



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월20일
(11) 등록번호 10-2783206
(24) 등록일자 2025년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 47/54 (2017.01)
A61K 47/60 (2017.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7013967
(22) 출원일자(국제) 2018년10월19일
심사청구일자 2021년10월19일
(85) 번역문제출일자 2020년05월15일
(65) 공개번호 10-2020-0083494
(43) 공개일자 2020년07월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/056801
(87) 국제공개번호 WO 2019/079781
국제공개일자 2019년04월25일
(30) 우선권주장
62/575,358 2017년10월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20100323001 A1
US20160369279 A1
WO2016077321 A1
WO2004078181 A1

(73) 특허권자
다이서나 파마수이티컬, 인크.
미국 02421 메사추세츠주 렉싱턴 헤이든 애비뉴 75
(72) 발명자
코서, 마틴
미국 02140 메사추세츠주 캄브릿지 캄브릿지파크 드라이브 87
아브람스, 마크
미국 02140 메사추세츠주 캄브릿지 캄브릿지파크 드라이브 87
(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 70 항

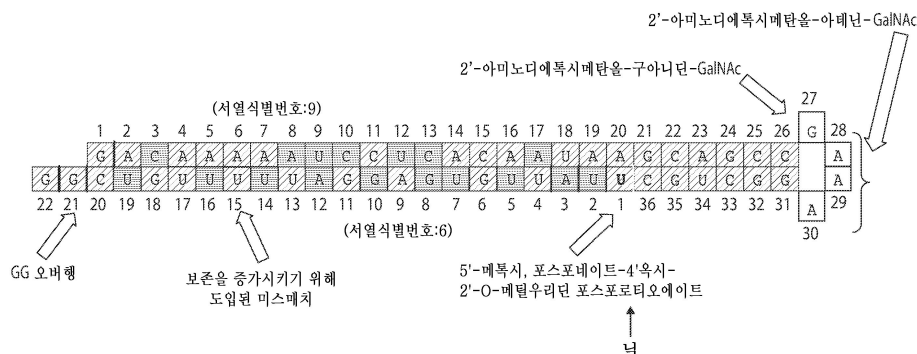
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 B형 간염 감염의 치료 방법

(57) 요약

본 개시내용은 개선된 올리고뉴클레오타이드-기반 조성물 및 대상체에서 HBV 감염을 치료하기 위한 관련 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 HBV 표면 항원 (HBsAg) 발현의 지속적인 녹다운을 생성하는 강력한 올리고뉴클레오타이드의 개발에 관한 것이다. 올리고뉴클레오타이드는 간세포에서 모든 형태의 HBsAg를 코딩하는 (뒷면에 계속)

대표도



mRNA의 RNA 간섭 (RNAi)-매개된 인식 및 파괴를 유도한다. 본 개시내용은 안티센스 가닥을 포함하는, B형 간염 바이러스 표면 항원 (HBsAg) mRNA의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 센스 가닥을 추가로 포함하고, 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성한다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61K 47/549 (2017.08)

A61K 47/60 (2017.08)

A61K 48/00 (2024.01)

A61P 1/16 (2018.01)

A61P 31/20 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하는 센스 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이며,

센스 가닥은 GACAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 9)에 제시된 서열로 이루어지고, 위치 3, 8-10, 12, 13 및 17에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 위치 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-26 및 31-36에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 및 위치 1과 2의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 연결을 포함하고,

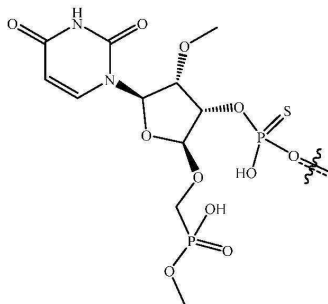
센스 가닥 상의 -GAAA- 서열의 뉴클레오타이드 각각이 1가 GalNac 모이어티에 접합되고;

안티센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG (서열식별번호: 6)에 제시된 서열로 이루어지고, 위치 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 및 19에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 위치 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18 및 20-22에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 및 위치 1과 2의 뉴클레오타이드 사이에, 위치 2와 3의 뉴클레오타이드 사이에, 위치 3과 4의 뉴클레오타이드 사이에, 위치 20과 21의 뉴클레오타이드 사이에, 및 위치 21과 22의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 연결을 포함하고,

안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드의 당의 4'-탄소는 메톡시 포스포네이트 (MOP)를 포함하는 것인 올리고뉴클레오타이드.

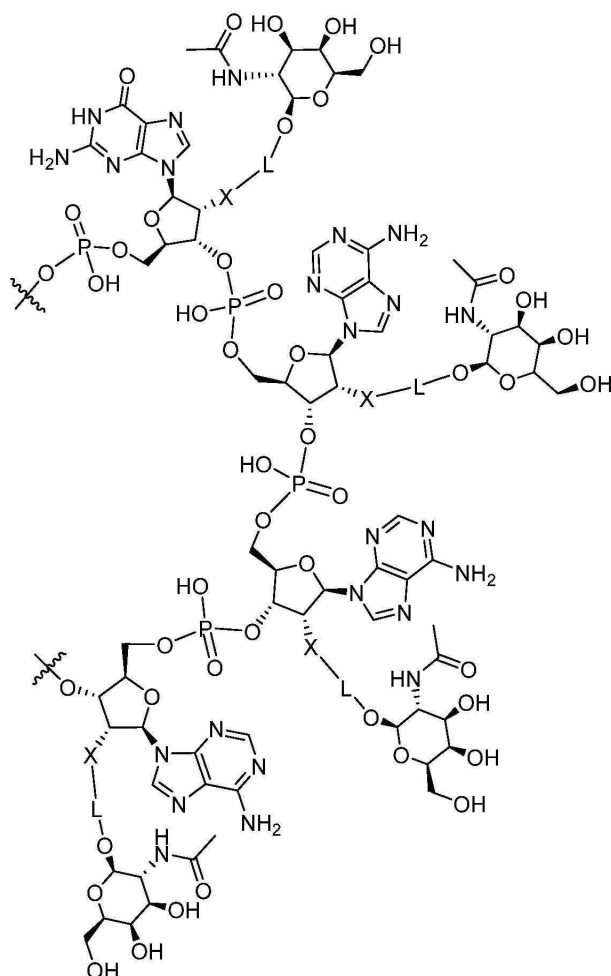
청구항 2

제1항에 있어서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드가 하기 구조를 갖는 것인 올리고뉴클레오타이드.



청구항 3

제1항에 있어서, -GAAA- 모티프가 하기 구조를 포함하는 것인 올리고뉴클레오타이드:



상기 식에서:

L은 결합, 클릭 화학 핸들, 또는 치환된 및 비치환된 알킬렌, 치환된 및 비치환된 알케닐렌, 치환된 및 비치환된 알키닐렌, 치환된 및 비치환된 헤테로알킬렌, 치환된 및 비치환된 헤테로알케닐렌, 치환된 및 비치환된 헤테로알키닐렌, 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 20개의 (경계값 포함) 연속적인 공유 결합된 원자 길이의 링커를 나타내고;

X는 O, S 또는 N이다.

청구항 4

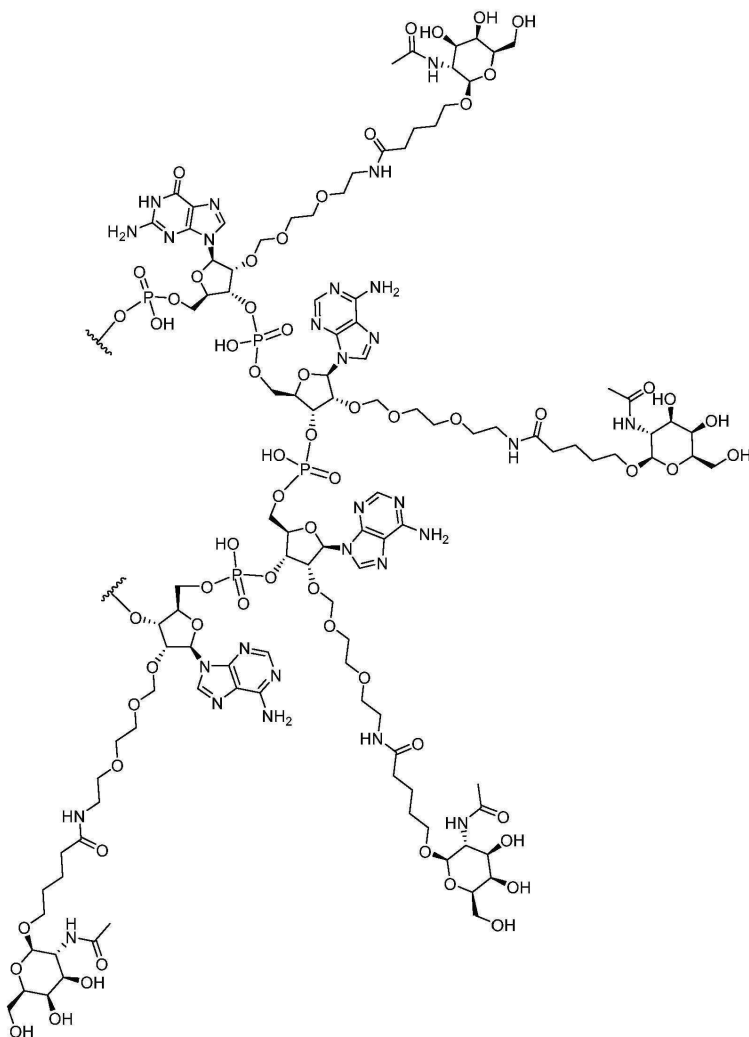
제3항에 있어서, L이 아세탈 링커인 올리고뉴클레오타이드.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, X가 O인 올리고뉴클레오타이드.

청구항 6

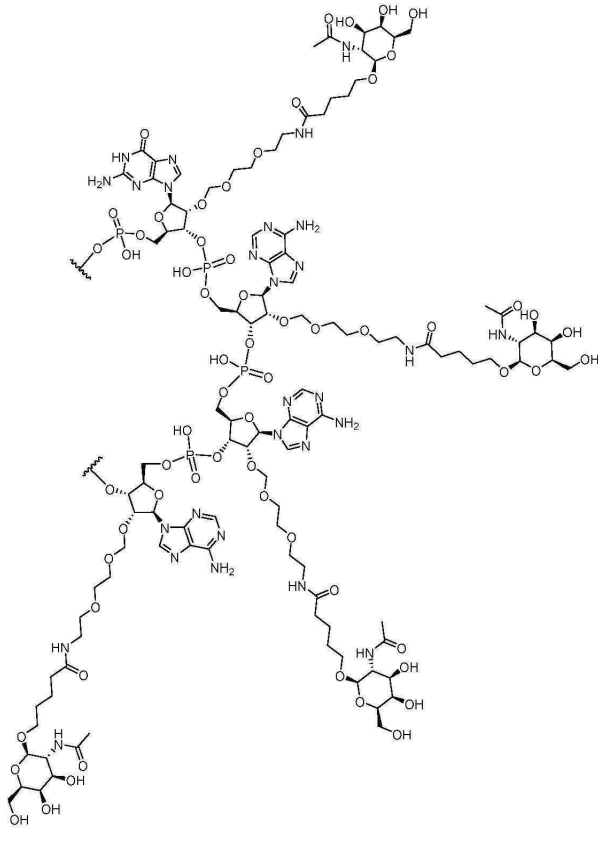
제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, -GAAA- 서열이 하기 구조를 포함하는 것인 올리고뉴클레오타이드.



청구항 7

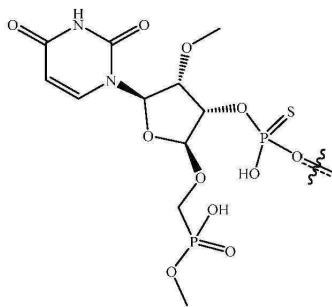
안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하는 센스 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이며:

센스 가닥은 GACAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 9)에 제시된 서열로 이루어지고, 위치 3, 8-10, 12, 13 및 17에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 위치 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-26 및 31-36에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 및 위치 1과 2의 뉴클레오타이드 사이에 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드 간 연결을 포함하며, 센스 가닥 상의 -GAAA- 서열의 뉴클레오타이드 각각은 1가 GalNAc 모이어티에 접합되고, -GAAA- 서열은 하기 구조를 포함하고:



;

안티센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG (서열식별번호: 6)에 제시된 서열로 이루어지고, 위치 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 및 19에서 2'-플루오로로 변형된 뉴클레오타이드, 위치 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18 및 20-22에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 및 위치 1과 2의 뉴클레오타이드 사이에, 위치 2와 3의 뉴클레오타이드 사이에, 위치 3과 4의 뉴클레오타이드 사이에, 위치 20과 21의 뉴클레오타이드 사이에, 및 위치 21과 22의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하며, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드가 하기 구조를 갖는 것인 올리고뉴클레오타이드.



청구항 8

제1항 내지 제4항 및 제7항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 환자에서 HBV 감염을 치료하는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 반대이온을 포함하는 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서, 인산염 완충된 식염수 용액을 포함하는 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제4항 및 제7항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 시험관 내에 있는 세포에서 B형 간염 바이러스 (HBV) 표면 항원(HBsAg)의 발현을 감소시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 세포가 간세포인 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 세포에서 올리고뉴클레오티드를 발현하도록 조작된 트랜스진의 형태로 전달되는 것인 조성물.

청구항 16

제8항에 있어서, 대상체에게 피하로 투여되는 조성물.

청구항 17

제8항에 있어서, 대상체에게 정맥내로 투여되는 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 제약상 허용가능한 담체를 포함하고, 여기서 제약상 허용가능한 담체는 용매 또는 물을 함유하는 분산 매질인 조성물.

청구항 19

하기를 포함하는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드.

센스 가닥:

5' mG-S-mA-fC-mA-mA-mA-mA-fA-fU-fC-mC-fU-fC-mA-mC-mA-fA-mU-mA-mA-mG-mC-mA-mG-mC-mC-[ademG-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-mG-mG-mC-mU-mG-mC 3'

및

안티센스 가닥:

5' [Me포스포네이트-4O-mU]-S-fU-S-fA-S-mU-fU-mG-fU-fG-mA-fG-mG-fA-mU-fU-mU-fU-mU-mG-fU-mC-S-mG-S-mG 3'

여기서,

뉴클레오타이드 사이에 "-"는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결을 나타내고;

뉴클레오타이드 사이에 "-S-"는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 나타내고;

mA는 2'-O-메틸아데노신 리보뉴클레오타이드를 나타내고;

mG는 2'-O-메틸구아노신 리보뉴클레오타이드를 나타내고;

mC는 2'-O-메틸시티딘 리보뉴클레오타이드를 나타내고;

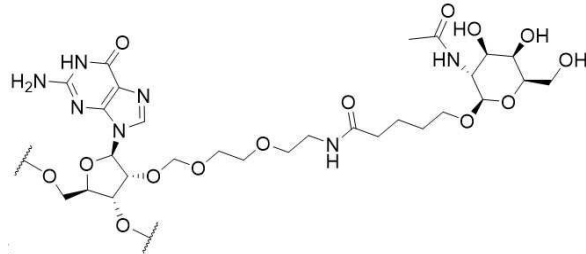
mU는 2'-O-메틸우리딘 리보뉴클레오타이드를 나타내고;

fA는 2'-플루오로-아데노신 데옥시리보뉴클레오시드를 나타내고;

fG는 2'-플루오로-구아노신 데옥시리보뉴클레오시드를 나타내고;

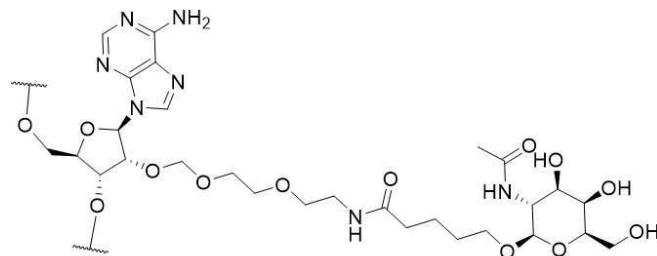
fC는 2'-플루오로-시티딘 데옥시리보뉴클레오시드를 나타내고;

fU는 2'-플루오로-우리딘 데옥시리보뉴클레오시드를 나타내고;



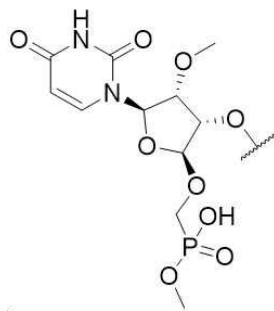
[ademG-GalNAc]는

를 나타내고;



[ademA-GalNAc]는

를 나타내고;



[Me포스포네이트-4O-mU]는

를 나타냄.

청구항 20

하기를 포함하는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 나트륨 염.

센스 가닥:

5' mG-S-mA-fC-mA-mA-mA-mA-fA-fU-fC-mC-fU-fC-mA-mC-mA-fA-mU-mA-mA-mG-mC-mA-mG-mC-mC-[ademG-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-mG-mG-mC-mU-mG-mC 3'

및

안티센스 가닥:

5' [Me포스포네이트-4O-mU]-S-fU-S-fA-S-mU-fU-mG-fU-fG-mA-fG-mG-fA-mU-fU-mU-fU-mU-mG-fU-mC-S-mG-S-mG 3'

여기서,

뉴클레오시드 사이에 "-"는 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결을 나타내고;

뉴클레오시드 사이에 "-S-"는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 나타내고;

mA는 2'-O-메틸아데노신 리보뉴클레오시드를 나타내고;

mG는 2'-*O*-메틸구아노신 리보뉴클레오시드를 나타내고;

mC는 2'-*O*-메틸시티딘 리보뉴클레오시드를 나타내고;

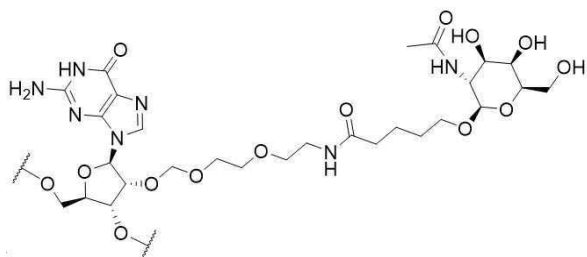
mU는 2'-*O*-메틸우리딘 리보뉴클레오시드를 나타내고;

fA는 2'-플루오로-아데노신 데옥시리보뉴클레오시드를 나타내고;

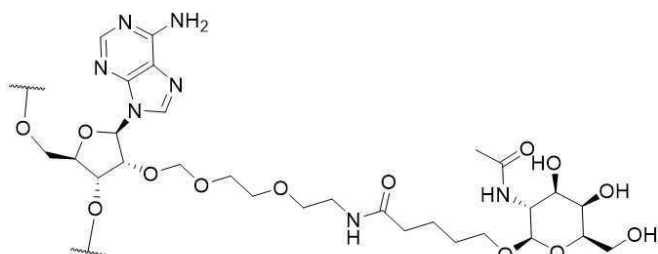
fG는 2'-플루오로-구아노신 데옥시리보뉴클레오시드를 나타내고;

fC는 2'-플루오로-시티딘 데옥시리보뉴클레오시드를 나타내고;

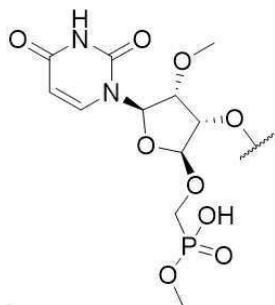
fU는 2'-플루오로-우리딘 데옥시리보뉴클레오시드를 나타내고;



[ademG-GalNAc]는 를 나타내고;



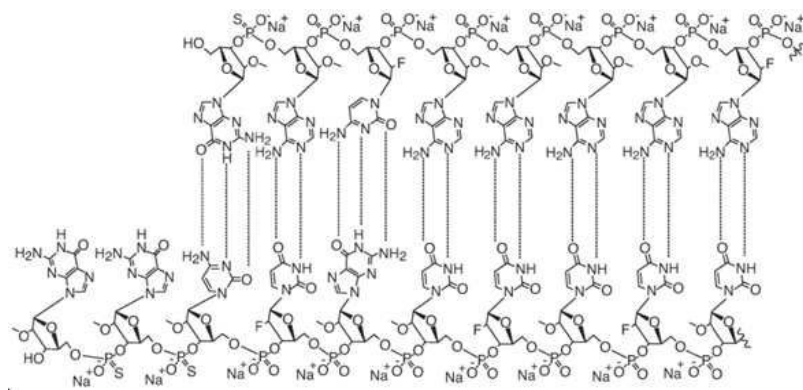
[ademA-GalNAc]는 를 나타내고;

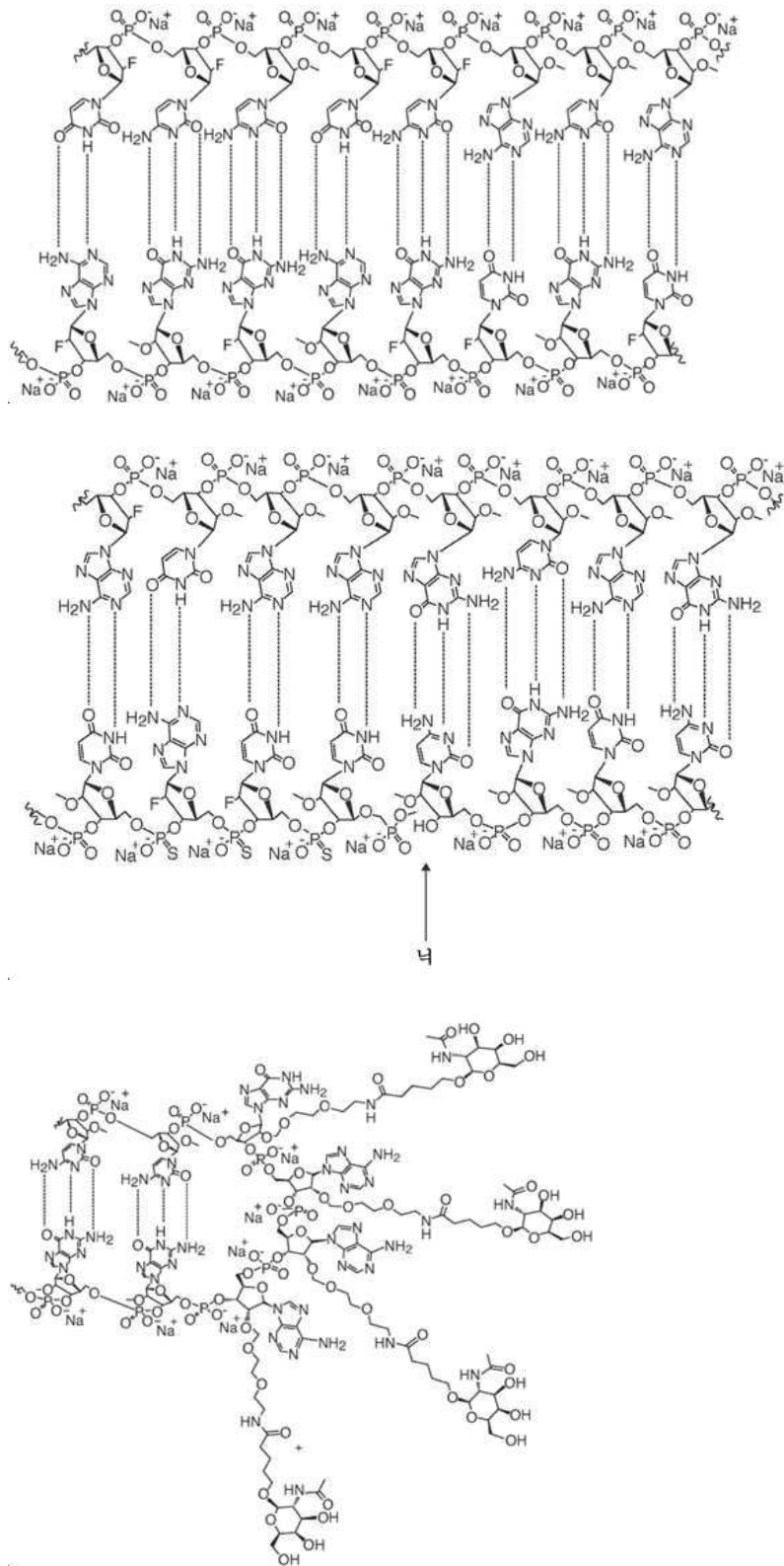


[Me포스포네이트-40-mU]는 를 나타냄.

청구항 21

하기 화학식의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드:





청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 환자에서 만성 B형 간염 감염을 치료하는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 반대이온을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 반대이온이 Na⁺ 반대이온인 조성물.

청구항 25

제22항에 있어서, 제약상 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 제약상 허용가능한 담체가 물인 조성물.

청구항 27

제22항에 있어서, Na⁺ 반대이온 및 물을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 28

제22항에 있어서, 환자에게 피하로 투여되는 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 환자가 HBV e-항원 (HBeAg) 양성 환자인 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, HBeAg 양성 환자가 혈청 HBV 표면 항원(HBsAg) > 1000 IU/mL를 갖는 것인 조성물.

청구항 31

제28항에 있어서, 환자가 HBeAg 음성 환자인 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, HBeAg 음성 환자가 혈청 HBsAg > 500 IU/mL를 갖는 것인 조성물.

청구항 33

제28항에 있어서, 환자가 혈청 HBV DNA > 20,000 IU/mL를 갖는 것인 조성물.

청구항 34

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 시험관 내에 있는 세포에서 B형 간염 바이러스 (HBV) 표면 항원(HBsAg)의 발현을 감소시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 세포가 간세포인 조성물.

청구항 36

제34항에 있어서, 올리고뉴클레오타드가 세포에서 올리고뉴클레오타드를 발현하도록 조작된 트랜스젠의 형태로 전달되는 것인 조성물.

청구항 37

안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하는 센스 가닥을 포함하며, 여기서 센스 가닥은 36 내지 50개 뉴클레오타이드 길이이고, GACAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 9)에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 22 내지 30개 뉴클레오타이드 길이이고, UUAUUGUGAGGAUUUUGUCGG (서열식별번호: 6)에 제시된 서열을 포함하는 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오타드.

청구항 38

제37항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 39

제38항에 있어서, 변형된 뉴클레오타이드가 2'-변형을 포함하는 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 40

제39항에 있어서, 2'-변형이 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산으로부터 선택된 변형인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 41

제37항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드의 모든 뉴클레오타이드가 변형된 뉴클레오타이드인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 42

제37항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 43

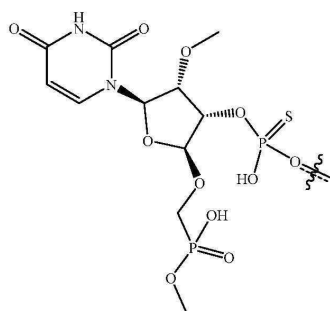
제42항에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드간 연결이 포스포로티오에이트 연결인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 44

제37항에 있어서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드의 당의 4'-탄소가 포스페이트 유사체를 포함하는 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 45

제44항에 있어서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드가 하기 구조를 갖는 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드:



청구항 46

제37항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드의 적어도 1개의 뉴클레오타이드가 표적화 리간드에 접합된 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 47

제46항에 있어서, 표적화 리간드가 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 48

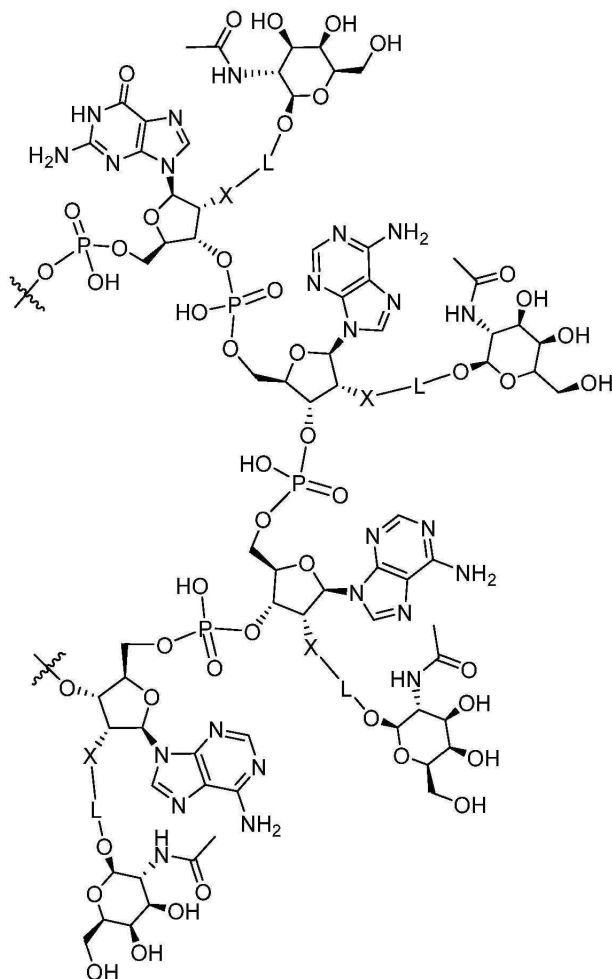
제47항에 있어서, 센스 가닥 상의 -GAAA- 서열의 뉴클레오타이드 중 1개 이상이 1가 GalNAc 모이어티에 접합된 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 49

제48항에 있어서, 센스 가닥 상의 -GAAA- 서열의 각각의 뉴클레오티드가 1가 GalNac 모이어티에 접합된 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오티드.

청구항 50

제49항에 있어서, -GAAA- 서열이 하기 구조를 포함하는 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며:



여기서,

L은 결합, 클릭 화학 핸들, 또는 치환 및 비치환된 알킬렌, 치환 및 비치환된 알케닐렌, 치환 및 비치환된 알키닐렌, 치환 및 비치환된 헤테로알킬렌, 치환 및 비치환된 헤테로알케닐렌, 치환 및 비치환된 헤테로알키닐렌, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 경계값 포함한 1 내지 20개의 연속적인 공유 결합된 원자 길이의 링커를 나타내고;

X는 O, S 또는 N인

이중 가닥 올리고뉴클레오티드.

청구항 51

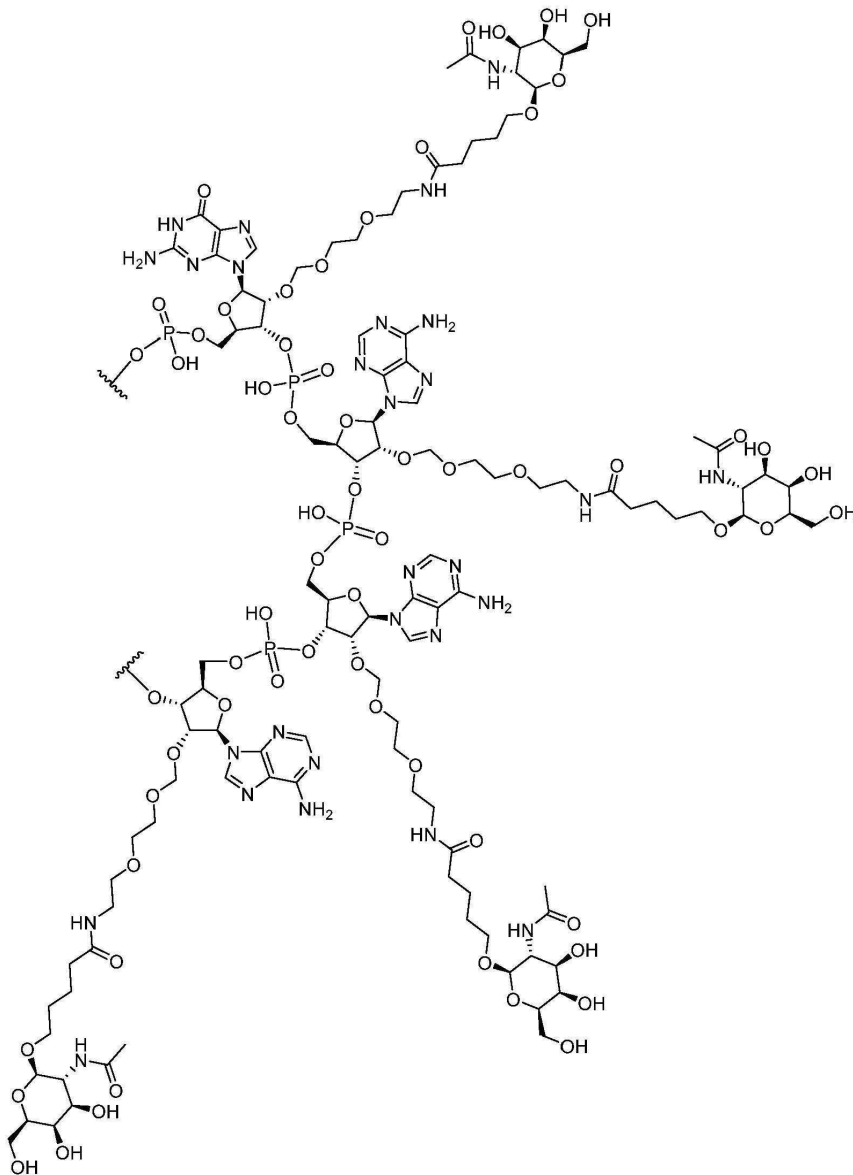
제50항에 있어서, L이 아세탈 링커인 이중 가닥 올리고뉴클레오티드.

청구항 52

제50항에 있어서, X가 O인 이중 가닥 올리고뉴클레오티드.

청구항 53

제50항에 있어서, -GAAA- 서열이 하기 구조를 포함하는 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드:



청구항 54

제37항에 있어서, 센스 가닥이 36개 뉴클레오타이드 길이이고, 위치 3, 8-10, 12, 13 및 17에 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 위치 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-26 및 31-36에 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 및 위치 1과 2의 뉴클레오타이드 사이에 1개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하고, 센스 가닥이 1개 이상의 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티에 접합된 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 55

제37항에 있어서, 안티센스 가닥이 22개 뉴클레오타이드 길이이고, 위치 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 및 19에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 위치 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18 및 20-22에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 및 뉴클레오타이드 위치 1과 2, 2와 3, 3과 4, 20과 21, 및 21과 22 사이의 5개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하고, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드의 당의 4'-탄소가 포스페이트 유사체를 포함하는 것인 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드.

청구항 56

제37항 내지 제55항 중 어느 한 항의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 환자에서 만성 B형 간염 감염

을 치료하는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 57

제56항에 있어서, 반대이온을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 58

제57항에 있어서, 반대이온이 Na⁺ 반대이온인 조성물.

청구항 59

제56항에 있어서, 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 60

제59항에 있어서, 제약상 허용되는 담체가 물인 조성물.

청구항 61

제56항에 있어서, Na⁺ 반대이온 및 물을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 62

제56항에 있어서, 환자에게 피하로 투여되는 조성물.

청구항 63

제62항에 있어서, 환자가 HBV e-항원 (HbeAg) 양성 환자인 조성물.

청구항 64

제63항에 있어서, HbeAg 양성 환자가 혈청 HBV 표면 항원 (HbsAg) > 1000 IU/mL를 갖는 것인 조성물.

청구항 65

제62항에 있어서, 환자가 HbeAg 음성 환자인 조성물.

청구항 66

제65항에 있어서, HbeAg 음성 환자가 혈청 HBsAg > 500 IU/mL를 갖는 것인 조성물.

청구항 67

제62항에 있어서, 환자가 > 20,000 IU/mL의 혈청 HBV DNA를 갖는 것인 조성물.

청구항 68

제37항 내지 제55항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 시험관내 세포에서 B형 간염 바이러스 (HBV) 표면 항원 (HBsAg)의 발현을 감소시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 69

제68항에 있어서, 세포가 간세포인 조성물.

청구항 70

제68항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 세포에서 올리고뉴클레오타이드를 발현하도록 조작된 트랜스건의 형태로 전달되는 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 서열 목록에 대한 참조

서열 목록은 2021년 1월 26일에 생성되고 "400930_009USC2_174427_SL.txt" (17,465 바이트)로 명명된 텍스트 파일의 형태로 EFS를 통해 전자적으로 제출되며, 그의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

본 출원은 올리고뉴클레오타이드 및 그의 용도, 특히 B형 간염 감염의 치료와 관련된 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 만성 B형 간염 바이러스 (HBV) 감염은 전세계 사망률 및 이환율의 상당한 원인이다. 현행 HBV 요법, 예컨대 뉴클레오시드 유사체는 혈장 바이러스혈증을 감소시키기 위해 평생 치료를 필요로 하며, 이들은 일반적으로 장기적으로는 효과가 없다. 만성 HBV의 기능적 치유가 전통적으로 최상의 치료 결과였다. RNA 간섭 (RNAi) 기술은 약리학적 개입을 위한 잠재성을 제공한다.

[0003] 외부 외피 단백질은 집합적으로 B형 간염 표면 항원 (HBsAg)으로 공지되어 있다. HBsAg는 중첩 오픈 리딩 프레임 (ORF)에 의해 코딩되는 S, M 및 L로 불리는 3가지 관련 폴리펩티드로 이루어진다. 가장 작은 외피 단백질은 226개 아미노산을 갖는 S이며, 이는 S-ORF로 불린다. M 및 L은 상류 번역 개시 부위로부터 생성되고, S에 각각 55개 및 108개 아미노산을 추가한 것이다. HBV S, M, 및 L 당단백질은 데인(Dane) 입자로 명명되는 무손상의 감염성 HBV 비리온의 바이러스 외피에서 발견되고, 3가지 모두 막대한 과량으로 생성 및 분비되어 만성 HBV 환자의 혈액에서 발견되는 비감염성의 서브바이러스성 구형 및 필라멘트상 입자 (둘 다 유인체 입자로 지칭됨)를 형성한다. 유인체 입자의 표면 상에서 HBsAg의 풍부는 만성 HBV 감염 (CHB)을 가진 환자에서 체액성 면역 및 자발적 제거를 억제하는 것으로 믿어진다.

발명의 내용

[0004] 본 개시내용의 측면은 개선된 올리고뉴클레오타이드-기반 조성물 및 대상체에서 HBV 감염을 치료하기 위한 관련 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 HBV 표면 항원 (HBsAg) 발현의 지속적인 억제를 생성하는 강력한 올리고뉴클레오타이드의 개발에 관한 것이다. 올리고뉴클레오타이드는 간세포에서 모든 형태의 HBsAg를 코딩하는 mRNA의 RNA 간섭 (RNAi)-매개된 인식 및 파괴를 유도한다. 이는 숙주 세포에 통합된 cccDNA 및 HBV DNA 둘 다로부터 전사된 바이러스 RNA로부터 번역된 단백질을 포함한다. 공지된 모든 유전자형에 걸쳐 HBV 게놈에 의해 코딩되는 HBsAg 전사체의 광범위한 집합을 표적화하도록 설계된 올리고뉴클레오타이드가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 간세포에서 HBsAg 전사체를 표적화하는 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드가 대상체에게 투여된 후에 장기간 동안 (예를 들어, 7 주 초과 내지 수 개월) 지속되는 높은 특이성을 가지면서 HBsAg 발현의 안정한 감소를 제공할 수 있음이 발견되었다 (예를 들어, 실시예 1 및 3 참고). 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 HBsAg 발현의 표적화가 프리-게놈 RNA (pgRNA) 및 다른 바이러스 생활 주기 중간체의 감소를 일으킨다는 것이 발견되었다. 본원에 개시된 특정한 RNAi 올리고뉴클레오타이드가 cccDNA 또는 통합된 바이러스로부터 발생하는 HBsAg mRNA 전사체를 억누를 수 있다는 것이 발견되었다. 추가의 측면에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 HBsAg 발현의 표적화가 모든 HBV 단백질 (HBx는 제외), 즉, HBcAg, HBeAg 및 HBV 폴리머라제의 발현을 감소시켜, HBV 코어 단백질의 시토크스 체류를 일으킨다는 것이 발견되었다. 추가로, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법을 이용하여 mRNA 억누름으로부터 생성된 순환 HBsAg의 제거가 CHB 환자에서 높은 수준의 순환 HBsAg에 의해 초래되는 HBV 관용을 파괴할 수 있기 때문에, 이는 임상적으로 유리하다. HBV 감염에 대한 면역계 활성화의 재활성화는 HBsAg의 영구적인 혈청제거 (seroclearance)로 정의되는 기능적 치유를 달성하는 초석이 되는 것으로 믿어진다.

[0005] 이전의 작업은, 다중의 상이한 HBV 유전자 (즉, S, C, P 및 X 유전자)를 표적화하거나 또는 일부 경우에 X 유전자 전사체 단독을 표적화하는 RNAi 작용제의 조합물의 사용이 HBV 복제 및 유전자 발현의 효과적인 억제를 달성함을 나타내었다. 그러나, 본원에 제공된 결과는 HBsAg 전사체를 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오타이드 단독의 사용 또한 HBV 복제 및 유전자 발현의 효과적인 억제를 달성함을 입증하였고, 이는 HBV 감염의 치료를 위한 새로운 치료 접근법을 제공한다. 바이러스 RNA를 침묵시키는 직접적인 효과 외에도, HSB(s)-219 전구체는 HBV 코어 항원 (HBcAg)의 핵 국지화를 방지한다. 중요하게는, HBV-X 또는 두 유전자 모두의 동시 표적화가 HBcAg 핵 국지화를 방지하지는 않는다. 임상전 데이터는 S-표적화 RNAi 요법에 의해 초래된 핵 코어 국지화의 억제가 HBsAg 저해의 유의하게 개선된 지속을 일으킴을 강력하게 시사한다. 주목할 만하게는, 환자에서 HBcAg의 핵 국지화의 결여는 항바이러스 요법에 대한 유리한 반응성과 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다.

[0006] 본 개시내용의 일부 측면은 19 내지 30개 뉴클레오타이드 길이의 안티센스 가닥을 포함하는, B형 간염 바이러스

표면 항원 (HBsAg) mRNA의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오타이드를 제공하며, 안티센스 가닥은 ACAANAAUCCUCACAAUA (서열식별번호: 1)에 제시된 HBsAg mRNA의 서열과 상보성인 영역을 포함한다.

[0007] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 19 내지 50개 뉴클레오타이드 길이의 센스 가닥을 추가로 포함하고, 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 UUNUUGUGAGGAUUN (서열식별번호: 2)에 제시된 서열에 대해 상보성인 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 5'-UUAUUGUGAGGAUUNUUGUC (서열식별번호: 3)에 제시된 서열에 대해 상보성인 영역을 포함한다.

[0008] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUNUUGUCGG (서열식별번호: 4)에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUCUUGUCGG (서열식별번호: 5)에 제시된 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUUUGUCGG (서열식별번호: 6)에 제시된 서열로 이루어진다.

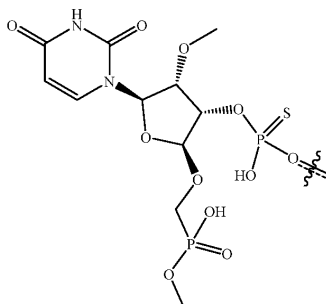
[0009] 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 ACAANAAUCCUCACAAUAA (서열식별번호: 7)에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 GACAANAAUCCUCACAAUAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 8)에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 GACAAAAUCCUCACAAUAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 9)에 제시된 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 GACAAGAUCCUCACAAUAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 10)에 제시된 서열로 이루어진다.

[0010] 본 개시내용의 다른 측면은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하는 센스 가닥을 포함하는, B형 간염 바이러스 표면 항원 (HBsAg) mRNA의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오타이드를 제공하며, 센스 가닥은 GACAAAAUCCUCACAAUAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 9)에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUUUGUCGG (서열식별번호: 6)에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥 및 센스 가닥 각각은 1개 이상의 2'-플루오로 및 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드 및 적어도 1개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하고, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체를 포함하고, 센스 가닥은 1개 이상의 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티에 접합된다.

[0011] 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하는 센스 가닥을 포함하는, B형 간염 바이러스 표면 항원 (HBsAg) mRNA의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오타이드가 본원에 추가로 제공되며, 센스 가닥은 GACAAAAUCCUCACAAUAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 9)에 제시된 서열을 포함하고, 위치 3, 8-10, 12, 13 및 17에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 위치 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-26 및 31-36에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 및 적어도 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하고, 센스 가닥은 1개 이상의 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티에 접합되며; 안티센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUUUGUCGG (서열식별번호: 6)에 제시된 서열을 포함하고, 위치 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 및 19에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 위치 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18 및 20-22에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하고, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체를 포함한다. 센스 가닥은 위치 1과 2의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 1과 2, 2와 3, 3과 4, 20과 21, 및 21과 22 사이에 5개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드는 하기 구조를 갖는다:

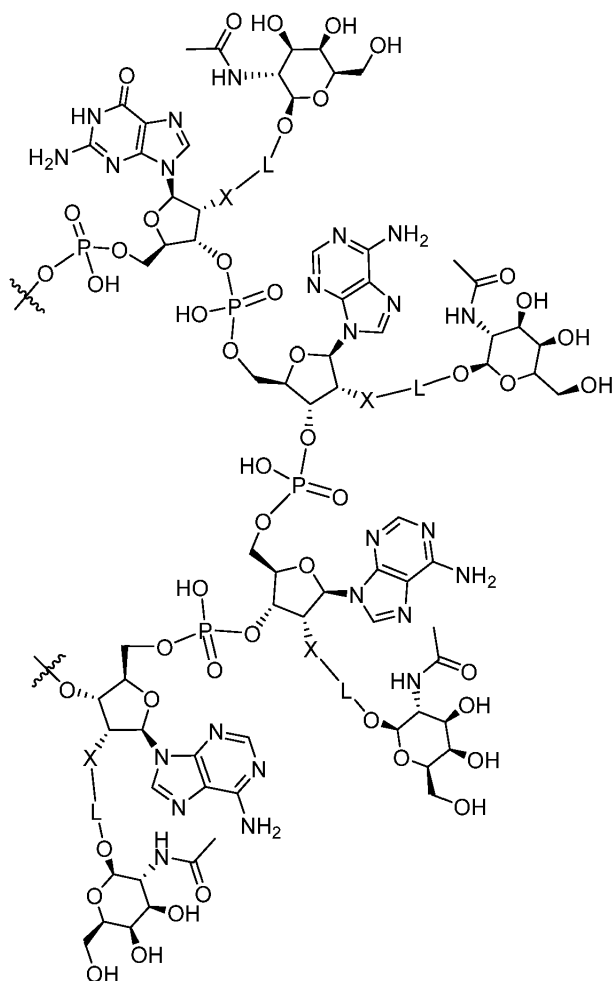


[0014]

[0015] 일부 실시양태에서, 센스 가닥 상의 -GAAA- 서열의 뉴클레오타이드 중 1개 이상은 1가 GalNAc 모이어티에 접합된다.

[0016] 일부 실시양태에서, 센스 가닥 상의 -GAAA- 서열의 뉴클레오타이드 각각은 1가 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일

부 실시양태에서, -GAAA- 모티프는 하기 구조를 포함한다:



[0017]

[0018]

상기 식에서:

[0019]

L은 결합, 클릭 화학 핸들, 또는 치환된 및 비치환된 알킬렌, 치환된 및 비치환된 알케닐렌, 치환된 및 비치환된 알키닐렌, 치환된 및 비치환된 헤테로알킬렌, 치환된 및 비치환된 헤테로알케닐렌, 치환된 및 비치환된 헤테로알키닐렌, 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 20개의 (경계값 포함) 연속적인 공유 결합된 원자 길이의 링커를 나타내고;

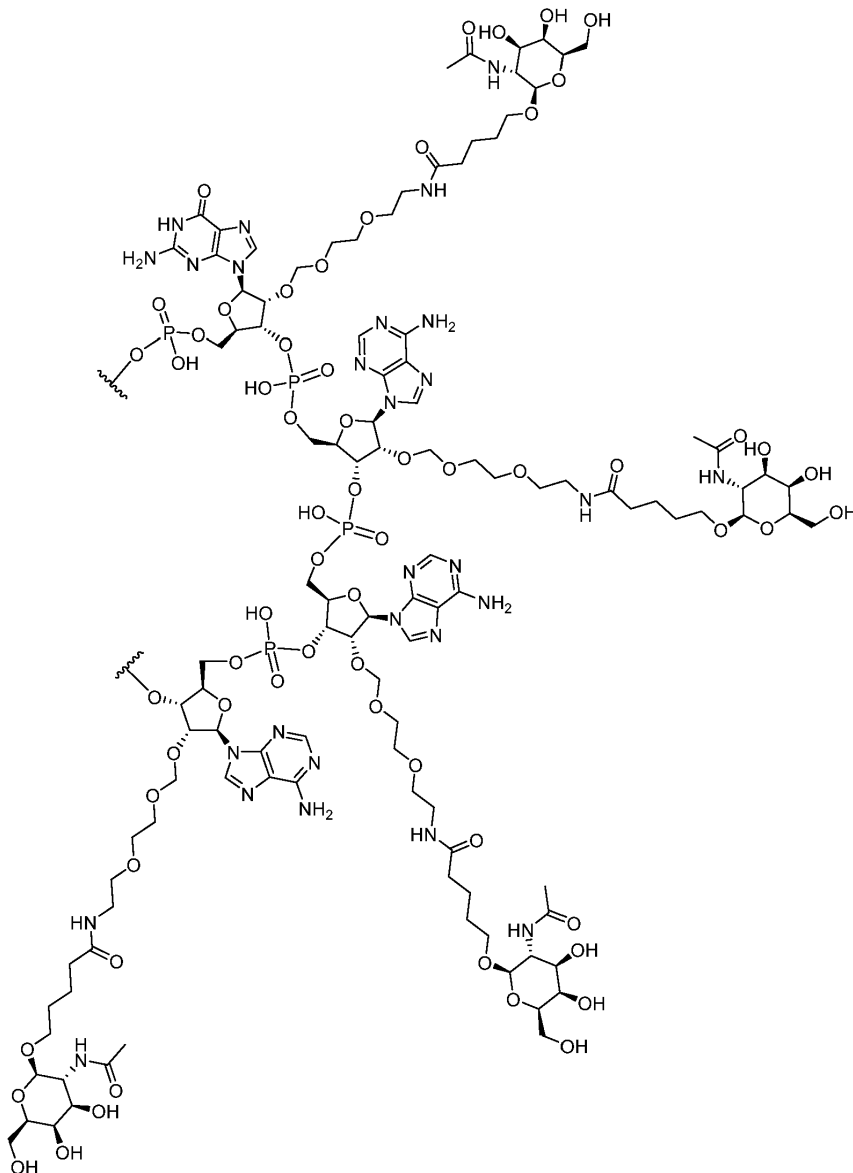
[0020]

X는 O, S 또는 N이다.

[0021]

일부 실시양태에서, L은 아세탈 링커이다. 일부 실시양태에서, X는 O이다.

[0022] 일부 실시양태에서, -GAAA- 서열은 하기 구조를 포함한다:



[0023]

[0024] 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 그의 3'-말단에 S_1 -L- S_2 로 제시되는 스템-루프를 포함하고, S_1 은 S_2 에 대해 상보성이고, L은 S_1 과 S_2 사이에 6개 이하의 뉴클레오타이드 길이의 루프를 형성한다. 일부 실시양태에서, L은 테트라루프이다. 일부 실시양태에서, L은 S_1 과 S_2 사이에 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프를 형성한다. 일부 실시양태에서, L은 GAAA로 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 스템-루프의 L의 4개 이하의 뉴클레오타이드 각각은 별도의 GalNAc에 접합된다.

[0025] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2'-변형은 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로- β -d-아라비노핵산으로부터 선택된 변형이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이다. 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체를 포함한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 표적화 리간드에 접합된다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티이다.

[0027] 이전 청구항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드 및 반대이온을 포함하는 조성물, 및 이전 청구항 중 어느 한

항의 올리고뉴클레오타이드 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이 본원에 추가로 제공된다.

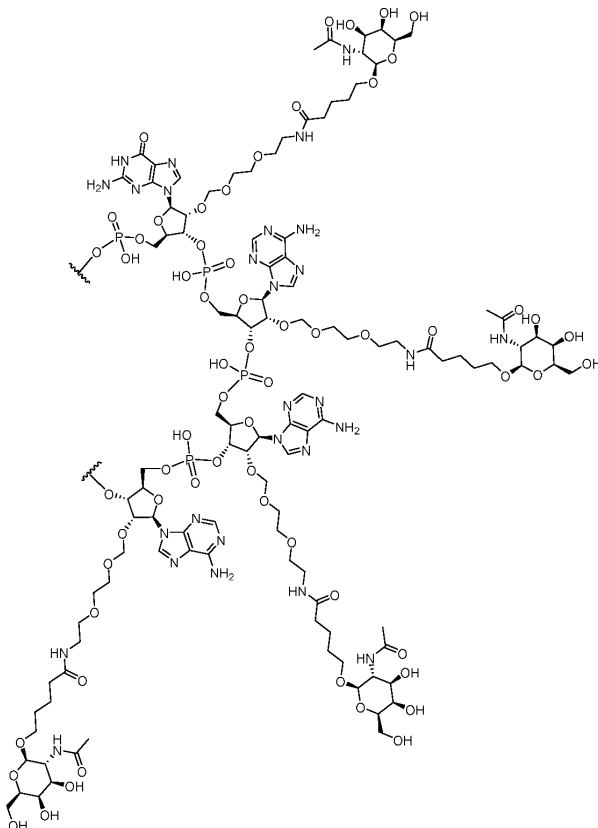
[0028] 본 개시내용의 다른 측면은 세포에 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드를 전달하는 것을 포함하는, 세포에서 B형 간염 바이러스 (HBV) 표면 항원의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 간세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 생체 내에 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 시험관 내에 있다.

[0029] 본 개시내용의 다른 측면은 대상체에게 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 또는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 B형 간염 바이러스 (HBV) 감염을 치료하는 방법을 제공한다.

[0030] 대상체에게 HBsAg mRNA를 선택적으로 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 HBV 감염을 치료하는 방법 또한 제공되며, HBV mRNA 전사체를 코딩하는 비-표면 항원을 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오타이드에 의한 치료의 부재하에 RNAi 올리고뉴클레오타이드를 투여한다. 대상체에게 HBsAg mRNA를 선택적으로 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 HBV 감염을 치료하는 방법 또한 제공되며, 대상체에게 HBxAg mRNA 전사체를 선택적으로 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오타이드를 투여하지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게 유효량의 엔테카비르(Entecavir)를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0031] 본 개시내용의 다른 측면은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하는 센스 가닥을 포함하는, B형 간염 바이러스 표면 항원 (HBsAg) mRNA의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오타이드를 제공하며,

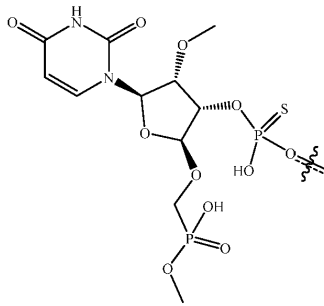
[0032] 센스 가닥은 GACAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCGUC (서열식별번호: 9)에 제시된 서열을 포함하고, 위치 3, 8-10, 12, 13 및 17에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 위치 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-26 및 31-36에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 및 위치 1과 2의 뉴클레오타이드 사이에 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하고, 센스 가닥 상의 -GAAA- 서열의 뉴클레오타이드 각각은 1가 GalNac 모이어티에 접합되고, -GAAA- 서열은 하기 구조를 포함하고:



[0033]

[0034] 안티센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG (서열식별번호: 6)에 제시된 서열을 포함하고, 위치 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 및 19에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 위치 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18 및 20-22에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 및 뉴클레오타이드 1과 2, 2와 3, 3과 4, 20과 21, 및 21과 22 사이에 5개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하고, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드의 당의 4'-탄소는

하기 구조를 갖는다.



[0035]

[0036]

올리고뉴클레오타이드를 포함하는 조성물 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 Na⁺ 반대이온을 추가로 포함한다.

[0037]

올리고뉴클레오타이드 또는 조성물을 전달하는 것을 포함하는, 세포에서 B형 간염 바이러스 (HBV) 표면 항원의 발현을 감소시키는 방법 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포는 간세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 생체 내에 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 시험관 내에 있다.

[0038]

대상체에게 올리고뉴클레오타이드 또는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 B형 간염 바이러스 (HBV) 감염을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게 유효량의 엔테카비르를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0039]

본 명세서의 일부로 포함되고 그를 구성하는 첨부된 도면은 특정 실시양태를 설명하고, 서면 명세서와 함께 본원에 개시된 조성물 및 방법의 특정한 측면의 비제한적인 예를 제공하는 역할을 한다.

도 1은 HBV 게놈의 조직화의 개략적 표시 상에서 RNAi 표적 부위의 예를 도시한다.

도 2는 HDI-마우스에서 HBsAg 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오타이드의 단일 용량 평가를 도시한다.

도 3은 HBsAg-표적화 올리고뉴클레오타이드에 의한 명시된 투약 레지멘 동안에 시간에 걸쳐 혈장 HBsAg 수준의 그래프 표시이다. 이 예에 도시된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드는 임상전 효능을 입증하였고, 투약 기간을 훨씬 지나서도 감소된 수준을 유지하였다.

도 4는 리포터 검정을 이용하여 HeLa 세포에서 HBsAg 맵핑의 결과를 나타내는 그래프를 도시한다. HBV 게놈의 위치 254를 표적화하는 비변형된 siRNA를 명시된 농도에서 양성 대조군으로 사용하였다. 써모 피셔(Thermo Fisher)로부터 상업적으로 입수가능한 사일런서 siRNA는 이들 실험을 위한 음성 대조군으로서 작용하였다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 5는 HBsAg-표적화 올리고뉴클레오타이드, HBV-219에서 설계된 미스매치가 HBV 유전자형에 걸쳐 적용범위(coverage)를 증가시킴을 도시하는 유전자형 보존 비교를 도시한다.

도 6은 프로토타입 서열로서 HBV 유전자형 A를 사용하여 psiCHECK2 리포터 검정을 위해 설계된 벡터를 도시한다.

도 7은 미스매치의 도입 효과를 평가하기 위해 설계된 올리고뉴클레오타이드의 몇몇 예를 도시한다. 모 및 미스매치 가닥에 대한 올리고뉴클레오타이드 서열을 정렬하고 박스 안에 미스매치 위치를 도시하였다. psiCHECK2 리포터 검정에서 사용된 상응하는 리포터 서열을 추가로 나타낸다.

도 8은 미스매치 연구에서 평가된 올리고뉴클레오타이드에 대한 단일-용량 적정 플롯을 도시하며, 이는 가이드 가닥에서의 미스매치가 생체 내에서 용인됨을 입증한다.

도 9는 HBsAg-표적화 올리고뉴클레오타이드에 미스매치의 도입이 생체내 효능에 불리한 영향을 미치지 않음을 입증하는 생체내 용량 적정 플롯을 도시한다.

도 10은 화학적 변형을 갖고 듀플렉스 형태인 HBsAg-표적화 올리고뉴클레오타이드 (HBV(s)-219)의 예를 도시한다. 더 어두운 색조는 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드를 나타낸다. 더 밝은 색조는 2'-플루오로-데옥시리보뉴클레오타이드를 나타낸다.

드를 나타낸다.

도 11a는 간세포에서 HBV 코어 항원 (HBcAg)의 세포내(subcellular) 분포를 나타내는 면역조직화학 염색 결과를 나타낸다.

도 11b는 HBV pgRNA에 대한 검출된 RNA 전사체 서열을 맵핑하는 RNA 시퀀싱 결과를 나타낸다.

도 12a는 HBV의 유체역학적 주사 (HDI) 모델에서 비히클 대조군 및 HBxAg mRNA를 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오타이드와 비교하여, HBsAg mRNA를 표적화하는 HBV(s)-219 올리고뉴클레오타이드 전구체 HBV(s)-219P2에 의한 처리 후에 HBsAg mRNA 발현의 시간 경과를 나타낸다.

도 12b는 AAV-HBV 모델에서 비히클 대조군 및 HBxAg mRNA를 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오타이드와 비교하여, HBsAg mRNA를 표적화하는 HBV(s)-219 올리고뉴클레오타이드 전구체 HBV(s)-219P2에 의한 처리 후에 HBsAg mRNA 발현의 시간 경과를 나타낸다.

도 13은 비히클 대조군 및 HBxAg mRNA를 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오타이드 (GalXC-HBVX)와 비교하여, HBsAg mRNA를 표적화하는 HBV(s)-219 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리 후에 HBV의 AAV-HBV 모델 및 HDI 모델로부터 수득된 간세포에서 HBcAg의 세포내 분포를 나타내는 면역조직화학 염색 결과를 도시한다.

도 14a-14d는 PXB-HBV 모델에서 HBV(s)-219 전구체 1 (HBV(s)-219 P1)의 항바이러스 활성을 도시한다. 9 마리 마우스의 코호트에게 PBS 중 0 또는 3 mg/kg의 HBV(s)-219P1의 3회의 매주 용량을 피하 투여로 제공하였다. 각각의 코호트로부터 6 마리의 마우스를 지정된 각각의 시점에서 비-말단 하악 볼 출혈에 의해 혈청 HBsAg 및 혈청 HBV DNA에 대해 분석하였다 (도 14a 및 14b). 28 일째에 (HBV(s)-219P1의 제1 용량에서 시작), 남아있는 모든 마우스를 안락사시키고, RT-qPCR에 의해 간 HBV DNA (도 14c) 및 간 cccDNA (도 14d)에 대해 간 생검을 수집하였다.

도 15a-15c는 HBV(s)-219 전구체 2 (HBV(s)-219P2)가 엔테카비르의 항바이러스 활성을 강화시킴을 도시한다. HBV 마우스 유체역학적 주사 (HDI) 모델에서, HBV(s)-219P2의 단일 용량을 1 일째에 마우스 피하로 투여한 후에, 14 일 동안 500 ng/kg 엔테카비르 (ETV)를 매일 경구로 투여하였다. 순환 바이러스 로드 (HBV DNA)를 qPCR에 의해 측정하였다 (도 15a). 혈장 HBsAg 수준을 ELISA에 의해 측정하였다 (도 15b). 간 HBV mRNA 및 pgRNA 수준을 qPCR에 의해 측정하였다 (도 15c). 결과는 조합 요법에 의한 명백한 상승적 효과를 나타낸다. ETV 요법 단독은 순환 HBsAg 또는 간 바이러스 RNA에 대해 효능을 나타내지 않는다. HBsAb 또는 HBV RNA에 의해 측정된 HBV(s)-219P2의 항바이러스 활성은 ETV의 공동 투약에 의해 영향을 받지 않는다. "BL0D"는 "검출 한계 미만"을 의미한다.

도 16a-16b는 S 항원 (HBV(s)-219P2) 또는 X 항원 (GalXC-HBVX로 지정됨)을 표적화하는 GalNac 접합된 올리고뉴클레오타이드의 HBsAg 저해 활성의 비교를 도시한다. 결과는 HBV(s)-219P2가 GalXC-HBVX 또는 두 RNAi 작용제의 동물 조합물에 비해 더 장기간 동안 HBsAg를 저해함을 나타낸다. 도 16a는 HBV 게놈에서 RNAi 표적 부위의 위치가 HBV-발현 마우스에서 HBsAg 회복 역학에 영향을 미침을 나타낸다. 도 16b는 투여후 2 주째에 (좌측 패널) 및 투여후 9 주째에 (우측 패널) 혈장 HBsAg 수준을 도시하고, 이는 단독으로 또는 HBV(s)-219P2와의 조합물로서 HBVX 코딩 영역의 표적화가 더 짧은 활성 기간을 일으킴을 나타낸다. 개별 동물 데이터가 도시되었다. 몇몇 데이터 점 (가장 밝은 회색 원)은 검출 한계 미만이었다.

도 17a-17c는 HBV(s)-219P2, GalXC-HBVX 또는 1:1 조합물로 처리된 HBV-발현 마우스에서 HBV 코어 항원 (HBcAg)의 세포내 위치를 도시한다. 도 17a는 투여후 1, 2, 6, 9 및 13 주째에 수득되고 HBcAg에 대해 염색된 간 분획에서의 대표적인 간세포를 도시한다. 도 17b는 각각의 동물에서 (n=3/그룹, 동물당 50개 세포, 투약후 2 주째) 핵 염색에 의한 HBcAg-양성-세포의 백분율을 도시한다. 대안적인 서열을 설계하여, X 및 S 오픈 리딩 프레임 내에서의 표적화에 대해 시험하였다. 도 17c는 S 항원 및 X 항원을 표적화하는 대안적인 RNAi 올리고의 투여후 2, 3 및 9 주째에 수득된 간세포에서 HBcAg의 세포내 분포를 도시한다.

도 18은 건강한 환자에서 HBV(s)-219의 안전성 및 내약성 및 HBV 환자에서 HBV(s)-219의 치료 효능을 평가하기 위해 설계된 연구에 대한 코호트별 용량 정보를 도시한다.

도 19a-19b는 HBV(s)-219 및 HBV(s)-219P2의 화학 구조를 도시한다. (도 19a) HBV(s)-219에 대한 화학 구조. (도 19b) HBV(s)-219P2에 대한 화학 구조.

도 20은 집중된 보존 분석을 나타냅니다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 일부 측면에 따라, 본 개시내용은 HBV 감염을 치료하기 위해 세포, 특히 간 세포 (예를 들어, 간세포)에서 HBsAg 발현을 감소시키는데 효과적인 강력한 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 HBsAg 표적화 올리고뉴클레오타이드는 이들 조직에서 HBV 감염을 치료하기 위해 표적 조직의 선택된 세포 (예를 들어, 간의 간세포)로 전달되도록 설계된다. 따라서, 관련 측면에서, 본 개시내용은 세포 (예를 들어, 간의 세포)에서 HBV 표면 항원 유전자 발현을 선택적으로 감소시키는 것을 수반하는, HBV 감염을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0041] 정의된 용어의 기재를 비롯하여 본 개시내용의 추가의 측면이 하기에 제공된다.
- [0042] **I. 정의**
- [0043] **대략적으로:** 본원에서 사용된 바와 같이, 1개 이상의 관심 값에 적용되는 용어 "대략적으로" 또는 "약"은 명시된 기준 값과 유사한 값을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 용어 "대략적으로" 또는 "약"은 달리 명시되지 않거나 또는 문맥으로부터 명백하지 않다면 명시된 기준 값의 어느 방향으로 (초과 또는 미만) 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만 내에 속하는 값의 범위를 지칭한다 (이러한 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 제외함).
- [0044] **투여하는:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "투여하는" 또는 "투여"는 (예를 들어, 대상체에서 상태를 치료하기 위해) 약리학적으로 유용한 방식으로 대상체에게 물질 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)을 제공하는 것을 의미한다.
- [0045] **아시알로당단백질 수용체 (ASGPR):** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "아시알로당단백질 수용체" 또는 "ASGPR"은 큰 48 kDa (ASGPR-1) 및 작은 40 kDa 서브유닛 (ASGPR-2)에 의해 형성된, 두 부분으로 나누어진 C-유형 렉틴을 지칭한다. ASGPR은 간세포의 동모양(sinusoidal) 표면 상에서 주로 발현되고, 말단 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기 (아시알로당단백질)를 함유하는 순환 당단백질의 결합, 내재화 및 후속적인 제거에서 주요 역할을 한다.
- [0046] **상보성:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성"은 2개의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 2개의 서열이 서로 염기 쌍을 형성하는 것을 허용하는, (예를 들어, 2개의 대향 핵산 상에서 또는 단일 핵산 가닥의 대향 영역 상에서) 2개의 뉴클레오타이드 사이의 또는 뉴클레오타이드의 2개의 서열 사이의 구조적 관계를 지칭한다. 예를 들어, 대향 핵산의 피리미딘 뉴클레오타이드에 대해 상보성인 한 핵산의 퓨린 뉴클레오타이드는 서로 수소 결합을 형성함으로써 함께 염기 쌍을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상보성 뉴클레오타이드는 왓슨-크릭(Watson-Crick) 방식으로 또는 적합한 듀플렉스의 형성을 허용하는 임의의 다른 방식으로 염기 쌍을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 2개의 핵산은 상보성 영역을 형성하도록 서로 상보성인 다중 뉴클레오타이드의 영역을 가질 수 있다.
- [0047] **데옥시리보뉴클레오타이드:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "데옥시리보뉴클레오타이드"는 리보뉴클레오타이드와 비교하여 그의 펜토스 당의 2' 위치에서 히드록실 대신에 수소를 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드는 당, 포스페이트 기 또는 염기 내의 또는 그의 변형 또는 치환을 비롯하여, 2' 위치 이외에 있는 원자의 1개 이상의 변형 또는 치환을 갖는 데옥시리보뉴클레오타이드이다.
- [0048] **이중-가닥 올리고뉴클레오타이드:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이중-가닥 올리고뉴클레오타이드"는 실질적으로 듀플렉스 형태인 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 듀플렉스 영역(들)의 상보성 염기-쌍 형성은 공유적으로 분리된 핵산 가닥의 뉴클레오타이드의 역평행 서열 사이에 형성된다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 듀플렉스 영역(들)의 상보성 염기-쌍 형성은 공유적으로 연결된 핵산 가닥의 뉴클레오타이드의 역평행 서열 사이에 형성된다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 듀플렉스 영역(들)의 상보성 염기-쌍 형성은 함께 염기 쌍을 형성하는 뉴클레오타이드의 상보성 역평행 서열을 제공하기 위해 (예를 들어, 헤어핀을 통해) 폴딩된 단일 핵산 가닥으로부터 형성된다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 서로 완전히 듀플렉스화된 2개의 공유적으로 분리된 핵산 가닥을 포함한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어 한쪽 또는 양쪽 말단에 오버행을 갖는 부분적으로 듀플렉스화된 2개의 공유적으로 분리된 핵산 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 부분적으로 상보성인 뉴클레오타이드의 역평행 서열을 포함하고, 따라서 1개 이상의 미스매치를 가질 수 있으며, 여기에는 내부 미스매치 또는 말단 미스매치가 포함될 수 있다.

- [0049] **듀플렉스**: 본원에서 사용된 바와 같이, 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)과 관련하여 용어 "듀플렉스"는 뉴클레오타이드의 2개의 역평행 서열의 상보성 염기 쌍 형성을 통해 형성된 구조체를 지칭한다.
- [0050] **부형제**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "부형제"는 예를 들어 원하는 점조도 또는 안정화 효과를 제공하거나 또는 부여하기 위해 조성물에 포함될 수 있는 비치료적인 작용제를 지칭한다.
- [0051] **간세포**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "간세포" 또는 "간세포들"은 간의 실질 조직의 세포를 지칭한다. 이들 세포는 간 질량의 대략 70-85%를 구성하고, 혈청 알부민, 피브리노겐, 및 응고 인자의 프로트롬빈 그룹 (인자 3 및 4는 제외)을 제조한다. 간세포 계통 세포에 대한 마커에는 트랜스티레틴 (Ttr), 글루타민 신테타제 (Glu1), 간세포 핵 인자 1a (Hnf1a), 및 간세포 핵 인자 4a (Hnf4a)가 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 성숙한 간세포에 대한 마커에는 시토크롬 P450 (Cyp3a11), 푸마릴아세토아세테이트 히드롤라제 (Fah), 글루코스 6-포스페이트 (G6p), 알부민 (Alb), 및 OC2-2F8이 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, [Huch *et al.*, (2013), *Nature*, 494(7436): 247-250]을 참고하며, 간세포 마커와 관련된 내용은 본원에 참고로 포함된다.
- [0052] **B형 간염 바이러스**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "B형 간염 바이러스" 또는 "HBV"는 헤파드나비리다에 (*Hepadnaviridae*) 패밀리에 속하고 오르토헤파드나바이러스(*Orthohepadnavirus*) 속의 유형 종으로 분류되는 소형 DNA 바이러스이다. HBV 바이러스 입자 (비리온)는 외부 지질 외피, 및 단백질로 구성된 정이십면체 뉴클레오캡시드 코어를 포함한다. 뉴클레오캡시드는 일반적으로 바이러스 DNA, 및 레트로바이러스와 유사한 역전사효소 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 둘러싼다. HBV 외부 외피는 취약한 세포의 바이러스 결합 및 상기 세포로의 진입에 관여하는 매립된 단백질을 함유한다. 간을 공격하는 HBV는 서열을 기반으로 하여 적어도 10가지 유전자형 (A-J)으로 분류되었다. 일반적으로, 계놈에 의해 코딩되는 4가지 유전자가 있고, 상기 유전자는 C, P, S 및 X로 지칭된다. 코어 단백질은 유전자 C (HBcAg)에 의해 코딩되고, 그의 시작 코돈 이전에 상류의 프레임내 AUG 시작 코돈이 있고, 그로부터 프리-코어 단백질이 생성된다. HBeAg는 프리-코어 단백질의 단백질 분해 가공에 의해 생성된다. DNA 폴리머라제는 유전자 P에 의해 코딩된다. 유전자 S는 표면 항원 (HBsAg)을 코딩한다. HBsAg 유전자는 하나의 긴 오픈 리딩 프레임이지만, 상기 유전자를 3가지 분획, 프리-S1, 프리-S2 및 S로 나누는 3개의 프레임내 "시작" (ATG) 코돈을 함유한다. 다중 시작 코돈 때문에, 대형, 중형 및 소형으로 불리는 3가지 상이한 크기를 갖는 폴리펩티드 (프리-S1 + 프리-S2 + S, 프리-S2 + S, 또는 S)가 생성된다. 이들은 1:1:4의 비를 가질 수 있다 (Heermann *et al.*, 1984).
- [0053] B형 간염 바이러스 (HBV) 단백질은 몇몇 카테고리 및 기능으로 조직화될 수 있다. 폴리머라제는 역전사효소 (RT)로서 기능하여 프리계놈 RNA (pgRNA)로부터 바이러스 DNA를 제조하고, 또한 DNA-의존성 폴리머라제로서 기능하여 바이러스 DNA로부터 공유결합 폐환형 DNA (cccDNA)를 제조한다. 이들은 마이너스 가닥의 5' 말단에 공유적으로 부착된다. 코어 단백질은 바이러스 캡시드 및 분비된 E 항원을 제조한다. 표면 항원은 간세포 내재화 리간드이고, 또한 바이러스의 구형 및 필라멘트상 입자의 주요 성분이다. 바이러스 입자는 테인 입자 (감염성 비리온)에 비해 >1000배로 생성되고, 면역 유인체로서 작용할 수 있다.
- [0054] **B형 간염 바이러스 표면 항원**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "B형 간염 바이러스 표면 항원" 또는 "HBsAg"는 HBV 계놈의 유전자 S (예를 들어, ORF S)에 의해 코딩되는 S-도메인 단백질이다. B형 간염 바이러스 입자는 유전자 S에 의해 코딩되는 3가지 단백질 (대형 표면, 중형 표면 및 주요 표면 단백질)에 의해 둘러싸인 코어 입자 내에 바이러스 핵산을 보유한다. 이들 단백질 중에서, 주요 표면 단백질은 일반적으로 약 226개 아미노산이고, S-도메인만을 함유한다.
- [0055] **감염**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "감염"은 대상체에서 미생물, 예컨대 바이러스의 병원성 침입 및/또는 확장을 지칭한다. 감염은 예를 들어 바이러스 DNA가 세포 내에서 휴면 상태인 용원성일 수 있다. 대안적으로, 감염은 예를 들어 바이러스가 활발히 증식하고 감염된 세포의 파괴를 일으키는 용해성일 수 있다. 감염은 임상적으로 명백한 증상을 초래할 수 있거나 초래하지 않을 수 있다. 감염은 국지화되어 유지될 수 있거나, 또는 예를 들어 대상체의 혈액 또는 림프계를 통해 전파될 수 있다. 예를 들어 HBV 감염을 가진 개체는 바이러스 로드, 표면 항원 (HBsAg), e-항원 (HBeAg) 중 하나 이상을 검출함으로써, 그리고 관련 기술분야에 공지된 HBV 감염의 검출을 위한 다양한 다른 검정에 의해 확인될 수 있다. HBV 감염의 검출을 위한 검정은, HBsAg 및/또는 HBeAg의 존재에 대해 혈청 또는 혈액 샘플을 시험하고, 임의적으로 HBV 항원이 검출 불가능한 수준일 수 있는 임의의 기간을 보상하기 위해 하나 이상의 바이러스 항체 (예를 들어, IgM 및/또는 IgG)의 존재에 대해 추가로 스크리닝하는 것을 수반할 수 있다.
- [0056] **간 염증**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "간 염증" 또는 "간염"은 간독성제에 대한 노출에 의해 초래될 수

있는 바와 같이, 특히 손상 또는 감염의 결과로서 붓고, 기능장애이고/거나 통증이 있는 신체 상태를 지칭한다. 증상에는 황달 (피부 또는 눈의 황변), 피로, 쇠약, 오심, 구토, 식욕 감소, 및 체중 손실이 포함될 수 있다. 간 염증을 치료하지 않고 방치한다면, 이는 섬유증, 간경변, 간부전 또는 간암으로 진행될 수 있다.

[0057] **간 섬유증:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "간 섬유증" 또는 "간의 섬유증"은 염증 및 간 세포 사멸으로 인해 콜라겐 (I, III 및 IV), 피브로넥틴, 우돌린, 엘라스틴, 라미닌, 히알루로난 및 프로테오글리칸을 포함할 수 있는 세포외 매트릭스 단백질의 간에서의 과도한 축적을 지칭한다. 간 섬유증을 치료하지 않고 방치한다면, 이는 간경변, 간부전 또는 간암으로 진행될 수 있다.

[0058] **루프:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "루프"는 서로 충분히 상보성인 핵산의 2개의 역평행 영역에 의해 플랭킹된 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)의 쌍을 형성하지 않은 영역을 지칭하며, 이로써 적절한 혼성화 조건하에 (예를 들어, 포스페이트 완충제에서, 세포에서) 쌍을 형성하지 않은 영역을 플랭킹하는 2개의 역평행 영역이 혼성화하여 듀플렉스 ("스텝"으로 지칭됨)를 형성한다.

[0059] **변형된 뉴클레오타이드간 연결:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 뉴클레오타이드간 연결"은 포스포디에스테르 결합을 포함하는 기준 뉴클레오타이드간 연결과 비교하여 1개 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오타이드간 연결을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 비-천연 발생 연결이다. 전형적으로, 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 변형된 뉴클레오타이드간 연결이 존재하는 핵산에 하나 이상의 바람직한 성질을 부여한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오타이드는 열 안정성, 분해에 대한 내성, 뉴클레아제 내성, 가용성, 생체이용률, 생활성, 감소된 면역원성 등을 개선시킬 수 있다.

[0060] **변형된 뉴클레오타이드:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 뉴클레오타이드"는 아데닌 리보뉴클레오타이드, 구아닌 리보뉴클레오타이드, 시토신 리보뉴클레오타이드, 우라실 리보뉴클레오타이드, 아데닌 데옥시리보뉴클레오타이드, 구아닌 데옥시리보뉴클레오타이드, 시토신 데옥시리보뉴클레오타이드 및 티미딘 데옥시리보뉴클레오타이드로부터 선택된 상응하는 기준 뉴클레오타이드와 비교하여 1개 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 비-천연 발생 뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 그의 당, 핵염기 및/또는 포스페이트 기에서 1개 이상의 화학적 변형을 갖는다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 상응하는 기준 뉴클레오타이드에 접합된 1개 이상의 화학적 모이어티를 갖는다. 전형적으로, 변형된 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드가 존재하는 핵산에 하나 이상의 바람직한 성질을 부여한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오타이드는 열 안정성, 분해에 대한 내성, 뉴클레아제 내성, 가용성, 생체이용률, 생활성, 감소된 면역원성 등을 개선시킬 수 있다.

[0061] **닉킹된 테트라루프 구조:** "닉킹된 테트라루프 구조"는 별개의 센스 (패신저) 및 안티센스 (가이드) 가닥의 존재를 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오타이드의 구조이며, 센스 가닥은 안티센스 가닥에 대해 상보성 영역을 갖고, 가닥들 중 적어도 하나, 일반적으로 센스 가닥은 적어도 1개의 가닥 내에 형성된 인접한 스텝 영역을 안정화시키도록 형성된 테트라루프를 갖는다.

[0062] **올리고뉴클레오타이드:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 예를 들어 100개 미만의 뉴클레오타이드 길이인 짧은 핵산을 지칭한다. 올리고뉴클레오타이드는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 듀플렉스 영역을 가질 수 있거나 또는 갖지 않을 수 있다. 비제한적인 예의 집합으로서, 올리고뉴클레오타이드는 소형 간섭 RNA (siRNA), 마이크로RNA (miRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 다이버 기질 간섭 RNA (dsiRNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 짧은 siRNA, 또는 단일-가닥 siRNA일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 RNAi 올리고뉴클레오타이드이다.

[0063] **오버행:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "오버행"은 1개의 가닥 또는 영역이 함께 듀플렉스를 형성하는 상보성 가닥의 말단 너머로 연장된 1개의 가닥 또는 영역으로부터 생성된 말단의 염기 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드(들)를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 오버행은 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 또는 3' 말단에서 듀플렉스 영역으로부터 연장된 쌍을 형성하지 않은 1개 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 오버행은 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥 또는 센스 가닥 상의 3' 또는 5' 오버행이다.

[0064] **포스페이트 유사체:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "포스페이트 유사체"는 포스페이트 기의 정전기적 및/또는 입체적 성질을 모방하는 화학적 모이어티를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 종종 효소적 제거에 민감한 5'-포스페이트 대신에 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 뉴클레오타이드에 위치한다. 일부 실시양태에서, 5' 포스페이트 유사체는 포스포타제-내성 연결을 함유한다. 포스페이트 유사체의 예에는 5' 포스포네이트, 예컨대 5' 메틸렌포스포네이트 (5'-MP) 및 5'-(E)-비닐포스포네이트 (5'-VP)가 포함된다. 일부 실시양태

에서, 올리고뉴클레오타이드는 5'-말단 뉴클레오타이드에서 당의 4'-탄소 위치에 포스페이트 유사체 ("4'-포스페이트 유사체"로 지칭됨)를 갖는다. 4'-포스페이트 유사체의 예는 옥시메틸 기의 산소 원자가 당 모이어티 (예를 들어, 그의 4'-탄소에서) 또는 그의 유사체에 결합된 옥시메틸포스포네이트이다. 예를 들어, 2016년 9월 2일에 출원한 미국 가출원 번호 62/383,207, 및 2016년 9월 12일에 출원한 62/393,401을 참고하며, 포스페이트 유사체와 관련된 각각의 내용은 본원에 참고로 포함된다. 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 대해 다른 변형이 개발되었다 (예를 들어, WO 2011/133871; 미국 특허 번호 8,927,513; 및 Prakash *et al.* (2015), *Nucleic Acids Res.*, 43(6):2993-3011, 포스페이트 유사체와 관련된 각각의 내용은 본원에 참고로 포함됨).

[0065] **감소된 발현:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 유전자의 "감소된 발현"은 적절한 기준 세포 또는 대상체와 비교하여 유전자에 의해 코딩된 RNA 전사체 또는 단백질의 양에서의 감소 및/또는 세포 또는 대상체에서 유전자 활성의 양에서의 감소를 지칭한다. 예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, HBsAg mRNA 서열에 대해 상보성인 안티센스 가닥을 갖는 것)로 세포를 처리하는 작용은 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드로 처리하지 않은 세포와 비교하여 (예를 들어, HBV 게놈의 S 유전자에 의해 코딩된) RNA 전사체, 단백질 및/또는 효소 활성의 양에서의 감소를 일으킬 수 있다. 유사하게, 본원에서 사용된 바와 같이 "발현을 감소시키는"은 유전자 (예를 들어, HBV 게놈의 S 유전자)의 감소된 발현을 일으키는 작용을 지칭한다.

[0066] **상보성 영역:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성 영역"은 적절한 혼성화 조건하에, 예를 들어 포스페이트 완충제에서, 세포 등에서 뉴클레오타이드의 두 서열 사이에 혼성화를 허용하기 위해 뉴클레오타이드의 역평행 서열에 대해 충분히 상보성인 핵산의 뉴클레오타이드의 서열 (예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드)을 지칭한다.

[0067] **리보뉴클레오타이드:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "리보뉴클레오타이드"는 그의 2' 위치에 히드록실 기를 함유하며 그의 펜토스 당으로서 리보스를 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 변형된 리보뉴클레오타이드는 리보스, 포스페이트 기 또는 염기 내의 또는 그의 변형 또는 치환을 비롯하여 2' 위치 이외에 있는 원자의 1개 이상의 변형 또는 치환을 갖는 리보뉴클레오타이드이다.

[0068] **RNAi 올리고뉴클레오타이드:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "RNAi 올리고뉴클레오타이드"는 (a) 표적 mRNA의 절단에서 안티센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 일부가 아르곤테(Argonaute) 2 (Ago2) 엔도뉴클레아제에 의해 사용되는 것인, 센스 가닥 (패신저) 및 안티센스 가닥 (가이드)을 갖는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드, 또는 (b) 표적 mRNA의 절단에서 안티센스 가닥 (또는 해당 안티센스 가닥의 일부)이 Ago2 엔도뉴클레아제에 의해 사용되는 것인, 단일 안티센스 가닥을 갖는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0069] **가닥:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "가닥"은 뉴클레오타이드간 연결 (예를 들어, 포스포디에스테르 연결, 포스포로티오에이트 연결)을 통해 함께 연결된 뉴클레오타이드의 단일 인접한 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 가닥은 2개의 유리 말단, 예를 들어 5'-말단 및 3'-말단을 갖는다.

[0070] **대상체:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 마우스, 토끼 및 인간을 비롯한 임의의 포유류를 의미한다. 한 실시양태에서, 대상체는 인간 또는 비-인간 영장류이다. 용어 "개체" 또는 "환자"는 "대상체"와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0071] **합성:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "합성"은 (예를 들어, 기계 (예를 들어, 고체 상태 핵산 합성기)를 사용하여) 인공적으로 합성되거나 또는 분자를 정상적으로 생성하는 천연 공급원 (예를 들어, 세포 또는 유기체)으로부터 달리 유래되지 않는 핵산 또는 다른 분자를 지칭한다.

[0072] **표적화 리간드:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "표적화 리간드"는 관심 조직 또는 세포의 관련 분자 (예를 들어, 수용체)에 선택적으로 결합하고, 다른 물질을 관심 조직 또는 세포에 표적화시키기 위한 목적으로 또 다른 물질에 접합될 수 있는 분자 (예를 들어, 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드 또는 지질)을 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오타이드를 특이적인 관심 조직 또는 세포에 표적화시키기 위한 목적으로 올리고뉴클레오타이드에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 세포 표면 수용체에 선택적으로 결합한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오타이드에 접합될 때, 세포의 표면 상에서 발현된 수용체와의 선택적 결합을 통해 및 올리고뉴클레오타이드, 표적화 리간드 및 수용체를 포함하는 복합체의 세포에 의한 엔도솜 내재화를 통해, 특정한 세포에게로 올리고뉴클레오타이드의 전달을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오타이드가 세포에서 표적화 리간드로부터 방출되도록 세포성 내재화 이후에 또는 동안에 절단되는 링커를 통해 올리고뉴클레오타이드에 접합된다.

[0073] **테트라루프:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "테트라루프"는 뉴클레오타이드의 플랭킹 서열의 혼성화에 의해 형

성된 인접한 듀플렉스의 안정성을 증가시키는 루프를 지칭한다. 안정성에서의 증가는, 무작위로 선택된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 비등한 길이를 갖는 루프의 집합으로부터 평균적으로 예상되는 인접한 스템 듀플렉스의 T_m 보다 높은, 인접한 스템 듀플렉스의 융점 (T_m)에서의 증가로서 검출가능하다. 예를 들어, 테트라루프는 적어도 2개 염기 쌍 길이의 듀플렉스를 포함하는 헤어핀에 10 mM NaHPO_4 중에서 적어도 50°C, 적어도 55°C, 적어도 56°C, 적어도 58°C, 적어도 60°C, 적어도 65°C 또는 적어도 75°C의 융점을 부여한다. 일부 실시양태에서, 테트라루프는 적층 상호작용에 의해 인접한 스템 듀플렉스에서 염기 쌍을 안정화시킬 수 있다. 또한, 테트라루프에서 뉴클레오타이드 사이의 상호작용에는 비-왓슨-크릭 염기 쌍 형성, 적층 상호작용, 수소 결합, 및 접촉 상호작용이 포함되나 이에 제한되지 않는다 (Cheong *et al.*, Nature 1990 Aug. 16; 346(6285):680-2; Heus and Pardi, Science 1991 Jul. 12; 253(5016):191-4). 일부 실시양태에서, 테트라루프는 4 내지 5개 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 테트라루프는 변형될 수 있거나 또는 변형되지 않을 수 있는 (예를 들어, 표적화 모이어티에 접합될 수 있거나 또는 접합되지 않을 수 있는) 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 한 실시양태에서, 테트라루프는 4개의 뉴클레오타이드로 이루어진다. 임의의 뉴클레오타이드가 테트라루프에서 사용될 수 있고, 이러한 뉴클레오타이드에 대한 표준 IUPAC-IUB 기호는 [Cornish-Bowden (1985) Nucl. Acids Res. 13: 3021-3030]에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다. 예를 들어, 문자 "N"은 임의의 염기가 해당 위치에 있을 수 있음을 의미하기 위해 사용될 수 있고, 문자 "R"은 A (아데닌) 또는 G (구아닌)이 해당 위치에 있을 수 있음을 나타내기 위해 사용될 수 있고, "B"는 C (시토신), G (구아닌), 또는 T (티민)이 해당 위치에 있을 수 있음을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 테트라루프의 예에는 테트라루프의 UNGC 패밀리 (예를 들어, UUCG), 테트라루프의 GNRA 패밀리 (예를 들어, GAAA), 및 CUUG 테트라루프가 포함된다. (Woese *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1990 November; 87(21):8467-71; Antao *et al.*, Nucleic Acids Res. 1991 Nov. 11; 19(21):5901-5). DNA 테트라루프의 예에는 테트라루프의 d(GNNA) 패밀리 (예를 들어, d(GTTA)), 테트라루프의 d(GNRA) 패밀리, 테트라루프의 d(GNAB) 패밀리, 테트라루프의 d(CNNG) 패밀리, 및 테트라루프의 d(TNCG) 패밀리 (예를 들어, d(TTCG))가 포함된다. 예를 들어 [Nakano *et al.* Biochemistry, 41 (48), 14281-14292, 2002. SHINJI *et al.* Nippon Kagakkai Koen Yokoshu VOL. 78th; NO. 2; PAGE. 731 (2000)]을 참고하며, 그들의 관련 개시내용에 대해서는 본원에 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, 테트라루프는 닉킹된 테트라루프 구조 내에 함유된다.

[0074] **치료하다:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다"는 기존 상태 (예를 들어, 기존 HBV 감염)와 관련하여 대상체의 건강 및/또는 복지를 개선시키기 위해 또는 상태의 발병 가능성을 예방하거나 감소시키기 위해 (예를 들어, 간 섬유증, 간염, 간암, 또는 HBV 감염과 연관된 다른 상태의 예방), 예를 들어 대상체에게 치료제 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)의 투여를 통해, 치료를 필요로 하는 대상체에게 치유를 제공하는 작용을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료는 대상체가 경험한 상태 (예를 들어, HBV 감염 또는 관련 상태)의 적어도 하나의 징후, 증상 또는 기여 인자의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 수반한다. HBV 감염 동안에, 대상체는 피부 및 눈의 황변 (황달), 짙은 소변, 극도의 피로, 오심, 구토 및 복통과 같은 증상을 나타낼 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 치료는 이러한 증상 중 하나 이상의 빈도 또는 중증도에서의 감소를 일으킬 수 있다. 그러나, HBV 감염은 1가지 이상의 간 상태, 예컨대 간경변, 간 섬유증, 간 염증 또는 간암으로 발전할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 치료는 이러한 상태 중 하나 이상의 예방 또는 약화, 또는 그의 빈도 또는 중증도에서의 감소를 일으킬 수 있다.

[0075] II. 올리고뉴클레오타이드-기반 억제제

[0076] i. HBV 표면 항원 표적화

[0077] 일부 실시양태에서, 치료 이익을 달성하기 위해 사용될 수 있는 HBV 표면 항원 발현의 올리고뉴클레오타이드-기반 억제제가 본원에 제공된다. HBV 표면 항원 mRNA의 실험 및 상이한 올리고뉴클레오타이드의 시험을 통해, HBV 감염을 치료하기 위해 HBV 표면 항원 (HBsAg)의 발현을 감소시키기 위한 강력한 올리고뉴클레오타이드를 개발하였다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 공지된 모든 유전자형에 걸쳐 공지된 HBV 게놈의 >95%를 포괄하는 HBsAg mRNA 서열을 표적화하도록 설계된다. 일부 실시양태에서, 이러한 올리고뉴클레오타이드는 간에서 HBV 프리-게놈 RNA (pgRNA) 및 HBsAg mRNA의 90% 초과 감소를 일으킨다. 일부 실시양태에서, HBsAg 발현에서의 감소는 단일 용량 또는 치료 레지멘에 따라 연장된 기간 동안 지속된다.

[0078] 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 세포에서 전사체를 표적화하기 위한 및 그들의 발현을 억제하기 위한 목적으로 HBsAg mRNA에 대해 상보성인 영역을 갖도록 설계된다. 상보성 영역은 일반적으로 발현을 억제하기 위한 목적으로 올리고뉴클레오타이드 (또는 그의 가닥)를 HBsAg mRNA에 어닐링할 수 있기

에 적합한 길이 및 염기 함량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19 또는 적어도 20개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30개 (예를 들어, 12 내지 30, 12 내지 22, 15 내지 25, 17 내지 21, 18 내지 27, 19 내지 27, 또는 15 내지 30개) 범위의 뉴클레오타이드 길이인 HBsAg mRNA에 대한 상보성 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오타이드 길이인 HBsAg mRNA에 대한 상보성 영역을 갖는다.

[0079] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 HBsAg를 코딩하는 mRNA 서열을 표적화하기 위해 설계된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, ACAANAAUCCUCACAAUA (서열식별번호: 1)에 제시된 서열에 대해 상보성인 영역을 갖는 안티센스 가닥을 가진 올리고뉴클레오타이드가 제공되고, N은 임의의 뉴클레오타이드 (A, G, T 또는 C)를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하는 센스 가닥을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 UUNUUGUGAGGAUUN (서열식별번호: 2)에 제시된 서열에 대해 상보성인 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUNUUGUC (서열식별번호: 3)에 제시된 서열에 대해 상보성인 영역 (5'에서 3'으로 도시됨)을 포함한다.

[0080] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUNUUGUCGG (서열식별번호: 4)에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUCUUGUCGG (서열식별번호: 5)에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 UUAUUGUGAGGAUUUUGUCGG (서열식별번호: 6)에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 ACAANAAUCCUCACAAUA (서열식별번호: 7)에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 GACAANAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 8)에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 GACAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 9)에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 GACAAGAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 10)에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0081] 일부 실시양태에서, HBsAg mRNA의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하는 센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 서열식별번호: 7-10 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 4-6 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 2'-플루오로 및 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드 및 적어도 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드 간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티에 접합된다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 2'-플루오로 및 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드 및 적어도 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드 간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥 각각은 2'-플루오로 및 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드 및 적어도 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드 간 연결을 포함하고, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체를 포함하고, 센스 가닥은 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티에 접합된다.

[0082] 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 8-10 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 센스 가닥은 위치 3, 8-10, 12, 13 및 17에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 위치 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-26 및 31-36에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드 간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 위치 1과 2의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드 간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티에 접합된다.

[0083] 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 4-6 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 안티센스 가닥은 위치 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 및 19에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 위치 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18 및 20-22에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 3개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드 간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 위치 1과 2의 뉴클레오타이드 사이에, 위치 2와 3의 뉴클레오타이드 사이에, 위치 3과 4의 뉴클레오타이드 사이에, 위치 20과 21의 뉴클레오타이드 사이에, 및 위치 21과 22의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드 간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드의 당의 4'-

탄소는 포스페이트 유사체를 포함한다.

[0084] **ii. 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드**

[0085] 본 개시내용의 방법에서 HBsAg mRNA 발현을 표적화하는데 유용한 올리고뉴클레오타이드의 다양한 구조, 예컨대 RNAi, 안티센스, miRNA 등이 있다. 본원에 또는 다른 곳에 기재된 임의의 구조가 본원에 기재된 서열을 포함시키거나 또는 표적화하기 위한 프레임워크로서 사용될 수 있다. (예를 들어, RNAi 경로를 통해) HBV 항원 발현을 표적화하기 위한 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 서로 듀플렉스를 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥은 공유적으로 연결되지 않는다. 그러나, 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥은 공유적으로 연결된다.

[0086] 일부 실시양태에서, HBsAg mRNA 발현의 발현을 감소시키기 위한 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 RNA 간섭(RNAi)과 결속된다. 예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 1 내지 5개 뉴클레오타이드의 적어도 1개의 3' 오버행과 함께 19-25개 뉴클레오타이드의 크기를 갖는 각각의 가닥으로 개발되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,372,968 참고). 활성 RNAi 생성물을 생성하도록 다이스에 의해 가공된 더 긴 올리고뉴클레오타이드 또한 개발되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,883,996 참고). 추가의 작업은, 가닥들 중 하나가 열역학적-안정화 테트라루프 구조를 포함하는 것인 구조를 비롯하여, 적어도 1개의 가닥의 적어도 1개의 말단이 듀플렉스 표적화 영역을 넘어서 연장된 것인, 연장된 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드를 생성하였다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,513,207 및 8,927,705, 뿐만 아니라 W02010033225 참고, 이들 올리고뉴클레오타이드의 개시내용에 대해서는 본원에 참고로 포함됨). 이러한 구조체는 단일-가닥 연장부 (분자의 한쪽 또는 양쪽 상에) 뿐만 아니라 이중-가닥 연장부를 포함할 수 있다.

[0087] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 다이스 효소에 의해 절단가능하다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 센스 가닥의 3' 말단에 오버행 (예를 들어, 1, 2 또는 3개 뉴클레오타이드 길이)을 가질 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, siRNA)는 표적 RNA에 대해 안티센스인 21개 뉴클레오타이드 가이드 가닥, 및 상보성 패신저 가닥을 포함할 수 있고, 두 가닥 모두 어닐링되어 19-bp 듀플렉스 및 하나의 또는 둘 다의 3' 말단에 2개 뉴클레오타이드 오버행을 형성한다. 23개 뉴클레오타이드의 가이드 가닥 및 21개 뉴클레오타이드의 패신저 가닥을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 비롯한 더 긴 올리고뉴클레오타이드 설계 또한 이용가능하고, 분자의 우측 (패신저 가닥의 3'-말단/가이드 가닥의 5'-말단) 상에 평활 말단 및 분자의 좌측 (패신저 가닥의 5'-말단/가이드 가닥의 3'-말단) 상에 2개 뉴클레오타이드 3'-가이드 가닥 오버행이 있다. 이러한 분자에는 21개 염기 쌍 듀플렉스 영역이 있다. 예를 들어, US9012138, US9012621 및 US9193753을 참고하며, 이들 각각은 관련 개시내용에 대해 본원에 포함된다.

[0088] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 둘 다 17 내지 26개 (예를 들어, 17 내지 26, 20 내지 25, 19 내지 21 또는 21-23개) 범위의 뉴클레오타이드 길이인 센스 및 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥은 동일한 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 둘 다 21-23개 범위의 뉴클레오타이드 길이인 센스 및 안티센스 가닥을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 센스, 안티센스, 또는 센스 및 안티센스 가닥 둘 다에 있는 3' 오버행은 1 또는 2개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 23개 뉴클레오타이드의 가이드 가닥 및 21개 뉴클레오타이드의 패신저 가닥을 갖고, 분자의 우측 (패신저 가닥의 3'-말단/가이드 가닥의 5'-말단) 상에 평활 말단 및 분자 좌측 (패신저 가닥의 5'-말단/가이드 가닥의 3'-말단) 상에 2개 뉴클레오타이드 3'-가이드 가닥 오버행이 있다. 이러한 분자에는 21개 염기 쌍 듀플렉스 영역이 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 다이스 효소에 의해 작동될 때 성숙 RISC에 도입된 안티센스 가닥을 생성하는 25개 뉴클레오타이드 센스 가닥 및 27개 뉴클레오타이드 안티센스 가닥을 포함한다.

[0089] 본원에 개시된 조성물 및 방법에서 사용하기 위한 다른 올리고뉴클레오타이드 설계에는 다음이 포함된다: 16합체 siRNA (예를 들어, Nucleic Acids in Chemistry and Biology. Blackburn (ed.), Royal Society of Chemistry, 2006 참고), shRNA (예를 들어, 19 bp 또는 그보다 짧은 스템을 가짐; 예를 들어, Moore *et al.* Methods Mol. Biol. 2010; 629:141-158 참고), 평활 siRNA (예를 들어, 19 bp 길이; 예를 들어, Kraynack and Baker, RNA Vol. 12, p163-176 (2006) 참고), 비대칭 siRNA (aiRNA; 예를 들어, Sun *et al.*, Nat. Biotechnol. 26, 1379-1382 (2008) 참고), 비대칭의 더 짧은-듀플렉스 siRNA (예를 들어, Chang *et al.*, Mol Ther. 2009 Apr; 17(4): 725-32 참고), 포크 siRNA (예를 들어, Hohjoh, FEBS Letters, Vol 557, issues 1-3; Jan 2004, p 193-198 참고), 단일-가닥 siRNA (Elsner; Nature Biotechnology 30, 1063 (2012)), 덤벨-형태의 원형 siRNA (예를 들어, Abe *et al.* J Am Chem Soc 129: 15108-15109 (2007) 참고), 및 소형의 내부 세그먼트화된 간섭 RNA (sisiRNA; 예를 들어, Bramsen *et al.*, Nucleic Acids Res. 2007 Sep; 35(17): 5886-5897 참고). 상기

각각의 참고문헌은 관련된 개시내용에 대해 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다. HBsAg의 발현을 감소시키거나 또는 억제하기 위해 일부 실시양태에서 사용될 수 있는 올리고뉴클레오타이드 구조체의 추가의 비제한적인 예는 마이크로RNA (miRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 및 짧은 siRNA (예를 들어, Hamilton *et al.*, Embo J., 2002, 21(17): 4671-4679 참고; 또한 미국 출원 번호 20090099115 참고)이다.

[0090] **a. 안티센스 가닥**

[0091] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥은 "가이드 가닥"으로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 가닥이 RNA-유도된 침묵 복합체 (RISC)와 결합될 수 있고 아르고너트 단백질에 결합할 수 있거나, 또는 1개 이상의 유사한 인자와 결합하거나 또는 그와 결합할 수 있고, 표적 유전자의 침묵을 지시할 수 있다면, 이는 가이드 가닥으로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥에 대해 상보적인 센스 가닥은 "패신저 가닥"으로 지칭될 수 있다.

[0092] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 50개 이하의 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 30개 이하, 27개 이하, 25개 이하, 21개 이하, 또는 19개 이하의 뉴클레오타이드 길이)인 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 12개 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 적어도 12, 적어도 15, 적어도 19, 적어도 21, 적어도 25, 또는 적어도 27개 뉴클레오타이드 길이)인 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥은 12 내지 50 또는 12 내지 30개 (예를 들어, 12 내지 30, 11 내지 27, 11 내지 25, 15 내지 21, 15 내지 27, 17 내지 21, 17 내지 25, 19 내지 27, 또는 19 내지 30개) 범위의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나의 안티센스 가닥은 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 또는 50개 뉴클레오타이드 길이이다.

[0093] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 AATCCTCACA (서열식별번호: 11)에 제시된 서열에 대해 상보적인 영역 (5'에서 3'으로 도시됨)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 UGUGAGGAUU (서열식별번호: 12)에 제시된 서열 (5'에서 3'으로 도시됨)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 TGTGAGGATT (서열식별번호: 13)에 제시된 서열 (5'에서 3'으로 도시됨)을 포함한다.

[0094] 일부 실시양태에서, HBsAg mRNA의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오타이드는 서열식별번호: 11에 제시된 서열에 대해 상보적인 영역 및 그의 3' 말단에 1개 또는 2개의 비-상보성 뉴클레오타이드를 갖는 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 4-6 중 어느 하나에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0095] 일부 실시양태에서, HBsAg mRNA의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오타이드는 서열식별번호: 11에 제시된 서열에 대해 상보적인 영역을 갖는 안티센스 가닥을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 다음 중 어느 하나에 제시된 서열 (5'에서 3'으로 도시됨)을 갖지 않는다: TATTGTGAGGATTCTGTCA (서열식별번호: 14); CGGTATTGTGAGGATTCTTG (서열식별번호: 15); TGTGAGGATTCTGTCAACA (서열식별번호: 16); UAUUGUGAGGAUUUUGUCA (서열식별번호: 17); UGCGUAUUGUGAGGAUUCTT (서열식별번호: 18); ACAGCATTGTGAGGATTCTGTGTC (서열식별번호: 19); UAUUGUGAGGAUUUUGUCAACA (서열식별번호: 20); AUUGUGAGGAUUUUGUCAACAA (서열식별번호: 21); 및 UUGUGAGGAUUUUGUCAACAAG (서열식별번호: 22). 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 4, 5 또는 6에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 3개 이하의 뉴클레오타이드만큼 상이하다.

[0096] **b. 센스 가닥**

[0097] 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 40개 이하의 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 40개 이하, 35개 이하, 30개 이하, 27개 이하, 25개 이하, 21개 이하, 19개 이하, 17개 이하, 또는 12개 이하의 뉴클레오타이드 길이)의 센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 12개 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 적어도 12, 적어도 15, 적어도 19, 적어도 21, 적어도 25, 적어도 27, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 38개 뉴클레오타이드 길이)인 센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 50개 범위의 (예를 들어, 12 내지 40, 12 내지 36, 12 내지 32, 12 내지 28, 15 내지 40, 15 내지 36, 15 내지 32, 15 내지 28, 17 내지 21, 17 내지 25, 19 내지 27, 19 내지 30, 20 내지 40, 22 내지 40, 25 내지 40, 또는 32 내지 40개) 뉴클레오타이드 길이인 센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 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 또는 40개 뉴클레오타이드 길이의 센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레

오티드의 센스 가닥은 27개보다 긴 뉴클레오타이드 (예를 들어, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40개 뉴클레오타이드)이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 센스 가닥은 25개보다 긴 뉴클레오타이드 (예를 들어, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오타이드)이다.

[0098]

일부 실시양태에서, 센스 가닥은 그의 3'-말단에 스템-루프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 그의 5'-말단에서 스템-루프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스템 루프를 포함하는 가닥은 2 내지 66개 범위의 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 2 내지 66, 10 내지 52, 14 내지 40, 2 내지 30, 4 내지 26, 8 내지 22, 12 내지 18, 10 내지 22, 14 내지 26, 또는 14 내지 30개 뉴클레오타이드 길이)이다. 일부 실시양태에서, 스템 루프를 포함하는 가닥은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 스템은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개 뉴클레오타이드 길이의 듀플렉스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스템-루프는 분자에게 분해 (예를 들어, 효소적 분해)에 대한 보다 양호한 보호를 제공하고, 표적 세포로의 전달을 위한 표적화 특징을 용이하게 한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 루프는 올리고뉴클레오타이드의 유전자 발현 억제 활성화에 실질적으로 영향을 미치지 않고 변형이 이루어질 수 있는 부가된 뉴클레오타이드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 센스 가닥은 (예를 들어, 그의 3'-말단에서) S_1 - L - S_2 로 제시된 스템-루프를 포함하고, S_1 은 S_2 에 대해 상보성이고, L 은 S_1 과 S_2 사이에 10개 이하의 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 뉴클레오타이드 길이)의 루프를 형성하는 것인 올리고뉴클레오타이드가 본원에 제공된다.

[0099]

일부 실시양태에서, 스템-루프의 루프 (L)는 (예를 들어, 닉킹된 테트라루프 구조 내의) 테트라루프이다. 테트라루프는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 이들의 조합물을 함유할 수 있다. 전형적으로, 테트라루프는 4 내지 5개의 뉴클레오타이드를 갖는다.

[0100]

c. 듀플렉스 길이

[0101]

일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 적어도 12개 (예를 들어, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 또는 적어도 21개) 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 12-30개 범위의 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 12 내지 30, 12 내지 27, 12 내지 22, 15 내지 25, 18 내지 30, 18 내지 22, 18 내지 25, 18 내지 27, 18 내지 30, 19 내지 30 또는 21 내지 30개 뉴클레오타이드 길이)이다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐 이어지지 않는다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이의 듀플렉스는 센스 또는 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐 이어진다. 특정 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이의 듀플렉스는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 다의 전체 길이에 걸쳐 이어진다.

[0102]

d. 올리고뉴클레오타이드 말단

[0103]

일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 센스 가닥 또는 안티센스 가닥, 또는 센스 및 안티센스 가닥 둘 다에 3'-오버행이 있도록 센스 및 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 다른 5' 말단과 비교하여 열역학적으로 덜 안정한 1개의 5' 말단을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 3' 말단에서 평활 말단 및 안티센스 가닥의 3' 말단에서 오버행을 포함하는 비대칭 올리고뉴클레오타이드가 제공된다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥 상의 3' 오버행은 1-8개 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 뉴클레오타이드 길이)이다.

[0104]

전형적으로, RNAi에 대한 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 (가이드) 가닥의 3' 말단 상에 2개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖는다. 그러나, 다른 오버행이 가능하다. 일부 실시양태에서, 오버행은 1 내지 6개 뉴클레오타이드, 임의적으로 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 6개 뉴클레오타이드, 또는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오타이드 길이를 포함하는 3' 오버행이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 오버행은 1 내지 6개 뉴클레오타이드, 임의적으로 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 6개 뉴클레오타이드, 또는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오타이드 길이를 포함하는 5' 오버행이다.

[0105]

일부 실시양태에서, 센스 및/또는 안티센스 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단의 1개 이상의 (예를 들어, 2, 3, 4개) 말단 뉴클레오타이드가 변형된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단의 1 또는 2개의 말단

뉴클레오티드가 변형된다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단에서 마지막 뉴클레오티드가 변형되고, 예를 들어 2'-변형, 예를 들어 2'-O-메톡시에틸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단에서 마지막 1 또는 2개의 말단 뉴클레오티드는 표적에 대해 상보성이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단에서 마지막 1 또는 2개의 뉴클레오티드는 표적에 대해 상보성이 아니다.

[0106] 일부 실시양태에서, 3' 말단 센스 가닥에 닉킹된(nicked) 테트라루프 구조체, 및 그의 안티센스 가닥의 3' 말단에 2개의 말단 오버행 뉴클레오티드를 갖는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드가 제공된다. 일부 실시양태에서, 2개의 말단 오버행 뉴클레오티드는 GG이다. 전형적으로, 안티센스 가닥의 2개의 말단 GG 뉴클레오티드 중 1개 또는 둘 다는 표적에 대해 상보성이거나 또는 아니다.

[0107] 일부 실시양태에서, 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 말단 및/또는 3' 말단은 역전된 캡 뉴클레오티드를 갖는다.

[0108] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개) 변형된 뉴클레오티드간 연결이 센스 및/또는 안티센스 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단의 말단 뉴클레오티드들 사이에 제공된다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드간 연결이 센스 및/또는 안티센스 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단에서 오버행 뉴클레오티드들 사이에 제공된다.

[0109] e. 미스매치

[0110] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 센스 및 안티센스 가닥 사이에 1개 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개) 미스매치를 가질 수 있다. 센스 및 안티센스 가닥 사이에 1개 초과 미스매치가 있다면, 이들은 상보성 영역에 걸쳐 연속하여 (예를 들어, 연이어 2, 3개 이상) 또는 산재하여 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 3' - 말단은 1개 이상의 미스매치를 함유한다. 한 실시양태에서, 2개의 미스매치가 센스 가닥의 3' 말단에 포함된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥의 3'-말단에서 염기 미스매치 또는 세그먼트 탈안정화는 가능하게는 다이에 의한 가공을 촉진시킴으로써 RNAi에서 합성 듀플렉스의 효능을 개선시켰다.

[0111] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 상응하는 전사체 서열과 비교하여 1개 이상의 미스매치를 함유하는 HBsAg 전사체에 대한 상보성 영역을 가질 수 있다. 적절한 혼성화 조건하에 전사체와 상보성 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 올리고뉴클레오티드 상의 상보성 영역은 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하 등의 미스매치를 가질 수 있다. 대안적으로, 적절한 혼성화 조건하에 HBsAg mRNA와 상보성 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 올리고뉴클레오티드 상의 상보성 영역은 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하 또는 5개 이하의 미스매치를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역에 1개 초과 미스매치가 있는 경우, 올리고뉴클레오티드가 적절한 혼성화 조건하에 HBsAg mRNA와 상보성 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 이들은 상보성 영역에 걸쳐 연속하여 (예를 들어, 연이어 2, 3, 4개 이상) 또는 산재하여 위치할 수 있다.

[0112] iii. 단일-가닥 올리고뉴클레오티드

[0113] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 HBsAg 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드는 HBsAg mRNA에 대해 상보성인 단일-가닥 올리고뉴클레오티드이다. 이러한 구조체에는 단일-가닥 RNAi 올리고뉴클레오티드가 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 최근의 노력은 단일-가닥 RNAi 올리고뉴클레오티드의 활성을 입증하였다 (예를 들어, Matsui *et al.* (May 2016), Molecular Therapy, Vol. 24(5), 946-955 참고). 그러나, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASOs)이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5'에서 3' 방향으로 쓰여질 때 특정한 핵산의 표적화된 세그먼트의 역 상보체를 포함하는 핵염기 서열을 갖는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드이며, (예를 들어, 갱머로서) 세포에서 그의 표적 RNA의 RNaseH 매개된 절단을 유도하기 위해 또는 (예를 들어, 믹스머로서) 세포에서 표적 mRNA의 번역을 억제하기 위해 적합하게 변형된다. 본 개시내용에서 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방식으로, 예를 들어 미국 특허 번호 9,567,587에 기재된 바와 같이 변형될 수 있으며, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 변형 (예를 들어, 길이, 핵염기 (피리미딘, 퓨린)의 당 모이어티, 및 핵염기의 헤테로시클릭 부분의 변경)과 관련된 그의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다. 추가로, 안티센스 분자는 특이적 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위해 수십년 동안 사용되어 왔다 (예를 들어, Bennett *et al.*; Pharmacology of Antisense Drugs, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Vol. 57: 81-105 참고).

[0114] iv. 올리고뉴클레오티드 변형

[0115] 올리고뉴클레오티드는 특이성, 안정성, 전달, 생체이용률, 뉴클레아제 분해로부터의 내성, 면역원성, 염기-쌍 형성 성질, RNA 분포 및 세포 흡수, 및 치료 또는 연구 사용과 관련된 다른 특징을 개선시키거나 또는 조절하기

위해 다양한 방식으로 변형될 수 있다. 예를 들어, [Bramsen *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, 2867-2881; Bramsen and Kjems (*Frontiers in Genetics*, 3 (2012): 1-22)]를 참고한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 적합한 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 그의 염기 (또는 핵염기), 당 (예를 들어, 리보스, 데옥시리보스), 또는 포스페이트 기에서 변형을 갖는다.

[0116] 올리고뉴클레오타이드 상에서 변형의 개수 및 이들 뉴클레오타이드 변형의 위치는 올리고뉴클레오타이드의 성질에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 그들을 지질 나노입자 (LNP) 또는 유사한 담체에 접합시키거나 또는 포함시킴으로써 생체내로 전달될 수 있다. 그러나, 올리고뉴클레오타이드가 LNP 또는 유사한 담체에 의해 보호되지 않을 경우에는, 그의 뉴클레오타이드의 적어도 일부가 변형되는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 임의의 올리고뉴클레오타이드의 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 모든 또는 실질적으로 모든 뉴클레오타이드가 변형된다. 특정 실시양태에서, 절반이 넘는 뉴클레오타이드가 변형된다. 특정 실시양태에서, 절반 미만의 뉴클레오타이드가 변형된다. 전형적으로, 네이키드 전달에 의해, 모든 당이 2'-위치에서 변형된다. 이들 변형은 가역적일 수 있거나 또는 비가역적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 원하는 특징 (예를 들어, 효소적 분해로부터의 보호, 생체내 투여 후에 원하는 세포를 표적화하는 능력, 및/또는 열역학적 안정성)을 유발하기에 충분한 개수 및 유형의 변형된 뉴클레오타이드를 갖는다.

[0117] a. 당 변형

[0118] 일부 실시양태에서, 변형된 당 (본원에서 당 유사체로도 지칭됨)은 예를 들어 1개 이상의 변형이 당의 2', 3', 4' 및/또는 5' 탄소 위치에서 발생하는 것인 변형된 데옥시리보스 또는 리보스 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 당은 또한 비천연의 대안적인 탄소 구조체, 예컨대 록킹된 핵산 ("LNA") (예를 들어, Koshkin *et al.* (1998), *Tetrahedron* 54, 3607-3630 참고), 록킹되지 않은 핵산 ("UNA") (예를 들어, Snead *et al.* (2013), *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2, e103 참고), 및 브릿지된 핵산 ("BNA") (예를 들어, Imanishi and Obika (2002), *The Royal Society of Chemistry, Chem. Commun.*, 1653-1659 참고)에 존재하는 것들을 포함할 수 있다. [Koshkin *et al.*, Snead *et al.*, 및 Imanishi and Obika]는 당 변형에 관한 그들의 개시내용에 대해 본원에 참고로 포함된다.

[0119] 일부 실시양태에서, 당에서의 뉴클레오타이드 변형은 2'-변형을 포함한다. 2'-변형은 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산일 수 있다. 전형적으로, 변형은 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 또는 2'-O-메톡시에틸이다. 일부 실시양태에서, 당에서의 변형은 당 고리의 변형을 포함하고, 이는 당 고리의 1개 이상의 탄소의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드의 당의 변형은 당의 2'-산소가 당의 1'-탄소 또는 4'-탄소에 연결되거나 또는 에틸렌 또는 메틸렌 브릿지를 통해 2'-산소가 1'-탄소 또는 4'-탄소에 연결되는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-탄소와 3'-탄소의 결합이 결여된 아시클릭 당을 갖는다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 예를 들어 당의 4' 위치에서 티올 기를 갖는다.

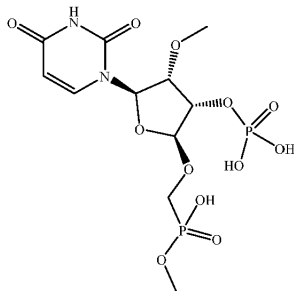
[0120] 일부 실시양태에서, 말단의 3'-말단 기 (예를 들어, 3'-히드록실)는 포스페이트 기 또는 다른 기이고, 예를 들어 링커, 어댑터 또는 표지를 부착시키기 위해 또는 올리고뉴클레오타이드를 또 다른 핵산에 직접적으로 라이게이션시키기 위해 사용될 수 있다.

[0121] b. 5' 말단 포스페이트

[0122] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 포스페이트 기는 아르고너트 2와의 상호작용을 증강시킨다. 그러나, 5'-포스페이트 기를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 포스파타제 또는 다른 효소를 통해 분해되기 쉬울 수 있고, 이는 생체 내에서 그들의 생체이용률을 제한할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이러한 분해에 대해 내성인 5' 포스페이트의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸포스포네이트, 비닐포스포네이트, 또는 말로닐포스포네이트일 수 있다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 가닥의 5' 말단은 천연 5'-포스페이트 기의 정전기적 및 입체적 성질을 모방하는 화학적 모이어티 ("포스페이트 모방체")에 부착된다 (예를 들어, Prakash *et al.* (2015), *Nucleic Acids Res.*, *Nucleic Acids Res.* 2015 Mar 31; 43(6): 2993-3011 참고, 포스페이트 유사체에 관한 내용은 본원에 참고로 포함됨). 5' 말단에 부착될 수 있는 여러 포스페이트 모방체가 개발되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,927,513 참고, 포스페이트 유사체에 관한 내용은 본원에 참고로 포함됨). 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 대한 다른 변형이 개발되었다 (예를 들어, WO 2011/133871 참고, 포스페이트 유사체에 관한 내용은 본원에 참고로 포함됨). 특정 실시양태에서, 히드록실 기는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 부착된다.

[0123] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 당의 4'-탄소 위치에서 포스페이트 유사체 ("4'-포스페이트 유사체"로 지칭됨)를 갖는다. 예를 들어, 2016년 9월 2일에 출원한, "4'-포스페이트 유사체 및 그를 포함하는 올리고뉴클레오타이드"의 명칭을 갖는 미국 가출원 번호 62/383,207, 및 2016년 9월 12일에 출원한, "4'-포스페이트 유사체 및 그를 포함하는 올리고뉴클레오타이드"의 명칭을 갖는 62/393,401을 참고하며, 포스페이트 유사체에 관한 이들 각각의 내용은 본원에 포함된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 5'-말단 뉴클레오타이드에 4'-포스페이트 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸 기의 산소 원자가 (예를 들어, 그의 4'-탄소에서) 당 모이어티에 결합되어 있는 옥시메틸포스포네이트 또는 그의 유사체이다. 다른 실시양태에서, 4'-포스페이트 유사체는 티오메틸 기의 황 원자 또는 아미노메틸 기의 질소 원자가 당 모이어티의 4'-탄소에 결합되어 있는 티오메틸포스포네이트 또는 아미노메틸포스포네이트, 또는 그의 유사체이다. 특정 실시양태에서, 4'-포스페이트 유사체는 옥시메틸포스포네이트이다. 일부 실시양태에서, 옥시메틸포스포네이트는 화학식 $-O-CH_2-PO(OH)_2$ 또는 $-O-CH_2-PO(OR)_2$ 로 표현되며, 여기서 R은 H, CH_3 , 알킬 기, CH_2CH_2CN , $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCH_2CH_2Si(CH_3)_3$, 또는 보호기로부터 독립적으로 선택된다. 특정 실시양태에서, 알킬 기는 CH_2CH_3 이다. 더욱 전형적으로, R은 H, CH_3 또는 CH_2CH_3 으로부터 독립적으로 선택된다.

[0124] 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드에 부착된 포스페이트 유사체는 메톡시 포스포네이트 (MOP)이다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드에 부착된 포스페이트 유사체는 5' 모노-메틸 보호된 MOP이다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 가이드 (안티센스) 가닥의 제1 위치에 포스페이트 유사체를 포함하는 하기 우리딘 뉴클레오타이드가 사용될 수 있고:



[0125]

[0126] 변형된 뉴클레오타이드는 [Me포스포네이트-40-mU] 또는 5'-메톡시, 포스포네이트-4'옥시- 2'-O-메틸우리딘으로 지칭된다.

[0127] c. 변형된 뉴클레오타이드간 연결

[0128] 일부 실시양태에서, 포스페이트 변형 또는 치환은 적어도 1개의 (예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3 또는 적어도 5개) 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나는 1 내지 10개의 (예를 들어, 1 내지 10, 2 내지 8, 4 내지 6, 3 내지 10, 5 내지 10, 1 내지 5, 1 내지 3 또는 1 내지 2개) 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다.

[0129] 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결, 포스포로티오에이트 연결, 포스포트리에스테르 연결, 티오노알킬포스포네이트 연결, 티오노알킬포스포트리에스테르 연결, 포스포아미다이트 연결, 포스포네이트 연결 또는 보라노포스페이트 연결일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나의 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이다.

[0130] d. 염기 변형

[0131] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 1개 이상의 변형된 핵염기를 갖는다. 일부 실시양태에서, 변형된 핵염기 (본원에서 염기 유사체로도 지칭됨)는 뉴클레오타이드 당 모이어티의 1' 위치에서 연결된다. 특정 실시양태에서, 변형된 핵염기는 질소성 염기이다. 특정 실시양태에서, 변형된 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, 미국 공개 특허 출원 번호 20080274462를 참고한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 보편적 염기를 포함한다. 그러나, 특정 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 핵염기를 함유하지 않는다 (무염기).

- [0132] 일부 실시양태에서, 보편적 염기는 변형된 뉴클레오타이드에서 뉴클레오타이드 당 모이어티의 1' 위치에 또는 뉴클레오타이드 당 모이어티 치환에서 동등한 위치에 위치하는 헤테로시클릭 모이어티이며, 이는 듀플렉스로 존재할 때 듀플렉스의 구조를 실질적으로 변경시키지 않고 1가지 유형 초과 염기에 대항하여 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산에 대해 완전히 상보성인 기준 단일-가닥 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)과 비교하여, 보편적 염기를 함유하는 단일-가닥 핵산은 상보성 핵산과 함께 형성된 듀플렉스보다 낮은 T_m 을 갖는, 표적 핵산과의 듀플렉스를 형성한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 보편적 염기가 단일 미스매치를 생성하도록 하는 염기로 대체된 기준 단일-가닥 핵산과 비교하여, 보편적 염기를 함유하는 단일-가닥 핵산은 미스매치된 염기를 포함하는 핵산과 함께 형성된 듀플렉스보다 높은 T_m 을 갖는, 표적 핵산과의 듀플렉스를 형성한다.
- [0133] 보편적-결합 뉴클레오타이드의 비제한적인 예에는 이노신, 1- β -D-리보푸라노실-5-니트로인돌, 및/또는 1- β -D-리보푸라노실-3-니트로피롤이 포함된다 (Quay 등의 미국 특허 출원 공개 번호 20070254362; Van Aerschot *et al.*, An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside. *Nucleic Acids Res.* 1995 Nov 11;23(21):4363-70; Loakes *et al.*, 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR. *Nucleic Acids Res.* 1995 Jul 11;23(13):2361-6; Loakes and Brown, 5-Nitroindole as an universal base analogue. *Nucleic Acids Res.* 1994 Oct 11;22(20):4039-43. 이들 각각은 염기 변형에 관한 그들의 개시내용에 대해 본원에 참고로 포함됨).
- [0134] **e. 가역적인 변형**
- [0135] 표적 세포에 도달하기 전에 생체내 환경으로부터 올리고뉴클레오타이드를 보호하기 위한 특정한 변형이 이루어질 수 있지만, 이는 올리고뉴클레오타이드가 표적 세포의 시토졸에 도달하였을 때 그의 효능 또는 활성을 감소시킬 수 있다. 분자가 세포 밖에서 바람직한 성질을 유지하도록 하는 가역적인 변형이 이루어질 수 있고, 이는 세포의 시토졸 환경에 들어갈 때 제거된다. 가역적인 변형은 예를 들어 세포내 효소의 작용에 의해 또는 세포 내의 화학적 조건에 의해 (예를 들어, 세포내 글루타티온에 의한 감소를 통해) 제거될 수 있다.
- [0136] 일부 실시양태에서, 가역적으로 변형된 뉴클레오타이드는 글루타티온-민감성 모이어티를 포함한다. 전형적으로, 뉴클레오타이드간 디포스페이트 연결에 의해 생성된 음의 전하를 차폐시키고, 세포 흡수 및 뉴클레아제 내성을 개선시키기 위해, 핵산 분자를 시클릭 디설파이드 모이어티에 의해 화학적으로 변형시켰다. 트라베르사 테라퓨틱스, 인크.(Traversa Therapeutics, Inc.) ("Traversa")에게 원래 양도된 미국 공개 출원 번호 2011/0294869, 솔스티스 바이올로지스, 리미티드(Solstice Biologics, Ltd.) ("Solstice")에게 양도된 PCT 공개 번호 WO 2015/188197, [Meade *et al.*, *Nature Biotechnology*, 2014,32:1256-1263] ("Meade"), 머크 샤프 앤 돔 코퍼레이션(Merck Sharp & Dohme Corp)에게 양도된 PCT 공개 번호 WO 2014/088920을 참고하며, 이들 각각은 이러한 변형에 관한 그들의 개시내용에 대해 참고로 포함된다. 뉴클레오타이드간 디포스페이트 연결의 이러한 가역적인 변형은 시토졸의 환원 환경 (예를 들어 글루타티온)에 의해 세포 내에서 절단되도록 설계된다. 초기의 예에는 세포 내에서 절단가능한 것으로 보고된 포스포트리에스테르 변형을 중화시키는 것이 포함된다 (Dellinger *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 2003,125:940-950).
- [0137] 일부 실시양태에서, 이러한 가역적인 변형은 올리고뉴클레오타이드가 뉴클레아제 및 다른 혹독한 환경 조건 (예를 들어, pH)에 노출되는 생체내 투여 (예를 들어, 혈액 및/또는 세포의 리소좀/엔도솜 구획을 통한 이동) 동안에 보호를 가능하게 한다. 글루타티온 수준이 세포의 공간에 비해 높은 세포의 시토졸로 방출될 때, 변형이 역전되고, 결과는 절단된 올리고뉴클레오타이드이다. 가역적인 글루타티온 민감성 모이어티를 사용하면, 비가역적인 화학적 변형을 사용하여 이용가능한 옵션과 비교하여 입체적으로 더 큰 화학적 기를 관심 올리고뉴클레오타이드에 도입시키는 것이 가능하다. 이는 이들 더 큰 화학적 기가 시토졸에서 제거될 것이고, 따라서 세포의 시토졸 내에서 올리고뉴클레오타이드의 생물학적 활성을 방해하지 않아야 하기 때문이다. 결과적으로, 이들 더 큰 화학적 기는 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 대해 다양한 이점, 예컨대 뉴클레아제 내성, 친유성, 전하, 열안정성, 특이성, 및 감소된 면역원성을 부여하도록 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티의 구조는 그의 방출 동역학을 변경시키도록 조작될 수 있다.
- [0138] 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 뉴클레오타이드의 당에 부착된다. 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 변형된 뉴클레오타이드의 당의 2' 탄소에 부착된다. 일부 실시양태에서, 특히 변형된 뉴클레오타이드가 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 뉴클레오타이드일 때, 글루타티온-민감성 모이어티는 당의 5'-탄소에 위치한다. 일부 실시양태에서, 특히 변형된 뉴클레오타이드가 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단 뉴클레오타이드일 때, 글루타티온-민감성 모이어티는 당의 3'-탄소에 위치한다. 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 술폰닐 기를 포함한다. 예를 들어, 2016년 8월 23일에 출원한, "가역적으로 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함

하는 조성물 및 그의 용도"의 명칭을 갖는 미국 가출원 번호 62/378,635를 참고하며, 그의 관련 개시내용에 대한 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0139] **v. 표적화 리간드**

[0140] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드를 하나 이상의 세포 또는 하나 이상의 장기에 대해 표적화하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 전략은 다른 장기에서 바람직하지 않은 효과를 피하는데 도움이 될 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오타이드로부터 이익을 얻지 않는 세포, 조직 또는 장기로의 올리고뉴클레오타이드의 과도한 손실을 피할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 특정한 조직, 세포 또는 장기의 표적화를 용이하게 하도록, 예를 들어 간으로 올리고뉴클레오타이드의 전달을 용이하게 하도록 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 간의 간세포로 올리고뉴클레오타이드의 전달을 용이하게 하도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 1개 이상의 표적화 리간드에 접합된 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0141] 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 단백질의 일부 (예를 들어, 항체 또는 항체 단편) 또는 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 압타머이다. 예를 들어, 표적화 리간드는 종양 맥관구조 또는 신경교종 세포를 표적화하기 위해 사용되는 RGD 펩티드, 종양 맥관구조 또는 스토마를 표적화하기 위해 사용되는 CREKA 펩티드, CNS 맥관구조 상에서 발현된 트랜스페린 수용체를 표적화하기 위해 사용되는 트랜스페린, 락토페린 또는 압타머, 또는 신경교종 세포 상의 EGFR을 표적화하기 위해 사용되는 항-EGFR 항체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적화 리간드는 1개 이상의 GalNAc 모이어티이다.

[0142] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 1개 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개) 뉴클레오타이드 각각은 별도의 표적화 리간드에 접합된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 2 내지 4개 뉴클레오타이드 각각은 별도의 표적화 리간드에 접합된다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드가 칫솔의 강모와 유사하고, 올리고뉴클레오타이드가 칫솔과 유사하도록, 표적화 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 말단에서 2 내지 4개 뉴클레오타이드에 접합된다 (예를 들어, 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 또는 3' 말단 상의 2 내지 4개 뉴클레오타이드 오버행 또는 연장부에 접합됨). 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 센스 가닥의 5' 또는 3' 말단에서 스템-루프를 포함할 수 있고, 스템의 루프의 1, 2, 3 또는 4개 뉴클레오타이드는 표적화 리간드에 개별적으로 접합될 수 있다.

[0143] 일부 실시양태에서, HBV 항원의 발현을 감소시키는 올리고뉴클레오타이드를 대상체의 간의 간세포에 대해 표적화시키는 것이 바람직하다. 임의의 적합한 간세포 표적화 모이어티가 이 목적을 위해 사용될 수 있다.

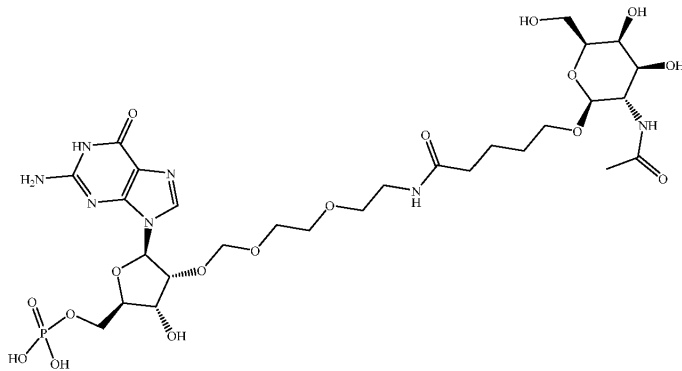
[0144] GalNAc는 간세포의 동모양 표면에서 주로 발현되고, 말단 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유하는 순환 당단백질 (아시알로당단백질)의 결합, 내재화 및 후속적인 제거에서 주요 역할을 하는 아시알로당단백질 수용체 (ASGPR)에 대한 고친화도 리간드이다. GalNAc 모이어티와 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드의 (간접적인 또는 직접적인) 접합은 이들 올리고뉴클레오타이드를 이들 간세포 세포 상에서 발현된 ASGPR에 대해 표적화하기 위해 이용될 수 있다.

[0145] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드는 1가 GalNAc에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 1개 초과 1가 GalNAc에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된다 (즉, 2, 3 또는 4개의 1가 GalNAc 모이어티에 접합되고, 전형적으로 3 또는 4개의 1가 GalNAc 모이어티에 접합됨). 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드는 1개 이상의 2가 GalNAc, 3가 GalNAc, 또는 4가 GalNAc 모이어티에 접합된다.

[0146] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 1개 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개) 뉴클레오타이드 각각은 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스템-루프의 루프 (L)의 2 내지 4개 뉴클레오타이드 각각은 별도의 GalNAc에 접합된다. 일부 실시양태에서, GalNAc 모이어티가 칫솔의 강모와 유사하고, 올리고뉴클레오타이드가 칫솔과 유사하도록, 표적화 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 말단에서 2 내지 4개 뉴클레오타이드에 접합된다 (예를 들어, 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 또는 3' 말단 상에서 2 내지 4개 뉴클레오타이드 오버행 또는 연장부에 접합됨). 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 센스 가닥의 5' 또는 3' 말단에서 스템-루프를 포함하고, 스템의 루프의 1, 2, 3 또는 4개 뉴클레오타이드는 GalNAc 모이어티에 개별적으로 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, GalNAc 모이어티는 센스 가닥의 뉴클레오타이드에 접합된다. 예를 들어, 4개의 GalNAc 모이어티가 센스 가닥의 테트라루프에서 뉴클레오타이드에 접합될 수 있고, 각각의 GalNAc 모이어티는 1개의 뉴클레오타

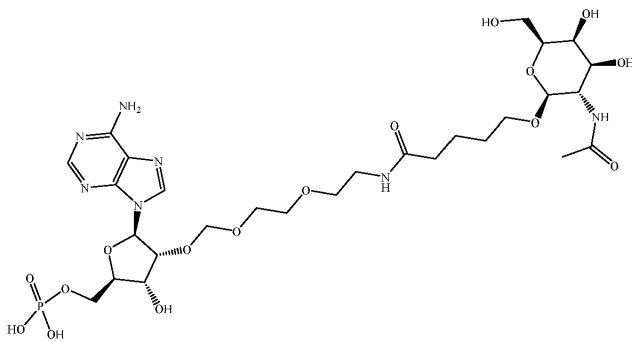
드에 접합된다.

[0147] 일부 실시양태에서, 본원에서 올리고뉴클레오타이드는 하기 도시된 바와 같이 [ademG-GalNAc] 또는 2'-아미노디에톡시메탄올-구아니딘-GalNAc로 지칭되는, 구아니딘 뉴클레오타이드에 부착된 1가 GalNAc를 포함한다:



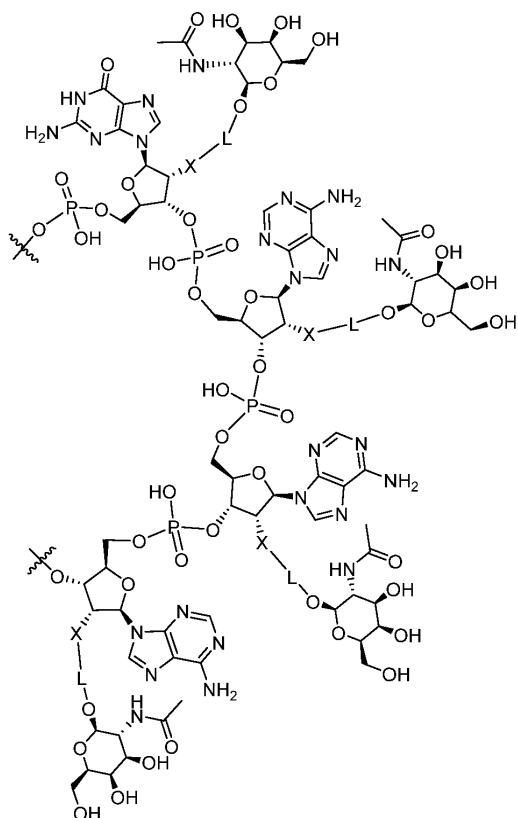
[0148]

[0149] 일부 실시양태에서, 본원의 올리고뉴클레오타이드는 하기 도시된 바와 같이 [ademA-GalNAc] 또는 2'-아미노디에톡시메탄올-아데닌-GalNAc로 지칭되는, 아데닌 뉴클레오타이드에 부착된 1가 GalNAc를 포함한다.



[0150]

[0151] 5'에서 3'으로 뉴클레오타이드 서열 GAAA를 포함하는 루프에 대해 이러한 접합의 예가 하기에 도시되며 (L = 링커, X = 헤테로원자), 스템 부착점이 도시된다. 이러한 루프는 예를 들어 도 1A에 도시된 분자의 위치 27-30에 존재할 수 있다. 화학식에서, 는 올리고뉴클레오타이드 가닥에 대한 부착점이다.



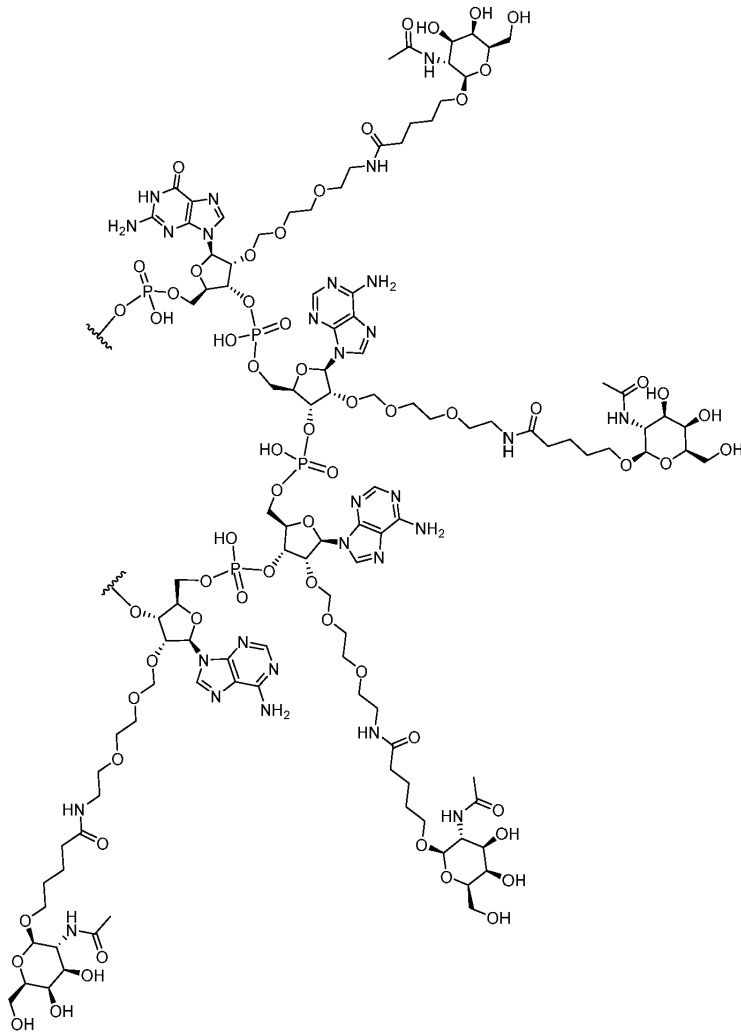
[0152]

[0153]

적절한 방법 또는 화학 (예를 들어, 클릭 화학)을 이용하여 표적화 리간드를 뉴클레오타이드에 연결시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 클릭 링커를 이용하여 표적화 리간드를 뉴클레오타이드에 접합시킨다. 일부 실시양태에서, 아세탈-기반 링커를 이용하여 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나의 뉴클레오타이드에 표적화 리간드를 접합시킨다. 아세탈-기반 링커는 예를 들어 2016년 6월 23일에 출원한 국제 특허 출원 공개 번호 WO2016100401 A1에 개시되어 있으며, 이러한 링커에 관한 내용은 본원에 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, 링커는 불안정한 링커이다. 그러나, 다른 실시양태에서, 링커는 상당히 안정하다.

[0154]

5'에서 3'으로 뉴클레오타이드 GAAA를 포함하는 루프에 대한 예가 하기에 도시되고, 여기서 GalNac 모이어티는 아세탈 링커를 이용하여 루프의 뉴클레오타이드에 접합된다. 이러한 루프는 예를 들어 도 10에 도시된 분자의 위치 27-30에 존재할 수 있다. 화학식에서, --- 는 올리고뉴클레오타이드 가닥에 대한 부착점이다.



[0155]

[0156]

III. 제형

[0157]

올리고뉴클레오타이드 사용을 용이하게 하기 위해 다양한 제형이 개발되었다. 예를 들어, 분해를 최소화하거나, 전달 및/또는 흡수를 용이하게 하거나, 또는 제형에서 올리고뉴클레오타이드에 대해 또 다른 유익한 성질을 제공하는 제형을 이용하여 올리고뉴클레오타이드를 대상체 또는 세포 환경으로 전달할 수 있다. 일부 실시양태에서, HBV 항원 (예를 들어, HBsAg)의 발현을 감소시키기 위해 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 단일-가닥 또는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드)를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 이러한 조성물은 표적 세포의 직면한 환경으로 또는 전신으로 대상체에게 투여될 때 올리고뉴클레오타이드의 충분한 부분이 세포에 들어가서 HBV 항원 발현을 감소시키도록 적합하게 제형화될 수 있다. 임의의 다양한 적합한 올리고뉴클레오타이드 제형을 이용하여 본원에 개시된 바와 같이 HBV 항원의 감소를 위해 올리고뉴클레오타이드를 전달할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 완충제 용액, 예컨대 인산염 완충된 식염수 용액, 리포솜, 미셀 구조체, 및 캡시드 중에서 제형화된다.

[0158]

양이온성 지질을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 제형을 이용하여 올리고뉴클레오타이드가 세포에 트랜스펙션되는 것을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 양이온성 지질, 예컨대 리포펙션, 양이온성 글리세롤 유도체, 및 다가 양이온성 분자 (예를 들어, 폴리리신)를 이용할 수 있다. 적합한 지질에는 올리고펙타민, 리포펙타민 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies)), NC388 (리보자임 파마슈티컬즈, 인크.(Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.)), 콜로라도주 볼더), 또는 퓨진(FuGene) 6 (로셰(Roche))이 포함되고, 이들 모두는 제조자의 지침에 따라 사용될 수 있다.

[0159]

따라서, 일부 실시양태에서, 제형은 지질 나노입자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 부형제는 리포솜, 지질, 지질 복합체, 미세구, 미세입자, 나노구, 또는 나노입자를 포함하거나, 또는 그를 필요로 하는 대상체의 세포, 조직, 장기 또는 신체에 투여하기 위해 달리 제형화될 수 있다 (예를 들어, Remington: The Science and

Practice of Pharmacy, 22nd edition, Pharmaceutical Press, 2013 참고).

- [0160] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제형은 부형제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 부형제는 조성물에게 활성 성분의 개선된 안정성, 개선된 흡수, 개선된 가용성 및/또는 치료적 증강을 부여한다. 일부 실시양태에서, 부형제는 완충제 (예를 들어, 시트르산나트륨, 인산나트륨, 트리스 염기, 또는 수산화나트륨) 또는 비히클 (예를 들어, 완충된 용액, 바셀린, 디메틸 술폰, 또는 광유)이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 그의 보관 수명을 연장시키기 위해 동결건조된 다음, 사용하기 (예를 들어, 대상체에게 투여하기) 전에 용액으로 만들어진다. 따라서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나를 포함하는 조성물 중의 부형제는 동결 건조보호제 (예를 들어, 만니톨, 락토스, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 폴리비닐 피롤리돈), 또는 붕괴 온도 조정제 (예를 들어, 텍스트란, 피콜 또는 젤라틴)일 수 있다.
- [0161] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 그의 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화된다. 투여 경로의 예에는 비경구, 예를 들어, 정맥내, 피내, 피하, 경구 (예를 들어, 흡입), 경피 (국소), 경점막 및 직장 투여가 포함된다.
- [0162] 주사 용도에 적합한 제약 조성물은 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위해 멸균 수성 용액 (수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체에는 생리 식염수, 정균수, 크레모포어(Cremophor) EL.TM. (바스프(BASF), 뉴저지주 파시패니) 또는 인산염 완충된 식염수 (PBS)가 포함된다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리에틸렌 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 여러 경우에, 조성물 중에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨 및 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 멸균성 주사 용액은 선택된 용매 중에 필요한 양의 올리고뉴클레오타이드를 필요에 따라 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 그들의 조합물과 함께 도입시킨 후에, 멸균 여과시킴으로써 제조될 수 있다.
- [0163] 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 약 0.1%의 치료제 (예를 들어, HBV 항원 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오타이드) 또는 그 초과를 함유할 수 있지만, 활성 성분(들)의 백분율은 총 조성물의 중량 또는 부피의 약 1% 내지 약 80% 또는 그 초과일 수 있다. 가용성, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 보관 수명, 뿐만 아니라 다른 약리학적 고려사항과 같은 인자가 이러한 제약 제형의 제조에 관련된 기술분야의 기술자에 의해 고려될 것이고, 따라서 다양한 용량 및 치료 레지멘이 바람직할 수 있다.
- [0164] 수많은 실시양태가 본원에 개시된 임의의 올리고뉴클레오타이드의 간-표적화된 전달에 관한 것이지만, 다른 조직의 표적화 또한 고려된다.
- [0165] **IV. 사용 방법**
- [0166] **i. HBsAg 발현의 감소**
- [0167] 일부 실시양태에서, HBsAg의 발현을 감소시키기 위한 목적으로 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나의 유효량을 세포에 전달하는 방법이 제공된다. 본원에 제공된 방법은 임의의 적절한 세포 유형에서 유용하다. 일부 실시양태에서, 세포는 HBV 항원을 발현하는 임의의 세포 (예를 들어, 간세포, 대식세포, 단핵구-유래된 세포, 전립선암 세포, 뇌, 내분비 조직, 골수, 림프절, 폐, 담낭, 간, 십이지장, 소장, 췌장, 신장, 위장관, 방광, 지방 및 연조직 및 피부의 세포)이다. 일부 실시양태에서, 세포는 대상체로부터 수득되고 제한된 횟수의 계대를 겪을 수 있는 일차 세포이며, 따라서 세포는 그의 천연의 표현형 성질을 실질적으로 유지한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드가 전달되는 세포는 생체의 또는 시험관내에 있다 (즉, 배양물 중의 세포에 또는 세포가 존재하는 유기체에 전달될 수 있음). 구체적인 실시양태에서, 간세포에서 HBsAg의 발현만을 감소시키기 위한 목적으로 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나의 유효량을 세포에 전달하는 방법이 제공된다.
- [0168] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 용액의 주사, 올리고뉴클레오타이드로 피복된 입자의 충격, 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 용액에 세포 또는 유기체의 노출, 또는 올리고뉴클레오타이드의 존재하에 세포 막의 전기천공을 비롯하여 적절한 핵산 전달 방법을 이용하여 도입될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드를 세포에 전달하는 다른 적절한 방법, 예컨대 지질-매개된 담체 수송, 화학물질-매개된 수송, 및 양이온성 리포좀 트랜스펙션, 예컨대 인산칼슘 등이 이용될 수 있다.
- [0169] 억제 결과는 세포 또는 대상체의 하나 이상의 성질을 평가하기 위한 적절한 검정에 의해, 또는 HBV 항원 발현을 나타내는 분자 (예를 들어, RNA, 단백질)를 평가하는 생화학적 기술에 의해 확인될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드가 HBV 항원의 발현 수준을 감소시키는 정도는 HBV 항원의 발현 수준 (예를 들어, mRNA 또는 단백질 수준)을 적절한 대조군 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드가 전달되지 않거나 또는 음

성 대조군이 전달된 세포 또는 세포 집단에서 HBV 항원 발현 수준)과 비교함으로써 평가된다. 일부 실시양태에서, HBV 항원 발현의 적절한 대조군 수준은 예정된 수준 또는 값일 수 있고, 따라서 대조군 수준을 매번 측정할 필요는 없다. 예정된 수준 또는 값은 다양한 형태를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 예정된 수준 또는 값은 단일 컷-오프 값, 예컨대 중간 또는 평균일 수 있다.

[0170] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드의 투여는 세포에서 HBV 항원 (예를 들어, HBsAg) 발현 수준을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, HBV 항원 발현 수준에서의 감소는 HBV 항원의 적절한 대조군 수준과 비교하여 1% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 15% 이하, 20% 이하, 25% 이하, 30% 이하, 35% 이하, 40% 이하, 45% 이하, 50% 이하, 55% 이하, 60% 이하, 70% 이하, 80% 이하, 또는 90% 이하로의 감소일 수 있다. 적절한 대조군 수준은 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단에서의 HBV 항원 발현 수준일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 따른 세포로의 올리고뉴클레오타이드의 전달 효과는 한정된 기간 후에 평가된다. 예를 들어, HBV 항원 수준은 올리고뉴클레오타이드를 세포에 도입한지 적어도 8 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간; 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105, 112, 119, 126, 133, 140 또는 147 일 후에 세포에서 분석될 수 있다.

[0171] 일부 실시양태에서, HBV 항원 (예를 들어, HBsAg) 발현 수준에서의 감소는 투여후 연장된 기간 동안 지속된다. 일부 실시양태에서, HBsAg 발현에서의 검출가능한 감소는 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드의 투여후 7 내지 70 일의 기간 내에 지속된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 검출가능한 감소는 올리고뉴클레오타이드의 투여후 10 내지 70, 10 내지 60, 10 내지 50, 10 내지 40, 10 내지 30, 또는 10 내지 20 일의 기간 내에 지속된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 감소는 올리고뉴클레오타이드의 투여후 20 내지 70, 20 내지 60, 20 내지 50, 20 내지 40, 또는 20 내지 30 일의 기간 내에 지속된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 감소는 올리고뉴클레오타이드의 투여후 30 내지 70, 30 내지 60, 30 내지 50, 또는 30 내지 40 일의 기간 내에 지속된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 감소는 올리고뉴클레오타이드의 투여후 40 내지 70, 40 내지 60, 40 내지 50, 50 내지 70, 50 내지 60, 또는 60 내지 70 일의 기간 내에 지속된다.

[0172] 일부 실시양태에서, HBsAg 발현에서의 검출가능한 감소는 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드의 투여후 2 내지 21 주의 기간 내에 지속된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 검출가능한 감소는 올리고뉴클레오타이드의 투여후 2 내지 20, 4 내지 20, 6 내지 20, 8 내지 20, 10 내지 20, 12 내지 20, 14 내지 20, 16 내지 20, 또는 18 내지 20 주의 기간 내에 지속된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 감소는 올리고뉴클레오타이드의 투여후 2 내지 16, 4 내지 16, 6 내지 16, 8 내지 16, 10 내지 16, 12 내지 16, 또는 14 내지 16 주의 기간 내에 지속된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 감소는 올리고뉴클레오타이드의 투여후 2 내지 12, 4 내지 12, 6 내지 12, 8 내지 12, 또는 10 내지 12 주의 기간 내에 지속된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 감소는 올리고뉴클레오타이드의 투여후 2 내지 10, 4 내지 10, 6 내지 10, 또는 8 내지 10 주의 기간 내에 지속된다.

[0173] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 세포에서 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 그의 센스 및 안티센스 가닥)를 발현하도록 조작된 트랜스진의 형태로 전달된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 본원에 개시된 임의의 올리고뉴클레오타이드를 발현하도록 조작된 트랜스진을 이용하여 전달된다. 트랜스진은 바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 우두 바이러스, 수두 바이러스, 아데노-연관된 바이러스 또는 단순 포진 바이러스) 또는 비-바이러스 벡터 (예를 들어, 플라스미드 또는 합성 mRNA)를 이용하여 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 대상체에게 직접적으로 주사될 수 있다.

[0174] ii. 치료 방법

[0175] 본 개시내용의 측면은 대상체에서 HBV 감염의 치료를 위해 HBsAg 발현을 감소시키는 (예를 들어, HBsAg 발현의 감소) 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 이러한 감소를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나의 유효량을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 개시내용은 HBV 감염 및/또는 HBV 감염과 연관된 질환 또는 장애의 위험이 있는 (또는 그에 걸리기 쉬운) 대상체를 치료하는 예방적 및 치료적 방법 둘 다를 제공한다.

[0176] 특정 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료제 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 또는 이를 코딩하는 벡터 또는 트랜스진)를 투여함으로써 대상체에서 본원에 기재된 질환 또는 장애를 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 치료하고자 하는 대상체는 예를 들어 간에서 HBsAg 단백질 양의 감소로부터 치료적으로 이익을 얻을 것인 대상체이다. 질환 또는 장애의 위험이 있는 대상체는 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 진단 또는 예후 검정 중 하나 또는 이들의 조합에 의해 확인될 수 있다 (예를 들어, 간경변 및/또는 간 염증의 확인). 예방제의 투여는 질환 또는 장애의 특징적인 증상의 검출 또는 출현 이전에 일어날 수 있으며, 따라서 질환 또는 장

애가 예방되거나 또는 대안적으로 그의 진행이 지연된다.

[0177] 본원에 기재된 방법은 전형적으로 대상체에게 올리고뉴클레오타이드의 유효량, 즉, 바람직한 치료 결과를 생성할 수 있는 양을 투여하는 것을 수반한다. 치료적으로 허용가능한 양은 질환 또는 장애를 치료할 수 있는 양일 수 있다. 임의의 한 대상체에게 적절한 용량은 대상체의 크기, 신체 표면적, 연령, 투여되는 특정한 조성물, 조성물 중의 활성 성분(들), 투여 시간 및 경로, 전반적인 건강, 및 동시에 투여되는 다른 약물을 비롯하여 특정 인자에 따라 좌우될 것이다. 예를 들어, 용량은 0.1 mg/kg 내지 12 mg/kg의 범위일 수 있다. 용량은 또한 0.5 내지 10 mg/kg의 범위일 수 있다. 대안적으로, 용량은 1.0 내지 6.0 mg/kg의 범위일 수 있다. 용량은 또한 3.0 내지 5.0 mg/kg의 범위일 수 있다.

[0178] 일부 실시양태에서, 대상체에게 본원에 개시된 조성물 중 어느 하나를 장내로 (예를 들어, 경구로, 위 공급관에 의해, 십이지장 공급관에 의해, 위루형성술을 통해 또는 직장으로), 비경구로 (예를 들어, 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입, 동맥내 주사 또는 주입, 골내 주입, 근육내 주사, 대뇌내 주사, 뇌실내 주사, 경막내), 국소적으로 (예를 들어, 표피, 흡입, 점안제를 통해 또는 점막을 통해), 또는 표적 기관 (예를 들어, 대상체의 간)으로 직접 주사에 의해 투여한다. 전형적으로, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드를 정맥내로 또는 피하로 투여한다.

[0179] 비제한적인 예로서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 분기별로 (3 개월마다 한번), 격월로 (2 개월마다 한번), 매달 또는 매주 투여될 것이다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 1, 2 또는 3 주마다 투여될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 매일 투여될 수 있다.

[0180] 일부 실시양태에서, 치료하고자 하는 대상체는 인간 또는 비-인간 영장류 또는 다른 포유류 대상체이다. 다른 예시적인 대상체에는 길들여진 동물, 예컨대 개 및 고양이; 가축, 예컨대 말, 소, 돼지, 양, 염소 및 닭; 및 동물, 예컨대 마우스, 래트, 기니피그 및 햄스터가 포함된다.

[0181] 실시예

[0182] 실시예 1. HBsAg 발현의 강력한 올리고뉴클레오타이드 억제제의 발달

[0183] HBV 표면 항원은 HBV 감염을 치료하기 위해 RNAi-기반 요법을 위한 표적으로서 확인되었다. 도 1에 도시된 HBV 게놈 조직화에 나타난 바와 같이, HBsAg는 단일 ORF로부터 전사된 3개의 RNA 분자에 의해 코딩된다. HBsAg 어셈블리에 기여하는 1개 이상의 RNA 전사체를 침묵시키기 위한 목적으로 올리고뉴클레오타이드를 설계하였다 (예시적인 RNAi 표적 부위는 도 1에서 "X"로 표시됨). HBsAg-표적화 올리고뉴클레오타이드, HBV-254를 설계하였고, 시험관내 및 생체내에서 평가하였다. 4가지 HBV RNA 종에 대한 mRNA 전사체를 직접적으로 표적화하는 능력을 기반으로 하여 HBV-254를 선택하고 설계하였다. 실험에서 사용된 HBV-254 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드는 GUGGUGGACUUCUCUCAAUAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 23)에 제시된 서열 (5'에서 3'으로 도시됨)을 갖는 센스 가닥; 및 UAUUGAGAGAAGUCCACCACGG (서열식별번호: 24)에 제시된 서열 (5'에서 3'으로 도시됨)을 갖는 안티센스 가닥을 포함하였다.

[0184] HDI-마우스에서 올리고뉴클레오타이드 HBV-254의 단일 용량 평가를 수행하였고, HBsAg 바이러스 전사체를 피하로 표적화하는 능력을 입증하였다 (도 2). 도시된 바와 같이, HBV-254는 용량이 증가함에 따라 마우스에서 HBsAg 수준을 체계적으로 감소시켰다. HBV-254를 3 mg/kg으로 피하 투여하는 QWx3 투약 레지멘 이후에 마우스에서 임상전 효능을 추가로 평가하였다 (도 3). 투여 시점은 도면에서 화살표로 표시하였다. HBsAg 수준을 147 일에 걸친 기간 동안 올리고뉴클레오타이드 처리된 및 비처리된 대조군 마우스 모두에서 모니터링하였다. 연구 전체에 걸쳐 처리된 마우스에서는 감소된 HBsAg 수준이 지속되었고, (대조군에 비해) 발현 수준이 첫번째 투여후 대략 2 개월째에 감소된 기준선에서 정착하는 것으로 보였다.

[0185] 추가의 강력한 HBsAg-표적화 올리고뉴클레오타이드는 비변형된 테트라루프 형태를 갖는 올리고뉴클레오타이드에 의한 psiCHECK 리포터 검정을 이용하는 시험관내 스크리닝에 의해 확인하였다. 3가지 상이한 플레이트로부터의 결과가 도 4에 도시되어 있다. HBV-254를 비롯한 각각의 올리고뉴클레오타이드를 3가지 농도 (1, 10 및 100 pM)에서 형광-기반 리포터 검정을 이용하여 HeLa 세포에서 평가하였다. 각각의 플레이트에 대해 보고된 결과는 양성 대조군 (8, 40, 및 200 pM), 음성 대조군 (1 nM), 및 모의 형질감염과 비교하여 추가로 도시된다. 박스로 강조하여 도시된 올리고뉴클레오타이드는 생체내 시험을 위해 규모 증가시켰고, HBV-219 및 HBV-258은 HBV-254 및 스크리닝으로부터 확인된 것들 중에서 가장 강력한 올리고뉴클레오타이드인 것으로 확인되었다. HBV-219는 HBV-254에 비해 효능에서의 다중-로그 개선을 나타내었고, 추가의 평가를 위해 선택되었다.

[0186] 실시예 2. 서열 보존 분석, 및 전반적인 치료 유용성을 증가시키기 위한 미스매치 조작

[0187] 실시예 1에서 평가된 가장 강력한 올리고뉴클레오타이드 중 몇몇을 HBV 유전자형 A-I에 대한 게놈 서열과 비교하였다. 초기 보존 분석의 결과를 표 1에 나열하였다. 도식된 바와 같이, HBV-219는 이들 게놈에 걸쳐 비교적 낮은 % 보존을 갖는다. 그러나, 미스매치 (MM)가 가이드 가닥의 위치 15에 도입된 경우에는, % 보존이 유의하게 증가한다 (66%에서 96%로). 본원에 참고로 포함되는 진뱅크(GenBank) 공용 데이터베이스로부터의 유전자형 분석된 B형 간염 바이러스 (HBV) 서열 데이터를 생물정보학 큐레이션 및 정렬을 위해 사용하였다.

[0188] 표 1. 최고 HBV 서열에 의한 초기 보존 분석

올리고뉴클레오타이드	가이드 가닥 (MM 은 굵게 나타냄)	게놈에 걸쳐 % 보존	MM 이 용인되는 경우 % 보존
HBV-0217	UUUGUGAGGAUU UU UGUCAAGG (서열식별번호: 25)	66	97
HBV-0219	UUAUUUGUGAGGAUU UU UGUCGG (서열식별번호: 6)	66	96
HBV-0254	UCUGAGAGAAGUCCACCACGGG (서열식별번호: 26)	94	98
HBV-0255	UACUGAGAGAAGUCCACCACGG (서열식별번호: 27)	95	99
HBV-0258	UAAAA C UGAGAGAAGUCCACGG (서열식별번호: 28)	94	98

[0189]

[0190] 후속적인 보존 분석을 수행하였고, 이는 표 1로부터의 몇몇 올리고뉴클레오타이드에 집중되었고, 보다 넓은 검색 변수를 수반하였다. 예를 들어, 초기 분석에는 전장 게놈 서열만이 포함된 반면에, 집중된 분석에는 전장 및 부분 (표적 부위에 대해 >80% 동일성) 서열이 포함되었다. 추가로, 시험한 게놈의 개수는 초기 분석의 경우 5,628개에서 집중된 분석의 경우 17,000개 초과의 게놈으로 증가하였다. 집중된 분석으로부터의 결과는 초기 분석에서 관찰된 경향과 전반적으로 일치하였다 (도 20). 도 5에 도시되고 추가로 설명된 바와 같이, 가이드 가닥의 위치 15에서의 미스매치가 용인되지 않다면, HBV-219는 HBV 유전자형 B, E, F, H 및 I에 대해 불활성인 것으로 예측되었다.

[0191] 삭제

[0192] 삭제

[0193] psiCHECK-2 이중-루시페라제 리포터 시스템을 이용하여, 각각의 HBV-217, HBV-219, HBV-254, HBV-255 및 HBV-258에서 선택된 위치에서 미스매치의 효과를 평가하였다. psiCHECK 벡터는 리포터 유전자에 융합된 표적 유전자의 발현에서의 변화의 모니터링을 가능하게 하고, 활성 RNAi는 융합 구축물로 분해되어, 리포터 신호에서 상응하는 감소를 생성한다. 도 6의 도식은 이들 검정에서 이용된 벡터를 총칭적으로 도시한다. 모 부분 리포터 서열은 S ORF에서 관심 표적 부위 주변에 유전자형 A (진뱅크: AM282986.1)로부터의 120개 염기-쌍 단편을 함유하였다. 모 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스 서열은 도 6에 도시된 상응하는 부위에서 리포터 플라스미드와 100% 상동성을 갖는 반면에, 미스매치 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스 서열은 리포터 플라스미드에 대해 단일 미스매치를 갖는다. 시험한 올리고뉴클레오타이드에 대한 모 및 미스매치 서열을 상응하는 모 부분 리포터 서열에 대해 정렬하여 도 7에 도시하였다.

[0194] 예시적인 미스매치 검정의 경우, 시험한 올리고뉴클레오타이드는 동일한 변형 패턴을 포함하였다. 도 7에서 각각의 올리고뉴클레오타이드에 대해 도시된 넘버링 방식에 따라, 변형은 다음과 같다: 위치 1에서 5'-메톡시, 포스포네이트-4'-옥시-2'-O-메틸우리딘; 위치 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 및 19에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드; 위치 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18 및 20-22에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드; 및 위치 1과 2, 2와 3, 3과 4, 20과 21, 및 21과 22의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결. 미스매치된 위치는 각각의 모 및 미스매치 세트마다 상이하고, 도 7에서 박스로 나타내었다.

[0195] 각각의 올리고뉴클레오타이드에 대한 psiCHECK2 리포터 검정을 3 일 기간에 걸쳐 HeLa 세포에서 형질감염된 1 nM

에서 시작하여 6-점 5-배 계열 희석을 이용하여 수행하였다. 1 일째에, 10,000 HeLa 세포/웰 (96-웰)을 흑색벽 투명 바닥 플레이트에 시딩하였다 (80-90% 전면생장). 2 일째에, 벡터 DNA 및 RNAi 분자를 혈청이 없이 적절한 양의 옵티-MEM(Opti-MEM)® I 배지로 희석하고, 부드럽게 혼합하였다. 부드럽게 혼합한 후, 리포펙타민 (Lipofectamine)® 2000, 0.2 μ L를 각각의 반응에 대해 혈청이 없이 25 μ L의 옵티-MEM® I 배지로 희석하였다. 희석액을 부드럽게 혼합하고, 실온에서 5 분 동안 인큐베이션하였다. 5 분 인큐베이션 후에, 동등한 부피의 희석된 DNA 및 RNAi 분자를 희석된 리포펙타민® 2000과 합하였다. 합한 혼합물을 부드럽게 혼합하고, 20 분 동안 실온에서 인큐베이션하여, 복잡한 형성이 일어나게 하였다. 그 후에, DNA-RNAi 분자-리포펙타민® 2000 복합체를 세포 및 배지를 함유하는 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 앞뒤로 흔들어서 부드럽게 혼합하였다. 이어서, 세포를 수확하고 표적 유전자에 대해 검정할 준비가 될 때까지 세포를 37°C에서 CO₂ 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 3 일째에, 100 μ L의 듀얼-글로(Dual-Glo) 시약을 각각의 웰에 첨가하고, 혼합하고, 10 분 동안 인큐베이션한 후, 발광을 판독하였다. 추가의 100 μ L의 듀얼-글로 스탑 & 글로(Dual-Glo Stop & Glo)를 각각의 웰에 첨가하고, 혼합하고, 10 분 동안 인큐베이션한 후에, 발광을 판독하였다. 각각의 모 및 미스 매치 올리고뉴클레오타이드에 대해 용량-반응 곡선을 생성하여, 활성화에 대한 미스매치의 효과를 평가하였다. 각각의 올리고뉴클레오타이드에 대해 측정된 EC₅₀S 값을 추가의 설명과 함께 표 3에 도시하였다.

[0196] 표 3. HBsAg-표적화 올리고뉴클레오타이드의 미스매치 평가

	HBV-217	HBV-219	HBV-254	HBV-255	HBV-258
ORF 표적	S	S	S	S	S
센스 19 합체	TGTTGACAAGA ATCCTCACAAT (서열식별번호 : 35)	GACAAGAATCC TCACAATA (서열식별번호 : 29)	CGTGGTGGACT TCTCTCAA (서열식별번호 : 30)	TCGTGGTGGAC TTCTCTCAAT (서열식별번호 : 36)	GTGGACTTCTC TCAATTTT (서열식별번호 : 31)
모호한 염기를 갖는 센스 19 합체	TGTTGACAANA ATCCTCACAAT (서열식별번호 : 37)	GACAANAATCC TCACAATA (서열식별번호 : 32)	CGTGGTGGACT TCTCTCAN (서열식별번호 : 33)	TCGTGGTGGAC TTCTCTCANT (서열식별번호 : 38)	GTGGACTTCTC TCAATTTT (서열식별번호 : 34)
미스매치의 가이드 위치	13	15	2	3	6
% EC ₅₀ S (pM)	20	5	37	35	10
MM EC ₅₀ S (pM)	25	8	96	366	>1000

[0197]

[0198]

상대적인 EC₅₀S 값에 의해 입증되는 바와 같이, HBV-219 듀플렉스에 대한 시험관내 용량-반응 곡선은 가이드 가닥의 위치 15에서의 단일 미스매치에 의해 활성화의 손실을 나타내지 않았다. HBV-219 모 (본원에서 HBV(s)-219P1로 지정됨) 및 미스매치 올리고뉴클레오타이드 (본원에서 HBV(s)-219P2로 지정됨)를 비교하는 후속적인 생체 내 분석에 의해, 미스매치의 도입이 활성화의 손실을 일으키지 않았음이 확인되었다 (도 8). 도 9에 나타난 단일-용량 적정 플롯에서 도시된 바와 같이, HBV-219 미스매치 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스 (HBV(s)-219P2)는 투여 후 70 일 기간에 걸쳐 생체 내에서 용인되었다.

[0199]

도 10은 도입된 미스매치를 갖는 HBV-219 (본원에서 HBV(s)-219로 지정됨)에 대한 변형된 듀플렉스 구조의 예를 도시한다. 도 7에서 각각의 올리고뉴클레오타이드에 대해 도시된 넘버링 방식에 따라, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 1 내지 36에 걸쳐 이어지고, 안티센스 가닥은 올리고뉴클레오타이드 1 내지 22에 걸쳐 이어지며, 후자의 가닥은 오른쪽에서 왼쪽 방향으로 넘버링되어 도시된다. 듀플렉스 형태는 센스 가닥의 위치 36과 안티센스 가닥의 위치 1의 뉴클레오타이드 사이에 넥을 갖는 것으로 도시된다. 센스 가닥에서의 변형은 다음과 같다: 위치 3, 8-10, 12, 13 및 17에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드; 위치 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-26 및 31-36에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드; 위치 1과 2의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결; 위치 27-30에 2'-OH 뉴클레오타이드; 위치 27에 2'-아미노디에톡시메탄올-구아니딘-GaINAc; 및 각각의 위치 28, 29 및 30에 2'-아미노디에톡시메탄올-아데닌-GaINAc. 안티센스 가닥에서의 변형은 다음과 같다: 위치 1에서 5'-메톡시, 포스포네이트-4'-옥시-2'-O-메틸우리딘 포스포로티오에이트; 위치 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 및 19에서 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드; 위치 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18 및 20-22에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드; 및 위치 1과 2, 2와 3, 3과 4, 20과 21, 및 21과 22의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결. 안티센스 가닥은 위치 15에서 도입된 미스매치를 포함하였다. 또한, 도시된 바와 같이, 듀플렉스의 안티센스 가닥은 위치 21-22에 걸쳐 이어지는 "GG" 오버행을 포함하였다.

[0200]

HBV(s)-219, 및 상기에 언급된 두 전구체 (HBV(s)-219P1 및 HBV(s)-219P2)는 표 4에 도시된다.

[0201] 표 4. HBV(s)-219 및 전구체

RNAi 올리고뉴클레오티드	길이 (센스/안티센스)	서열/화학적 변형
HBV(s)-219	36/22합제	안티센스 가닥의 위치 15에서 미스매치를 함유함. 아세탈 기반 GalNAc 링커가 사용됨. 메톡시, 포스포네이트-4'옥시-2'-O-메틸우리딘 (MeMOP)이 안티센스 가닥의 위치 1에서 사용됨. 도 10 및 도 19a 참고
HBV(s)-219P2	36/22합제	안티센스 가닥의 위치 15에서 미스매치를 함유함. 클릭 화학 기반 접합이 트리아졸 기반 GalNAc 링커를 포함함. 완전히 탈보호된 5'-포스포네이트-4'옥시-2'-O-메틸우리딘 (MOP)이 안티센스 가닥의 위치 1에서 사용됨. 도 19b 참고
HBV(s)-219P1	36/22합제	안티센스 가닥의 위치 15에서 미스매치를 함유하지 않음. HBV(s)-219P2와 동일한 화학적 변형.

[0202]

[0203] 실시예 3: HBV(s)-219 전구체의 항바이러스 활성

[0204] HBV 코어 항원 (HBcAg)의 세포내 국지화에 대한 HBV(s)-219 전구체로의 처리 효과를 평가하였다. NOD_{scid} 마우스를 HBV 게놈의 헤드-테일 이합체의 유체역학적 주사 (HDI)에 적용하였다. 올리고뉴클레오티드로의 처리를 HDI 이후 2 주째에 시작하였다. 처리후 마우스로부터 단리된 간세포의 면역조직화학 염색은 HBV 코어 항원 (HBcAg) 발현에서 급격한 감소를 나타내었다.

[0205] RNA 시퀀싱을 수행하여, HBV 바이러스 전사체의 전체 발현에 대한 HBsAg 녹다운의 효과를 실험하였다. 각각 3 회의 3mg/kg의 주 1회 용량 이후 4 일째에 HDI 마우스로부터 간세포를 단리하였다. 총 RNA를 간세포로부터 추출하고, HiSeq 플랫폼을 사용하여 일루미나(Illumina) 시퀀싱에 적용하였다. 도 11b는 검출된 RNA 전사체 서열을 HBV RNA에 대해 맵핑한 RNA 시퀀싱 결과를 나타낸다. HBV(s)-219 및 그의 전구체의 표적 부위 또한 나타내었으며, 이는 올리고뉴클레오티드가 pgRNA (3.5kb), S1 (2.4kb) 및 S2 (2.1kb) 전사체를 표적화함을 나타낸다. 상기 결과는, 비히클 대조군과 비교하여, HBV(s)-219P1에 의한 처리가 모든 HBV 바이러스 전사체의 90% 초과를 침묵시켰음을 나타내었다.

[0206] HBV(s)-219P1 올리고뉴클레오티드의 지속적인 효과를 HBV의 2가지 상이한 마우스 모델 - cccDNA-의존성인 HDI 모델 및 cccDNA 비의존성인 AAV 모델에서 시험하였다. HBsAg mRNA 발현의 시간 경과 (12 주) 분석을, HBV의 HDI 모델에서 비히클 대조군 및 HBxAg mRNA를 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오티드와 비교하여, HBsAg mRNA를 표적화하는 HBV(s)-219P1 올리고뉴클레오티드에 의한 3회의 3mg/kg의 주 1회 용량을 수반하는 처리에 따라 수행하였다 (도 12a). HBV(s)-219P1 올리고뉴클레오티드는 ≥ 3.9 로그 감소를 일으켰고, 7 주 넘게 지속되는 비교적 긴 활성 기간을 가진 반면에; 비교하면 HBV(x) 표적화 올리고뉴클레오티드는 약 3.0 로그 감소를 일으켰고, 이는 더 짧은 기간 동안 지속되었다.

[0207] HBsAg mRNA 발현의 추가의 시간 경과 (12 주) 분석을, AAV-HBV 모델에서 비히클 대조군 및 HBxAg mRNA를 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오티드와 비교하여, HBsAg mRNA를 표적화하는 HBV(s)-219P2 올리고뉴클레오티드에 의한 3회의 3mg/kg의 주 1회 용량을 수반하는 처리에 따라 수행하였다 (도 12b). 이 모델에서, HBV(s)-219P2 올리고뉴클레오티드는 HBV(x) 표적화 올리고뉴클레오티드와 비등한 로그 감소 및 지속을 일으켰다. 도 12a 및 12b에서 사용된 HBxAg mRNA를 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오티드는 UGCACUUCGCGUCACCUCUAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 39)의 센스 가닥 서열 및 UAGAGGUGACGCGAAGUGCAGG (서열식별번호: 40)의 안티센스 가닥 서열을 갖는다. HBxAg를 표적화하는 이 RNAi 올리고뉴클레오티드는 본원에서 GaIXC-HBVX로 지정된다.

[0208] 면역조직화학 염색을 수행하여, 상기 기재된 바와 같이 비히클 대조군 및 HBxAg mRNA를 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오티드와 비교하여, HBsAg mRNA를 표적화하는 상기 나타낸 HBV(s)-219 전구체 올리고뉴클레오티드로의 처리후 HBV의 AAV-HBV 모델 및 HDI 모델로부터 수득된 간세포에서 HbcAg의 세포내 분포를 실험하였다 (도 13). 처리후 잔류 코어 단백질 (HBcAg)은 AAV 모델에서가 아니라 HDI 모델에서 두 RNAi 올리고뉴클레오티드 사이의 세포내 국지화에서 주목할만한 차이를 나타내었다.

[0209] 실시예 4: PXB-HBV 키메라 인간 간 모델 유전자형 C에서 HBV(s)-219P1의 평가

- [0210] HBV(s)-219P1의 항바이러스 활성을 키메라 인간 간 모델로서 HBV 문헌에도 공지된 PXB-HBV 모델에서 평가하였다. 이 기술은 인간 간세포를 심각하게 면역손상된 마우스에 그래프팅한 다음, 유전자 메커니즘을 이용하여 숙주 튜린 간세포를 독살하는 것을 기반으로 한다 (Tateno et al., 2015). 이 과정에 의해 > 70% 인간 조직으로부터 유래된 간을 함유하는 마우스가 생성되고, 이는 야생형 마우스와는 달리 HBV에 의해 감염될 수 있다 (Li et al., 2014). PXB-HBV 모델은 HBV(s)-219 약리학의 맥락에서 몇몇 목적을 위해 사용된다: (1) 올리고뉴클레오타이드가 생체 내에서 인간 RNAi 기구 (RISC)와 결합할 수 있음을 확인하기 위해, (2) GalNAc-표적화 리간드 배치가 생체 내에서 인간 ASGR를 통해 간세포에 내재화될 수 있음을 확인하기 위해, 및 (3) (HBV 발현의 조작된 모델과는 반대로) HBV 감염의 진정한 모델에서의 효능을 확인하기 위해. 그래프팅된 인간 간세포가 불규칙한 키메라 간 생리학을 일으킨다는 제약에도 불구하고 (Tateno et al., 2015), 유의한 항바이러스 효능이 이 모델에서 관찰될 수 있다.
- [0211] HBV 유전자형 C에 의한 마우스의 초기 감염후 대략 8 주째에, 각각의 마우스에 대해 혈장을 수집하여 기준선 HBsAg 측정치로 사용한다. 이어서, 각각 9 마리 마우스의 코호트 (PK의 경우 n=3, PD의 경우 n=6)에게 0 (PBS) 또는 3 mg/kg HBV(s)-219P1의 3회의 매주 SC 주사를 제공하였다. 투약 첫 날은 0 일째로 고려된다. 비-말단 채혈을 매주 수행하여, 각각의 마우스에서 혈청 HBsAg 및 순환 HBV DNA 수준을 측정하였다 (도 14a-14d). 마우스를 28 일째에 말단 조직 종점에 대해 안락사시켰다. 28 일째 간 샘플을 간내 HBV DNA 및 cccDNA 수준에 대해 분석하였다. 유의한 항바이러스 활성이 HBsAg의 >80% 감소, 뿐만 아니라 순환 HBV DNA, 간내 HBV DNA 및 cccDNA에서의 유의한 감소를 비롯하여 HBV(s)-219P1로 처리한 마우스에 대해 분석한 모든 종점에서 관찰되었다 (도 14a-14d). 이들 데이터는 HBV(s)-219 처리가 전신 투여후 감염된 인간 간세포에서 항바이러스 활성을 일으킴을 입증한다.
- [0212] *실시예 5: HBV(s)-219P2는 엔테카비르의 항바이러스 활성을 강화시킨다*
- [0213] 현행의 치료 표준인, 뉴클레오(시)티드 유사체 (예를 들어, 엔테카비르)는 순환 HBV 게놈 DNA를 감소시키는데 효과적이지만, 순환 HBsAg를 감소시키지는 않는다. 이러한 처리 동안에 이는 제어된 바이러스혈증을 일으키지만, 평생 치료가 필요하고, 기능적 치유는 거의 달성되지 않는다. S 항원을 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오타이드는 바이러스 폴리머라제 및 HBsAg 단백질 둘 다에 영향을 미친다. 이 연구에서, 항바이러스 활성에 대해 단일요법 및 엔테카비르와의 조합 치료로서 HBV(s)-219P2의 조합 효과를 HBV-발현 마우스 (HDI 모델)에서 연구하였다.
- [0214] 마우스에게 14 일 동안 매일 500 ng/kg 엔테카비르 (ETV)를 경구 투여하였다. HBV(s)-219P2의 단일 피하 투여를 수행하였다. 순환 바이러스 로드 (HBV DNA)를 qPCR에 의해 측정하고 (도 15a), 혈장 HBsAg 수준을 ELISA에 의해 측정하고 (도 15b), 간 HBV mRNA 및 pgRNA 수준을 qPCR에 의해 측정하였다. 명백한 상가적 효과가 HBV(s)-219P2 및 ETV의 조합 요법에서 관찰되었다. 결과는 ETV 요법 단독이 순환 HBsAg 또는 간 바이러스 RNA에 대해 효과를 나타내지 않음을 보여준다. 추가로, HBsAg 또는 HBV RNA에 의해 측정된 HBV(s)-219P2의 항바이러스 활성은 ETV의 공동 투약에 의해 영향을 받지 않는다 (도 15b-15c).
- [0215] 도 15a-15c에 도시된 바와 같이, 14 일 동안 매일 500 ng/kg PO 용량의 엔테카비르의 단일요법은 PBS 처리된 마우스 (n=6)에 비해 혈장에서 검출된 HBV DNA에서 평균 ~1.6 로그 감소를 일으켰다. 순환 HBsAg, 또는 간 바이러스 RNA에서는 유의한 감소가 관찰되지 않았다. 0 일째에 단일 1 mg/kg 또는 3 mg/kg SC 용량의 HBV(s)-219P2의 단일요법은 PBS (n=7)에 비해 혈장에서 검출된 HBV DNA에서 각각 평균 ~0.8 로그 또는 ~1.8 로그 감소를 일으켰다. 0 일째에 단일 6 mg/kg SC 용량의 HBV(s)-219P2의 단일요법은 혈장에서 HBV DNA에서의 평균 ~2.5 로그 감소 및 2마리 마우스에서 검출 한계 미만으로 떨어지는 수준을 일으켰다 (n=7). 0 일째에 단일 SC 용량의 HBV(s)-219P2의 단일요법은 순환 HBsAg 뿐만 아니라 간 바이러스 RNA 모두에서 용량 의존성 감소를 일으켰다. 0 일째에 14 일 동안 매일 500 ng/kg PO 용량의 엔테카비르 및 단일 1 mg/kg SC 용량의 HBV(s)-219P2의 조합 요법은 혈장에서 검출된 HBV DNA에서 평균 ~2.3 로그만큼 추가의 감소를 일으켰다. 단일 1 mg/kg SC 용량의 HBV(s)-219P2의 단일요법에 의해 관찰되는 것과 유사한 혈장 HBsAg 및 간 바이러스 전사체 수준에서의 감소는 순환 HBsAg에서가 아니라 혈장 HBV DNA 또는 간 바이러스 전사체를 감소시키는데 있어서의 상가성을 나타낸다.
- [0216] *실시예 6. HBV(s)-219P2 및 GalXC-HBVX의 항바이러스 활성의 비교*
- [0217] 이 연구에서, HBV-발현 마우스 (HDI 모델)에게 HBV(s)-219P2, GalXC-HBVX (도 12a 및 12b에서 사용된 GalXC-HBVX와 동일한 서열), 또는 2가지 RNAi 올리고뉴클레오타이드의 조합물을 투여하였고, 투여후 2 주 또는 9 주째에 혈장 HBsAg 수준을 모니터링하였다. 도 16b에 도시된 바와 같이, 유사한 수준의 HBsAg 저해가 단일 포화 9

mg/kg SC 용량의 HBV(s)-219P2, GalXC-HBVX, 또는 이들 둘의 조합물로 처리후 2 주째에 관찰되었다. HBsAg의 연장된 저해가 S-표적화 HBV(s)-219P2 처리로 처리한 마우스에서 관찰된 반면에, GalXC-HBVX, 또는 이들 둘의 조합물로 처리한 마우스는 처리후 9 주째에 HBsAg의 유의한 회복을 가졌다 (n=3).

[0218] HBV-발현 마우스에서 HBV 코어 항원 (HBcAg)의 세포내 국지화 또한 HBV(s)-219P2, GalXC-HBVX, 또는 두 RNAi 올리고뉴클레오타이드의 조합물을 제공받은 마우스에서 평가하였다. HBV-발현 마우스 (HDI 모델)를 단일 포화 용량 (9 mg/kg, s.c.)의 HBV(s)-219P2, GalXC-HBVX 또는 1:1 조합물로 처리하였다. 도 17a에 나타낸 시점에서, 간 분획을 HBcAg에 대해 염색하였고; 대표적인 간세포가 도시된다. 단일요법으로서 또는 GalXC-HBVX와의 조합물로서 HBV(s)-219P2로 처리된 코호트는 핵 HBcAg를 특징으로 한다. GalXC-HBVS만으로 처리된 코호트는 치료 반응의 유리한 예후 지지자로서 보고된 HBcAg의 시토졸 국지화만을 나타낸다 (Huang et al. J. Cell. Mol. Med. 2018). 각각의 동물에서 핵 염색을 갖는 HBcAg-양성-세포의 백분율이 도 17b에 도시된다 (n=3/그룹, 동물 당 50개 세포 카운트, 투약후 2 주째). HBcAg 세포내 국지화에 대한 효과가 HBV 전사체의 영역으로 인한 것이며, RNAi 서열의 미지의 성질로 인한 것이 아님을 확인하기 위해, X 및 S 오픈 리딩 프레임 내에서 표적화하는 대안적인 서열을 설계하고 시험하였다 (도 17c 참고). HBV-254가 도 17c에서 사용되었다. HBV-254의 서열이 실시예 1에 기재되어 있다. 도 17c에서 사용된 HBxAg를 표적화하는 대안적인 올리고뉴클레오타이드는 GCACCUCUCUUUACGCGAAGCAGCCGAAAGGCUGC (서열식별번호: 41)의 센스 가닥 서열 및 UCCGCGUAAAGAGAGGUGCGG (서열식별번호: 42)의 안티센스 서열을 갖는다. 2가지 대안적인 RNAi 올리고뉴클레오타이드는 S 또는 X 항원에서 도 16b에서 사용된 RNAi 올리고뉴클레오타이드와는 상이한 RNAi 표적 서열을 갖는다. 그러나, 이들은 혈장 수준 HBcAg에 대해 동일한 차등 효과를 나타내고, 상기 효과는 S 항원 자체를 표적화하는데는 특이적이지만, 사용된 올리고뉴클레오타이드를 표적화하는데는 특이적이지 않음을 나타낸다.

[0219] 실시예 7 건강한 인간 대상체에서 안전성, 내약성의 평가, 및 HBV 환자에서 HBV(s)-219의 효능

[0220] 이 연구는 건강한 대상체 (그룹 A)에서 안전성 및 내약성, 및 HBV 환자 (그룹 B)에서 HBV(s)-219의 효능을 평가하기 위해 설계된다. 코호트별 용량 정보는 도 18에 도시되어 있다. HBV(s)-219의 분자 구조는 도 10, 도 19a에 도시되어 있고, 하기에도 도시된다:

[0221] **센스 가닥:**

5' mG-S-mA-fC-mA-mA-mA-mA-fA-fU-fC-mC-fU-fC-mA-mC-mA-fA-mU-mA-mA-mG-mC-mA-mG-mC-mC-[ademG-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-mG-mG-mC-mU-mG-mC 3'

[0223] 하기에 혼성화됨:

[0224] **안티센스 가닥:**

5' [Me포스포네이트-4O-mU]-S-fU-S-fA-S-mU-fU-mG-fU-fG-mA-fG-mG-fA-mU-fU-mU-fU-mU-mG-fU-mC-S-mG-S-mG 3'

[0226] **범례:**

mX: 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드

fX: 2'-플루오로-데옥시리보뉴클레오타이드

[ademA-GalNAc]: 2'-변형된-GalNAc 아데노신

[ademG-GalNAc]: 2'-변형된-GalNAc 구아노신

[Me포스포네이트-4O-mU]: 4'-O-모노메틸포스포네이트-2'-O-메틸 우리딘

연결: "-"는 포스포디에스테르를 나타낸다.

"-S-"는 포스포로티오에이트를 나타낸다.

환자 선택 기준을 하기에 나타내었다.

그룹 A - 건강한 대상체

포함 기준:

1. 정보 동의서에 서명하는 시점에서 18세 (또는 법적 동의 연령, 둘 중 더 많은 나이) 내지 65세 (경계값

포함).

- [0238] 2. 의학적 이력, 신체 검사 및 실험실 시험을 비롯한 의학적 평가에 의해 측정시 스크리닝 시점에서 명백히 건강함
- [0239] a. 진행 중인 질병의 증상이 없음
- [0240] b. 체온, 맥박수, 호흡률, 혈압에서 임상적으로 유의한 이상이 없음
- [0241] c. 임상적으로 유의한 심혈관 또는 폐 질환이 없고, 약리학적 복약을 필요로 하는 심혈관 또는 폐 질환이 없음.
- [0242] 3. 정상 한계 내의 12-리드 심전도 (ECG) 또는 연구자의 의견에 따라 스크리닝시 및 -1 일째에 임상적으로 유의한 이상이 없음
- [0243] 4. 스크리닝 방문 1 및 입원시에 (-1 일째에) 알콜 또는 약물 남용에 대한 음성 스크리닝
- [0244] 5. 스크리닝 방문 1 이전 적어도 5 년 동안 비흡연자, 스크리닝 방문 1에서 음성의 소변 코티닌 농도
- [0245] 6. 18.0 - 32.0 kg/m² (경계값 포함) 범위 내의 체질량 지수 (BMI).
- [0246] 7. 남성 또는 여성:
- [0247] a. 남성 참여자:
- [0248] 남성 참여자는 치료 기간 동안, 및 연구 개입의 투여후 적어도 2 주 동안 피임법을 사용하고, 이 기간 동안 정자 기증을 삼가하는 것에 동의해야 한다.
- [0249] b. 여성 참여자:
- [0250] 여성 참여자는 임신중이지 않고, 수유중이지 않고, 하기 조건 중 적어도 하나에 적용되는 경우에 참여할 자격이 있다: 가임 여성 (WOCBP)이 아님 또는 영역에 따라; 스크리닝후 연구 등록시에 시작하여 치료 기간 내내 및 연구 개입 투여후 적어도 12 주 동안 지속되는 피임 지침을 따르도록 동의한 WOCBP.
- [0251] 8. 요건 및 제한의 준수를 포함하는 서명한 정보 동의서 1을 제공할 수 있음.
- [0252] **배제 기준, 그룹 A**
- [0253] 1. 연구 약물의 흡수, 분포 또는 제거를 방해하거나 또는 이 연구에서 임상적 및 실험실 평가를 방해할 수 있는 임의의 의학적 상태의 이력, 예컨대 (비제한적으로); 만성 또는 재발성 신장 질환, 기능성 장 장애 (예를 들어, 빈번한 설사 또는 변비), GI 관 질환, 채장염, 발작 장애, 점막피부 또는 근골격 장애, 자살 시도(들) 또는 자살 생각의 이력, 또는 임상적으로 유의한 우울증 또는 약리학적 개입을 필요로 하는 다른 정신병리학적 장애
- [0254] 2. 불량하게 제어되거나 불안정한 고혈압; 또는 스크리닝시에 지속적인 수축기 BP > 150 mmHg 또는 이완기 BP > 95 mmHg
- [0255] 3. 인슐린 또는 저혈당제로 치료된 진성 당뇨병의 이력
- [0256] 4. 이전 12 개월 내에 입원을 요하는 천식의 이력
- [0257] 5. 중앙 연구 실험실에서 스크리닝 결과에 의해 결정되는 G-6-PD 결핍의 증거
- [0258] 6. 현재 불량하게 제어되는 내분비 상태, 임의의 약리학적으로 치료된 갑상선 상태가 제외되는 경우에는 갑상선 상태 (갑상선 기능 항진증/저하증 등) 제외
- [0259] 7. 참여자의 악성종양이 이전 3 년 동안 화학요법을 완전히 중단하였고 추가의 의학적 또는 수술적 개입이 없는 경우에는, 악성종양의 이력이 허용된다
- [0260] 8. 다중 약물 알러지의 이력 또는 올리고뉴클레오타이드 또는 GalNAc에 대한 알러지 반응의 이력
- [0261] 9. 연구 개입 투여 또는 국지적 내약성 평가를 잠재적으로 방해할 수 있는 SC 주사(들)에 대한 과민성 또는 유의한 복부 흉터의 이력
- [0262] 10. 임상적으로 관련된 수술 이력
- [0263] 11. 이전 3 년 내에 지속적인 에탄올 남용 (> 40 gm 에탄올/일) 또는 불법 약물 사용의 이력.

- [0264] 12. 연구 개입의 투여전 7 일 이내에 임상적으로 유의한 질병
- [0265] 13. 연구 개입의 투여전 2 개월 이내에 500 mL 초과 의 혈액의 기증 또는 스크리닝전 7 일 이내에 혈장 기증
- [0266] 14. 스크리닝시에 진행중인 유의한 감염 또는 공지된 염증성 과정 (연구자의 의견에 따라)
- [0267] 15. 스크리닝전 1 개월 이내에 만성 또는 재발성 요로 감염 (UTI), 또는 UTI의 이력
- [0268] 16. 이 연구를 수행하는 동안에 선택적 수술 절차에 대한 계획
- [0269] 17. 연구 개입의 투여전 4 주 이내에 처방 의약의 사용
- [0270] 18. 연구자 및 후원자가 임상적으로 관련이 없다고 동의하지 않는 한, 첫번째 투약 7 일 이내에 일상적인 비타민을 제외하고 처방전 없이 살 수 있는 (OTC) 의약 또는 허브 보충제의 사용.
- [0271] 19. 투약전 3 개월 이내에 연구용 약품을 제공받았거나 또는 연구 등록 이전에 또 다른 임상 연구를 추적조사 중임.
- [0272] 20. 스크리닝시에 HBV, HIV, HCV 또는 HDV 항체에 대해 혈청 양성 (과거 시험이 스크리닝전 3 개월 이내에 수행되는 경우에는 이용될 수 있음)
- [0273] 21. 스크리닝 방문시 또는 입원시에 (-1 일째에) 기준 범위 밖에 있는 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 감마-글루타밀 트랜스퍼라제 (GGT), 총 빌리루빈, 알칼리성 포스파타제 (ALP), 또는 알부민
- [0274] 22. 연구자에 의해 임상적으로 관련이 있고 허용될 수 없는 것으로 고려되는 완전 혈구 카운트 검사 이상; 헤모글로빈 <12.0 g/dL (120 g/L와 동등함); 정상 범위 밖에 있는 혈소판.
- [0275] 23. 헤모글로빈 A1C (HbA1C) > 7%
- [0276] 24. 연구자에 의해 임상적으로 관련이 있고 허용될 수 없는 것으로 고려되는 임의의 다른 안전성 실험실 시험 결과
- [0277] 25. 임상 연구 센터에 들어가기 전 48 시간으로부터 연구 마지막까지 운동 수준에서의 유의한 변화를 수행하였거나 또는 수행할 계획임.
- [0278] 26. 연구자의 의견에 따라 참여자가 등록에 적합하지 않게 하거나 또는 연구에 참여하거나 연구를 완료하는데 방해가 될 수 있는 임의의 상태.
- [0279] B형 간염을 갖는 그룹 B 성인
- [0280] **포함 기준, 그룹 B**
- [0281] 1. 정보 동의서에 서명하는 시점에서 18세 (또는 법적 동의 연령, 둘 중 더 많은 나이) 내지 65세 (경계값 포함).
- [0282] 2. 다음에 의해 입증되는 만성 B형 간염 감염:
 - [0283] a. 양립가능한 임상 정보를 기반으로 하여 CHB와 양립가능한 임상적 이력, 및 HBsAg 및 잠재적으로 다른 HBV 혈청학적 마커 (HBeAg, HBV DNA)에 대한 이전의 혈청 양성
 - [0284] b. 스크리닝에서 HBeAg-양성 환자의 경우 혈청 HBsAg > 1000 IU/mL, 또는 HBeAg-음성 환자의 경우 > 500 IU/mL
 - [0285] c. 중앙 연구 실험실에서 탁맨(TaqMan)TM HBV DNA v2.0 검정에 의해 측정시, 스크리닝에서 치료받은 적이 없는 (treatment-naive) 환자의 경우 혈청 HBV DNA> 20,000 IU/mL
 - [0286] d. 혈청 IgM 항-HBc 음성
- [0287] 3. 간경변의 증거없이 보상된 간 질환과 양립가능한 임상적 이력:
 - [0288] a. 식도 또는 위장관 맥관류로부터의 출혈 이력이 없음
 - [0289] b. 복수의 이력이 없음
 - [0290] c. 만성 간 질환에 기여하는 황달의 이력이 없음

- [0291] d. 간 뇌병증의 이력이 없음
- [0292] e. 문맥 고혈압 - 거미 혈관종 등의 신체적 징후가 없음
- [0293] f. 간경변을 나타내는 이전의 간 생검, 간 영상화 연구, 또는 탄성측정 결과가 없음
- [0294] 4. B형 간염에 대해 치료받은 적이 없음: 스크리닝 방문전 적어도 12 주 동안 B형 간염에 대한 이전의 항바이러스 요법이 없음 (이전의 HBV 뉴클레오시[티]드 또는 인터페론-함유 치료가 없음) 또는 진행중인 뉴클레오시(티)드 요법 (엔테카비르 또는 테노포비르)이 없음, 만족스러운 용인 및 준수
- [0295] 5. 혈청 ALT > 60 U/L (남성) 또는 > 38 U/L (여성) ([American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) HBV guidance criteria, Terrault et al., 2016]에 의한 2x ULN)
- [0296] 6. (연구자의 의견에 따라) 스크리닝시 및 -1 일째에 임상적으로 유의한 이상이 없는 12-리드 ECG
- [0297] 7. 간 질환의 다른 공지된 원인이 없음
- [0298] 8. 잘 제어된 고혈압, 및 고콜레스테롤혈증의 스타틴 관리 이외에, 지속적인 의학적 관리 또는 만성 또는 재발성 약리학적 개입을 요하는 다른 의학적 상태가 없음
- [0299] 9. 18.0 - 32.0 kg/m² (경계값 포함) 범위 내의 BMI
- [0300] 10. 남성 또는 여성
- [0301] a. 남성 참여자:
- [0302] 남성 참여자는 치료 기간 동안, 및 연구 개입의 투여후 적어도 12 주 동안 피임법을 사용하고, 이 기간 동안 정자 기증을 삼가하는 것에 동의해야 한다.
- [0303] b. 여성 참여자:
- [0304] 여성 참여자는 임신중이지 않고, 수유중이지 않고, 하기 조건 중 적어도 하나에 적용되는 경우에 참여할 자격이 있다: WOCBP가 아님 또는 영역에 따라, 치료 기간 동안 및 연구 개입 투여후 적어도 12 주 동안 피임 지침을 따르도록 동의한 WOCBP.
- [0305] 11. 요건 및 제한의 준수를 포함하는 서명한 정보 동의서를 제공할 수 있음.
- [0306] **배제 기준, 그룹 B**
- [0307] 1. 연구 약물의 흡수, 분포 또는 제거를 방해하거나 또는 이 연구에서 임상적 및 실험실 평가를 방해할 수 있는 임의의 의학적 상태의 이력, 예컨대 (비제한적으로); 만성 또는 재발성 신장 질환, 기능성 장 장애 (예를 들어, 빈번한 설사 또는 변비), GI 관 질환, 궤양염, 발작 장애, 점막피부 또는 근골격 장애, 자살 시도(들) 또는 자살 생각의 이력, 또는 임상적으로 유의한 우울증 또는 약리학적 개입을 필요로 하는 다른 정신병리학적 장애
- [0308] 2. 불량하게 제어되거나 불안정한 고혈압
- [0309] 3. 인슐린 또는 저혈당제로 치료된 진성 당뇨병의 이력
- [0310] 4. 이전 12 개월 내에 입원을 요하는 천식의 이력
- [0311] 5. 중앙 연구 실험실에서 스크리닝 결과에 의해 결정되는 G-6-PD 결핍의 증거
- [0312] 6. 현재 불량하게 제어되는 내분비 상태, 임의의 약리학적으로 치료된 갑상선 상태가 제외되는 경우에는 갑상선 상태 (갑상선 기능 항진증/저하증 등) 제외
- [0313] 7. 스크리닝전 1 개월 이내에 만성 또는 재발성 UTI, 또는 UTI의 이력
- [0314] 8. HCC의 이력
- [0315] 9. 환자의 악성종양이 이전 3 년 동안 화학요법을 완전히 중단하였고 추가의 의학적 또는 수술적 개입이 없는 경우에는, HCC 이외의 악성종양의 이력이 허용된다
- [0316] 10. 이전 3 년 내에 지속적인 에탄올 남용 (> 40 gm 에탄올/일) 또는 불법 약물 사용의 이력.
- [0317] 11. 연구 개입 투여 또는 국지적 내약성 평가를 잠재적으로 방해할 수 있는 SC 주사(들)에 대한 과민성 또는 유

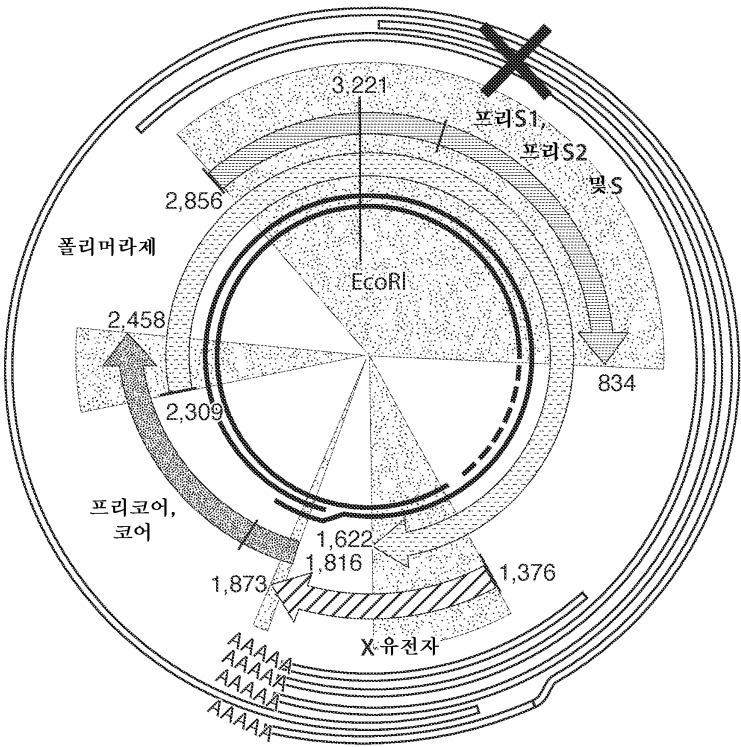
의한 복부 흉터의 이력.

- [0318] 12. 요법전 지난 6 주 내에 수혈을 받았거나 또는 시험후 추적조사를 통해 수혈이 예상됨.
- [0319] 13. 스크리닝전 2 개월 이내에 > 500 mL의 혈액의 기증 또는 손실, 또는 스크리닝전 7 일 이내에 혈장 기증
- [0320] 14. 스크리닝 3 개월 이내에 항바이러스 요법 (엔테카비르 또는 테노포비르 이외의) 또는 지난 3 년 내에 인티페론에 의한 치료
- [0321] 15. 지난 6 개월 이내에 항응고제, 전신 투여된 코르티코스테로이드, 전신 투여된 면역조절제, 또는 전신 투여된 면역저해제의 사용 (또는 그에 대한 필요성이 예상됨)
- [0322] 16. 연구 개입의 투여전 14 일 이내에 PI 또는 후원자의 의견에 따라 연구 수행을 방해하는 처방 의약의 사용. 전신 흡수가 아닌 국소 제품, 스타틴 (로수바스타틴 제외), 고혈압 의약, OTC 및 처방 진통제 또는 호르몬 피임약 (여성)은 허용된다
- [0323] 17. 주사가능한/이식가능한 피임을 제외하고, 연구 개입의 투여전 3 개월 이내에 임의의 약물의 테포 주사 또는 이식.
- [0324] 18. 허브 보충제 또는 처방전 없이 살 수 있는 전신용 의약의 지속적인 사용; 참여자는 연구 기간 동안에 중단하고자 해야 한다.
- [0325] 19. 투약전 3 개월 이내에 연구용 약품을 제공받았거나 또는 연구 등록 이전에 또 다른 임상 연구를 추적조사 중임.
- [0326] 20. 스크리닝에서 간 탄성측정 (즉, 피브로스캔(FibroScan)®) kPa > 10.5
- [0327] 21. 스크리닝에서 10 분 양와위 휴식후 수축기 혈압 >150 mmHg 및 이완기 혈압 >95 mmHg.
- [0328] 22. 스크리닝에서 간 트랜스아미나제 (ALT 또는 AST)가 > 7 x ULN으로 확인됨
- [0329] 23. 공지된 길버트(Gilbert) 질환 또는 두빈-존슨(Dubin-Johnson) 증후군이 없이 지속적인 또는 재발성 고빌리루빈혈증의 이력
- [0330] 24. 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 또는 C형 간염 바이러스 (HCV) 또는 델타 간염 바이러스 (HDV)에 대한 항체에 대해 혈청 양성
- [0331] 25. Hgb < 12 g/dL (남성) 또는 < 11 g/dL (여성)
- [0332] 26. 스크리닝에서 혈청 알부민 <3.5 g/dL.
- [0333] 27. 스크리닝에서 총 WBC 카운트 < 4,000 세포/ μ L 또는 절대 호중구 카운트 (ANC) <1800 세포/ μ L.
- [0334] 28. 스크리닝에서 μ L당 혈소판 카운트 $\leq$ 100,000.
- [0335] 29. 스크리닝에서 (지역 실험실 기준 범위에 따라) 정상 기준 범위의 상한을 초과하는 국제 정규화 비 (INR) 또는 프로트롬빈 시간 (PT).
- [0336] 30. 혈청 BUN 또는 크레아티닌 > ULN
- [0337] 31. 혈청 아밀라제 또는 리파제 > 1.25 x ULN
- [0338] 32. 혈청 HbA1c > 7.0%
- [0339] 33. 혈청 알파 태아단백질 (AFP) 값 >100 ng/mL. 스크리닝에서 AFP가 > ULN이지만 < 100 ng/mL인 경우에는, 간 영상화 연구에 의해 HCC가 의심될 수 있는 병변이 없는 것으로 밝혀진 경우에 환자는 적격성임
- [0340] 34. 연구자에 의해 임상적으로 관련이 있고 허용될 수 없는 것으로 고려되는 임의의 다른 안전성 실험실 시험 결과
- [0341] 35. 임상 연구 센터에 들어가기 전 48 시간으로부터 연구 마지막까지 운동 수준에서의 유의한 변화를 수행하였거나 또는 수행할 계획임.
- [0342] 36. 연구자의 의견에 따라 참여자가 등록에 적합하지 않게 하거나 또는 연구에 참여하거나 연구를 완료하는데 방해가 될 수 있는 임의의 상태.

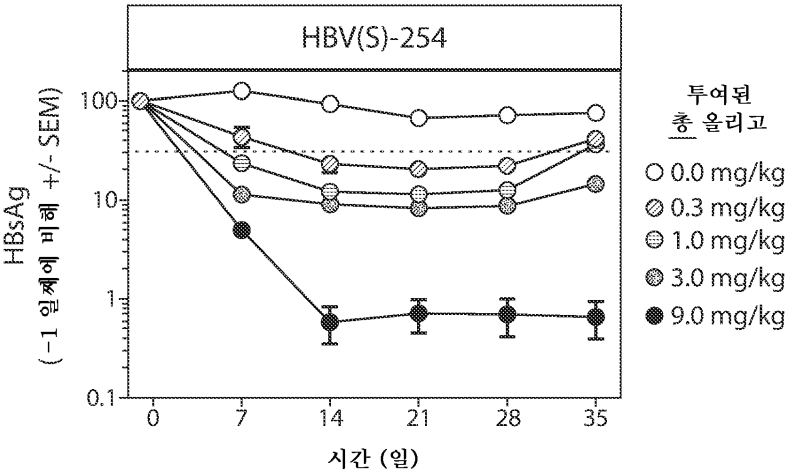
- [0343] 본원에 예시적으로 기재된 본 개시내용은 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재하에 적합하게 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본원의 각각의 예에서, 용어 "포함하는", "로 본질적으로 이루어진" 및 "로 이루어진"은 다른 두 용어와 교체될 수 있다. 사용된 용어 및 표현은 제한이 아니라 기재의 측면에서 사용되고, 이러한 용어 및 표현의 사용에 있어서 도시되고 기재된 특징 또는 그의 일부의 임의의 등가물을 제외하려는 의도는 없으며, 청구된 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능한 것으로 인식된다. 따라서, 본 발명이 바람직한 실시양태에 의해 구체적으로 개시되었지만, 본원에 개시된 개념의 임의적인 특징, 변형 및 변동이 관련 기술분야의 기술자에 의해 재분류될 수 있고, 이러한 변형 및 변동이 상기 기재 및 첨부된 청구항에 의해 한정되는 본 발명의 범위 내에서 고려된다는 것을 이해해야 한다.
- [0344] 본 발명의 기재하는 문맥에서 (특히 하기 청구항의 문맥에서) 단수 용어 및 유사한 지시대상의 사용은 본원에서 달리 지시되지 않거나 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는다면 단수 및 복수 둘 다를 포함하는 것으로 파악되어야 한다. 용어 "포함하는(comprising)", "갖는(having)", "포함하는(including)" 및 "함유하는(containing)"은 달리 언급되지 않는다면 개방형 용어로서 파악되어야 한다 (즉, "포함하나 이에 제한되지 않음"을 의미함). 본원에서 값의 범위의 기재는 단지 본원에서 달리 지시되지 않는다면 상기 범위 내에 속하는 각각의 별개의 값을 개별적으로 지칭하는 약칭 방법으로서 작용하기 위해 단지 의도되는 것이고, 각각의 별개의 값은 본원에 개별적으로 인용된 것과 같이 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법은 본원에서 달리 지시되지 않거나 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는다면 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 모든 예시 또는 예시적인 표현 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 보다 잘 설명하기 위해 의도된 것이고, 달리 청구되지 않는다면 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 명세서의 어떠한 표현도 본 발명의 실시에서 필수적인 것으로 청구되지 않은 임의의 요소를 나타내는 것으로 파악되어서는 안된다.
- [0345] 본 발명을 실시하기 위해 발명자들에게 공지된 최상의 방식을 비롯하여 본 발명의 실시양태가 본원에 기재된다. 이들 실시양태의 변동은 상기 기재를 읽은 후에 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백해질 수 있다.
- [0346] 본 발명자들은 숙련가들이 이러한 변동을 적절하게 이용할 것으로 예상하며, 본 발명자들은 본 발명이 본원에 구체적으로 기재된 것과 다르게 실시되는 것을 의도한다. 따라서, 본 발명자들은 적용가능한 법률에 의해 허용되는 바와 같이 본원에 첨부된 청구항에 인용된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 더욱이, 그의 모든 가능한 변동에서 상기 기재된 요소들의 임의의 조합은 본원에서 달리 지시되지 않거나 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는다면 본 발명에 포함된다. 관련 기술분야의 기술자들은 일상적인 실험만으로도 본원에 기재된 본 발명의 구체적인 실시양태에 대한 여러 등가물을 인식할 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구항에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

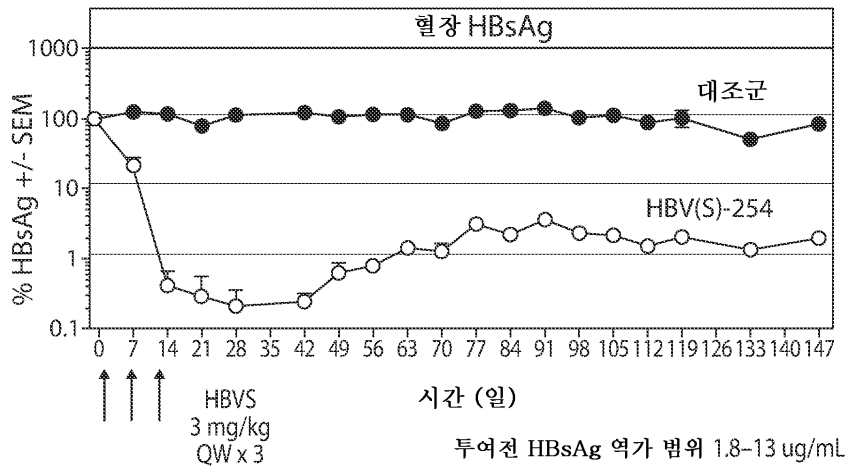
도면1



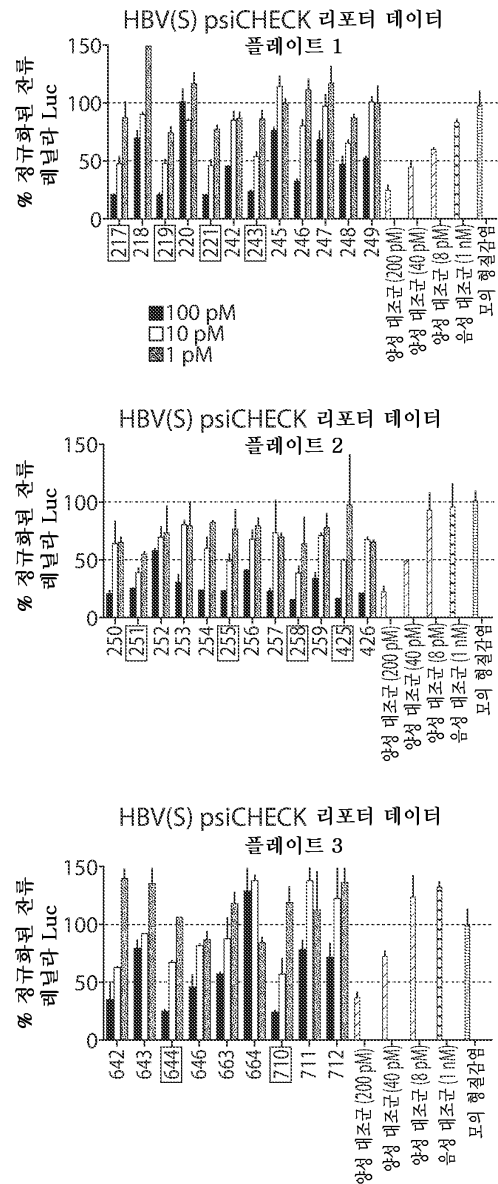
도면2



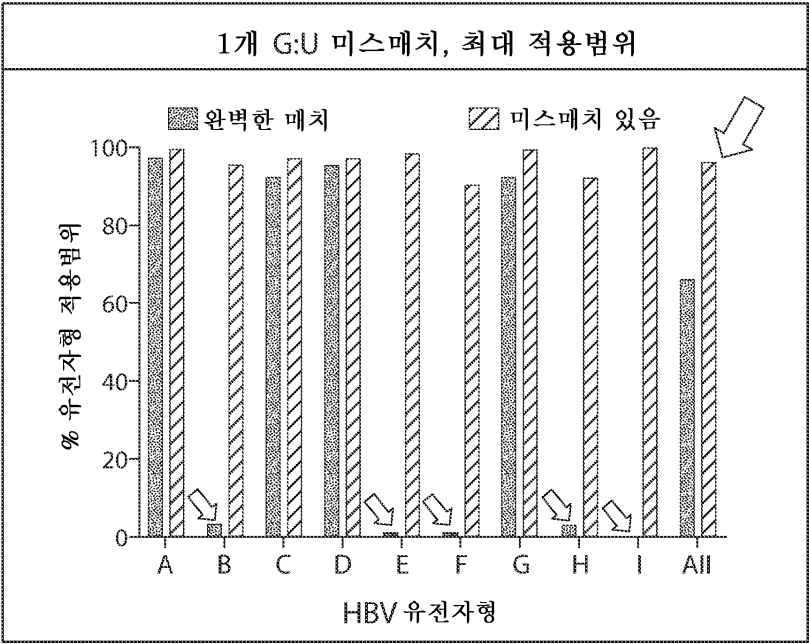
도면3



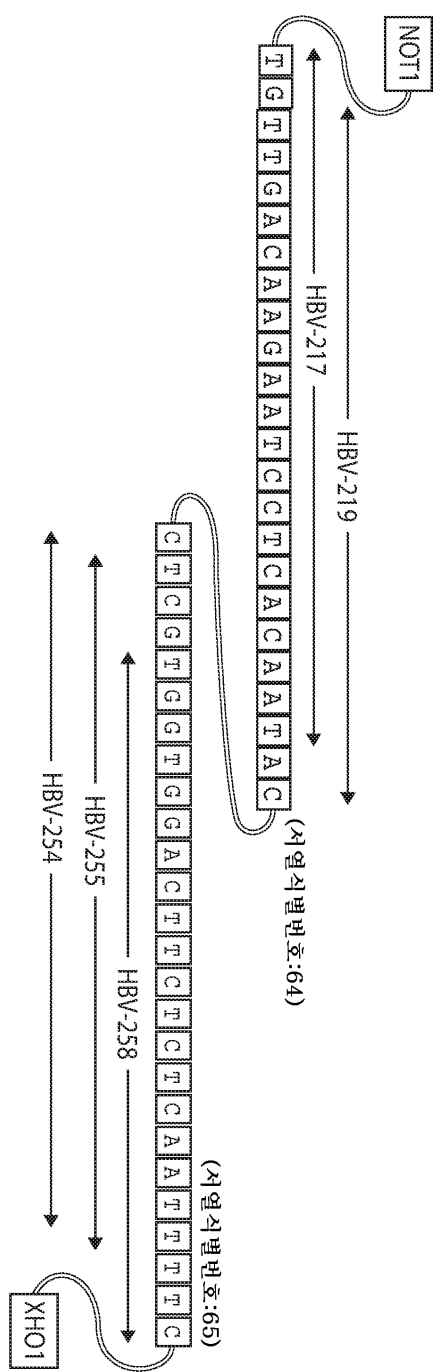
도면4



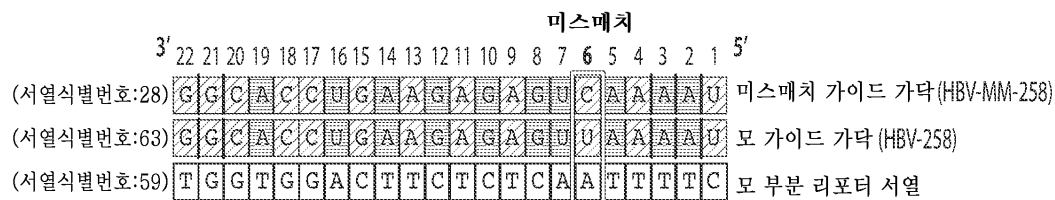
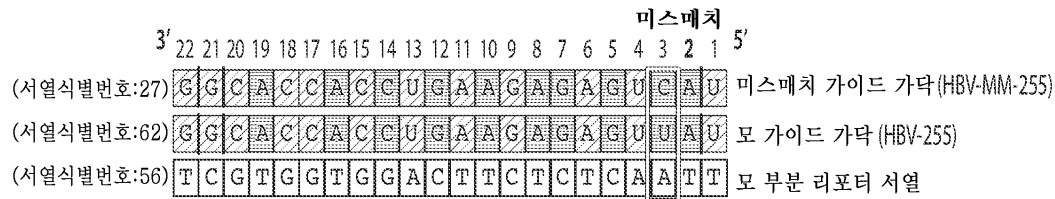
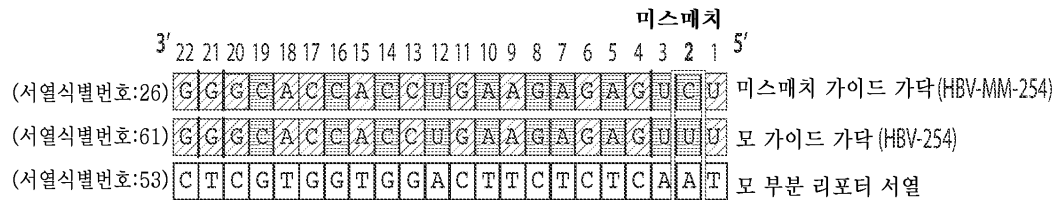
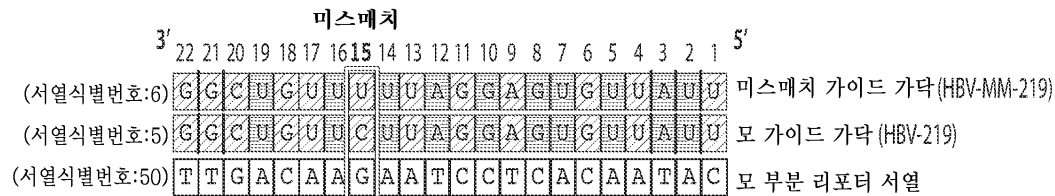
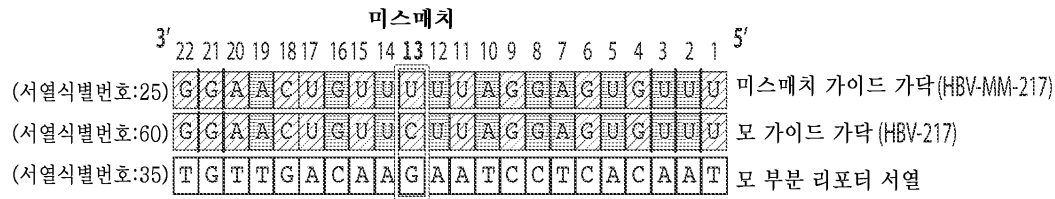
도면5



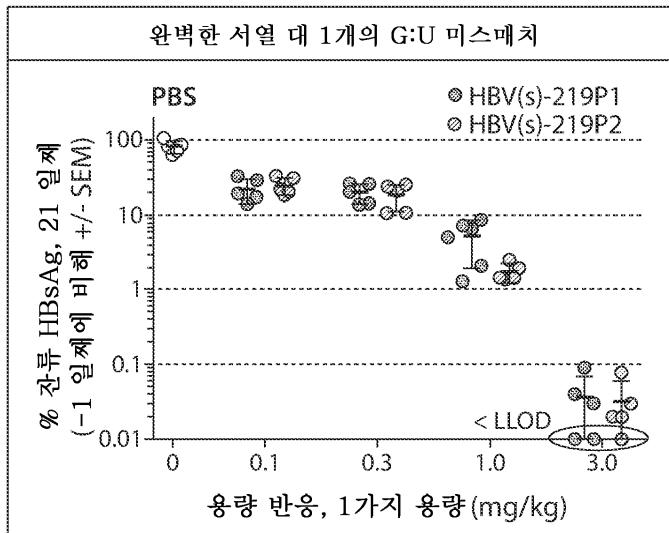
도면6



도면7

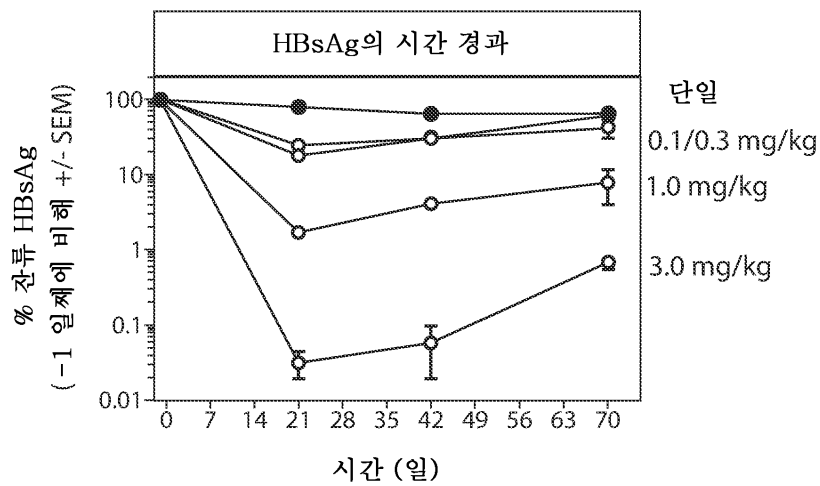


도면8

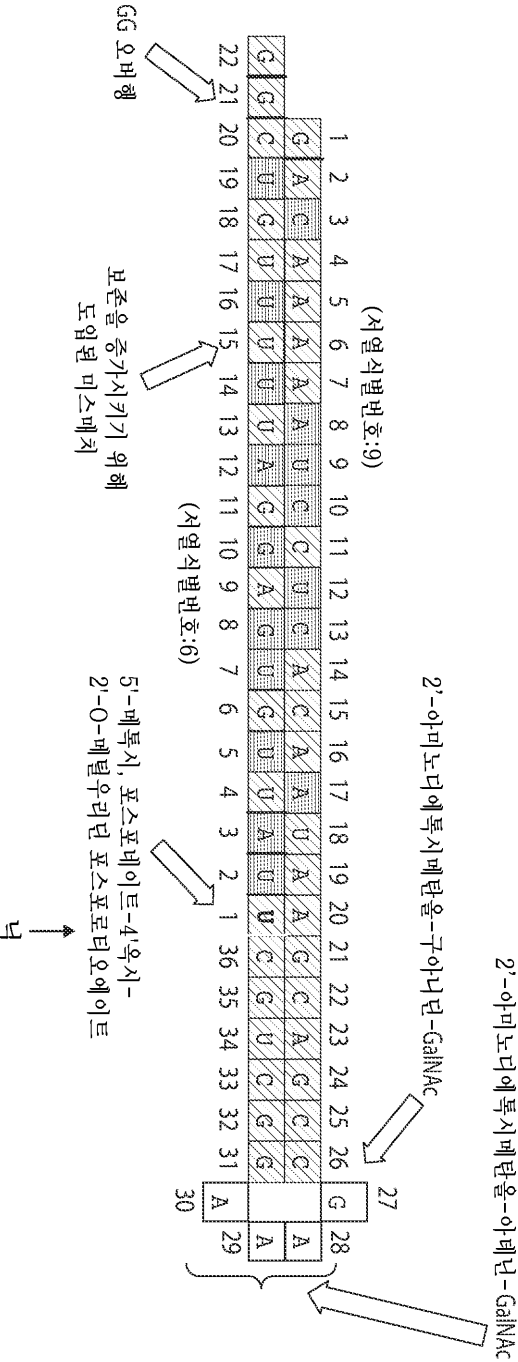


도면9

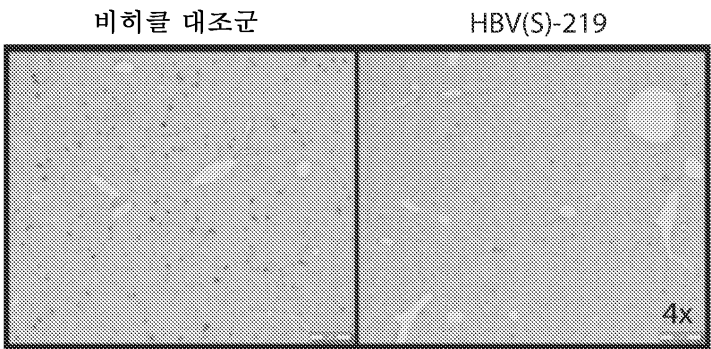
미스매치를 갖는 HBV(S)-219 듀플렉스의 용량 적정
가이드의 위치 15에서의 미스매치는 HBVS-219에 대해 생체 내에서 용인됨



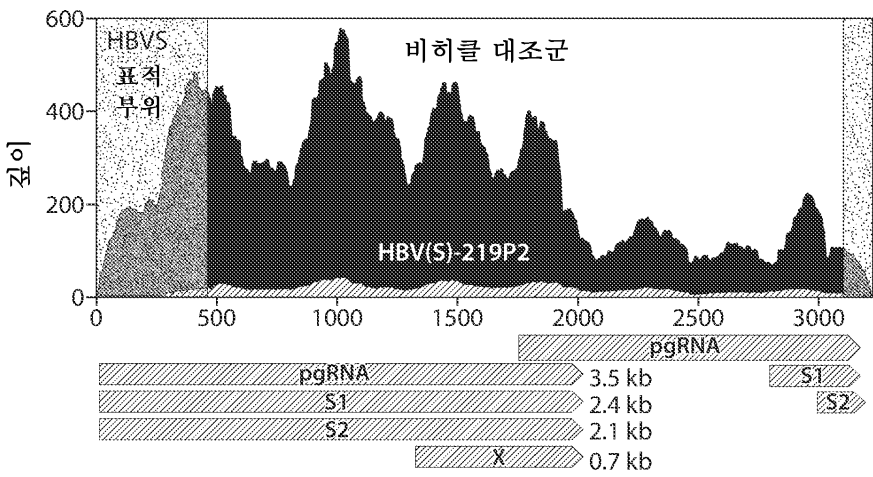
도면10



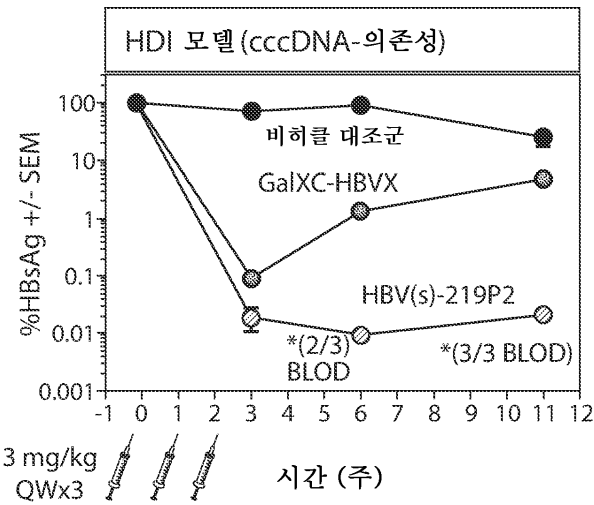
도면11a



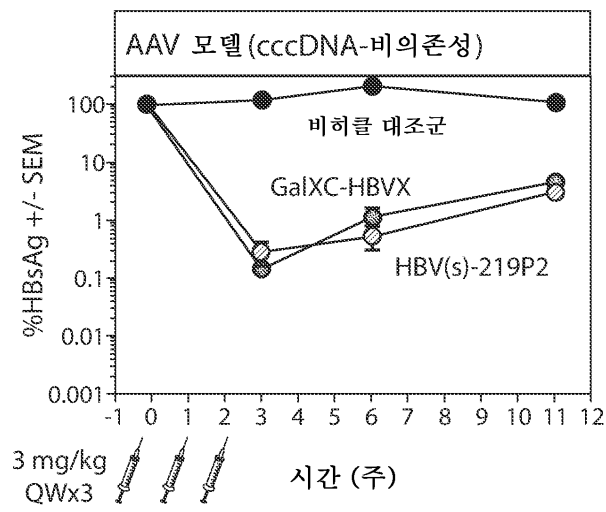
도면11b



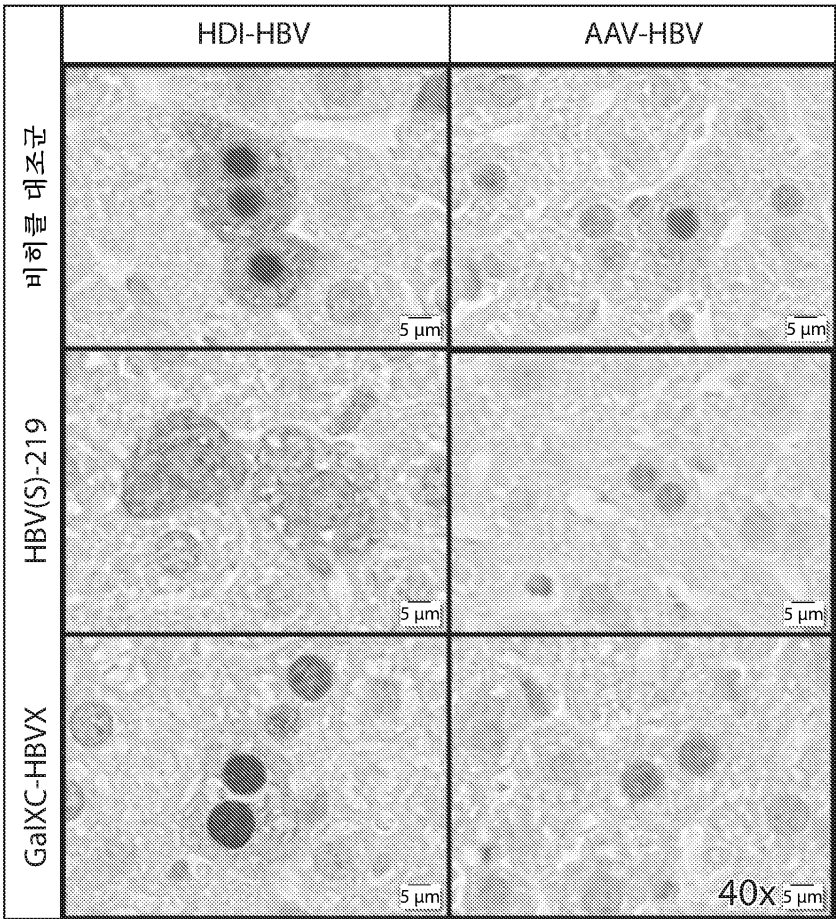
도면12a



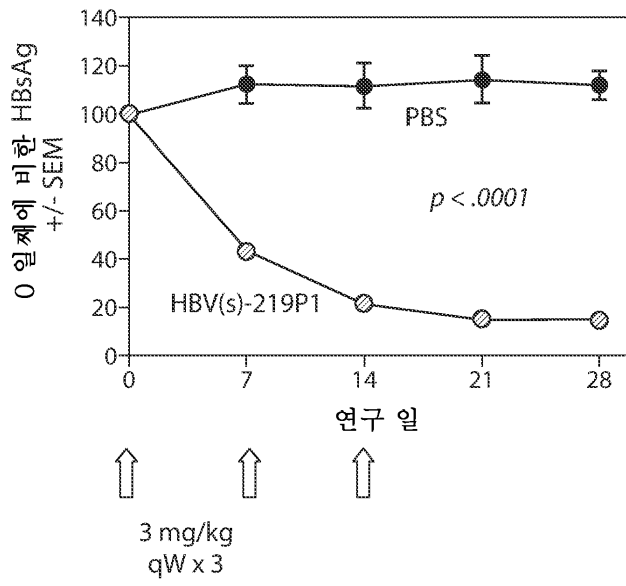
도면12b



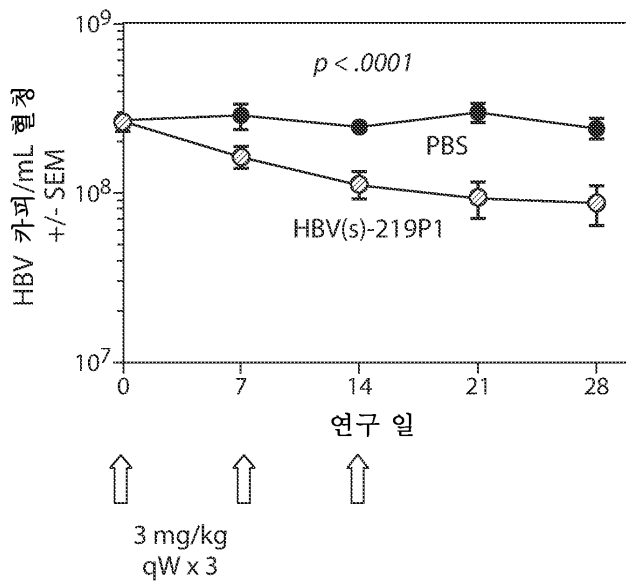
도면13



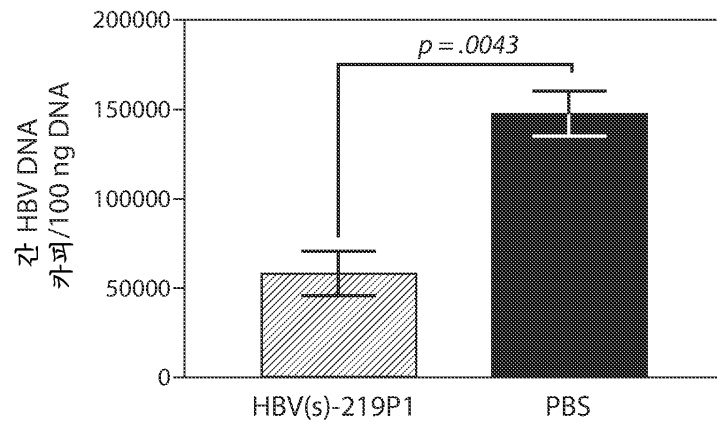
도면14a



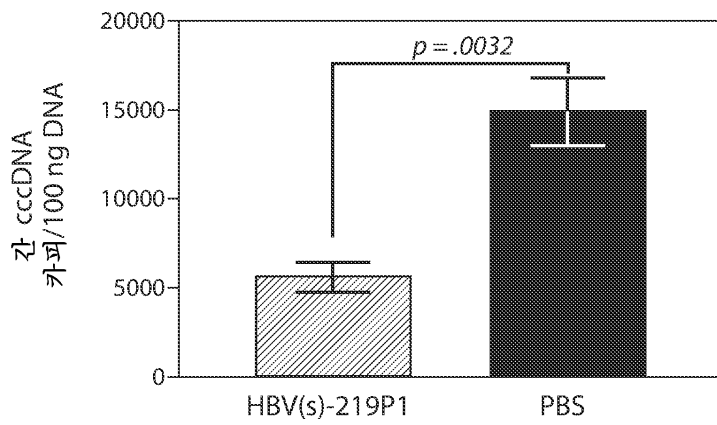
도면14b



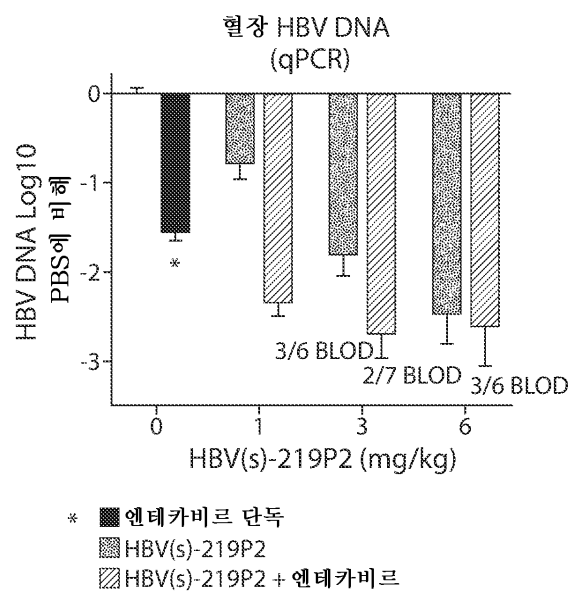
도면14c



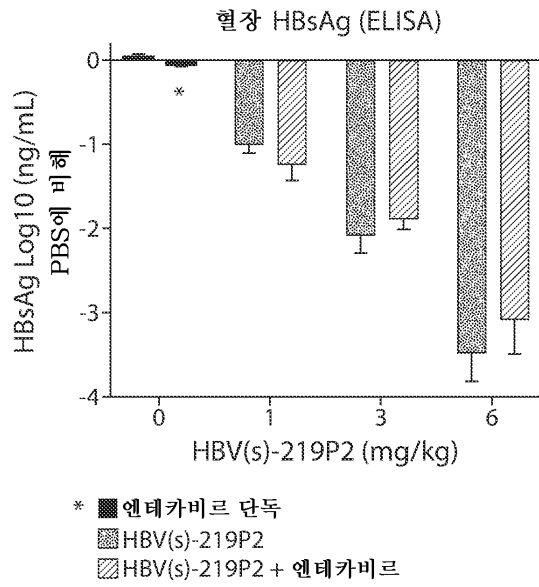
도면14d



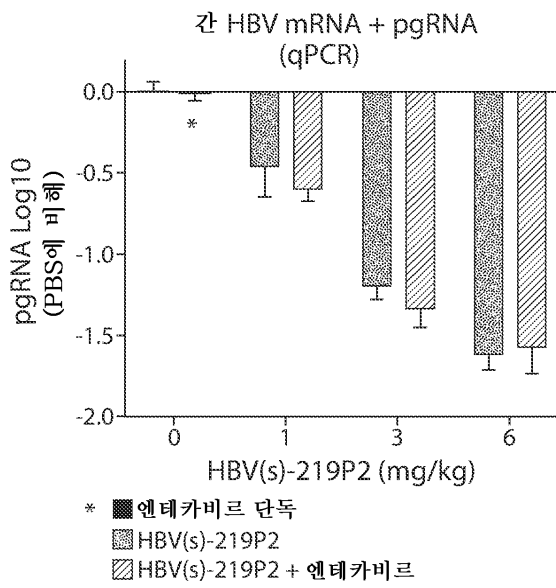
도면15a



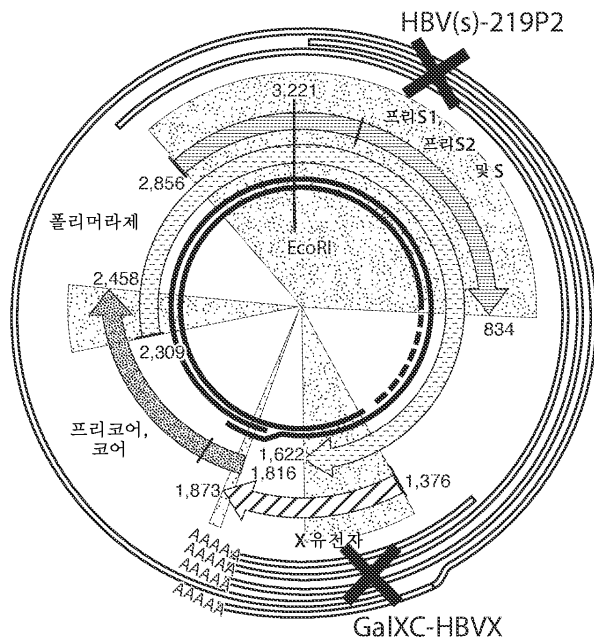
도면15b



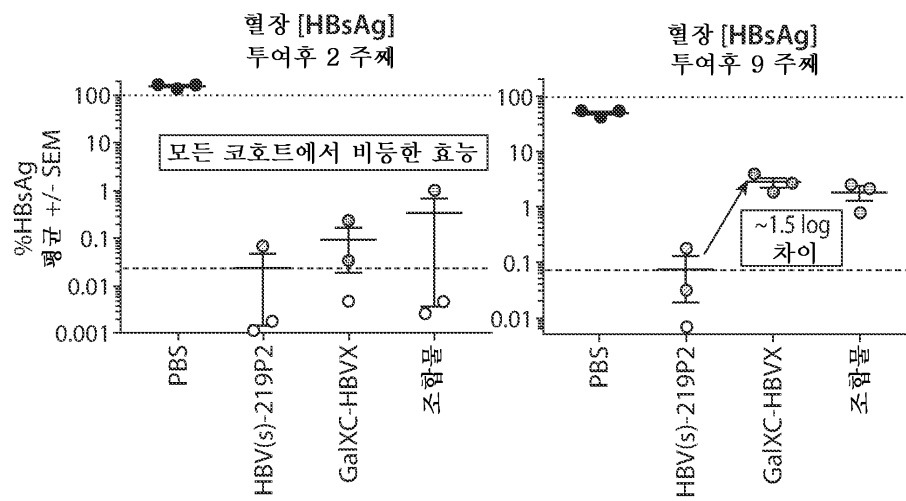
도면15c



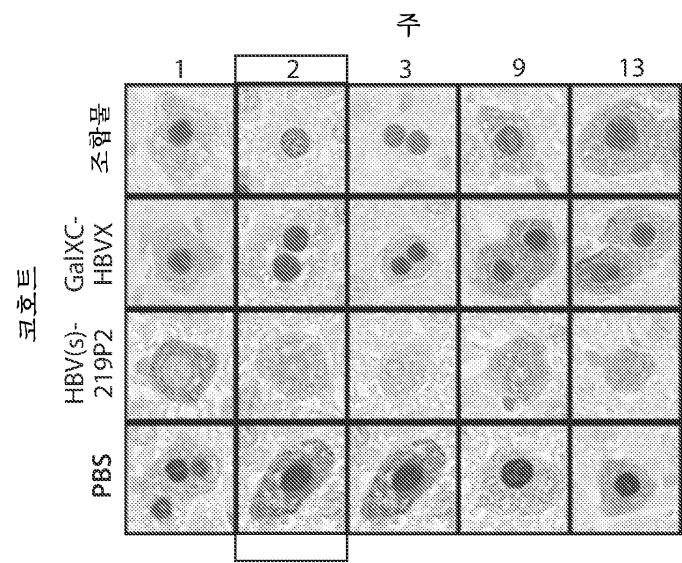
도면16a



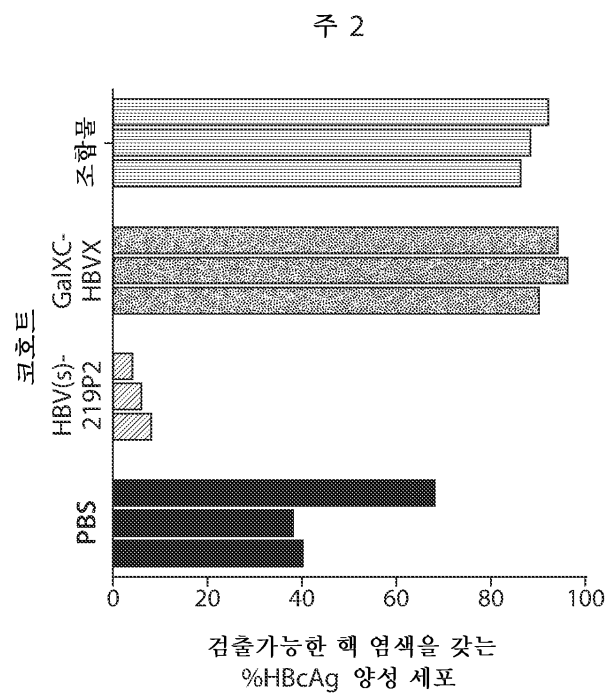
도면16b



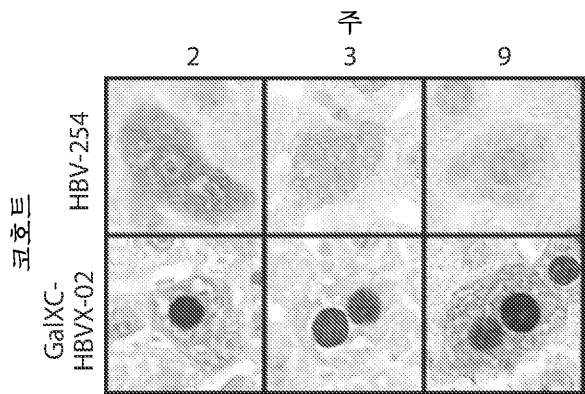
도면17a



도면17b



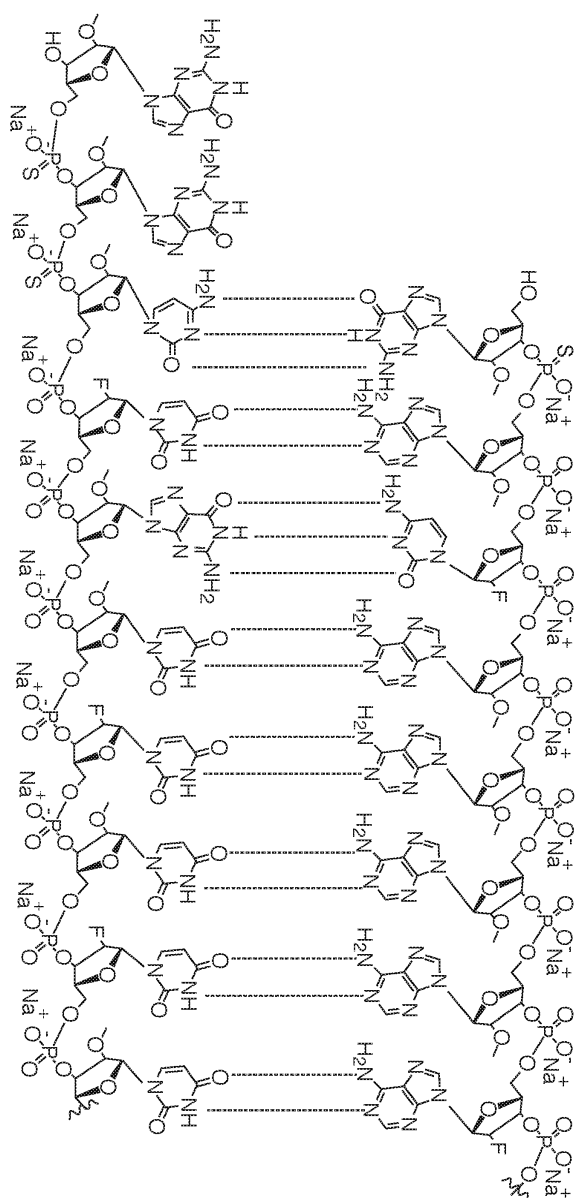
도면17c



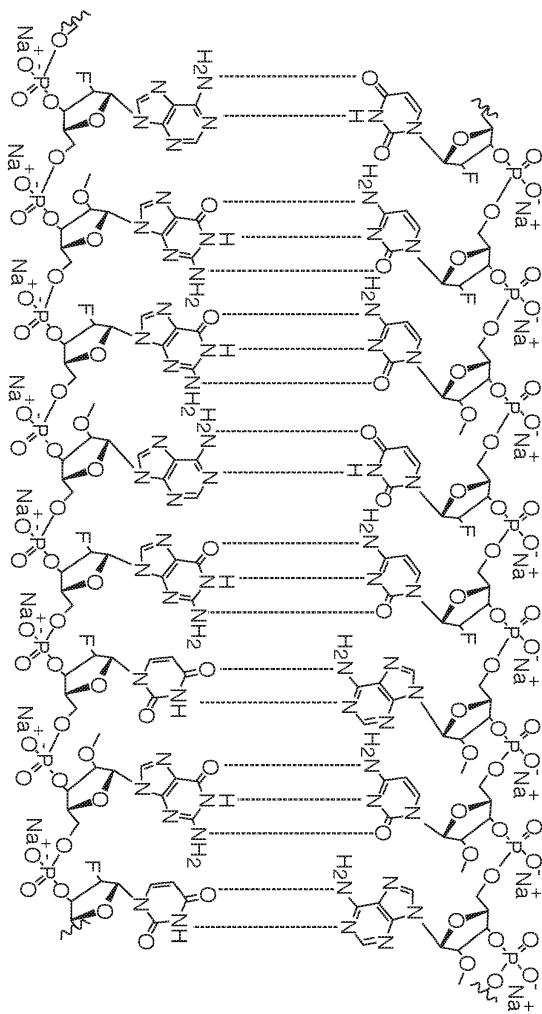
도면18

코호트별 용량					
그룹 A 코호트	용량	그룹 B 코호트	용량	그룹 C 코호트	용량
A 1	0.1 mg/kg	B 1	3.0 mg/kg	C 1	1.5 mg/kg x 4
A 2	1.5 mg/kg			C 2	3.0 mg/kg x 4
A 3	3.0 mg/kg			C 3	6.0 mg/kg x 4
A 4	6.0 mg/kg				
A 5	12.0 mg/kg				

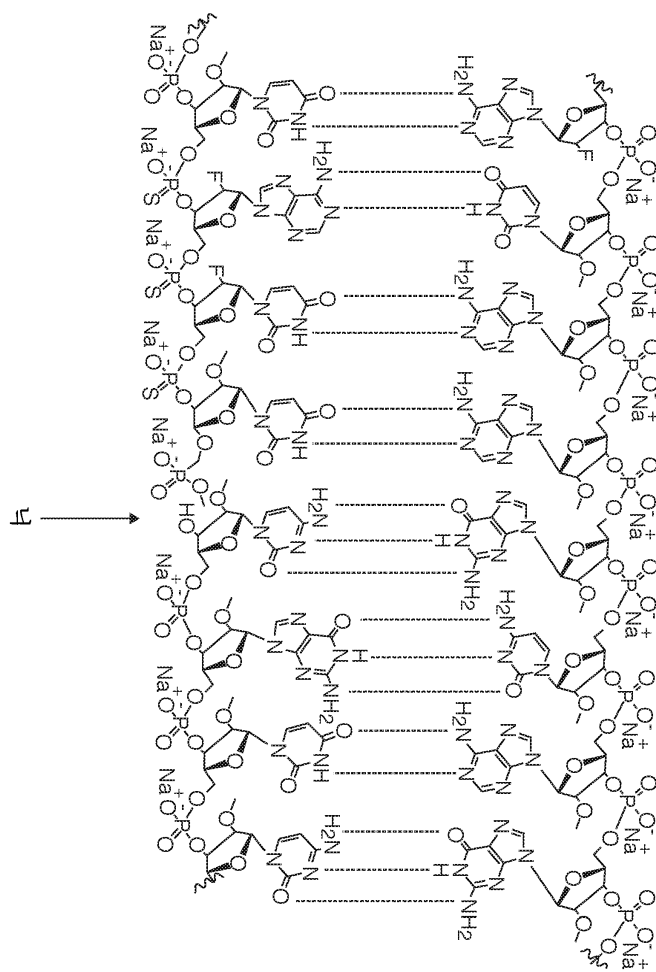
도면19aa



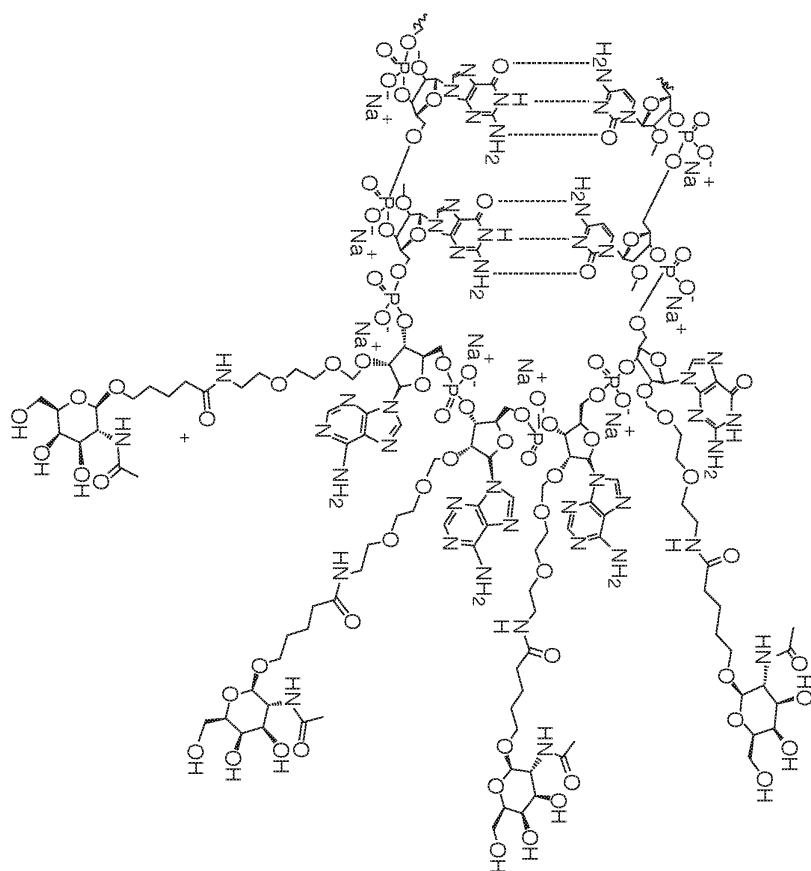
도면19ab



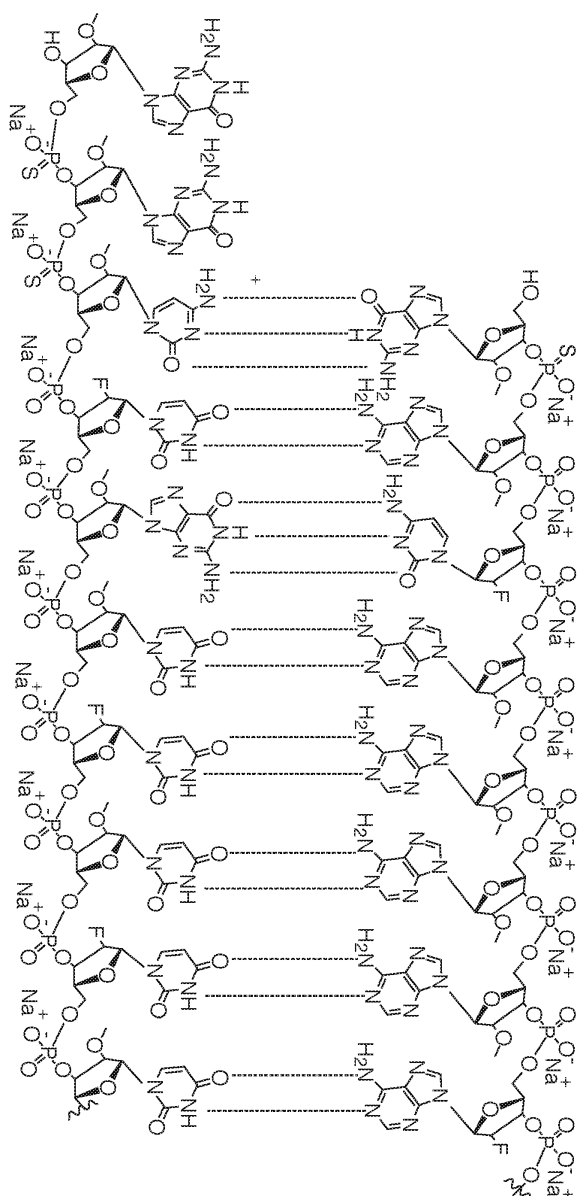
도면19ac



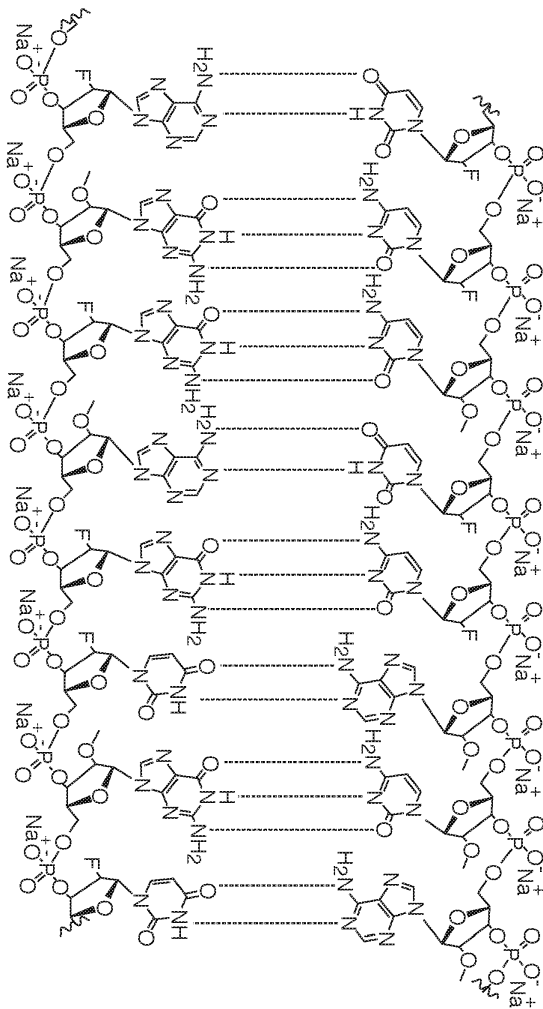
도면 19ad



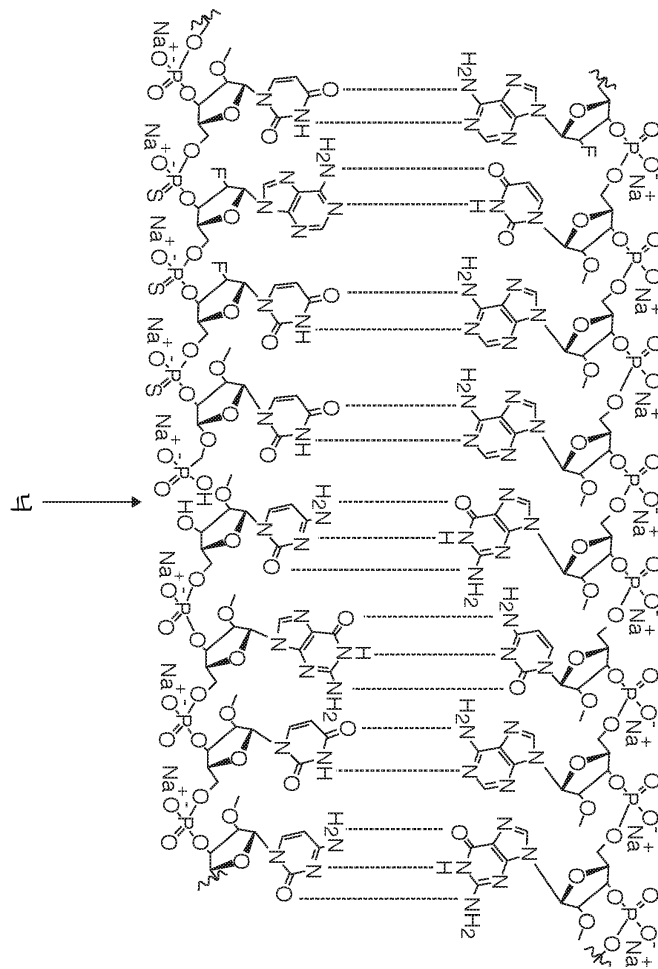
도면 19ba



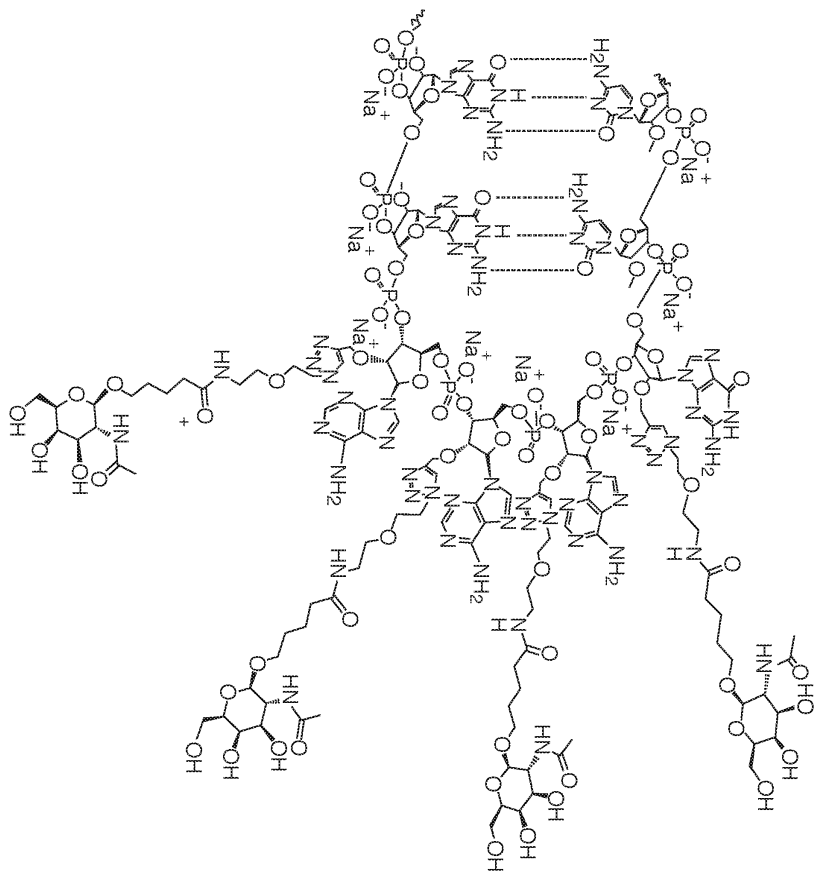
도면19bb



도면 19bc



도면 19bd



도면20

		HBV-219	HBV-254	HBV-258
ORF 표적		S	S	S
센스 19 합체		GACAAGAATCCTC ACAATA (서열식별번호: 29)	CGTGGTGGACTTCTCT CAA (서열식별번호: 30)	GTGGACTTCTCTCAAT TTT (서열식별번호: 31)
	보호한 염기를 갖는 센스 19 합체	GACAANAATCCTC ACAATA (서열식별번호: 32)	CGTGGTGGACTTCTCT CAN (서열식별번호: 33)	GTGGACTTCTCTCANT TTT (서열식별번호: 34)
미스매치의 가이드 위치		15	2	6
유전자형 표준*	유전자형 A	97/99 [3278]	94/97 [4002]	94/97 [4005]
	유전자형 B	03/95 [2563]	81/97 [2700]	82/99 [2700]
	유전자형 C	92/97 [4783]	95/97 [4938]	96/98 [4938]
	유전자형 D	95/97 [4311]	96/99 [4395]	96/98 [4398]
	유전자형 E	01/98 [1039]	93/95 [1234]	93/95 [1232]
	유전자형 F	01/90 [425]	94/96 [501]	95/96 [501]
	유전자형 G	92/99 [83]	98/98 [85]	99/99 [85]
	유전자형 H	03/92 [71]	86/97 [78]	87/99 [78]
	유전자형 I	00/100 [18]	95/100 [22]	95/100 [22]
총 (집중된 분석)		72/97 [17021]	93/97 [17995]	93/98 [17959]
총 (초기 분석)		66/96 [5628]	94/98 [5628]	94/98 [5628]

*%보존은 (완벽한/MM)으로 보고되고, <90%의 값은 굵게 표시됨; [총 N#]

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Dicerna Pharmaceuticals, Inc.

<120> PCT/US2018/056801

<130> D0800.70003W000

<140> PCT/US2018/056801

<141> 2018-10-19

<150> US 62/575,358

<151> 2017-10-20

<160> 59

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)
 <223> n is a, c, g, or u
 <400> 1
 acaanaaucc ucacaaua 18

 <210> 2
 <211> 15
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n is a, c, g, or u
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n is a, c, g, or u
 <400> 2
 uunuugugag gauun 15

 <210> 3
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n is a, c, g, or u

 <400> 3
 uuauugugag gauunuuguc 20

 <210> 4
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)
 <223> n is a, c, g, or u
 <400> 4
 uuauugugag gauunuuguc gg 22
 <210> 5
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 5
 uuauugugag gauucuuguc gg 22

 <210> 6
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 6
 uuauugugag gauuuuuguc gg 22
 <210> 7
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n is a, c, g, or u
 <400> 7
 acaanaaucc ucacaauaa 19
 <210> 8
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n is a, c, g, or u
 <400> 8
 gacaanaauc cucacaauaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 9
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 9
 gacaaaaauc cucacaauaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 10
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 10
 gacaagauc cucacaauaa gcagccgaaa ggcugc 36

 <210> 11
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 11
 aatcctcaca 10
 <210> 12
 <211> 10
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 12
 ugugaggauu 10
 <210> 13

<211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 13
 tgtgaggatt 10

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 14
 tattgtgagg attcttgca 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 15
 cgggtattgtg aggattcttg 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 16
 tgtgaggatt cttgtcaaca 20

<210> 17
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 17

uauugugagg auuuuuguca a	21
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 18	
ugcgguaauug ugaggauuct t	21
<210> 19	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 19	
acagcattgt gaggattctt gtc	23
<210> 20	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 20	
uauugugagg auuuuuguca aca	23
<210> 21	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 21	
auugugagga uuuuugucaa caa	23
<210> 22	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	

<400> 22	
uugugaggau uuuugucaac aag	23
<210> 23	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 23	
gugguggacu ucucucaaua gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 24	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 24	
uauugagaga aguccaccac gg	22
<210> 25	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 25	
uuugugagga uuuuugucaa gg	22
<210> 26	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 26	
ucugagagaa guccaccacg gg	22
<210> 27	
<211> 22	
<212> RNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 27

uacugagaga aguccaccac gg 22

<210> 28

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 28

uaaaacugag agaaguccac gg 22

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 29

gacaagaatc ctcacaata 19

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 30

cgtggtggac ttctctcaa 19

<210> 31

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 31

gtggacttct ctcaatttt 19

<210> 32

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 32
 gacaanaatc ctcacaata 19
 <210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 33
 cgtgggtggac ttctctcan 19
 <210> 34
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 34
 gtggacttct ctcantttt 19
 <210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 35
 tgttgacaag aatcctcaca at 22

<210> 36
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 36
 tcgtggtgga cttctctcaa t 21

<210> 37
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 37
 tgttgacaan aatcctcaca at 22

<210> 38
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 38
 tcgtggtgga cttctctcan t 21

<210> 39
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 39

ugcacuucgc gucaccucua gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 40

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 40

uagaggugac gcgaagugca gg 22

<210> 41

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 41

gcaccucucu uuacgcggaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 42

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 42

uuccgcguua agagaggugc gg 22

<210> 43

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> may be modified by phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(7)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(10)

<

223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(26)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> may be modified by 2'-modified-GalNAc guanosine

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(30)

<223> may be modified by 2'-modified-GalNAc adenosine

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(36)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<400> 43

gacaaaaauc cucacaauaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 44

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> may be modified by 4'-O-monomethylphosphonate-2'-O-methyl uridine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> may be modified by phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220>

><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> may be modified by 2'-fluoro-deoxyribonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(22)

<223> may be modified by 2'-O-methyl ribonucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (20)..(22)
 <223> may be modified by phosphorothioate
 <400> 44
 uuauugugag gauuuuuugu cgg 23
 <210> 45
 <211> 50

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 45
 tggtgacaag aatcctcaca atacctcgtg gtggacttct ctcaattttc 50
 <210> 46
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 46
 ggaacuguuu uuaggagugu uu 22
 <210> 47
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 47
 ggaacuguuc uuaggagugu uu 22

 <210> 48
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 48
 ggcuguuuuu aggaguguua uu 22

<210> 49
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 49
 ggcuguucuu aggaguguua uu 22
 <210> 50
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 50
 ttgacaagaa tcctcacaat ac 22

 <210> 51
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 51
 gggcaccacc ugaagagagu cu 22
 <210> 52
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 52
 gggcaccacc ugaagagagu uu 22
 <210> 53
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 53

ctcgtggtgg acttctctca at	22
<210> 54	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 54	
ggcaccaccu gaagagaguc au	22
<210> 55	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 55	
ggcaccaccu gaagagaguu au	22
<210> 56	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 56	
tcgtggtgga cttctctcaa tt	22
<210> 57	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 57	
ggcaccugaa gagagucaaa au	22
<210> 58	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 58

ggcaccugaa gagaguuaaa au

22

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 59

tgggtggactt ctctcaattt tc

22