text{MOE} - \text{Me} - \text{MOE} \dots$ 又は、 $\text{Et} - \text{MOE} - \text{Et} - \text{MOE} - \text{Et} - \text{MOE} \dots$) を有する、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 個のヌクレオチド。

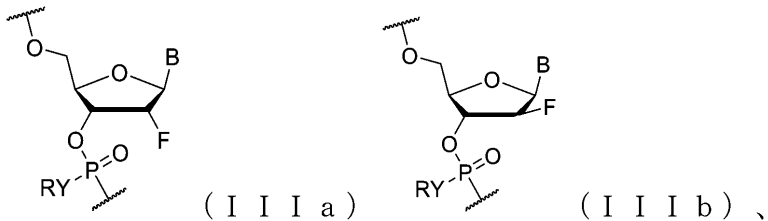
40

【0084】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、式 (III a) 及び / 又は (III b) の 2' - フルオロヌクレオチドを含み、

【0085】

【化 5】



式中、Yは、S又はOであり、Rは、H又は正に荷電された対イオンであり、Bは、核酸塩基である。

【0086】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも4つの式(I)又は(II)及び式(I I I a)の交互のヌクレオチドを含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個の交互のヌクレオチドを含む。

【0087】

式(I)、(II)、(I I I a)、及び(I I I b)のヌクレオチドの核酸塩基Bは、各々独立して、天然若しくは未修飾の核酸塩基又は修飾核酸塩基であってよい。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2,6-ジアミノプリン核酸塩基を含むが、任意にアデニンを含まない。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、5-メチルウラシル核酸塩基を含むが、任意にウラシルを含まない。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2,6-ジアミノプリン核酸塩基を含むが、アデニンを含まず、5-メチルウラシル核酸塩基を含むが、任意にウラシルを含まない。

【0088】

式(I)、(II)、(I I I a)、及び(I I I b)の各ヌクレオチドにおけるYは、独立して、O又はSであり得る。いくつかの実施形態では、Yは、少なくとも1回(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30回等)の場合においてSである。他の実施形態では、Yは、少なくとも1回の場合においてSであり、少なくとも別の場合においてOである。他の実施形態では、Yは、各場合においてSである。いくつかの実施形態では、Yは、少なくとも1回(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30回等)の場合においてOである。

【0089】

式(I)、(II)、(I I I a)、及び(I I I b)の各々の2つ以上のヌクレオチドが含まれる実施形態では、2つ以上のそのような式のヌクレオチドは、同じであっても異なってもよい。例えば、いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、式(I)の少なくとも1つのヌクレオチドに加え、式(I)(II)、(I I I a)、及び(I I I b)の少なくとも1つのヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、式(I)及び/又は式(II)及び/又は(I I I)の少なくとも2つの交互のヌクレオチドを含む。例えば、開示されるオリゴヌクレオチドは、交互の2'修飾を有する2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個のヌクレオチドを含んでよい。

【0090】

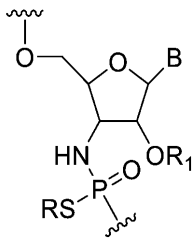
いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、上記の修飾のうちの1つ又は2つ以上を含み、核HBV cccDNAに対する親和性を有するか、又はHBV cccDNA分子のエンハンサーI領域又はその付近にある標的配列にハイブリダイズすることにより、エンハンサーI領域又はその付近にDループを生成/維持する。例えば、いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、本明細書に列挙される配列のうちの1つによる上記修飾及び核酸塩基配列のうちの1つ又は2つ以上を含有する。

【0091】

いくつかの実施形態では、本技術のオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドを含む。
例えば、本開示の化合物は、式(I)のヌクレオチドを含み、

【0092】

【化6】



(I')

10

式中、Rは、H又は正に荷電された対イオンであり、Bは、各場合において独立して、天然若しくは未修飾の核酸塩基又は修飾核酸塩基であり、 R_1 は、 $-(CR'_2)_2OCR'_3$ であり、 R' は、各場合において独立して、H又はFである。

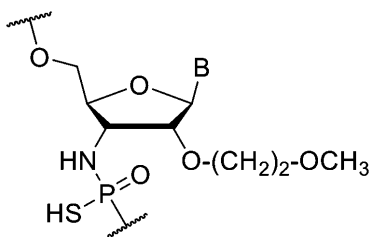
【0093】

式(I')のヌクレオチドでは、 R_1 は、 $-(CR'_2)_2OCR'_3$ である。いくつかの実施形態では、 R' は、各場合においてHである。他の実施形態では、少なくとも1つの R' は、Fであり、例えば、1、2、3、4、5、6又は7つの R' は、Fである。いくつかの実施形態では、 CR'_3 は、1、2又は3つのF部分を含有する。例えば、実施形態では、 R_1 は、 $-CH_2CH_2OCH_3$ (又はMOE)、 $-CF_2CH_2OCH_3$ 、 $-CH_2CF_2OCH_3$ 、 $-CH_2CH_2OCF_3$ 、 $-CF_2CF_2OCH_3$ 、 $-CH_2CF_2OCF_3$ 、 $-CF_2CH_2OCF_3$ 、 $-CF_2CF_2OCF_3$ 、 $-CHFCH_2OCH_3$ 、 $-CHFCH_2FOCH_3$ 、 $-CHFCH_2OCFH_2$ 、 $-CHFCH_2OCHF_2$ 、及び $-CH_2CHF_2OCH_3$ からなる群から選択される。実施形態では、式Iのヌクレオチドは、次のものである。

20

【0094】

【化7】



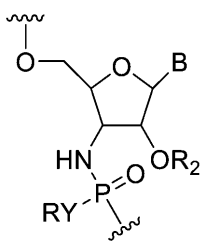
30

【0095】

実施形態では、本開示の化合物は、式(I')の少なくとも1つのヌクレオチド及び/又は式(II')の少なくとも1つのヌクレオチドを含み、

【0096】

【化8】



(II')

40

式中、YはS又はOであり、RはH又は正に荷電された対イオンであり、Bは核酸塩基であり、 R_2 は、 $-CR'_3$ 、 $-CR'_2OCR'_3$ 、 $-(CR'_2)_3OCR'_3$ 、若しくは $-(CR'_2)_{1-2}CR'_3$ であり、又は、 R_2 は、 $-(CR'_2)_2OCR'$

50

₃ であり、YはOであり、R'は、各場合において独立してH又はFである。

【0097】

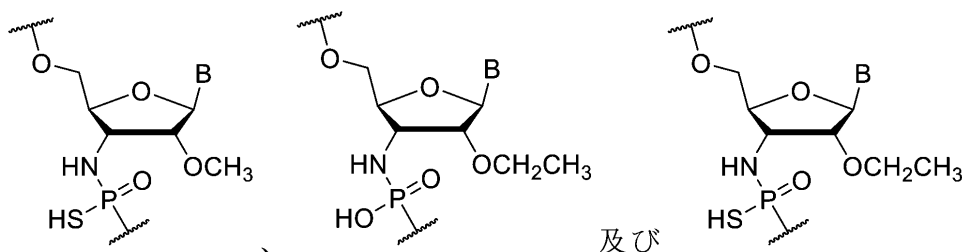
式(II')のヌクレオチドでは、R₂は、-CR'₃、-(CR'₂)₁₋₃OCR'₃又は-(CR'₂)₁₋₂CR'₃である。いくつかの実施形態では、R₂は、-CR'₃又は- $\text{CR}'_2\text{CR}'_3$ である。いくつかの実施形態では、R'は、各場合においてHである。他の実施形態では、少なくとも1つのR'は、Fであり、例えば、1、2、3、4又は5つのR'は、Fである。いくつかの実施形態では、CR'₃は、1、2又は3つのF部分を含む。例えば、実施形態では、R₁は、-CH₃(又はMe)、-CFH₂、-CHF₂、CF₃、-CH₂OCH₃、-CFH₂OCH₃、-CHF₂OCH₃、-CF₃OCH₃、-CH₂OCFH₂、-CH₂OCHF₂、-CH₂OCF₃、-CFH₂OCH₃、-CFH₂OCFH₂、-CFH₂OCHF₂、-CFH₂OCF₃、-CHF₂OCH₃、-CHF₂OCFH₂、-CHF₂OCHF₂、-CHF₂OCF₃、-(CR'₂)₃OCR'₃、-CH₂CH₃(又はEt)、-CFH₂CH₃、-CHF₂CH₃、-CF₃CH₃、-CH₂CFH₂、-CH₂CHF₂、-CH₂CF₃、-CFH₂CH₃、-CFH₂CFH₂、-CFH₂CHF₂、-CFH₂CF₃、-CHF₂CH₃、-CHF₂CFH₂、-CHF₂CHF₂、-CHF₂CF₃、-CH₂CH₂CH₃、CF₂CH₂CH₃、CH₂CF₂CH₃、CH₂CH₂CF₃、CF₂CF₂CH₃、CH₂CF₂CF₃、CF₂CH₂CF₃、CF₂CF₂CF₃、CHFCH₂CH₃、CHFCHF₂OCH₃、CHFCH₂CFH₂、CHFCH₂CHF₂及びCH₂CHFCH₃からなる群から選択される。実施形態では、R₁は、-CH₃(又はMe)又は-CH₂CH₃(又はEt)である。実施形態では、式IIのヌクレオチドは、次のものからなる群から選択される

10

20

【0098】

【化9】



30

【0099】

式(I')又は(II')の化合物では、Yは、O又はSであり得る。いくつかの実施形態では、少なくとも1回(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30回等)の場合においてSである。他の実施形態では、Yは、少なくとも1回の場合においてSであり、少なくとも別の場合においてOである。他の実施形態では、Yは、各場合においてSである。いくつかの実施形態では、Yは、少なくとも1回(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30回等)の場合においてOである。

40

【0100】

開示されるオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの式(I')のヌクレオチドを含む。実施形態では、開示されるオリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個の式(I')のヌクレオチドを含む。実施形態では、開示されるオリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個の式(II')のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2~40個のヌクレオチド、例えば、8~26個のヌクレオチド、又はそれらの間の整数のヌクレオチドを含

50

む。

【0101】

2つ以上の式(I')のヌクレオチドが含まれる実施形態では、ヌクレオチドは、同じであっても異なってもよい。いくつかの実施形態では、1つ又は2つ以上の式(II')のヌクレオチドが含まれ、それらは同じであっても異なってもよい。例えば、いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの式(I')のヌクレオチド及び少なくとも1つの式(II')のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの式(I')のヌクレオチド(式中、少なくとも1つの R_1 が、MOEである)及び少なくとも1つの式(II')のヌクレオチド(式中、 R_2 が、Me又はEtである)を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも2つの式(I')及び式(II')の交互のヌクレオチドを含む。例えば、交互の2'修飾(例えば、Me-MOE-Me-MOE...又は、Et-MOE-Et-MOE...)を有する、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個のヌクレオチド。

10

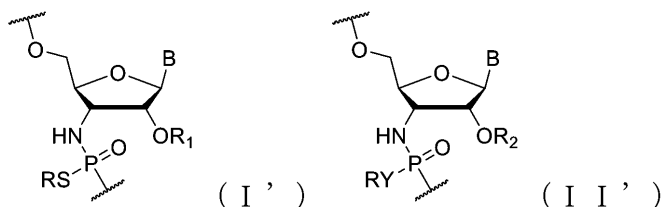
【0102】

いくつかの実施形態では、式(I')及び/又は式(II')のヌクレオチドが含まれてもよく、以下によって表される。

【0103】

【化10】

20



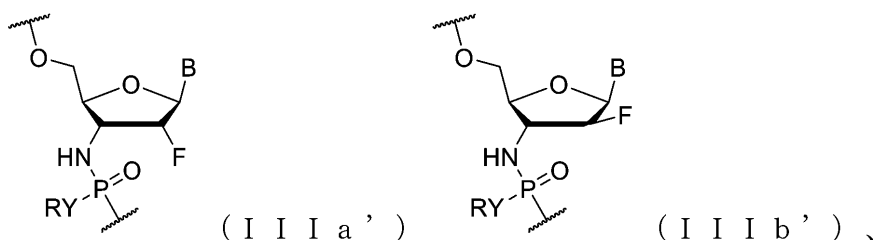
【0104】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、式(I)のヌクレオチドを含み、かつ/又は式(IIIIa')及び/若しくは(IIIIb')の2'-フルオロヌクレオチドを含み、

30

【0105】

【化11】



式中、Yは、S又はOであり、Rは、H又は正に荷電された対イオンであり、Bは、核酸塩基である。

40

【0106】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも4つの式(I')及び式(IIIIa')の交互のヌクレオチドを含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個の交互のヌクレオチドを含む。

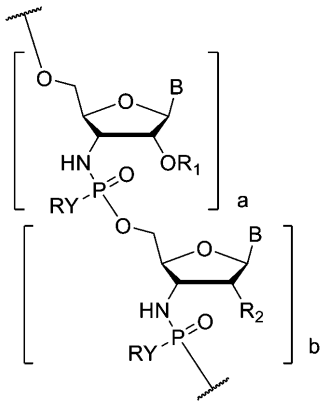
【0107】

ある特定の実施形態は、4~40個のヌクレオチドを含む、及び式(IV')を含む、オリゴヌクレオチドを含み、

【0108】

50

【化 1 2】



(IV')、

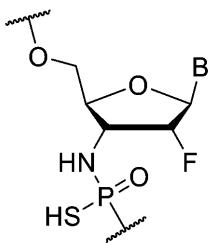
式中、YはS又はOであり、RはH又は正に荷電された対イオンであり、Bは核酸塩基であり、 R_1 は $-(CR'_2)_2OCR'_3$ であり、 R_2 は、 $-OCR'_3$ 、 $-OCR'_2OCR'_3$ 、 $-O(CR'_2)_3OCR'_3$ 又は $-O(CR'_2)_{1-2}CR'_3$ 及びFから選択され、 R' は、各場合において独立してH又はFであり、aは1～10の整数であり、bは1～10の整数であり、20までの場合、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19及び20である。

【0109】

本開示の化合物は、次式(III')を含む化合物を含み、

【0110】

【化 1 3】



(III')、

式中、Yは、S又はOであり、Rは、H又は正に荷電された対イオンであり、Bは、各場合において独立して、天然若しくは未修飾の核酸塩基又は修飾核酸塩基であり、任意に、式(I')、(II')及び/又は(IV')のうちの1つ又は2つ以上を含む。

【0111】

式(I')、(II')、(IIIa')、(IIIb')、(IV')及び(V')のヌクレオチドの核酸塩基Bは、各々独立して、天然若しくは未修飾の核酸塩基又は修飾核酸塩基であってよい。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2,6-ジアミノプリン核酸塩基を含むが、任意にアデニンを含まない。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、5-メチルウラシル核酸塩基を含むが、任意にウラシルを含まない。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2,6-ジアミノプリン核酸塩基を含むが、アデニンを含まず、5-メチルウラシル核酸塩基を含むが、任意にウラシルを含まない。

【0112】

式(II')、(IIIa')、(IIIb')、(IV')及び(V')の各ヌクレオチドにおけるYは、独立して、O又はSであり得る。いくつかの実施形態では、Yは、少なくとも1回(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30回等)の場合においてSである。他の実施形態では、Yは、少なくとも1回の場合においてSであり、少なくとも別の場合においてOである。他の実施形態では、Yは、各場合においてSである。いくつかの実施形態では、Yは、少なくとも

1 回（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 回等）の場合において 0 である。

【0113】

2 つ以上の式 (I')、(II')、(IIa')、(IIb')、(IV') 及び (V') の各々のヌクレオチドが含まれる実施形態では、2 つ以上のそのような式のヌクレオチドは、同じであっても異なってもよい。例えば、いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、少なくとも 1 つの式 (I) のヌクレオチドに加え、少なくとも 1 つの式 (II')、(IIa')、(IV') 及び / 又は (V') のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、少なくとも 2 つの式 (I') 及び / 又は式 (II') 及び / 又は (IIa') 及び / 又は (IV')、(V') 及び / 又は (V') の交互のヌクレオチドを含む。例えば、開示されるオリゴヌクレオチドは、交互の 2' 修飾を有する 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 個のヌクレオチドを含んでよい。

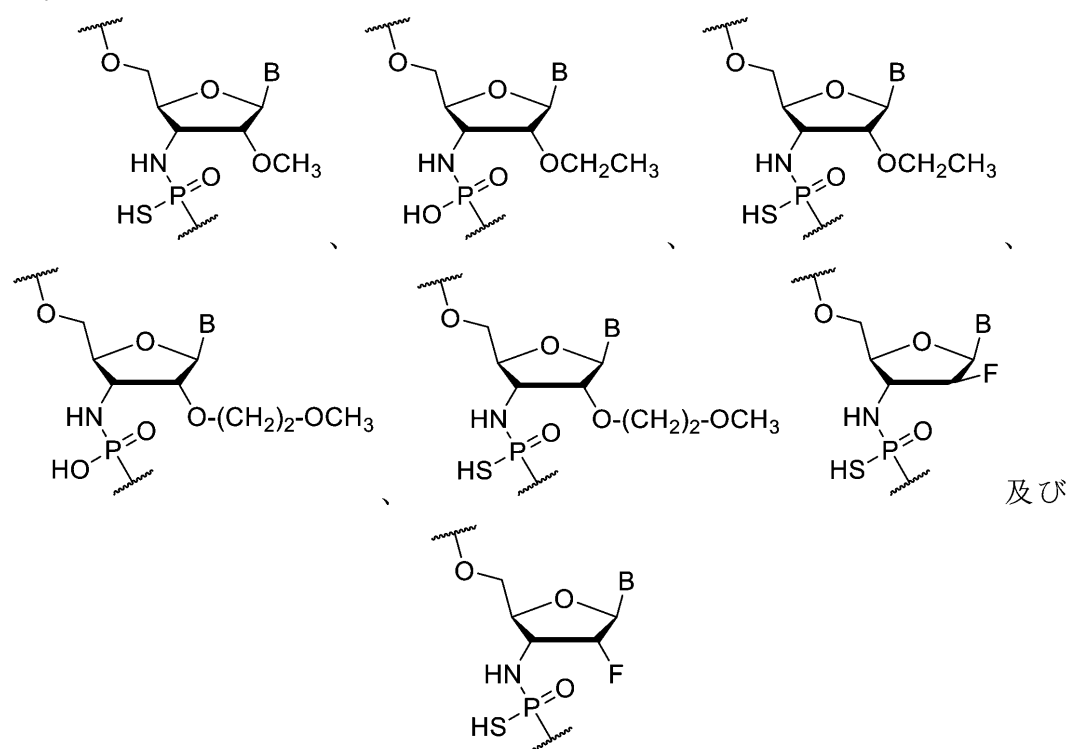
10

【0114】

実施形態では、オリゴヌクレオチドのヌクレオチドは、次のものからなる群から選択され、

【0115】

【化 14】



20

30

式中、B は、任意の天然又は修飾塩基であり得る。

40

【0116】

本開示の化合物は、以下の式 (V'') を含む化合物を含み、

【0117】

(V'')

10

20

30

40

50

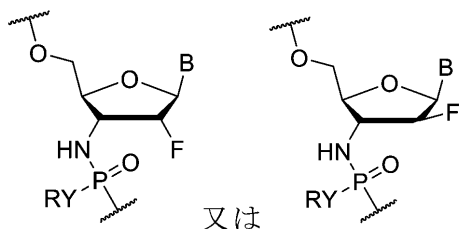
なくとも1つの式(I')、(II')、(III')、(IV')及び/又は(V')のヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、少なくとも2つの式(V'')並びに式(I')、及び/又は(II')の交互のヌクレオチドを含む。例えば、交互の2'修飾を有する2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個のヌクレオチド。

【0123】

いくつかの実施形態では、式(V') (及び任意に式(I')、(II')、(III')、(IV')及び/又は(V''))を含むヌクレオチドは、以下の構造：

【0124】

【化16】



の2-フルオロヌクレオチドを更に含み、

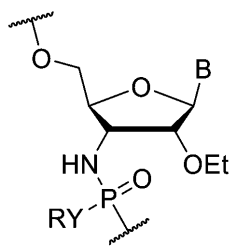
式中、Y、R及びBは、式(I')と同じである。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、少なくとも4つの式(V')及び2-フルオロヌクレオチドの交互のヌクレオチドを含む。

【0125】

本開示の化合物は、次式(V')を含む化合物を含み、

【0126】

【化17】



式中、Yは、S又はOであり、Rは、H又は正に荷電された対イオンであり、Bは、各場合において独立して、天然若しくは未修飾の核酸塩基又は修飾核酸塩基であり、任意に、式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及び/又は(V'')のうちの1つ又は2つ以上を含む。

【0127】

以下の略語を本開示で用いる。2'-H(デオキシリボース)ヌクレオシドは、核酸塩基に対応する大文字、例えば、A、C、G及びTによって言及される。2'-O-メチル化(2'-O-Me)ヌクレオシドは、小文字m及び核酸塩基に対応する大文字、例えば、mA、mC、mG及びmUによって言及される。2'-O-Me、5-メチルシトシンは、5mmCと略記される。

【0128】

ヌクレオチドの主鎖又はサブユニット間結合について、リン酸ジエステルサブユニット間結合は、「PO」と称されるか、又は一般に配列の詳細には含まれない。チオリン酸サブユニット間結合は、小文字「ps」と略記される。ホスホロアミダートサブユニット間結合は、小文字「np」と略記される。チオホスホロアミダートサブユニット間結合は、小文字「nps」と略記される。

【0129】

10

20

30

40

50

実施形態では、配列番号 1 ~ 65 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 1 つのヌクレオチドは、5 - メチルシトシン核酸塩基、2' 位における O - Me 修飾 (mA、5mmC、mG 及び mU)、並びにヌクレオチド間のホスホロチオエート (PS) 結合を含むように修飾される。実施形態では、配列番号 1 ~ 65 のうちのいずれか 1 つの各ヌクレオチドは、以下のように修飾される。

(a) シトシン核酸塩基を有する各ヌクレオチドは、2' - O - Me、5 - メチルシトシン (5mmC) であるように修飾され、

(b) 各他のヌクレオチドもまた、2' 位に O - Me 修飾 (mA、mG 及び mU) を含むように修飾され、及び

(c) 各ヌクレオチドは、ヌクレオチド間にホスホロチオエート (PS) 結合を含有する。

10

【0130】

例えば、配列番号 1 ~ 13 は、表 2 に記載されるように修飾され得る。配列番号 1 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 66 として修飾され得る。配列番号 2 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 67 として修飾され得る。配列番号 3 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 68 として修飾され得る。配列番号 4 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 69 として修飾され得る。配列番号 5 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 70 として修飾され得る。配列番号 6 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 71 として修飾され得る。配列番号 7 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 72 として修飾され得る。配列番号 8 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 74 として修飾され得る。配列番号 9 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 75 として修飾され得る。配列番号 10 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 76 として修飾され得る。配列番号 11 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 77 として修飾され得る。配列番号 12 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 78 として修飾され得る。配列番号 13 のオリゴヌクレオチドは、配列番号 79 として修飾され得る。

20

【0131】

実施形態では、配列番号 1 ~ 65 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 1 つのヌクレオチドは、5 - メチルシトシン核酸塩基、2' 位における O - Me 修飾 (mA、5mmC、mG 及び mU) 並びにヌクレオチド間のチオホスホロアミダート (NPS) 結合を含むように修飾される。実施形態では、配列番号 1 ~ 65 のうちのいずれか 1 つの各ヌクレオチドは、以下のように修飾される。

30

(a) シトシン核酸塩基を有する各ヌクレオチドは、2' - O - Me、5 - メチルシトシン (5mmC) であるように修飾され、

(b) 各他のヌクレオチドもまた、2' 位に O - Me 修飾 (mA、mG 及び mU) を含むように修飾され、及び

(c) 各ヌクレオチドは、ヌクレオチド間にチオホスホロアミダート (NPS) 結合を含有する。

【0132】

例えば、配列番号 7 のオリゴヌクレオチドは、表 2 に記載されるように配列番号 73 として修飾されてもよい。

【0133】

40

【表 2】

表 2

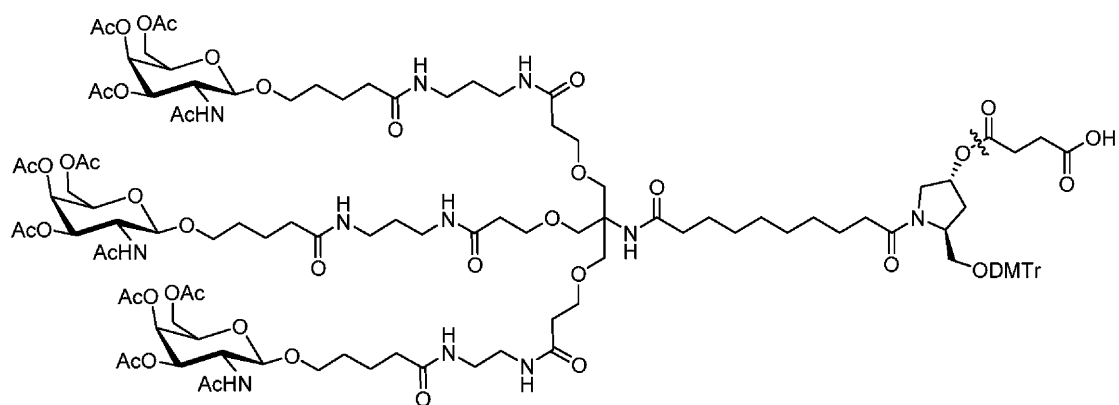
修飾オリゴヌクレオチド配列 (配列番号)	
5' - mApsmApsmGps5mmCps5mmCps5mmCps5mmCpsmApsmGps5mmCps5mmCpsmApsmGpsmUpsmGpsmGpsmGpsmGpsmGpsmUpsmU - 3' (配列番号66)	10
5' - 5mmCps5mmCpsmApsmApsmGps5mmCps5mmCps5mmCps5mmCpsmApsmGps5mmCps5mmCpsmApsmGpsmUpsmGpsmGpsmG - 3' (配列番号67)	
5' - 5mmCpsmUpsmUpsmGpsmUpsmApsmApsmGpsmUpsmUpsmGpsmGps5mmCpsmGpsmApsmGpsmApsmApsmApsmG - 3' (配列番号68)	
5' - mUpsmAps5mmCpsmUpsmUpsmUps5mmCps5mmCpsmApsmApsmUps5mmCpsmApsmApsmUpsmApsmGpsmGps5mmCps - 3' (配列番号69)	
5' - 5mmCps5mmCpsmUpsmApsmUpsmUpsmGpsmApsmUpsmUpsmGpsmGpsmApsmApsmApsmGpsmU - 3' (配列番号70)	
5' - mGps5mmCps5mmCpsmUpsmApsmUpsmUpsmGpsmApsmUpsmUpsmGpsmGpsmApsmApsmApsmGpsmUpsmA - 3' (配列番号71)	20
5' - mUpsmGpsmApsmAps5mmCps5mmCpsmUpsmUpsmUpsmAps5mmCps5mmCps5mmCps5mmCpsmGpsmUpsmUpsmGps5mmCps5mmC - 3' (配列番号72)	
5' - mUnpsmGnpsmApsmAps5mmCnps5mmCnpsmUnpsmUnpsmUnpsmAps5mmCnps5mmCnps5mmCnps5mmCnpsmGnpsmUnpsmUnpsmGnps5mmCnps5mmC - 3' (配列番号73)	
5' - mUpsmGps5mmCpsmGpsmUps5mmCpsmApsmGps5mmCpsmApsmApsmAps5mmCpsmAps5mmCpsmUpsmUpsmGpsmGps5mmCps - 3' (配列番号74)	
5' - mGps5mmCpsmGpsmUps5mmCpsmApsmGps5mmCpsmApsmApsmAps5mmCpsmAps5mmCpsmUpsmUpsmGpsmGps5mmCpsmA - 3' (配列番号75)	
5' - mUps5mmCpsmUps5mmCpsmGps5mmCps5mmCpsmApsmAps5mmCpsmUpsmUpsmAps5mmCpsmApsmApsmGpsmGps5mmCps5mmC - 3' (配列番号76)	30
5' - mApsmUpsmUpsmGpsmApsmUpsmUpsmGpsmGpsmApsmApsmApsmGpsmU - 3' (配列番号77)	
5' - mGps5mmCps5mmCpsmApsmApsmGpsmUpsmGpsmUpsmUpsmUpsmGps5mmCpsmUpsmGpsmAps5mmCpsmGps5mmC - 3' (配列番号78)	
5' - mGps5mmCpsmUps5mmCpsmGps5mmCpsmApsmGps5mmCps5mmCpsmGpsmGpsmUps5mmCpsmUpsmGpsmGpsmApsmG - 3' (配列番号79)	

【0134】

実施形態では、リガンド標的化部分は、オリゴヌクレオチドに共役される。標的化部分は、G a l N A c - 1 - 13などのG a l N A cを含む。例えば、以下のG a l N A c誘導体が、いくつかの実施形態に含まれる。以下は、構造に示されるように、リンカー又は支持体に結合したG a l N A c部分を示す。

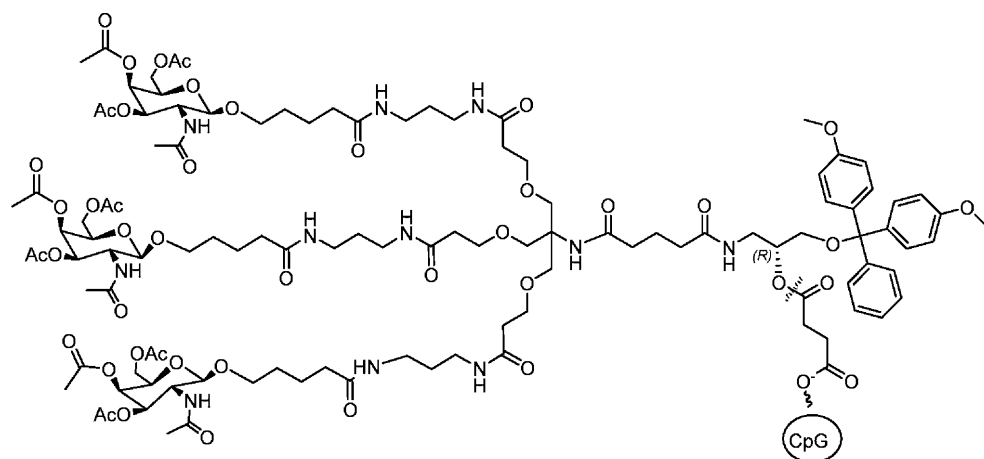
【0135】

【化 1 8】



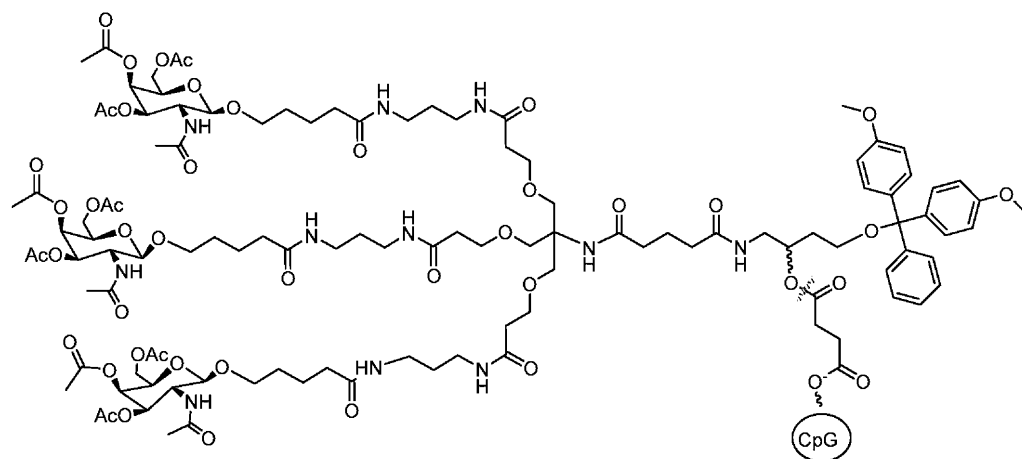
10

GalNAc-1



20

GalNAc-2-CPG



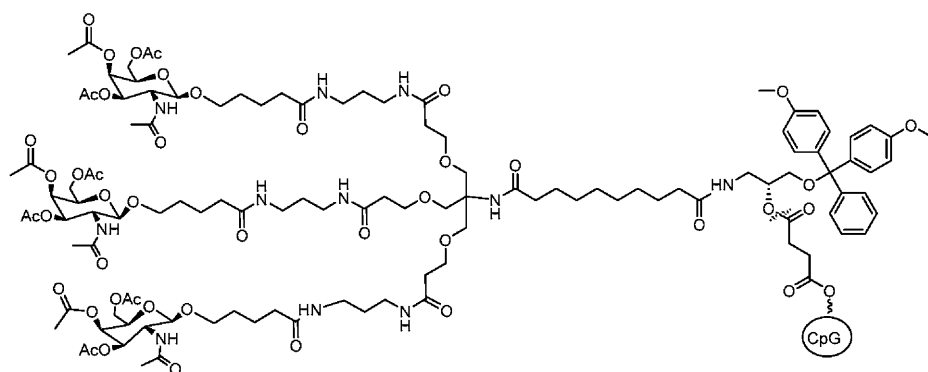
30

GalNAc-3-CPG

【 0 1 3 6 】

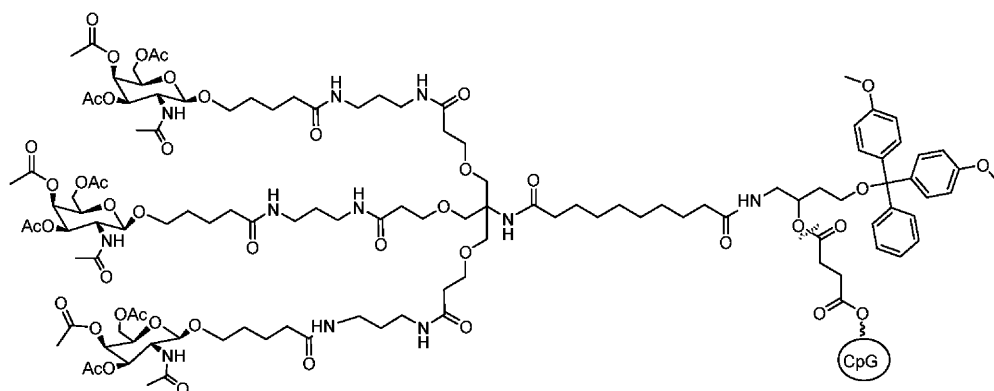
40

【化 1 9】



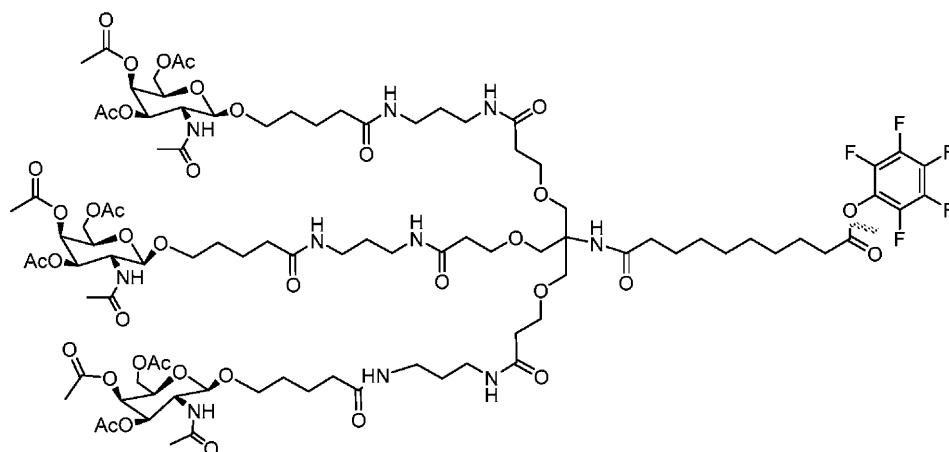
10

GalNAc-4-CPG



20

GalNAc-5-CPG



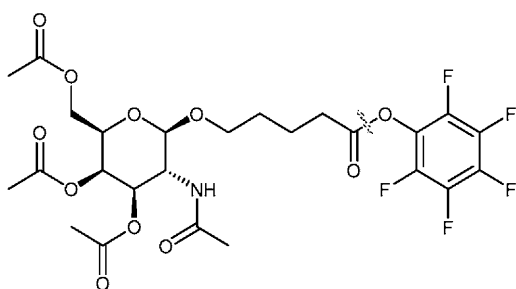
30

GalNAc-6

【 0 1 3 7 】

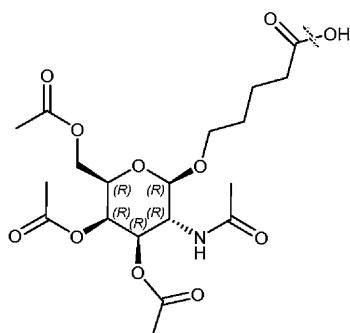
40

【化 2 0】



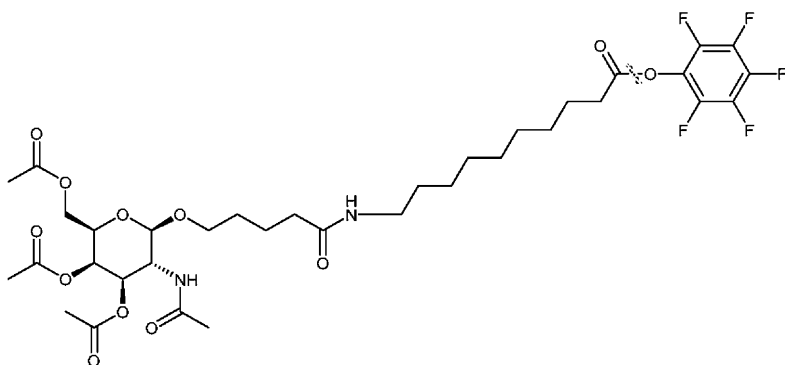
GalNAc-7

10



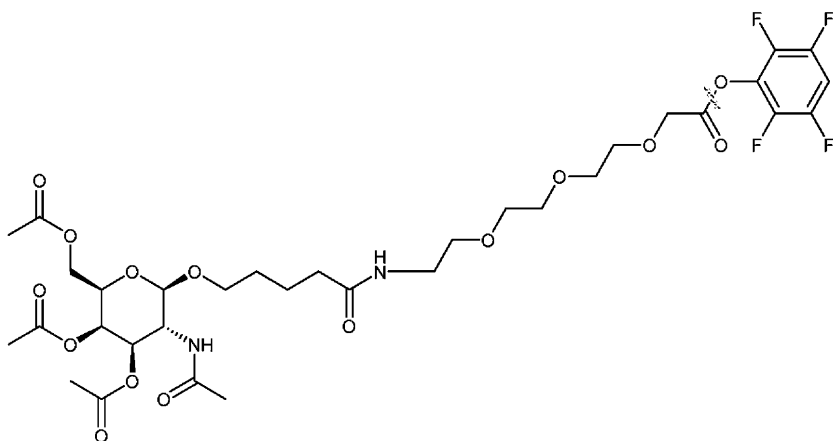
20

GalNAc-8



30

GalNAc-9

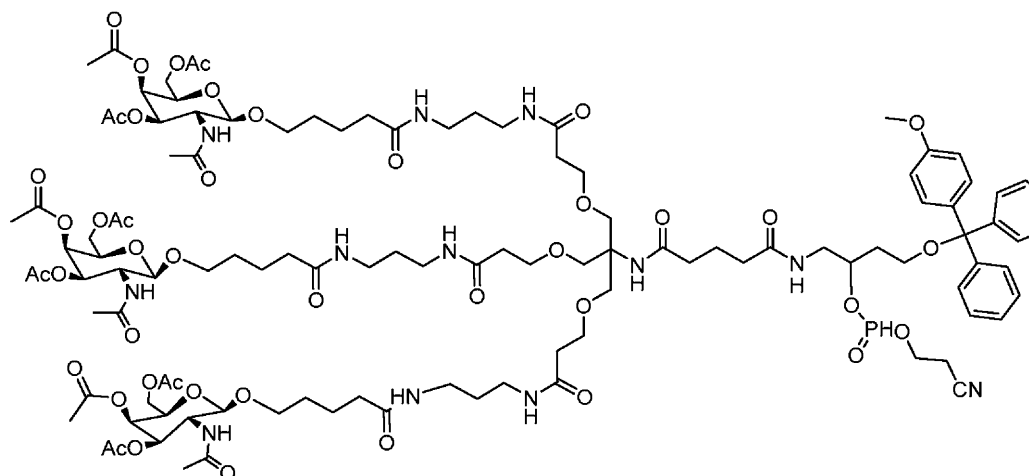


40

【 0 1 3 8 】

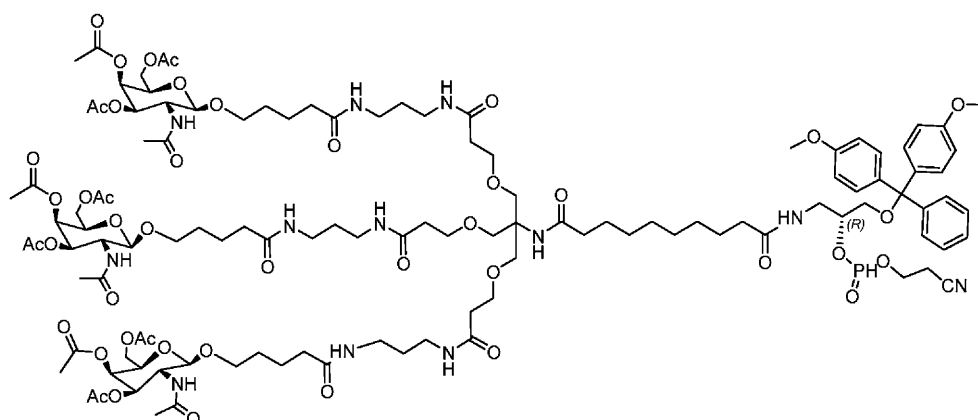
【化 2 1】

GalNAc-10



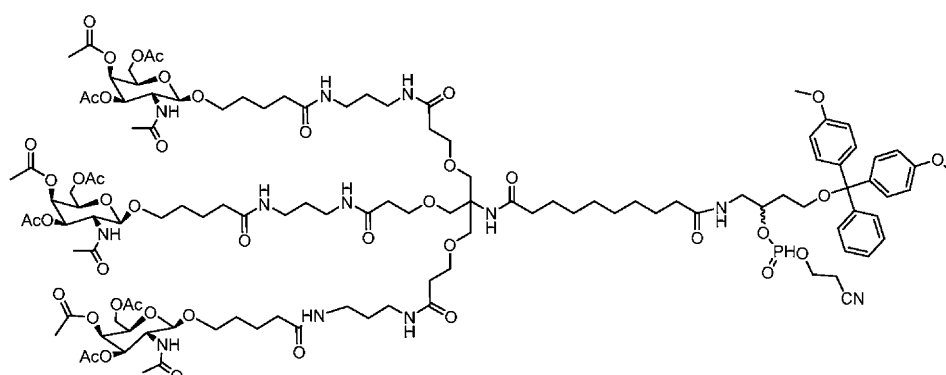
10

GalNAc-11



20

GalNAc-12



30

GalNAc-13

【 0 1 3 9 】

GalNAc誘導体は、本開示のオリゴヌクレオチドの3'及び/又は5'末端で共役されてもよい。例えば、配列番号71のオリゴヌクレオチドは、3' GalNAc (配列番号80)を含み得る。他の標的化部分は、パルミトイル又はトコフェロール修飾を含み得る。例えば、配列番号71のオリゴヌクレオチドは、3' パルミトイル (配列番号81)又は3' トコフェロール (配列番号82)を含み得る。

【 0 1 4 0 】

50

治療及び予防方法

以下の記述は、単に例として提示され、制限することを意図したものではない。

【0141】

本開示の一態様は、HBV感染症及び/又はHBV関連障害を有する、その疑いがある、又はそのリスクがあると診断された対象を治療するための方法を含む。治療用途では、本開示のオリゴヌクレオチドを含む組成物は、そのような疾患（例えば、対象の血清及び/若しくは肝臓中のHBV抗原（例えば、HBV cccDNAの持続、HBsAg及び/若しくはHBeAg）の存在、又は高HBVウイルス負荷レベル）の疑いがある、又はそのような疾患に既に罹患している対象に、疾患の発症におけるその合併症及び中間の病理学的表現型を含む、疾患の症状を治癒する、又は少なくとも部分的に停止させるのに十分な量で投与される。

10

【0142】

HBV感染症及び/又はHBV関連障害に罹患している対象は、本明細書に記載されるHBV感染症及び/又はHBV関連障害の典型的な症状の検出を含む、当該技術分野において既知の診断又は予後アッセイのいずれか又は組み合わせによって同定することができる。

【0143】

本開示は、有効量の本開示のオリゴヌクレオチド組成物を対象に投与することを含む、HBV感染症及び/又はHBV関連疾患を有すると診断された又はその疑いがある対象を治療するための方法を提供する。

20

【0144】

いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチド組成物で治療された対象は、次の症状、すなわち肝HBV cccDNAの存在、血清及び/又は肝HBV抗原（例えば、HBsAg及び/又はHBeAg）の存在、抗HBV抗体、肝障害、肝硬変、デルタ肝炎、急性B型肝炎、急性B型劇症肝炎、慢性B型肝炎、肝線維症、末期肝疾患、肝細胞癌、血清病様症候群、食欲不振、悪心、嘔吐、微熱、筋肉痛、易疲労感、味覚力及び嗅覚異常（食物及びタバコへの嫌悪感）、右上腹部及び心窩部痛（断続的、軽度～中程度）、肝性脳症、傾眠、睡眠パターン障害、精神錯乱、昏睡、腹水、消化管出血、凝固障害、黄疸、肝腫大（ゆっくりと拡大、軟肝臓）、脾腫、手掌紅斑、くも状母斑、筋消耗、くも状血管腫、血管炎、静脈りゅう出血、末梢性浮腫、女性化乳房、精巣萎縮、腹部側副静脈（メズサの頭）、AST値より高いALT値、白血球減少（すなわち、顆粒球減少）、アルブミン濃度の低下、血清鉄濃度の上昇、リンパ球増加、赤血球沈降速度（ESR）の上昇、赤血球寿命の短縮、溶血、血小板減少症、国際標準化比（INR）の延長、血清HBV DNAの存在、プロトロンビン時間（PT）の延長、高グロブリン血症、抗平滑筋抗体（ASMA）又は抗核抗体（ANA）などの組織非特異的抗体の存在、甲状腺に対する抗体などの組織特異的抗体の存在、高ビリルビン血症、血小板数及び白血球数の低値、ALT値より高いAST値、変性及び新生肝細胞の変化を伴う小葉性炎症、並びに大部分の小葉中心壊死のうちの1つ又は2つ以上の改善又は排除を示す。

30

【0145】

いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチド組成物で治療された対象は、HBV感染症及び/又はHBV関連疾患に罹患している未治療の対象と比較して、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）、アルカリホスファターゼ（ALP）、ビリルビン、及びリウマチ因子（RF）の中から選択される1つ又は2つ以上のバイオマーカーの発現レベルの低減を示す。

40

【0146】

いくつかの実施形態では、HBV感染症及び/又はHBV関連疾患を有する対象にHBV cccDNAを標的とするオリゴヌクレオチドを投与し、それにより、HBV cccDNAレベル、HBV抗原レベル、HBVウイルス負荷レベル、ALTレベル、及び/又はASTレベル、例えば、細胞、組織、血液又は対象の他の生物学的流体は、オリゴヌ

50

クレオチドの投与前に対象において観察されるレベルと比較して、少なくとも約 10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、31 %、32 %、33 %、34 %、35 %、36 %、37 %、38 %、39 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は少なくとも約 99 % 以上低減される。

10

【0147】

いくつかの実施形態では、HBV 感染症及び / 又は HBV 関連疾患を有する対象に HBV cccDNA を標的とするオリゴヌクレオチドを投与し、それにより例えば、細胞、組織、血液又は対象の他の生物学的流体中の抗 HBV 抗体のレベルは、オリゴヌクレオチドの投与前に対象において観察されるレベルと比較して、少なくとも約 10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、31 %、32 %、33 %、34 %、35 %、36 %、37 %、38 %、39 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は少なくとも約 99 % 以上増加する。

20

【0148】

本開示の方法は、HBV cccDNA レベルが、約 1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76 又は約 80 時間にわたって低減されるように、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド組成物を投与することを含む。一実施形態では、HBV cccDNA レベルは、長期間、例えば、少なくとも約 2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日以上、又は約 1 週間、2 週間、3 週間、若しくは約 4 週間以上にわたって減少する。

30

【0149】

いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチド組成物の投与は、例えば、患者の細胞、組織、血液、尿又は器官中の肝 HBV cccDNA の存在、HBV DNA (例えば、rcDNA) のレベル、血清及び / 又は肝 HBV 抗原 (例えば、HBsAg 及び / 若しくは HBeAg) の存在、ALT レベル並びに / 又は AST レベルを、少なくとも約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、31 %、32 %、33 %、34 %、35 %、36 %、37 %、38 %、39 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は少なくとも約 99 % 以上、例えば、アッセイの検出レベルを下回るまで低減する。

40

【0150】

50

追加的に又は代替的に、いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチド組成物の投与は、例えば、患者の細胞、組織、血液、尿又は器官中の血清及び／又は肝臓抗HBV抗体の存在を、少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は少なくとも約99%以上増加させる。

10

【0151】

一態様では、本開示は、HBV cccDNAを配列番号1～82のうちのいずれか1つの配列を有するオリゴヌクレオチドと接触させることを含む、HBV cccDNAにおけるDループ形成を誘導するための方法を提供する。別の態様では、本開示は、ヌクレオチド位置900～1310（エンハンサーI領域）からなるHBV cccDNAゲノムの標的領域を、HBV cccDNAの標的領域に対して少なくとも90%相補的であるオリゴヌクレオチドと接触させることを含む、HBV cccDNAにおけるDループ形成を誘導するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドは、HBV cccDNAとハイブリダイズして、抗原性Dループ構造の形成を誘導する。いくつかの実施形態では、Dループ形成の誘導は、先天性免疫を刺激する。

20

【0152】

治療用途の場合、本開示のオリゴヌクレオチド組成物は、対象に投与される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、1日当たり1回、2回、3回、4回、又は5回投与される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、1日当たり5回よりも多く投与される。追加的に又は代替的に、いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、毎日、1日おき、3日おき、4日おき、5日おき、又は6日おきに投与される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、毎週、隔週、3週間ごと、又は毎月投与される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、1、2、3、4、又は5週間の期間にわたって投与される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、6週間以上にわたって投与される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、12週間以上にわたって投与される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、1年未満の期間にわたって投与される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、1年を超える期間にわたって投与される。

30

【0153】

本開示の方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、1週間以上にわたって毎日投与される。本開示の方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、2週間以上にわたって毎日投与される。本開示の方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、3週間以上にわたって毎日投与される。本開示の方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、4週間以上にわたって毎日投与される。本開示の方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、6週間以上にわたって毎日投与される。本開示の方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、12週間以上にわたって毎日投与される。

40

【0154】

疾患の治療の有効性は、例えば、疾患の進行、疾患の寛解、症状の重篤度、疼痛の低減、生活の質、治療効果を維持するために必要な薬剤の用量、疾患マーカーのレベル又は治

50

療されている所与の疾患に対して適切な任意の他の測定可能なパラメータを測定することによって評価することができる。そのようなパラメータのうちのいずれか1つ、又はパラメータの任意の組み合わせを測定することによって、治療の有効性をモニタリングすることは、十分に当業者の能力の範囲内である。例えば、C H B の治療の有効性は、例えば、ウイルス負荷及びトランスアミナーゼレベルの定期的なモニタリングによって評価できる。初期値とその後の値を比較することによって、処置が有効であるかどうかの指標が提供される。

【0155】

投与様式

本開示は、本開示のオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物及び製剤を提供する。医薬組成物は、H B V 感染症に関連する疾患又は障害を治療するのに有用である。

10

【0156】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド、及び医薬的に許容される担体を含む。そのような医薬組成物は、送達様式に基づいて配合される。

【0157】

本開示の医薬組成物は、局所治療が所望されるか又は全身治療が所望されるかに応じて、また治療されるべき領域に応じて、多数の方法で投与することができる。投与は、例えば、噴霧器、気管内、鼻腔内、上皮、経口、直腸、又は非経口によるものを含む、散剤又はエアロゾルの吸入又は吹送によって、局所、肝内、経皮（例えば、経皮パッチによる）、肺であり得る。非経口投与としては、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内又は筋肉内注射若しくは注入、皮下、例えば、移植されたデバイスを介して、又は頭蓋内、例えば、実質内、髄腔内又は心室内投与によるものが挙げられる。

20

【0158】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、非経口送達を介した、例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、頭蓋内、又は皮下での全身投与用に配合される。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、脳実質への直接送達、例えば、連続ポンプ注入による脳への注入のために配合される。

【0159】

いくつかの実施形態では、投与は、デポー注射を介して行われる。デポー注射は、長期間にわたって一貫した方法でオリゴヌクレオチドを放出することができる。したがって、デポー注射は、所望の治療効果又は予防効果を得るために必要とされる投与頻度を低減することができる。デポー注射はまた、より一貫した血清濃度を提供し得る。デポー注射は、皮下注射又は筋肉内注射を含み得る。

30

【0160】

いくつかの実施形態では、投与は、ポンプを介して行われる。ポンプは、外部ポンプ又は外科的に埋め込まれたポンプであってもよい。ある特定の実施形態では、ポンプは皮下移植された浸透圧ポンプである。他の実施形態では、ポンプは、注入ポンプである。注入ポンプは、静脈内、皮下、動脈、又は硬膜外注入に使用されてもよい。ある特定の実施形態では、注入ポンプは、皮下注入ポンプである。他の実施形態では、ポンプは、オリゴヌクレオチドを肝臓に送達する外科的に埋め込まれたポンプである。

40

【0161】

局所投与用の医薬組成物及び製剤としては、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、液滴、坐剤、スプレー、液体及び粉末を挙げることができる。従来の医薬担体、水性、粉末又は油性塩基、増粘剤等が含まれてもよい。好適な局所製剤としては、本開示において特徴付けられるオリゴヌクレオチドが、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤及び界面活性剤などの局所送達剤と混和されるものが挙げられる。好適な脂質及びリポソームは、中性（例えば、ジオレオイルホスファチジルD O P E エタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリンD M P C、ジステアロホスファチジルコリン）、アニオン性（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロール

50

D M P G) 又はカチオン性 (例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピル D O T A P 及びジオレオイルホスファチジルエタノールアミン D O T M A) であってもよい。本開示において特徴付けられるオリゴヌクレオチドは、リボソーム内に封入され得るか又はリボソーム、特にカチオン性リボソームと複合体を形成することができる。代替的に、オリゴヌクレオチドは、脂質、特にカチオン性脂質と複合体化され得る。好適な脂肪酸及びエステルとしては、アラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリアクレート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1 - モノカプリン酸グリセリル、1 - ドデシルシクロヘプタン - 2 - オン、アシルカルニチン、アシルコリン、又は C₁ - C₂₀ アルキルエステル (例えば、イソプロピルミリスレート I P M) 、モノグリセリド、ジグリセリド又はその医薬的に許容される塩が挙げられるが、これらに限定されない。局所製剤は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 6 , 7 4 7 , 0 1 4 号に詳述されている。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 2 】

経口投与の場合、液体又は固体製剤が使用されてもよい。そのような製剤の例としては、錠剤、ゼラチンカプセル、ピル、トローチ、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウエハース、チューインガム等が挙げられる。本開示のオリゴヌクレオチドは、当業者に理解されるように、好適な医薬担体 (ビヒクル) 又は賦形剤と混合することができる。担体及び賦形剤の例としては、デンプン、乳、糖、ある特定の種類の粘土、ゼラチン、乳酸、ステアリン酸又はこれらの塩 (ステアリン酸マグネシウム若しくはステアリン酸カルシウムを含む) 、タルク、植物性脂肪若しくは油、ガム及びグリコールが挙げられる。

【 0 1 6 3 】

口腔用組成物は、一般に、不活性希釈剤又は食用担体を含む。経口治療投与の目的で、活性化合物は、賦形剤と共に組み込まれ、錠剤、トローチ、又はカプセル、例えば、ゼラチンカプセルの形態で使用するすることができる。口腔用組成物はまた、口内洗浄剤として使用するための流体キャリアを使用して調製することもできる。医薬的に適合性のある結合剤、及び / 又はアジュバント物質は、組成物の一部として含まれてもよい。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ等は、以下の成分又は同様の性質の化合物のうちのいずれかを含有することができる：微結晶セルロース、トラガカントゴム若しくはゼラチンなどの結合剤；デンプン若しくはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、ブライモゲル、若しくはトウモロコシデンプンなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム若しくは S t e r o t e などの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素などの滑剤；スクロース若しくはサッカリンなどの甘味剤；又はペパーミント、サリチル酸メチル、若しくはオレンジ風味などの香味剤。

【 0 1 6 4 】

本開示の医薬組成物は、H B V の c c c D N A を標的とするのに十分な投与量で投与され得る。

【 0 1 6 5 】

一実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、体重ベースの用量として対象に投与される。「体重ベースの用量」(例えば、m g / k g の用量) は、対象の体重に応じて変化するオリゴヌクレオチドの用量である。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、固定用量として対象に投与される。「固定用量」(例えば、m g の用量) は、重量などの任意の特定の対象に関連する因子にかかわらず、全ての対象に対して同じオリゴヌクレオチド用量が使用されることを意味する。特定の一実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドの固定用量は、所定の重量又は年齢に基づく。

【 0 1 6 6 】

一般に、本開示のオリゴヌクレオチドの好適な用量は、1 日当たり、レシピエントの体重 1 キログラム当たり約 0 . 0 0 0 1 ~ 約 2 0 0 . 0 ミリグラムの範囲又は 1 日当たり、体重 1 キログラム当たり約 1 ~ 5 0 m g の範囲である。例えば、オリゴヌクレオチドは、1 日当たり約 0 . 0 1 m g / k g 、約 0 . 0 5 m g / k g 、約 0 . 5 m g / k g 、約 1 m g / k g 、約 1 . 5 m g / k g 、約 2 m g / k g 、約 3 m g / k g 、約 1 0 m g / k g 、

約 20 mg / kg、約 30 mg / kg、約 40 mg / kg、又は約 50 mg / kg で投与することができる。

【0167】

対象には、治療有効量の本開示のオリゴヌクレオチド、例えば約 0.01 mg / kg、0.02 mg / kg、0.03 mg / kg、0.04 mg / kg、0.05 mg / kg、0.1 mg / kg、0.15 mg / kg、0.2 mg / kg、0.25 mg / kg、0.3 mg / kg、0.35 mg / kg、0.4 mg / kg、0.45 mg / kg、0.5 mg / kg、0.55 mg / kg、0.6 mg / kg、0.65 mg / kg、0.7 mg / kg、0.75 mg / kg、0.8 mg / kg、0.85 mg / kg、0.9 mg / kg、0.95 mg / kg、1.0 mg / kg、1.1 mg / kg、1.2 mg / kg、1.3 mg / kg、1.4 mg / kg、1.5 mg / kg、1.6 mg / kg、1.7 mg / kg、1.8 mg / kg、1.9 mg / kg、2.0 mg / kg、2.1 mg / kg、2.2 mg / kg、2.3 mg / kg、2.4 mg / kg、2.5 mg / kg、2.6 mg / kg、2.7 mg / kg、2.8 mg / kg、2.9 mg / kg、3.0 mg / kg、3.1 mg / kg、3.2 mg / kg、3.3 mg / kg、3.4 mg / kg、3.5 mg / kg、3.6 mg / kg、3.7 mg / kg、3.8 mg / kg、3.9 mg / kg、4.0 mg / kg、4.1 mg / kg、4.2 mg / kg、4.3 mg / kg、4.4 mg / kg、4.5 mg / kg、4.6 mg / kg、4.7 mg / kg、4.8 mg / kg、4.9 mg / kg、5.0 mg / kg、5.1 mg / kg、5.2 mg / kg、5.3 mg / kg、5.4 mg / kg、5.5 mg / kg、5.6 mg / kg、5.7 mg / kg、5.8 mg / kg、5.9 mg / kg、6.0 mg / kg、6.1 mg / kg、6.2 mg / kg、6.3 mg / kg、6.4 mg / kg、6.5 mg / kg、6.6 mg / kg、6.7 mg / kg、6.8 mg / kg、6.9 mg / kg、7.0 mg / kg、7.1 mg / kg、7.2 mg / kg、7.3 mg / kg、7.4 mg / kg、7.5 mg / kg、7.6 mg / kg、7.7 mg / kg、7.8 mg / kg、7.9 mg / kg、8.0 mg / kg、8.1 mg / kg、8.2 mg / kg、8.3 mg / kg、8.4 mg / kg、8.5 mg / kg、8.6 mg / kg、8.7 mg / kg、8.8 mg / kg、8.9 mg / kg、9.0 mg / kg、9.1 mg / kg、9.2 mg / kg、9.3 mg / kg、9.4 mg / kg、9.5 mg / kg、9.6 mg / kg、9.7 mg / kg、9.8 mg / kg、9.9 mg / kg、10 mg / kg、15 mg / kg、20 mg / kg、25 mg / kg、30 mg / kg、35 mg / kg、40 mg / kg、45 mg / kg、又は約 50 mg / kg のオリゴヌクレオチドが投与され得る。列挙された値の中間の値及び範囲もまた、本開示の一部として企図される。

10

20

30

【0168】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、又は約 10 mg / kg の用量で投与されてもよい。列挙された値の中間の値及び範囲もまた、本開示の一部として企図される。

40

【0169】

別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約 0.1 ~ 約 50 mg / kg、約 0.25 ~ 約 50 mg / kg、約 0.5 ~ 約 50 mg / kg、約 0.75 ~ 約 50 mg / kg、約 1 ~ 約 50 mg / kg、約 1.5 ~ 約 50 mg / kg、約 2 ~ 約 50 mg / kg、約 2.5 ~ 約 50 mg / kg、約 3 ~ 約 50 mg / kg、約 3.5 ~ 約 50 mg / kg、約 4 ~ 約 50 mg / kg、約 4.5 ~ 約 50 mg / kg、約 5 ~ 約 50 mg / kg、約 5.5 ~ 約 50 mg / kg、約 6 ~ 約 50 mg / kg、約 6.5 ~ 約 50 mg / kg、約 7 ~ 約 50 mg / kg、約 7.5 ~ 約 50 mg / kg、約 8 ~ 約 50 mg / kg、約 8.5 ~ 約 50 mg / kg、約 9 ~ 約 50 mg / kg、約 9.5 ~ 約 50 mg / kg、約 10 ~ 約 50 mg / kg、又は約 50 mg / kg 以上。

50

5 ~ 約 50 mg / kg、約 3 ~ 約 50 mg / kg、約 3 . 5 ~ 約 50 mg / kg、約 4 ~ 約 50 mg / kg、約 4 . 5 ~ 約 50 mg / kg、約 5 ~ 約 50 mg / kg、約 7 . 5 ~ 約 50 mg / kg、約 10 ~ 約 50 mg / kg、約 15 ~ 約 50 mg / kg、約 20 ~ 約 50 mg / kg、約 25 ~ 約 50 mg / kg、約 30 ~ 約 50 mg / kg、約 35 ~ 約 50 mg / kg、約 40 ~ 約 50 mg / kg、約 45 ~ 約 50 mg / kg、約 0 . 1 ~ 約 45 mg / kg、約 0 . 25 ~ 約 45 mg / kg、約 0 . 5 ~ 約 45 mg / kg、約 0 . 75 ~ 約 45 mg / kg、約 1 ~ 約 45 mg / kg、約 1 . 5 ~ 約 45 mg / kg、約 2 ~ 約 45 mg / kg、約 2 . 5 ~ 約 45 mg / kg、約 3 ~ 約 45 mg / kg、約 3 . 5 ~ 約 45 mg / kg、約 4 ~ 約 45 mg / kg、約 4 . 5 ~ 約 45 mg / kg、約 5 ~ 約 45 mg / kg、約 7 . 5 ~ 約 45 mg / kg、約 10 ~ 約 45 mg / kg、約 15 ~ 約 45 mg / kg、約 20 ~ 約 45 mg / kg、約 25 ~ 約 45 mg / kg、約 30 ~ 約 45 mg / kg、約 35 ~ 約 45 mg / kg、約 40 ~ 約 45 mg / kg、約 0 . 1 ~ 約 40 mg / kg、約 0 . 25 ~ 約 40 mg / kg、約 0 . 5 ~ 約 40 mg / kg、約 0 . 75 ~ 約 40 mg / kg、約 1 ~ 約 40 mg / kg、約 1 . 5 ~ 約 40 mg / kg、約 2 ~ 約 40 mg / kg、約 2 . 5 ~ 約 40 mg / kg、約 3 ~ 約 40 mg / kg、約 3 . 5 ~ 約 40 mg / kg、約 4 ~ 約 40 mg / kg、約 4 . 5 ~ 約 40 mg / kg、約 5 ~ 約 40 mg / kg、約 7 . 5 ~ 約 40 mg / kg、約 10 ~ 約 40 mg / kg、約 15 ~ 約 40 mg / kg、約 20 ~ 約 40 mg / kg、約 25 ~ 約 40 mg / kg、約 30 ~ 約 40 mg / kg、約 35 ~ 約 40 mg / kg、約 0 . 1 ~ 約 30 mg / kg、約 0 . 25 ~ 約 30 mg / kg、約 0 . 5 ~ 約 30 mg / kg、約 0 . 75 ~ 約 30 mg / kg、約 1 ~ 約 30 mg / kg、約 1 . 5 ~ 約 30 mg / kg、約 2 ~ 約 30 mg / kg、約 2 . 5 ~ 約 30 mg / kg、約 3 ~ 約 30 mg / kg、約 3 . 5 ~ 約 30 mg / kg、約 4 ~ 約 30 mg / kg、約 4 . 5 ~ 約 30 mg / kg、約 5 ~ 約 30 mg / kg、約 7 . 5 ~ 約 30 mg / kg、約 10 ~ 約 30 mg / kg、約 15 ~ 約 30 mg / kg、約 20 ~ 約 30 mg / kg、約 25 ~ 約 30 mg / kg、約 0 . 1 ~ 約 20 mg / kg、約 0 . 25 ~ 約 20 mg / kg、約 0 . 5 ~ 約 20 mg / kg、約 0 . 75 ~ 約 20 mg / kg、約 1 ~ 約 20 mg / kg、約 1 . 5 ~ 約 20 mg / kg、約 2 ~ 約 20 mg / kg、約 2 . 5 ~ 約 20 mg / kg、約 3 ~ 約 20 mg / kg、約 3 . 5 ~ 約 20 mg / kg、約 4 ~ 約 20 mg / kg、約 4 . 5 ~ 約 20 mg / kg、約 5 ~ 約 20 mg / kg、約 7 . 5 ~ 約 20 mg / kg、約 10 ~ 約 20 mg / kg、又は約 15 ~ 約 20 mg / kg の用量で投与される。列挙された値の中間の値及び範囲もまた、本開示の一部として企図される。

10

20

30

【0170】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約 0 . 01、0 . 02、0 . 03、0 . 04、0 . 05、0 . 06、0 . 07、0 . 08、0 . 09、0 . 1、0 . 2、0 . 3、0 . 4、0 . 5、0 . 6、0 . 7、0 . 8、0 . 9、1、1 . 1、1 . 2、1 . 3、1 . 4、1 . 5、1 . 6、1 . 7、1 . 8、1 . 9、2、2 . 1、2 . 2、2 . 3、2 . 4、2 . 5、2 . 6、2 . 7、2 . 8、2 . 9、3、3 . 1、3 . 2、3 . 3、3 . 4、3 . 5、3 . 6、3 . 7、3 . 8、3 . 9、4、4 . 1、4 . 2、4 . 3、4 . 4、4 . 5、4 . 6、4 . 7、4 . 8、4 . 9、5、5 . 1、5 . 2、5 . 3、5 . 4、5 . 5、5 . 6、5 . 7、5 . 8、5 . 9、6、6 . 1、6 . 2、6 . 3、6 . 4、6 . 5、6 . 6、6 . 7、6 . 8、6 . 9、7、7 . 1、7 . 2、7 . 3、7 . 4、7 . 5、7 . 6、7 . 7、7 . 8、7 . 9、8、8 . 1、8 . 2、8 . 3、8 . 4、8 . 5、8 . 6、8 . 7、8 . 8、8 . 9、9、9 . 1、9 . 2、9 . 3、9 . 4、9 . 5、9 . 6、9 . 7、9 . 8、9 . 9、又は約 10 mg / kg の用量で投与されてもよい。列挙された値の中間の値及び範囲もまた、本開示の一部として企図される。

40

【0171】

ある特定の実施形態では、対象には、約 0 . 1、0 . 125、0 . 15、0 . 175、0 . 2、0 . 225、0 . 25、0 . 275、0 . 3、0 . 325、0 . 35、0 . 375、0 . 4、0 . 425、0 . 45、0 . 475、0 . 5、0 . 525、0 . 55、0 . 575、0 . 6、0 . 625、0 . 65、0 . 675、0 . 7、0 . 725、0 . 75、

50

0.775、0.8、0.825、0.85、0.875、0.9、0.925、0.95、0.975、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は約50mg/kgなど、単一の治療有効量のオリゴヌクレオチドを投与することができる。列挙された値の中間の値及び範囲もまた、本開示の一部として企図される。

10

【0172】

他の実施形態では、対象は、治療有効量のオリゴヌクレオチドの複数回投与、例えば約0.1、0.125、0.15、0.175、0.2、0.225、0.25、0.275、0.3、0.325、0.35、0.375、0.4、0.425、0.45、0.475、0.5、0.525、0.55、0.575、0.6、0.625、0.65、0.675、0.7、0.725、0.75、0.775、0.8、0.825、0.85、0.875、0.9、0.925、0.95、0.975、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は約50mg/kgの用量で投与される。複数回投与レジメンは、治療有効量のオリゴヌクレオチドを毎日、例えば、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間又はそれ以上にわたって投与することを含み得る。

20

30

40

【0173】

他の実施形態では、対象は、治療有効量のオリゴヌクレオチドの反復投与、例えば約0.1、0.125、0.15、0.175、0.2、0.225、0.25、0.275、0.3、0.325、0.35、0.375、0.4、0.425、0.45、0.475、0.5、0.525、0.55、0.575、0.6、0.625、0.65、0.675、0.7、0.725、0.75、0.775、0.8、0.825、0.85、0.875、0.9、0.925、0.95、0.975、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、

50

2 . 4、2 . 5、2 . 6、2 . 7、2 . 8、2 . 9、3、3 . 1、3 . 2、3 . 3、3 . 4、3 . 5、3 . 6、3 . 7、3 . 8、3 . 9、4、4 . 1、4 . 2、4 . 3、4 . 4、4 . 5、4 . 6、4 . 7、4 . 8、4 . 9、5、5 . 1、5 . 2、5 . 3、5 . 4、5 . 5、5 . 6、5 . 7、5 . 8、5 . 9、6、6 . 1、6 . 2、6 . 3、6 . 4、6 . 5、6 . 6、6 . 7、6 . 8、6 . 9、7、7 . 1、7 . 2、7 . 3、7 . 4、7 . 5、7 . 6、7 . 7、7 . 8、7 . 9、8、8 . 1、8 . 2、8 . 3、8 . 4、8 . 5、8 . 6、8 . 7、8 . 8、8 . 9、9、9 . 1、9 . 2、9 . 3、9 . 4、9 . 5、9 . 6、9 . 7、9 . 8、9 . 9、10、10 . 5、11、11 . 5、12、12 . 5、13、13 . 5、14、14 . 5、15、15 . 5、16、16 . 5、17、17 . 5、18、18 . 5、19、19 . 5、20、20 . 5、21、21 . 5、22、22 . 5、23、23 . 5、24、24 . 5、25、25 . 5、26、26 . 5、27、27 . 5、28、28 . 5、29、29 . 5、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は約50mg/kgの用量で投与される。反復投与レジメンは、治療有効量のオリゴヌクレオチドを、定期的に、例えば、1日おき、3日おき、4日おき、週2回、週1回、隔週、又は月1回投与することを含んでもよい。

10

【0174】

例えば、本開示のオリゴヌクレオチド、例えば、医薬組成物中のオリゴヌクレオチドは、約0.01mg/kg、0.0125mg/kg、0.015mg/kg、0.0175mg/kg、0.02mg/kg、0.0225mg/kg、0.025mg/kg、0.0275mg/kg、0.03mg/kg、0.0325mg/kg、0.035mg/kg、0.0375mg/kg、0.04mg/kg、0.0425mg/kg、0.045mg/kg、0.0475mg/kg、0.05mg/kg、0.0525mg/kg、0.055mg/kg、0.0575mg/kg、0.06mg/kg、0.0625mg/kg、0.065mg/kg、0.0675mg/kg、0.07mg/kg、0.0725mg/kg、0.075mg/kg、0.0775mg/kg、0.08mg/kg、0.0825mg/kg、0.085mg/kg、0.0875mg/kg、0.09mg/kg、0.0925mg/kg、0.095mg/kg、0.0975mg/kg、0.1mg/kg、0.125mg/kg、0.15mg/kg、0.175mg/kg、0.2mg/kg、0.225mg/kg、0.25mg/kg、0.275mg/kg、0.3mg/kg、0.325mg/kg、0.35mg/kg、0.375mg/kg、0.4mg/kg、0.425mg/kg、0.45mg/kg、0.475mg/kg、又は約0.5mg/kgの用量で投与されてもよい。前述の値の中間の値もまた、本開示の一部であることが意図される。

20

30

【0175】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約100mg～約900mg、約100mg～約850mg、約100mg～約800mg、約100mg～約750mg、約100mg～約700mg、約100mg～約650mg、約100mg～約600mg、約100mg～約550mg、約100mg～約500mg、約200mg～約850mg、約200mg～約800mg、約200mg～約750mg、約200mg～約700mg、約200mg～約650mg、約200mg～約600mg、約200mg～約550mg、約200mg～約500mg、約300mg～約850mg、約300mg～約800mg、約300mg～約750mg、約300mg～約700mg、約300mg～約650mg、約300mg～約600mg、約300mg～約550mg、約300mg～約500mg、約400mg～約850mg、約400mg～約800mg、約400mg～約750mg、約400mg～約700mg、約400mg～約650mg、約400mg～約600mg、約400mg～約550mg、又は約400mg～約500mgの固定用量として投与される。

40

【0176】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約100mg、約125mg、約1

50

50 mg、約175 mg、約200 mg、約225 mg、約250 mg、約275 mg、約300 mg、約325 mg、約350 mg、約375 mg、約400 mg、約425 mg、約450 mg、約475 mg、約500 mg、約525 mg、約550 mg、約575 mg、約600 mg、約625 mg、約650 mg、約675 mg、約700 mg、約725 mg、約750 mg、約775 mg、約800 mg、約825 mg、約850 mg、約875 mg、又は約900 mgの固定用量で投与される。

【0177】

医薬組成物は、一定期間にわたって、例えば5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は約25分の期間にわたって、静脈内注入によって投与することができる。投与は、例えば、定期的に、例えば週1回、隔週（すなわち、2週間ごと）、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月又はそれ以上にわたって繰り返されてもよい。初期治療の投薬計画後、頻度を減らして治療薬を投与してもよい。例えば、3ヶ月にわたり週1回又は2週間に1回投与した後、6ヶ月又は1年以上にわたって、月1回の投与を繰り返してよい。

10

【0178】

医薬組成物は、1日1回投与され得るか、又はオリゴヌクレオチドは、1日に適切な間隔で2回、3回若しくはそれ以上のサブ用量として、若しくは更には制御放出製剤を介した連続注入若しくは送達を使用して投与され得る。一実施形態では、各サブ用量に含まれるオリゴヌクレオチドは、全日投与量を達成するために、対応してより少なくなければならない。投与単位はまた、例えば、数日の期間にわたってオリゴヌクレオチドの持続放出を提供する従来の持続放出製剤を使用して、数日間にわたって送達するために配合することもできる。持続放出製剤は、当該技術分野において周知であり、特定の部位での薬剤の送達に特に有用である。一実施形態では、投与単位は、対応する複数の1日用量を含有する。

20

【0179】

他の実施形態では、単一用量の医薬組成物は、後続の投与が3、4、若しくは5日間隔以下で、又は1、2、3、若しくは4週間間隔以下で投与されるように、長い持続性であり得る。いくつかの実施形態では、単一用量の本開示の医薬組成物は、1週間に1回投与される。他の実施形態では、単一用量の本開示の医薬組成物は、隔月に投与される。いくつかの実施形態では、単一用量の本開示の医薬組成物は、1ヶ月当たり1回、隔月、又は四半期に1回（すなわち、3ヶ月ごと）に投与される。

30

【0180】

本開示に包含される個々のオリゴヌクレオチドの有効投与量及びインビボ半減期の推定は、従来の方法論を使用して、又は適切な動物モデルを使用したインビボ試験に基づいて行うことができる。

【0181】

本方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、経口、局所、全身、静脈内、皮下、経皮的、髄腔内、鼻腔内、腹腔内、肝内、又は筋肉内投与される。

【0182】

本方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1週間以上にわたって毎日投与される。本方法の他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2週間以上にわたって毎日投与される。本方法のある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、3週間以上にわたって毎日投与される。本方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、4週間以上にわたって毎日投与される。本方法の他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、6週間以上にわたって毎日投与される。本方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12週間以上にわたって毎日投与される。

40

【0183】

併用療法

いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチド組成物は、HBV感染症又は/又はHBV関連障害の寛解又は治療のための1種又は2種以上の追加の治療剤と組み合わせ

50

せることができる。併用療法では、本開示のオリゴヌクレオチド組成物及びHBV感染症の1つ又は2つ以上の追加の治療が、同じ組成物若しくは別個の組成物中で同時に投与されてもよく、又は別々に、同時若しくは連続的に投与されてもよいことが理解される。

【0184】

併用療法で使用され得る追加の治療剤の例としては、抗ウイルス剤、ヌクレオチド類似体、ヌクレオシド類似体、逆転写酵素阻害剤（例えば、テノホビルジソプロキシルフマル酸塩（TDF）、テノホビルアラフェンアミド、ラミブジン、アデホビルジピボキシル、エンテカビル（ETV）、テルビブジン、AGX-1009、エムトリシタピン、クレブジン、リトナビル、ジピボキシル、ロブカビル、ファムビル、FTC、N-アセチル-システイン（NAC）、PC1323、theradigm-HBV、チモシン-、CMX157、AGX-1009、及びガンシクロビル）、免疫刺激剤（例えば、ペグ化インターフェロン-2a（PEG-IFN-Cc2a）、インターフェロン-2b、組み換えヒトインターロイキン-7、及びToll様受容体7（TLR7）アゴニスト）、治療ワクチン（例えば、GS-4774、DV-601、TG1050、ヘプリスラブ、ABX203、及びINO-1800）、ウイルス侵入阻害剤（例えば、Myrccludex）、siRNA（例えば、ARC520、ARC521、ALN-HBV、ARB-1467等）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、IONIS-HBV-LRx等）、HBsAgの分泌若しくは放出を阻害するオリゴヌクレオチド（例えば、REP9AC）、カプシド阻害剤（例えば、Bay41-4109、NVR-1221、NVR3-778、JNJ-379、AB-423、GLS-4、HAP-1、及びAT-1）、cccDNA阻害剤（例えば、IHVR-25）、TLRアゴニスト（例えば、GS-9620、ARB-1598、ANA975、RG7795（ANA773）、MEDI9197、PF-3512676、及びIMO-2055）、miRNA模倣体若しくは阻害剤、アプタマー、立体的遮断剤、短い活性化RNA（saRNA）、免疫調節性オリゴヌクレオチド、又は他の治療剤及び/若しくは手順、例えば、肝移植、及び化学療法が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0185】

複数の治療剤は、任意の順序で、又は同時に投与されてもよい。同時の場合、複数の治療剤は、単一の統一形態で又は複数の形態で（単なる例として、単一の丸剤として又は2つの別個の丸剤として）提供されてもよい。治療剤のうちの1つは、複数の用量で与えられてもよく、又は両方が複数の用量として与えられてもよい。同時ではない場合、複数の用量の間のタイミングは、0週間超～4週間未満で変動し得る。加えて、組み合わせ方法、組成物及び製剤は、2つの薬剤のみの使用に限定されるものではない。

30

【0186】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの投与に加えて、本方法は、抗ウイルス剤、ヌクレオチド類似体、ヌクレオシド類似体、逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤、治療ワクチン、ウイルス侵入阻害剤、カプシド阻害剤、及びcccDNA阻害剤からなる群から選択される1種又は2種以上の追加の治療剤を、別個に、連続的に又は同時に対象に投与することを更に含む。いくつかの実施形態では、逆転写酵素阻害剤は、テノホビルジソプロキシルフマル酸塩（TDF）、テノホビルアラフェンアミド、ラミブジン、アデホビルジピボキシル、エンテカビル（ETV）、テルビブジン、AGX-1009、エムトリシタピン、クレブジン、リトナビル、ジピボキシル、ロブカビル、ファムビル、FTC、N-アセチル-システイン（NAC）、PC1323、theradigm-HBV、チモシン-、CMX157、AGX-1009、又はガンシクロビルである。

40

【0187】

ある特定の実施形態では、免疫刺激剤は、ペグ化インターフェロン-2a（PEG-IFN-Cc2a）、インターフェロン-2b、組み換えヒトインターロイキン-7、又はToll様受容体7（TLR7）アゴニストである。いくつかの実施形態では、治療ワクチンは、GS-4774、DV-601、又はTG1050である。他の実施形態では、ウイルス侵入阻害剤は、Myrccludexであり、cccDNA阻害剤は、IHV

50

R - 25である。いくつかの実施形態では、カプシド阻害剤は、Bay 41 - 4109、NVR - 1221、NVR3 - 778、又はJNJ - 379である。いくつかの実施形態では、siRNAは、ARC520、ARC521、ALN - HBV、又はARB - 1467であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、IONIS - HBV - L R_xである。

【0188】

キット

本開示はまた、B型肝炎ウイルス(HBV)のcccDNAを標的とするキットを提供する。本開示のキットは、配列番号1~82からなる群から選択される配列又はその修飾を含む、1つ又は2つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。キットはまた、使用のための説明書、商業的販売のために意図されるパッケージなどのパッケージ等を含んでもよい。

10

【実施例】

【0189】

実施例1：本開示のオリゴヌクレオチドは感染した一次ヒト肝細胞中のウイルス抗原を低減する

全てのオリゴヌクレオチドを固相合成により調製した。(+)又は(-)DNA鎖のいずれかに及ぶ、約200の異なるオリゴヌクレオチドを合成した。HBV遺伝子発現(例えば、HBsAg、HBeAg、to_x)に対する異なるオリゴヌクレオチドの生物学的効果を、3つの異なる用量(0.3、3、又は30μM)でHBV(+)一次ヒト肝細胞(Primary Human Hepatocytes、PHH)中でスクリーニングした。

20

【0190】

培養及び感染。一次ヒト肝細胞(PHH)(Bioreclamation IVT, Baltimore, MD)を解凍し、製造元の指示に従ってBiocoat(商標)Collagen I Cellware 96ウェル、24ウェル又は6ウェルプレート(Corning Inc., Corning, New York)上に播種した。細胞を水浴中37℃で解凍し、一次肝細胞解凍及び播種培地(ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA)中で10分間、100×gで回転させた。細胞を再懸濁させ、FBS、インスリン、EGF及びデキサメタゾン(ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA)で補充した肝細胞維持培地(HMM)：DMEM中に8×10⁵/mLでプレートフォーマットで播種した。PHHは、4%(wt/vol)PEG 8000(Sigma)の存在下、肝細胞維持培地(HMM)中で播種した16時間後に50のGE HBVに感染させた。24時間後、ウイルス含有培地を除去し、細胞を4回洗浄し、更にHMM中で4日間インキュベートした。4日間の期間後、製造元の指示に従って、Lipofactamine RNAiMax(ThermoFisher)によるトランスフェクションを介して、PHHを0.0015~10μMのオリゴヌクレオチド又はビヒクルで処理した。次いで、処理したPHHを、6日間のインキュベーション期間の中間点で1回培地変更しながら6日間更にインキュベートした。

30

【0191】

ELISA。HBeAg ELISA及びHBsAg ELISAの各々を、それぞれHBe ELISAキット(Autobio Diagnostics Co. Ltd., Zhengzhou, China)及びsAg ELISAキット(Autobio Diagnostics Co. Ltd., Zhengzhou, China)を用いてPHH上清上で実施した。

40

【0192】

qPCR。全HBV DNAを、製造元の指示に従って、MagMax全核酸単離キット(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)を使用してPHHから抽出し、HBV DNAのコア領域の標準qPCRアッセイ増殖を使用して定量した。

【0193】

50

結果。P H H アッセイで試験した 2 0 0 オリゴヌクレオチドのうち、ヌクレオチド位置 9 6 0 付近で開始し、ヌクレオチド位置 1 3 3 0 で終わる、H B V c c c D N A ゲノムのエンハンサー I 領域周囲の配列を標的とするオリゴヌクレオチドは、驚くべきことに、開示されたオリゴヌクレオチドで処理された P H H の上清中に残っている H B e A g 及び H B s A g の低減に基づいて有意な抗ウイルス活性を示した。表 3 は、この抗ウイルス活性が観察された 3 つの試験された用量：0 . 3、3 . 0 及び 3 0 μ M のうちのいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド濃度を示す。

【 0 1 9 4 】

【表 3 - 1】

表 3

配列番号	核酸塩基配列(5' - 3')	抗ウイルス活性が観察される用量、 μ M
1	AAGCCCCAGCCAGUGGGGGUU	0.3
2	CCAAGCCCCAGCCAGUGGG	0.3
3	CUUGUAAGUUGGCGAGAAAG	>30
4	UACUUUCCAAUCAAUAGGC	>30
5	CCUAUUGAUUGGAAAGU	0.3
6	GCCUAUUGAUUGGAAAGUA	0.3
7	UGAACCUUUACCCCGUUGCC	0.3
8	UGCGUCAGCAAACACUUGGC	0.3
9	GCGUCAGCAAACACUUGGCA	0.3
10	UCUCGCCAACUUACAAGGCC	0.3
11	AUUGAUUGGAAAGU	3.0
12	GCCAAGUGUUUGCUGACGC	>30
13	GCUCGCAGCCGGUCUGGAG	0.3
14	ACUUUCCAAUCAAU	30
15	GGCAACGGGGUAAAGGUUCA	30
16	GCCGGGCAACGGGGUAAAGG	30
17	GCGUCAGCAAACACUUGGC	0.3
18	CCACGCAUGCGCUGAUGGCC	0.3
19	CCAGCCAGUGGGGGUUGCGUC	0.3
20	GCCCCCAGCCAGUGGGGGUU	0.3
21	AAGCCCCAGCCAGUGGGGG	0.3
22	AGCCAGUGGGGGUUGCGUC	30
23	UUCCACGCAUGCGCUGAUGG	0.3
24	AAAGGUUCCACGCAUGCGCA	0.3
25	UUCCGCAGUAUGGAUCGGC	0.3
26	CGCAGUAUGGAUCGGCAGAGG	0.3
27	AGGAGUUCCGCAGUAUGGAUC	0.3
28	GGCUGCGAGCAAAACAAGC	0.3
29	CCGGCUGCGAGCAAAACAAGC	0.3
30	CCGGCUGCGAGCAAAACAA	0.3
31	CCAGACCGGCUGCGAGCAAAA	0.3
32	CUCCAGACCGGCUGCGAGC	0.3
33	GCUCCAGACCGGCUGCGAGC	0.3
34	CCGGCUGCGAGCAAAACAAG	0.3
35	UUUGCUCCAGACCGGCUGCG	0.3
36	UGCUCAGACCGGCUGCGAG	0.3
37	ACCGGCUGCGAGCAAAACAA	0.3
38	GUUGCCGGGCAACGGGGUAA	30
39	UUGCCGGGCAACGGGGUAAA	30
40	GCCGGGCAACGGGGUAAAGG	30
41	CCGGGCAACGGGGUAAAGGU	3.0
42	CGGGCAACGGGGUAAAGGUU	3.0
43	CAGUGGGGGUUGCGUCAGCA	30
44	AGUGGGGGUUGCGUCAGCAA	30
45	GUGGGGGUUGCGUCAGCAAA	30
46	UGGGGGUUGCGUCAGCAAAC	3.0

【表 3 - 2】

(表 3 の続き)

配列番号	核酸塩基配列(5' - 3')	抗ウイルス活性が観察される用量、 μ M
47	GGGGGUUGCGUCAGCAAACA	30
48	GGGGUUGCGUCAGCAAACAC	30
49	GGUUGCGUCAGCAAACACUU	0.3
50	UCGCCAACUUACAAGGCCUU	30
51	CUCGCCAACUUACAAGGCCU	3.0
52	UUCUCGCCAACUUACAAGGC	3.0
53	UUUCUCGCCAACUUACAAGG	3.0
54	CUUUCUCGCCAACUUACAAG	30
55	ACUUUCUCGCCAACUUACAA	3.0
56	UGAACCUUUACCCCGUUGC	0.3
57	CCUUUACCCCGUUGCCCGGC	0.3
58	GAUCCAUAUCUGCGGAACUCCU	0.3
59	GCUUGUUUUGCUCGCAGCC	0.3
60	GCUUGUUUUGCUCGCAGCCGG	30
61	UUGUUUUGCUCGCAGCCGG	30
62	UUUUGCUCGCAGCCGGUCU	3.0
63	UUUUGCUCGCAGCCGGUCUGG	30
64	GCUCGCAGCCGGUCUGGAGC	30
65	CUUGUUUUGCUCGCAGCCGG	0.3

10

20

30

40

50

【0196】

抗ウイルス活性を有することが示されるある特定のオリゴヌクレオチドを、修飾のために選択した。具体的には、配列番号1のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号66のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号2のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号67のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号3のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号68のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号4のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号69のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号5のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号70のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号6のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号71のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号7のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号72のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号8のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号74のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号9のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号75のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号10のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号76のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号11のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号77のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号12のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号78のオリゴヌクレオチドを産生した。配列番号13のオリゴヌクレオチドを修飾して、配列番号79のオリゴヌクレオチドを産生した。オリゴヌクレオチドは、以下の手順に従って修飾した。

【0197】

2'-O-Meホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの合成。各オリゴヌクレオチドは、N⁶-ベンゾイル-2'-OMeアデノシン、2'-OMe-ウリジン、又はN⁶-イソブチリル-2'-OMeグアノシンで誘導体化された長鎖アルキルアミン制御細孔を有する標準的な固体支持体を使用して、1又は2 μ モルスケールでMerMade 12合成装置(Bioautomation, Plano, Texas)中で合成した。3'端のヌクレオチドが、5-メチル-2'-O-メチル-シトシンである場合、代わりにユニバーサルリンカー固体支持体(ChemGenes, MA)を使用した。3'-GalNac及び3'-トコフェロール共役オリゴヌクレオチドについては、対応する修飾された固体支持体を使用した。使用されるサイクルの後に、脱ブロッキング-カップリング-

カップリング - 酸化 - カッピングの工程が続いた。2' - O - メチルホスホルアミダイトを、乾燥アセトニトリル中 0.1 M 溶液として調製した。5 - エチルチオテトラゾールを活性化剤として使用し、ジクロロメタン中 3 % トリクロロ酢酸を使用して、THF 中の無水酢酸を脱トリチル化し、THF 中の 16 % N - メチルイミダゾールを使用してカップし、ピリジン中のキサンタンヒドリドの 0.1 M 溶液を硫化に使用した。脱トリチル化を (2 × 45) 秒間にわたって行った。全ての塩基について、(2 × 360) 秒で定量的カップリングを達成した。各カップリング工程を 90 秒間行った。硫化を 120 秒で達成した。固体支持体からの脱保護及び開裂は、65 で 15 分間アンモニアメチルアミン (AMA) で達成された。万能リンカーを使用した場合、脱保護を 65 で 1 時間放置した。固体支持体を除去するために濾過した後、脱保護溶液を真空下、Gene Vac 遠心蒸発器で除去した。粗産物を 1 M PBS に溶解し、Vivaspin - Hydrostart - 2000 MWCO (Generon Ltd, Berkshire, UK) を用いて限外濾過により脱塩した。純度及び分子量は、HPLC 分析 (60、IEX - Thermo DNAPac PA - 100、A - 25 mM リン酸ナトリウム、10 % アセトニトリル pH 11、B - 1.8 M NaBr 25 mM リン酸ナトリウム、10 % アセトニトリル pH 11; RPI P - Waters XBridge OST C18, A - 100 mM HFIP 7 mM TEA B - 7:3 メタノール / アセトニトリル) 及び Xcalibur の Promass Deconvolution を使用した ESI - MS 分析によって決定した。純度及び分子量は、HPLC 分析 (60、IEX - Thermo DNAPac PA - 100、A - 25 mM リン酸ナトリウム、10 % アセトニトリル pH 11、B - 1.8 M NaBr 25 mM リン酸ナトリウム、10 % アセトニトリル pH 11; RPI P - Waters XBridge OST C18, A - 100 mM HFIP 7 mM TEA B - 7:3 メタノール / アセトニトリル) 及び Xcalibur (Novatia, Newtown, PA) の Promass Deconvolution を使用した ESI - MS 分析によって決定した。

10

20

【0198】

加えて、配列番号 7 のオリゴヌクレオチドを修飾して、以下の手順に従って配列番号 7 のオリゴヌクレオチドを産生した。

【0199】

3' - アミノ - 2' - デオキシホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの合成。3' - アミノ - 2' - デオキシホスホロチオエートは、Zielinska, D.; Pongracz, K; Gryaznov, S. M., Tetrahedron Lett. 47, 4495 - 4499 (2006) に記載されるように合成した。3' - アミノ - 2' - デオキシホスホロチオテトラホスホルアミダイトモノマーは、Pharmaron においてカスタム合成した。乾燥剤を用いて、全てのモノマーを真空デシケーター内で乾燥させた (KOH 及び P₂O₅、室温で 24 時間)。第 1 の 5' 残基に結合した長鎖アルキルアミン制御細孔を有する固体担体は、Prime Synthesis (Aston, PA) から入手した。RNA オリゴヌクレオチドは、デブロック - カップリング - 酸化 - カップリング - 酸化 - カッピングサイクルを使用して、固体支持体上に予め装填されたオリゴヌクレオチドの 5' 残基から出発した標準的なオリゴヌクレオチドホスホロアミダート化学反応を使用して、Mermade 12 合成装置 (Bioautomation, Plano, Texas) 上で合成した。ホスホルアミダイトを、乾燥アセトニトリル中 0.1 M 溶液として調製した。5 - エチルチオテトラゾールを活性化剤として使用し、ジクロロメタン中 5 % のジクロロ酢酸を使用して、脱トリチル化 (50 秒) した。ACN 中のイソ酪酸無水物 - ルチジン - ACN 1:1:8 及び N - メチルイミダゾールを使用してカップし、ピリジン中のキサンタンヒドリドの 0.1 M 溶液を硫化に使用した。全ての塩基について、(2 × 120) 秒で最適なカップリングを達成した。カップリング工程を 90 秒間行った。硫酸化は、240 秒で達成された (2 つのカップリングで分割された)。固体支持体からの脱保護及び開裂は、55 で 5 時間、アンモニア水溶液を用いて達成された。固体支持体を除去するために濾過した後、脱保護溶液を真空下、Gene Vac 遠

30

40

50

心蒸発器で除去した。次いで、粗産物を、イオン交換クロマトグラフィー (Source 15 Q、20 mM NaH_2PO_4 、15% CH_3CN 、1.8 M NaBr 、勾配 5 ~ 50% B 20 カラム体積) を使用して、GE Akta Explorer 上で精製し、画分を、Thermo HPLC 上の逆相イオン対クロマトグラフィーによって分析した。純粋画分を貯留し、限外濾過 (Vivaspin-Hydrosart-2000 MWC0 (Generon Ltd., Berkshire, UK) を使用する) によって脱塩し、GeneVac 蒸発器上で蒸発乾固させた。純度及び分子量は、HPLC 分析 (60、IEX-Thermo DNAPac PA-100、A-25 mM リン酸ナトリウム、10% アセトニトリル pH 11、B-1.8 M NaBr 25 mM リン酸ナトリウム、10% アセトニトリル pH 11; RP-IP-Waters XBridge OST C18, A-100 mM HFIP 7 mM TEA B-7:3 メタノール/アセトニトリル) 及び Xcalibur (Novatia, Newtown, PA) の Promass Deconvolution を使用した ESI-MS 分析によって決定した。精製オリゴヌクレオチドを、2'-O-Me ホスホロチオエートのオリゴヌクレオチドの合成について上述したように分析した。

10

【0200】

表 4 は、更なる修飾のために選択された本開示のオリゴヌクレオチド、それらのヌクレオチド長、オリゴヌクレオチドによって標的化される配列及びオリゴヌクレオチドの方向のまとめを提供する。

20

【0201】

【表 4】

表 4

オリゴヌクレオチド	長さ	HBVゲノム開始 (HBV DNA ヌクレオチド インデックス5' ~ 3')	HBVゲノム停止 (HBV DNA ヌクレオチド インデックス5' ~ 3')	オリゴの方向: アンチセンス(AS) 又はセンス(SS)
配列番号66	21	1194	1214	AS
配列番号67	19	1198	1216	AS
配列番号68	20	1094	1113	AS
配列番号69	19	969	987	AS
配列番号70	17	986	970	SS
配列番号71	19	987	969	SS
配列番号72	20	1155	1136	SS
配列番号73	20	1155	1136	SS
配列番号74	20	1175	1194	AS
配列番号75	20	1174	1193	AS
配列番号76	20	1116	1097	SS
配列番号77	14	986	973	SS
配列番号78	19	1193	1175	SS
配列番号79	19	1315	1297	SS

30

【0202】

各オリゴヌクレオチドの EC50 値及び CC50 値を表 5 にまとめる。表 5 に示すように、本開示のオリゴヌクレオチドは、低濃度での HBV ウイルス抗原 (HBeAg 及び HBsAg) の発現レベルを阻害するのに有効であった。実際に、オリゴヌクレオチドの EC50 値は、HBeAg 阻害については 0.013 μM ~ 0.35 μM の範囲であり、HBsAg 阻害については 0.018 μM ~ 1.12 μM の範囲であった。表 5 を参照されたい。

40

【0203】

【表 5】

表 5

オリゴヌクレオチド	HB _e Ag EC ₅₀ (μ M)	HB _s Ag EC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)
配列番号66	0.35	0.02	>30
配列番号67		0.32	>30
配列番号68	0.19	1.12	>10
配列番号69	0.78	0.81	>10
配列番号70	0.04	0.09	6.6
配列番号71	0.020/0.036	0.024/0.04	>10
配列番号72	0.036/0.19	0.09/0.32	>10
配列番号73	0.13	1.1	3.3
配列番号74	0.29	0.34	>10
配列番号75	0.43	0.21	>10
配列番号76	0.025	0.064	1.37
配列番号77	0.1	0.1	>10
配列番号78	0.13	0.13	>1
配列番号79	0.013	0.018	>10

10

【0204】

20

これらの結果は、本開示のオリゴヌクレオチドが、HBV感染した肝細胞中のウイルス抗原を低減し得ることを実証する。したがって、本開示のオリゴヌクレオチドは、対象におけるHBV感染症を治療するための方法において有用である。

【0205】

表6に記載されるように、配列番号70～72、74及び75もまた、HBV DNAの低減について試験した。

【0206】

【表 6】

表 6

オリゴ	EC ₅₀ sup HBV DNA(μ M)
配列番号70	0.051
配列番号71	0.11
配列番号72	0.46
配列番号74	0.23
配列番号75	0.18

30

【0207】

更に、図2Aは、用量依存的な方法での未治療対照と比較して、配列番号71が、10 μ M～0.08 μ Mの範囲の濃度で、HBV感染したPHH中のrcDNA及びcccDNAレベルを減少させたことを実証する。図2B～図2Cは、配列番号71による治療が、用量依存的な方法での未治療対照と比較して、cccDNAレベルの低減（例えば、10 μ Mで66.3%低減）をもたらしたことを実証する。

40

【0208】

図2Dは、配列番号70、配列番号72及び配列番号75による治療が、HBV感染したPHH中のcccDNAレベルの用量依存的低減（cccDNAレベルの約50～75%の最大低減）をもたらしたことを実証する。配列番号70、配列番号72及び配列番号75のIC₅₀値は、それぞれ0.03 μ M、0.04 μ M及び0.16 μ Mであった。

【0209】

図3A～図3Bは、C57BL/6雌マウスにおける、配列番号71及び配列番号80のインビボ肝臓濃度及び肝臓半減期を示す。配列番号71の肝臓半減期は、319時間で

50

あった。配列番号 80 の肝臓半減期は、安定であった。同様のパターンが、本明細書に開示される他の cccDNA 標的オリゴヌクレオチドで観察された。これらの結果は、本開示の cccDNA 標的オリゴヌクレオチドが、インビボで肝臓に送達されることを実証する。

【0210】

免疫不全状態の FRG マウスを HBV に感染させ、屠殺前に安定したビリミアに到達させた。感染した肝細胞を播種し、3つの異なる濃度の示されたオリゴヌクレオチドで（三連で）直ちに治療した。治療の9日後に、HBV cccDNA レベルをサザンブロットによって評価した。配列番号 80 による治療は、未治療対照と比較して、エクスビボで HBV 感染した FRG (Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}) マウス肝細胞における cccDNA レベルの >60% 低減をもたらした。

10

【0211】

エクスビボ PXB 肝細胞を HBV に感染させ、-1日目（感染の1日前）、0日目（感染と同日）、及び1日目（感染の1日後）に異なる濃度の示されたオリゴヌクレオチド（自由摂取）で治療した。感染後12日目に、cccDNA レベルを qPCR によって評価した。配列番号 82 による治療は、HBV に感染したエクスビボ PXB 肝細胞における cccDNA レベルの >50% 低減をもたらした。表7は、配列番号 71、80 及び 82 についての HBsAg EC₅₀、cccDNA 低減、及び肝臓 AUC のまとめを提示する。

【0212】

20

【表7】

表7

配列番号	修飾	HBsAg EC ₅₀ (μM) -PHH、 トランスフェクション	cccDNA低減	肝臓AUC (ng*h/g)
71	—	0.024	>60%(PHH)	2,603,934
80	3'GalNAc	0.024*	>60%(FRG)	1,371,840
82	3'Toco		>50%(PXB)	

* 非共役親オリゴの EC₅₀ 値（配列番号 71）

30

【0213】

図4Aは、IFN活性化遺伝子（ISG）が、これらの治療された細胞内でのD-ループ構造の形成と一致する配列番号 71 及び配列番号 72 による治療時に、HBV 感染した PHH において上方調節されたことを示す。

【0214】

図4Bは、サイトカインが、配列番号 71 及び配列番号 72 と接触した HBV 陰性細胞において誘導されなかったことを実証し、したがって、図4Aで観察された免疫応答が、HBV 感染した細胞において cccDNA に特異的であったことを実証する。

【0215】

これらの結果は、本開示のオリゴヌクレオチドが、HBV 感染した肝細胞中のウイルス抗原及びウイルス DNA を選択的に低減し得ることを実証する。したがって、本開示のオリゴヌクレオチドは、対象における HBV 感染症を治療するための方法において有用である。

40

【0216】

同等物

本開示は、本開示の個々の態様の単一の説明として意図される、本出願に記載される特定の実施形態に関して限定されるものではない。本開示の多くの修正及び変形は、当業者には明らかとなるように、その趣旨及び範囲から逸脱することなくなされ得る。本開示の範囲内の機能的に同等な方法及び装置は、本明細書で列挙されるものに加えて、前述の説明から当業者には明らかとなるであろう。そのような修正及び変形は、本開示の範囲内に

50

含まれることが意図される。本開示は、特定の方法、試薬、化合物、組成物又は生物学的システムに限定されるものではなく、これらは無論のこと変更可能であることは理解されるはずである。また、本明細書において使用される用語は、あくまで特定の実施形態を説明することを目的としたものに過ぎず、限定的なものではない点も理解されるはずである。

【0217】

加えて、本開示の特徴又は態様が、マーカッシュ群に関して記載されている場合、当業者は、それにより本開示がまた、マーカッシュ群の任意の個々のメンバー又はメンバーの下位群に関して記載されることを認識するであろう。

【0218】

当業者には理解されるように、任意の及び全ての目的のために、特に記載された説明を提供するという観点から、本明細書に開示される全ての範囲はまた、任意の及び全ての可能な部分範囲及びそれらの部分範囲の組み合わせも包含する。任意の列挙された範囲は、同じ範囲が、少なくとも等しい半分、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1等に分解されることを可能にすると容易に認識することができる。非限定的な例として、本明細書で説明される各範囲は、下3分の1、中間3分の1及び上3分の1等に容易に分解することができる。当業者には理解されるように、「最大で」、「少なくとも」、「より大きい」、「より小さい」等の全ての言語は、列挙された数を含み、上述のように、その後部分範囲に分解することができる範囲を指す。最後に、当業者には理解されるように、範囲は、各個々のメンバーを含む。したがって、例えば、1～3個の細胞を有する群は、1、2又は3個の細胞を有する群を指す。同様に、1～5個の細胞を有する群は、1、2、3、4又は5個の細胞を有する群等を指す。

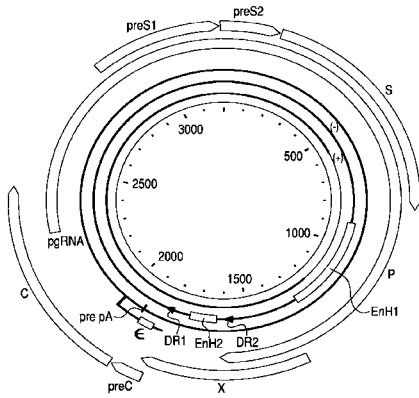
【0219】

本明細書で参照又は引用される全ての特許、特許出願、仮出願及び刊行物は、全ての図面及び表を含めて、本明細書の明白な教示と矛盾しない程度で参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

10

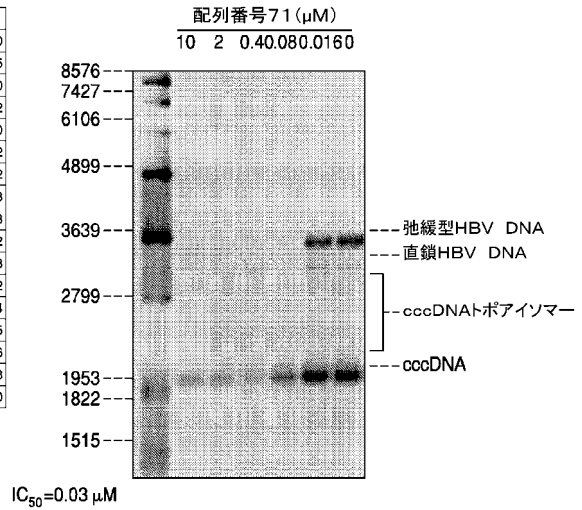
20

【図 1】



特性	開始	終了
プラス 鎖	1223	580
マイナス 鎖	1816	1815
Enh1	900	1310
Enh2	1635	1742
DR2	1590	1600
DR1	1822	1832
pgRNA	1993	1992
pgRNA_オーバーラップ	1816	1993
pre_pA	1908	1913
€	1849	1902
P	2305	1623
preS1	2846	3202
preS2	3203	154
S	155	835
X	1374	1836
preC	1812	1898
C	1899	2450

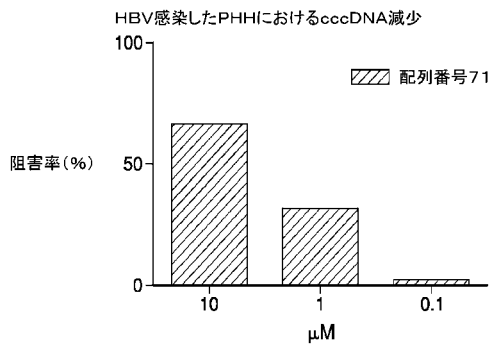
【図 2 A】



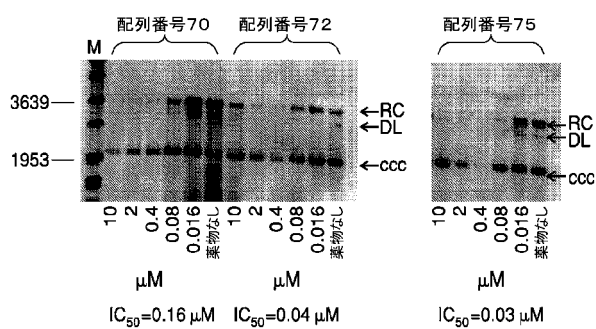
【図 2 B】

試料	cccDNA (pg) (+T5)	cccDNA減少 (GAPDHに対して正規化 された薬物なしと比較)
薬物なし	0.2296274	該当せず
感染なし	0.000314259	該当せず
10 μM 配列番号71	0.07669719	66.3%
1 μM 配列番号71	0.1636122	31.4%
0.1 μM 配列番号71	0.2419079	2.2%

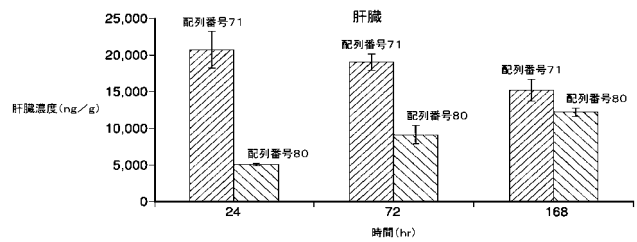
【図 2 C】



【図 2 D】



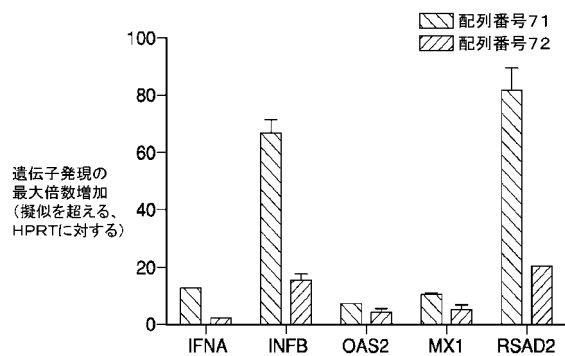
【図 3 A】



【図 3 B】

	配列番号71	配列番号80
肝臓C _{max}	20,817	12,190
肝臓AUC (ng·h/g)	2,603,934	1,371,840
腎臓AUC (ng·h/g)	7,938,860	1,393,514
肝臓/腎臓	0.33	0.98
肝臓t _{1/2} (hr)	319	安定

【図 4 A】



【図 4 B】

	ドナー	配列番号71	配列番号72	PBS	対照R848
IL-10	7191	—	—	—	++++
	8989	—	—	—	++++
IFN γ	7191	—	—	—	++
	8989	—	—	—	+++
IL-1 β	7191	—	—	—	++
	8989	—	—	—	++
IFN α 2	7191	—	—	—	—
	8989	—	—	—	—
TNF α	7191	—	—	—	+++++
	8989	—	—	—	++++
IL12p40	7191	—	—	—	++++
	8989	—	—	—	++++
G-CSF	7191	—	—	—	±
	8989	—	—	—	±
IL-6	7191	—	—	—	+++++
	8989	—	—	—	+++++
IL12p70	7191	—	—	—	++++
	8989	—	—	—	++++

— <100 pg/ml
 +/- ≥100 to ≤200 pg/ml
 + >200 to ≤1000 pg/ml
 ++ >500 to ≤1000 pg/ml
 +++ >1000 to ≤5000 pg/ml
 ++++ >5000 to ≤10000 pg/ml
 +++++ >10,000 pg/ml

【図 5 A】

(配列番号100)

CTCCACAACATTCACCAAGCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGGGGCGCTGTATTTTCC
 TGCTGGTGGCTCCAGTTTCAGGAACAGTAAACCTGTTCGACTACTGCCTCTCCCAT
 ATCGTCAATCTTCTCGAGGACTGGGGACCTGCACCGAACATGGAGAACATCACAT
 CAGGATTCTAGGACCCCTGCTCGTTTACAGCGGGGTTTTCTGTGTGACAAGAA
 TCCTCACAAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGG
 GAACACCCGTGTGCTTGGCCAAAATTCGAGTCCCAACCTCCAATCACTCACCAA
 CCTCTGTCTCCAATTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTCGCGGCTTTATCAT
 CTCTCTCTCATCTGCTGCTATGCTCATCTCTGTGTGTTCTCTGGACTATCAAG
 GTATGTTGCCGTTTGTCTCTAATTCAGGATCATCAACCACAGCACGGGACCAT
 GCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTA
 CAAAACCTTCGGACGGAACTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTGGGCTTTCG
 CAAAATTCCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGTTTCTCTGGCTCAGTTTACTAGTGCC
 ATTTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCCACTGTTGGCTTTCAGTTATATGGATG
 ATGTGGTATTGGGGCCAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTTACCGCTGTAC
 CAATTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAAACCTTAACAAAACAAAAGATGGGG
 TTACTCCCTTAACCTTCATGGGATATGTAATTGGAGGTTGGGTACATTGCCACAGGA
 ACATATTGTACAAAAATCAAAACAATGTTTAAAGAACTTCTGTAAACAGGCTAT
 TGAATGGAAAGTATGTCAACGAATTGTGGGCTTTTGGGCTTTGCTGGCTTTTACA
 CAATGTGGTTATCTGCTTTAATGCCTTTATATGCATGTATACAAGCTAAGCAGGCTT
 TCACTTTCTCGCCAACTTACAAGGCTTTCTGTGTAAACAATATCTGAACCTTTACCC
 CGTTGCCCGGCAACGGCCAGGTCTGTGCCAAGTGTGTGTGACGCAACCCCACTGG
 CTGGGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACTTTTGTGGCTCTCTGCC
 GATCCATATCGCGAATCTTACCGCTTGTGTGCTCGCAGCCGCTTGGAGCAAA
 ACTTATCGGACTGACAACCTGTGTCTCTCCCGAAATATACATCTTTTCCATGG
 CTGCTAGGCTGTGTGCCAACTGGATCTGCGCGGGACGTCTTTGTTTACGTCCGCT
 CGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCGCTTGGGACTTACCGTCCCC
 TTCTCCGTCTGCGCTTCCGGCGGACACGGGGCGCACCTCTTTTACGGGCTCTCCC
 GTCTGTGCTTCTCATCTGCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACTCTGACGCTGCGA
 TGGAGACACCGGTGAACGCCACAGCTTGGCCAAAGGCTTACATAAGAGGACTT
 GGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACTTGGGCACTTCAAAAGACTGTGTGTTT
 AAAGACTGGGAGGAGTTGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGCTTTTGTACTAGGAGG
 CTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTCACGACACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAA
 TCATCTCTTGTTCATGTCTACTGTTCAAGCTCCCAAGCTGTGCTTGGGTGGCTTTG
 GGGCATGGACATTGACCCCTATAAAGAATTGGAGCTTCTGTGGAGTTACTCTTTT
 TTGCTTCTGACTTCTTTCTTCTATTTCGAGATCTCTCGACACCGCTCAGCTCTGT
 TCGGGAGGCTTAGAGTCTCGGAACATTGTTCACTCACCATACAGCACTCAGGCA
 AGCTATTCTGTGTTGGGTGAGTTGATGAATCTAGCCACCTGGGTGGGAAGTAATT
 GGAAGATCCAGCATCCAGGGAATTAGTAGTCAGCTATGTCAATGTTAATATGGGCTT
 AAAAATCAGACAACATTTGGGTTTACATTTCTGTCTTACTTTTGGAGAGAAAC
 TGTTCTTGAGTATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTTCGCACTCTCCAGCTTATAGA
 CCACCAATGCCCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAACACTGTGTTGTAGACGACGA
 GGCAGGTCCCTAGAGAAGAAGTCCCTCGCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCCGC
 CGCTCGCAGAAGATCTAATCTCGGAATCTCAATGTTAGTATTCTTGGGACTATA

【図 5 B】

AGGTGGGAACTTTACTGGGCTTTATCTTCTACTGTACCTGTCTTTAATCCTGAATG
 GCAAACTCCCTCTTTCTTAACATTCATTTACAGGAGGACATTATTAATAGATGTCA
 ACAATTTGTGGGCCCTCTTACAGTAAATGAAAAAGGAGATTAAATTAATTTATGCC
 TGCTAGGTTTTATCCTAACCTTACCAAAATTTTGGCCCTTAGATAAAGGCATTAAACCT
 TATTATCCAGAACATGTAGTTAATCACTTCCAAACCAGACATTATTTACATACTC
 TTTGGAAGGCGGTTATTTATATAAGAGAGAACTACACGTAGCGCCTCATTTGTG
 GGTACCATATCTTGGGAACAAGAGCTACAGCATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCT
 CGAAAGGCATGGGGACGAATCTTCTGTTCCTAATCTCTGGGATCTTTCCCGAT
 CACCAGTTGGACCTGCATTACAGGCCAACTCAAAATCCAGATTGGGACTTCAAC
 CCCAACAGGACCACTGGCCAGACGCCAACCAAGGTAGGAGTGGGAGCATTCGGGCC
 AGGGTTCACCCCACCACGCGGCTTTTGGGGTGGAGCCCTCAGGCTCAGGGCAT
 ATTGACAACAGTGCCAGCAGCTCTCTCTCTGCTCCACCAATCGGCAATCAGGAAG
 GCAGCCTACTCCCATCTCTCCACCTCTAAGAGACAGTCATCTCAGGCCATGCAGTG
 GAA

【配列表】

2019533472000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/061348

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/113
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2012/145697 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC. [US]) 26 October 2012 (2012-10-26)</p> <p>page 111, line 9 - line 23 page 117 - page 118 page 156 claims the whole document</p> <p>----- -/--</p>	<p>1-5, 8, 11, 12, 14-17, 19, 20</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 January 2018

Date of mailing of the international search report

06/02/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, Giovanni

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/061348

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S.M. GRYAZNOV: "Oligonucleotide n3'-->p5' phosphoramidates and thio-phosphoramidates as potential therapeutic agents", Chemistry & biodiversity, 1 March 2010 (2010-03-01), page 477, XP055445374, Switzerland Retrieved from the Internet: URL: http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/cbdv.200900187/asset/477ftp.pdf?v=1&t=jcw5hrtu&s=1e98f50cf2b74417c6a924c09c65ac0f288965cc [retrieved on 2018-01-26] the whole document	8
A	----- BILLIOUD GAETAN ET AL.: "In vivo reduction of hepatitis B virus antigenemia and viremia by antisense oligonucleotides", JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol. 64, no. 4, 1 April 2016 (2016-04-01), pages 781-789, XP029448832, ISSN: 0168-8278, DOI: 10.1016/J.JHEP.2015.11.032 the whole document	1-20
A	-& GAETAN BILLIOUD ET AL.: "Supplementary information - In vivo reduction of hepatitis B virus antigenemia and viremia by antisense oligonucleotides", JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol. 64, no. 4, 1 April 2016 (2016-04-01), pages 781-789, XP055445356, AMSTERDAM, NL ISSN: 0168-8278, DOI: 10.1016/j.jhep.2015.11.032 the whole document	1-20
A	----- MOHUBE MAEPA ET AL.: "Progress and prospects of anti-HBV gene therapy development", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, vol. 16, no. 8, 31 July 2015 (2015-07-31), pages 17589-17610, XP055444220, DOI: 10.3390/ijms160817589 the whole document ----- -/--	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/061348

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KAZUTO TAJIRI ET AL.: "New horizon for radical cure of chronic hepatitis B virus infection", WORLD JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol. 8, no. 21, 1 January 2016 (2016-01-01), page 863, XP055444225, ISSN: 1948-5182, DOI: 10.4254/wjh.v8.i21.863 the whole document -----</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/061348

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012145697 A1	26-10-2012	AU 2012245243 A1	02-05-2013
		BR 112013027046 A2	29-11-2016
		CA 2833766 A1	26-10-2012
		CN 103582648 A	12-02-2014
		CN 106191060 A	07-12-2016
		CO 6862103 A2	10-02-2014
		CR 20130551 A	21-02-2014
		DO P2013000246 A	30-04-2014
		EA 201391572 A1	30-06-2014
		EP 2699583 A1	26-02-2014
		JP 6042871 B2	14-12-2016
		JP 2014513954 A	19-06-2014
		JP 2017046713 A	09-03-2017
		KR 20140026498 A	05-03-2014
		MX 340408 B	07-07-2016
		MX 347253 B	20-04-2017
		NZ 616512 A	29-05-2015
		NZ 705820 A	27-11-2015
		PE 11772014 A1	19-09-2014
		PH 12013502157 A1	29-05-2017
		RU 2013151843 A	27-05-2015
		SG 194555 A1	30-12-2013
		SG 10201604074T A	28-07-2016
		TW 201249988 A	16-12-2012
		US 2013035366 A1	07-02-2013
		US 2014107184 A1	17-04-2014
		US 2014357701 A1	04-12-2014
		US 2016046945 A1	18-02-2016
		US 2017369883 A1	28-12-2017
		WO 2012145697 A1	26-10-2012
		ZA 201307620 B	27-08-2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/061348

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
		A 6 1 K 48/00	
		A 6 1 K 45/00	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72)発明者 グリヤズノフ,セルゲイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 , サウス サン フランシスコ, イースト グラ
ンド アベニュー 2 6 0 , セカンド フロア

(72)発明者 フィッツジェラルド,メーガン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 , サウス サン フランシスコ, イースト グラ
ンド アベニュー 2 6 0 , セカンド フロア

(72)発明者 ストイチェヴァ,アンチツサ ディミトロヴァ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 1 9 , ハーフ ムーン ベイ,カーヌスティ ドライ
ブ 1 1 4

(72)発明者 ホン,ジン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 4 4 , パシフィカ スブルース シーティー . 6

F ターム(参考) 4C084 AA13 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB212 ZB331 ZB332 ZC75

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 NA05 NA14 ZB21
ZB33 ZC75