

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036745

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.16

(21) Номер заявки
201790160

(22) Дата подачи заявки
2015.07.07

(51) Int. Cl. A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСАМИ ГЕПАТИТА В И ГЕПАТИТА D

(31) 62/022,846; 62/091,943

(32) 2014.07.10; 2014.12.15

(33) US

(43) 2017.06.30

(86) PCT/CA2015/050626

(87) WO 2016/004525 2016.01.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РЕПЛИКОР ИНК. (CA)

(72) Изобретатель:
Вайан Эндрю (CA)

(74) Представитель:
Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-2013170386
WO-A1-2014032176
WO-A2-2012075114

(57) Предложен способ лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита В, или коинфекции, вызванной вирусом гепатита В/вирусом гепатита дельта. Способ предусматривает введение первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит по меньшей мере один тиофосфатный полимер нуклеиновой кислоты, способного удалять HBsAg из крови, и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит по меньшей мере один нуклеозидный/нуклеотидный аналог-ингибитор полимеразы вируса гепатита В.

036745 B1

036745 B1

036745

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее описание относится к способам лечения субъекта, инфицированного вирусом гепатита В (HBV) или коинфицированного HBV/вирусом гепатита дельта (HDV), включающие введение первого фармацевтически приемлемого лекарственного препарата тиофосфатного полимера нуклеиновой кислоты и второго фармацевтически приемлемого лекарственного препарата нуклеозидного/нуклеотидного аналога, который ингибирует полимеразу HBV.

Предшествующий уровень техники

Вирус гепатита В (HBV) поражает 400 миллионов людей по всему миру и по оценкам является причиной 600000 смертей ежегодно в результате осложнений, возникающих из-за инфекции HBV. Несмотря на то, что разрешены к использованию несколько противовирусных лекарственных средств, ни одно из них не способно вызывать терапевтически эффективный иммунный ответ, способный обеспечивать долгосрочный контроль над инфекцией, кроме как у небольшой части пациентов, проходящих лечение.

Инфекция HBV приводит к выработке двух разных частиц: 1) самого инфекционного вируса HBV (или частицы Дейна), который включает вирусный капсид, собранный из белка корового антигена HBV (HBsAg) и покрытый поверхностным антигеном HBV (HBsAg), и 2) субвирусные частицы (или SVP), которые представляют собой частицы, подобные липопротеинам высокой плотности, состоящие из липидов, холестерина, сложных эфиров холестерина и малых и средних форм поверхностного антигена HBV (HBsAg), которые не являются инфекционными. На каждую продуцированную вирусную частицу в кровь высвобождается 1000-10000 субвирусных единиц. Как таковые, субвирусные единицы (и белок HBsAg, который они несут) представляют собой подавляющее большинство вирусного белка в крови. Инфицированные HBV клетки также секретируют растворимый протеолитический продукт прекорового белка, называемый е-антигеном HBV (HBeAg).

Вирус гепатита D (HDV) использует HBsAg для формирования своей вирусной структуры (Taylor, 2006, Virology, 344: 71-76) и, собственно, инфекция HDV может появиться только у субъектов с сопутствующей инфекцией HBV. Тогда как заболеваемость коинфекцией HDV у бессимптомных носителей HBV и заболеваемость хронической болезнью печени, связанной с HBV, является низкой в странах с низкой заболеваемостью инфекцией HBV, это является значительным осложнением у инфицированных HBV субъектов в странах с высокой заболеваемостью инфекцией HBV и может повысить скорость прогрессирования болезни печени до цирроза печени. Неудовлетворенная медицинская потребность в способах лечения инфекции HBV является еще более неотложной у субъектов с коинфекцией HBV/HDV; не существует специфического разрешенного к применению лекарственного средства, которое напрямую бы воздействовало на вирус HDV, и ответ у пациентов даже на комбинированную терапию разрешенными лекарственными средствами для лечения HBV слабее, чем у пациентов с моноинфекцией HBV (Wedemeyer et al, 2014, Oral abstract 4, 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 9-14, London, UK).

Разрешенные в настоящее время средства лечения HBV включают иммунотерапии на основе интерферона-α или тимозина-α1 и подавление продуцирования вируса путем ингибирования полимеразы HBV аналогами нуклеозидов/нуклеотидов. Ингибиторы полимеразы HBV являются эффективными в отношении снижения продуцирования инфекционных вирионов, но практически не влияют на уменьшение HBsAg или только очень медленно уменьшают HBsAg при длительном лечении у ограниченного числа пациентов (Fung et al., 2011, Am. J. Gastroenterol, 106: 1766-1773; Reijnders et al., 2011, J. Hepatol, 54: 449-454; Charuorn et al., 2014, Poster abstract 401, 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 24-28, Amsterdam, The Netherlands). Основное воздействие ингибиторов полимеразы HBV состоит в блокировке трансформации прегеномной вирусной мРНК в частично двухцепочечную ДНК, которая присутствует в инфекционных вирионах. Иммунотерапия на основе интерферона может достигать снижения концентрации инфекционного вируса и удаления HBsAg из крови, но только у небольшого процента субъектов, прошедших лечение.

HBsAg в крови может блокировать анти-HBsAg антитела и давать возможность инфекционным вирусным частицам избежать обнаружения иммунной системой, что вероятно является одной из причин, почему инфекция HBV остается хроническим заболеванием. Кроме того, HBsAg, HBeAg и HBcAg, все имеют иммуноингибиторные свойства, как рассматривается ниже, и наличие этих вирусных белков в крови пациента после введения любого из доступных в настоящее время лекарственных средств против

HBV, как описано выше, вероятно оказывает значительное воздействие, препятствуя достижению у пациентов иммунологического контроля над их инфекцией HBV.

Несмотря на то, что три основных белка HBV (HBsAg, HBeAg и HBcAg), все имеют иммуноингибиторные свойства (см. ниже), HBsAg составляет подавляющее большинство белка HBV в кровотоке субъектов, инфицированных HBV, и вероятно является основным посредником ингибирования иммунного ответа организма хозяина на инфекцию HBV. Тогда как удаление HBeAg, появление анти-HBe антител или признаки снижения вирусемии в сыворотке не коррелируют с развитием устойчивого контроля над инфекцией HBV в период без лечения, удаление сывороточного HBsAg из крови (и появление свободных анти-HBsAg антител) при инфекции HBV является широко известным отличным прогностическим признаком противовирусного ответа на лечение, которое приведет к контролю над инфекцией HBV

в период без лечения (хотя это происходит только у небольшой части пациентов, проходящих иммунотерапию или получающих ингибиторы полимеразы HBV). Таким образом, тогда как снижение всех трех основных белков HBV (HBsAg, HBeAg и HBcAg) может дать в результате оптимальное снятие ингибирующего действия, удаление HBsAg является существенным и удаления только его вероятно является достаточным для того, чтобы снять основную часть ингибирования иммунной функции у субъектов с инфекцией HBV.

Другим критическим признаком хронической инфекции HBV является создание стабильного запаса генетической информации HBV в ядре инфицированных клеток, называемой ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК). Ковалентно замкнутая кольцевая ДНК существует в виде множества копий внутри ядра в качестве внехромосомной эписомы, которая функционирует как матрица для транскрипции для получения мРНК, кодирующей все вирусные белки и незрелые геномы (прегеномная мРНК) для продуцирования новых вирионов. После инкапсуляции в цитоплазме незрелая прегеномная мРНК преобразуется в зрелую, частично двухцепочечную ДНК генома с помощью полимеразы HBV (которая инкапсулируется совместно с прегеномной мРНК), таким образом, делая зрелый геном HBV способным создать или восполнить запас кзкДНК в интактных или в прежде инфицированных клетках. Конец инфекционного процесса состоит из доставки этой частично двухцепочечной геномной матрицы HBV в ядро и его превращение в кзкДНК.

Запас кзкДНК может быть восполнен в ядре инфицированных клеток посредством ядерного импорта капсид HBV, содержащих зрелые геномы HBV, которые восполняют число копий кзкДНК. Это восполнение кзкДНК в ядре достигается с помощью двух механизмов: прямого ядерного импорта собранных капсид из цитоплазмы или повторной инфекции прежде инфицированных гепатоцитов с последующей челночной доставкой интернализированных капсидов в ядро (Rabe et al, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 9849-9854). Ингибирование или прекращение транскрипции этого геномного запаса HBV в ядре является критическим для установления длительного контроля над инфекцией HBV после лечения.

Длительное лечение нуклеозидными/нуклеотидными ингибиторами полимеразы HBV может уменьшить число копий кзкДНК внутри ядра, что согласуется со способностью ингибиторов полимеразы HBV блокировать восполнение кзкДНК посредством ядерного импорта капсидов, содержащих зрелые геномы HBV. Однако в то время как число копий кзкДНК на гепатоцит снижено, кзкДНК все еще остается транскрипционно активной, таким образом, уровни HBsAg остаются в значительной степени не затронутыми (Werle-Lapostolle et al., 2004, Gastroenterol, 126: 1750-1758; Wong et al., 2013, Clin. Gastroenterol. Hepatol., 11: 1004-1010; Wong et al., 2014, Poster abstract 1074, 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 9-14, London, UK). Ковалентно замкнутую кольцевую ДНК можно транскрипционно инактивировать посредством иммуноопосредованных процессов (Belloni et al., 2012, J. Clin. Inv., 122: 529-537), но способность иммунного ответа провоцировать цитокиновые ответы, необходимые для инактивации кзкДНК, вероятно блокируется постоянно циркулирующим HBsAg, как описано в заявке на патент США №2014/0065102 (который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки), и это согласуется с неэффективностью иммунотерапии при лечении инфекции HBV.

Соответственно, в области медицины существует неудовлетворенная потребность в разработке схемы лечения, которая может вызвать долговременный иммунологический контроль над инфекцией HBV у большей части пациентов, получающих такое лечение.

Сущность изобретения

В заявке предложен способ лечения инфекции HBV или конинфекции HBV/HDV. Данный способ включает введение первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит хелатный комплекс по меньшей мере одного тиофосфатного полимера нуклеиновой кислоты, способного удалять HBsAg из крови, и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит по меньшей мере один нуклеозидный/нуклеотидный аналог-ингибитор полимеразы HBV.

Указанный полимер нуклеиновой кислоты может содержать рибозу с модификацией в 2'-положении, где модифицирована может быть как одна рибоза, так и несколько рибоз, включая все рибозы в полимере нуклеиновой кислоты.

Полимер нуклеиновой кислоты также может предусматривать 2'-О-метил-модификацию рибозы. Данная модификация может затронуть как по меньшей мере одну рибозу, так и все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты.

В еще одном воплощении, полимер нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один 5'-метилцитозин. В связанном воплощении предусмотрено, что все цитозины, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, представлены в виде 5'-метилцитозина.

Используемый в способе полимер нуклеиновой кислоты может содержать и по меньшей мере одну 2'-О-метил-модификацию рибозы и по меньшей мере один 5'-метилцитозин. В частном случае воплощения это предусматривает, что все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, имеют 2'-О-метил-модификацию, и все цитозины, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, представлены в виде 5'-метилцитозина.

Второе фармацевтически приемлемое средство в частных случаях воплощения может представлять собой хелатный комплекс с кальцием, хелатный комплекс с магнием или хелатный комплекс с кальци-

ем/магнием.

Согласно одному воплощению изобретения, указанные первое и второе фармацевтически приемлемые средства входят в состав одной фармацевтической композиции. Альтернативно, указанные первое и второе фармацевтически приемлемые средства могут входить в состав разных фармацевтических композиций.

В способе по изобретению указанные первое и второе фармацевтически приемлемые средства могут быть введены одновременно.

Также предусмотрено воплощение, когда фармацевтические средства вводят разными путями. Например, указанные первое и второе фармацевтически приемлемые средства вводят с использованием одного или нескольких следующих способов: пероральный прием внутрь, ингаляция аэрозоля, подкожная инъекция, внутривенная инъекция и внутривенная инфузия.

Дополнительно в изобретении предложен способ лечения инфекции HBV или конинфекции HBV/HDV, включающий введение первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит хелатный комплекс по меньшей мере одного тиофосфатного полимера нуклеиновой кислоты, способного удалять HBsAg из крови, который выбран из:

последовательности SEQ ID NO: 2;

последовательности SEQ ID NO: 10;

последовательности SEQ ID NO: 13;

последовательности SEQ ID NO: 1, 3-9, 11, 12 и 14-20;

тиофосфатного олигонуклеотида длиной от 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности AC;

тиофосфатного олигонуклеотида длиной от 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности CA;

тиофосфатного олигонуклеотида длиной от 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности TG, и

тиофосфатного олигонуклеотида длиной от 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности GT;

и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит по меньшей мере один нуклеозидный/нуклеотидный аналог-ингибитор полимеразы HBV и выбрано из следующих веществ:

ламивудин;

адефовир дипивоксил;

энтекавир;

телбивудин;

тенофовира дизопроксил фумарат;

эмтрицитабин;

клевудин;

безифовир;

тенофовира алафенамида фумарат;

AGX-1009;

элвусцитабин;

лагоцикловира валактат;

прадефовира мезилат;

валторцитабин и

любой нуклеозидный/нуклеотидный аналог, который ингибирует полимеразу HBV.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан синергетический эффект комбинированной терапии с полимером нуклеиновой кислоты (ПНК) REP 2055 (SEQ ID NO: 2) и энтекавиром (ЭТВ) в отношении снижения сывороточных уровней HBsAg.

На фиг. 2А показана противовирусная активность ПНК, вводимых инфицированным пекинским уткам в виде хелатных комплексов с кальцием, с вирусом гепатита В уток (DHBV), измеренным с помощью мониторинга сывороточного HBsAg уток (DHBsAg) в конце лечения с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

На фиг. 2В показана противовирусная активность ПНК, вводимых инфицированным пекинским уткам в виде хелатных комплексов с кальцием, с DHBV, оцененным с помощью мониторинга ДНК DHBV в печени в конце лечения с использованием количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

На фиг. 3А показаны уровни ДНК DHBV в сыворотке уток, проходивших лечение в течение 28 дней физиологическим раствором, в следующие периоды времени: А) перед лечением, В) когда лечение на половину завершено, С) конец лечения, D) один месяц после лечения и Е) два месяца после лечения. Нижний предел количественного определения (НПКО) составляет $3,1 \times 10^4$ ВГЭ/мл. Значения ниже НПКО были установлены на уровне 3×10^3 ВГЭ/мл. ВГЭ = вирусные геном-эквиваленты.

На фиг. 3В показаны уровни ДНК DHBV в сыворотке уток, проходивших лечение в течение 28 дней

тенофиром дизопроксил фумаратом (ТДФ), в следующие периоды времени: А) перед лечением, В) когда лечение на половину завершено, С) конец лечения, D) один месяц после лечения и Е) два месяца после лечения. Нижний предел количественного определения (НПКО) составляет $3,1 \times 10^4$ ВГЭ/мл. Значения ниже НПКО были установлены на уровне 3×10^3 ВГЭ/мл. ВГЭ = вирусные геном-эквиваленты.

На фиг. 3С показаны уровни ДНК DHBV в сыворотке уток, проходивших лечение в течение 28 дней REP 2139-Са, в следующие периоды времени: А) перед лечением, В) когда лечение на половину завершено, С) конец лечения, D) один месяц после лечения и Е) два месяца после лечения. Нижний предел количественного определения (НПКО) составляет $3,1 \times 10^4$ ВГЭ/мл. Значения ниже НПКО были установлены на уровне 3×10^3 ВГЭ/мл. ВГЭ = вирусные геном-эквиваленты.

На фиг. 3D показаны уровни ДНК DHBV в сыворотке уток, проходивших лечение в течение 28 дней REP 2139-Са и ТДФ, в следующие периоды времени: А) перед лечением, В) когда лечение на половину завершено, С) конец лечения, D) один месяц после лечения и Е) два месяца после лечения. Нижний предел количественного определения (НПКО) составляет $3,1 \times 10^4$ ВГЭ/мл. Значения ниже НПКО были установлены на уровне 3×10^3 ВГЭ/мл. ВГЭ = вирусные геном-эквиваленты.

На фиг. 3Е показаны уровни ДНК DHBV в сыворотке уток, проходивших лечение в течение 28 дней REP 2139-Са, ТДФ и энтекавиром (ЭТВ), в следующие периоды времени: А) перед лечением, В) когда лечение на половину завершено, С) конец лечения, D) один месяц после лечения и Е) два месяца после лечения. Нижний предел количественного определения (НПКО) составляет $3,1 \times 10^4$ ВГЭ/мл. Значения ниже НПКО были установлены на уровне 3×10^3 ВГЭ/мл. ВГЭ = вирусные геном-эквиваленты.

Подробное описание изобретения

Согласно настоящей заявке предложена комбинированная терапия против инфекции HBV, которая состоит из введения первого фармацевтически приемлемого средства, способного удалять HBsAg из крови, и второго фармацевтически приемлемого средства, которое ингибирует полимеразу HBV. Подобная комбинированная терапия позволяет восстанавливать иммунную функцию организма хозяина (путем удаления сывороточного HBsAg), что в свою очередь приводит к иммуноопосредованной транскрипционной инактивации кзкДНК и/или снижению числа копий кзкДНК в инфицированных гепатоцитах, вместе с одновременной блокировкой процесса воспроизведения кзкДНК посредством ядерного импорта капсидов, содержащих зрелые геномы HBV, или блокировкой продуцирования инфекционного вируса (путем ингибирования полимеразы HBV). Комбинированные синергетические эффекты этих двух средств могут ускорить появление противовирусного ответа на терапию и/или элиминацию кзкДНК из инфицированных клеток, таким образом, сокращая время проведения терапии, необходимое для получения устойчивого подавления инфекции в период без лечения. Важно, что этих эффектов можно достичь в условиях отсутствия иммунотерапии. Это комбинированное лечение будет эффективным при моноинфекции HBV и коинфекции HBV/HDV.

HBsAg играет ключевую роль в инфекции HBV и коинфекции HBV/HDV. Кроме его роли в качестве существенного структурного компонента для формирования вириона, HBsAg также высвобождается в больших количествах в кровь инфицированных субъектов в форме субвирусных частиц (SVP), у которых нет вирусного капсида и генома и чья функция кажется главным образом состоит в доставке HBsAg в кровь. Субвирусные единицы секретируются из инфицированных клеток в 1000-10000 кратном избытке по сравнению с секрецией вируса, что позволяет субвирусным единицам эффективно блокировать антитела к HBsAg (анти-HBs), так что вирус гепатита В или вирус гепатита D в крови может избегать узнавания приобретенным иммунитетом. Несколько исследований также предположили, что HBsAg может также иметь функцию, состоящую в прямой блокировке активации приобретенного и врожденного иммунных ответов на инфекцию HBV (Cheng et al., 2005, Journal of hepatology, 43:4 65-471; Op den Brouw et al., 2009, Immunology, 126: 280-289; Vanlandschoot et al., 2002, The Journal of general virology, 83: 1281-1289; Wu et al., 2009, Hepatology, 49: 1132-1140; Xu et al., 2009, Molecular immunology, 46: 2640-2646). Наличие такой функциональности при инфекции человека HBV и степень ее воздействия на активность иммунотерапевтических средств и дополнительную применимость этих противовирусных эффектов при коинфекции HBV/HDV ранее было описано в заявке на патент США № 2014/0065102 A1, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки. Несмотря на то, что также было показано, что HBeAg и HBcAg имеют иммуноингибиторные свойства (Kanda et al., 2012, J. Inf. Dis., 206: 415-420; Lang et al., 2011, J. Hepatol., 55: 762-769; Gruffaz et al., 2013, J. Hepatol., 58 (suppl), p s155, Abstract 378), они вероятно имеют минимальную степень воздействия, учитывая очень малую долю HBeAg и HBcAg относительно доли HBsAg в крови.

Нуклеозидные/нуклеотидные аналоги-ингибиторы полимеразы HBV (нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, НИОТ) являются широко известным классом противовирусных средств, чья активность против инфекции HBV проявляется по одинаковому механизму действия: этот класс соединений действует в качестве немедленных или отсроченных терминаторов синтеза цепи посредством конкуренции с природными нуклеотидными субстратами в ходе элонгации цепи ДНК (Menendez-Arias et al., 2015 Curr. Op. Virol. 8: 1-9). Этот класс соединений может сохранять фундаментальную внутреннюю структуру нуклеотида/нуклеозида, состоящую из азотистого основания и сахара, или может быть пред-

ставлен ациклическими нуклеотидами, или может не содержать кольца сахара или псевдосахара, или может иметь фосфовую группу, заменяющую α -фосфат, и может иметь много других дополнительных представленных модификаций, как описано в Michailidis et al., 2012 *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 44: 1060-1071 и De Clercq et al., 2010 *Viruses* 2: 1279-1305.

Утки, инфицированные вирусом гепатита В уток (DHBV), являются общепринятой моделью инфекции HBV и были использованы для оценки нескольких НИОТ HBV, применяемых в настоящее время для лечения человека (Schultz et al., 2004, *Adv Virus Res.* 63:1-70; Foster et al., 2005, *J Virol.* 79:5819-5832; Nicoll et al., 1998, *Antimicrob Agents Chemother.* 42:3130-3135). Было показано, что полимеры нуклеиновых кислот (ПНК), которые являются тиофосфатными, имеют противовирусную активность в инфицированных DHBV утках (Noordeen et al., 2013 *Anti-Microb. Agents Chemother.* 57: 5291- 5298 и 5299- 5306), которая не обусловлена никаким прямым иммуностимулирующим механизмом. Кроме того, при терапевтическом вмешательстве с использованием ПНК REP 2055 (SEQ ID N0:2) в ранее сф инфекцию DHBV in vivo REP 2055 привел к очищению сыворотки от HBsAg уток (DHBsAg), которое сопровождалось транскрипционной инактивацией кзкДНК и снижением числа копий кзкДНК (Noordeen et al, 2009, Abstract 88 HEPDART meeting Dec 6-9, HI, USA). Эта инактивация и элиминация кзкДНК вызвана удалением DHBsAg-опосредованной репрессии иммунной функции организма хозяина, которая затем может инактивировать и очистить от кзкДНК инфицированные клетки с помощью известных иммуноопосредованных механизмов (Levrero et al., 2009, *J. Hepatol.* 51: 581-592; Belloni et al., 2012, *J. Clin. Inv.*, 122: 529-537).

ПНК эффективно удаляют HBsAg из крови пациентов, как описано в заявке на патент США №2014/0065102. В принятой доклинической модели инфекции HBV (пекинские утки, зараженные HBV уток) лечение ПНК привело к элиминации сывороточного HBsAg уток (DHBsAg), и восстановление иммунной функции в условиях отсутствия сывороточного DHBsAg смогло как транскрипционно инактивировать, так и элиминировать кзкДНК из инфицированных гепатоцитов (Noordeen et al., 2009, Abstract 88, HEPDART meeting Dec 6-10, HI, USA). Таким образом, удаление HBsAg из сыворотки инфицированных HBV пациентов предположительно будет иметь такое же эффект в отношении инактивации кзкДНК в инфицированных гепатоцитах человека in situ.

Следовательно, как описано в настоящей заявке, эффективное средство для более быстрого установления контроля над сывороточной вирусемией или для установления длительного контроля над активностью кзкДНК и/или элиминации кзкДНК из гепатоцитов, инфицированных HBV, которое состоит из нового комбинированного подхода, при котором HBsAg снижен или удален из крови путем применения фармацевтически приемлемого препарата тиофосфатного ПНК и восполнение кзкДНК и продуцирование инфекционного вируса заблокировано вторым фармацевтически приемлемым препаратом нуклеотидного/нуклеозидного аналога, ингибирующего полимеразу HBV. Такой комбинированный подход имеет следующие новые и важные преимущества:

1) совмещает способность улучшенной иммунной функции организма хозяина (вызванной удалением сывороточного HBsAg) транскрипционно инактивировать и/или уменьшать число копий кзкДНК внутри клетки с блокадой процесса восполнения кзкДНК (посредством предотвращения попадания капсидов, содержащих зрелые геномы, в ядро (путем ингибирования активности полимеразы HBV) или предотвращения продуцирования инфекционных вирионов (посредством предотвращения трансформации прегеномной РНК в частично двухцепочечную ДНК внутри капсида HBV);

2) имеет синергетический эффект в отношении снижения длительности лечения, необходимого для удаления, элиминации или установления транскрипционной супрессии кзкДНК или контроля над сывороточной вирусемией в инфицированных гепатоцитах в печени по причине перекрывающихся эффектов от указанных двух фармацевтически приемлемых средств; и

3) не требует применение иммунотерапии (как сказано, конкретно необходимой в заявке на патент США № 2014/0065102) для достижения устойчивого контроля над инфекцией HBV после лечения, что будет представлять собой важное терапевтическое улучшение, учитывая слабую переносимость иммунотерапии у многих пациентов.

Улучшенные противовирусные эффекты при применении способов, описанных выше, будут иметь такой же благоприятный терапевтический эффект у пациентов с моноинфекцией HBV и коинфекцией HBV/HDV, так как инфекция HDV не может существовать при отсутствии инфекции HBV, как описано выше.

Следовательно, в условиях отсутствия в настоящее время какой-либо схемы лечения, которая могла бы либо элиминировать, либо установить длительный контроль над активностью кзкДНК без применения иммунотерапии у большей части пациентов, согласно настоящей заявке впервые предложена эффективное комбинированное лечение против инфекции HBV и коинфекции HBV/HDV, которое одновременно снижает или очищает от HBsAg кровь и которое блокирует процесс восполнения кзкДНК в ядре клеток, инфицированных HBV. Эти эффекты можно достичь применением фармацевтически приемлемого препарат тиофосфатного ПНК, применяемого в комбинации с фармацевтически приемлемым нуклеотидным/нуклеозидным аналогом-ингибитором полимеразы HBV.

Указанный новый комбинированный подход является эффективным в условиях отсутствия имму-

нотерапии, что имеет важные преимущества, состоящие в улучшении переносимости лечения и снижения частоты возникновения случаев гематологических и других побочных эффектов, которые, как известно, возникают с применением иммунотерапии.

Термин "олигонуклеотид" (ON) относится к олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) и/или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Указанный термин включает олигонуклеотиды, состоящие из модифицированных нуклеотидных оснований (включая 5'-метилцитозин и 4'-тиоурацил), сахаров и ковалентных межнуклеозидных (остов) связей, а также олигонуклеотидов, имеющих не встречающиеся в природе части, которые функционируют схожим образом. Подобные модифицированные или замененные олигонуклеотиды могут быть предпочтительнее, чем природные формы, из-за требуемых свойств, таких как, например, сниженная иммунореактивность, улучшенное клеточное поглощение, улучшенная аффинность по отношению к мишени, представляющей нуклеиновую кислоту (в контексте антисмысловых олигонуклеотидов, коротких интерферирующих РНК (киРНК, siRNA) и коротких шпилечных РНК (кшРНК, shRNA)), и/или повышенная устойчивость к опосредованной нуклеазами деградации. Олигонуклеотиды также могут быть двухцепочечными. Олигонуклеотиды также включают одноцепочечные молекулы, такие как антисмысловые олигонуклеотиды, шпигельмеры и аптамеры и микроРНК (miRNA), а также двухцепочечные молекулы, такие как короткие интерферирующие РНК (киРНК, siRNA) или короткие шпилечные РНК (кшРНК, shRNA).

Олигонуклеотиды могут включать различные модификации, например, стабилизирующие модификации, и, таким образом, могут включать по меньшей мере одну модификацию в фосфодиэфирной связи и/или в структуре сахара, и/или в структуре основания. Например, олигонуклеотид может включать без ограничения одну или несколько модификаций или быть полностью модифицированным, так что содержать все связи, или сахара, или основания с перечисленными модификациями. Модифицированные связи могут включать тиофосфатные связи и дитиофосфатные связи. Несмотря на то, что модифицированные связи являются полезными, олигонуклеотиды могут включать фосфодиэфирные связи. Дополнительные полезные модификации включают без ограничения модификации в 2'-положении сахара, включая 2'-О-алкил-модификации, такие как 2'-О-метил-модификации, 2'-О-метоксиэтил-модификации (2'-МОЭ), 2'-амино-модификации, 2'-галоген-модификации, такие как 2'-фтор; ациклические нуклеотидные аналоги. Другие модификации в 2'-положении также известны в данной области техники и могут быть использованы, например, закрытые нуклеиновые кислоты. В частности, олигонуклеотид имеет модифицированные связи в своем составе или у него каждая связь является модифицированной, например, тиофосфатной; имеет 3'-кэп и/или 5'-кэп; включает концевую 3'-5' связь; олигонуклеотид является или содержит конкатемер, состоящий из двух или более олигонуклеотидных последовательностей, соединенных линкером (линкерами). Модификации оснований могут включать 5'-метилирование цитозинового основания (5'-метилцитозин или, в контексте нуклеотида, 5'-метилцитидин) и/или 4'-тионирование урацилового основания (4'-тиоурацил или, в контексте нуклеотида, 4'-тиоуридин). Различные химически совместимые модифицированные связи могут быть скомбинированы в тех случаях, когда условия синтеза являются химически совместимыми, например, в случае олигонуклеотида с тиофосфатными связями, модификацией рибозы в 2'-положении (такой как 2'-О-метилирование) и модифицированным основанием (таким как 5'-метилцитозин). Олигонуклеотид может быть дополнительно полностью модифицирован с применением всех этих различных модификаций (например, каждая связь является тиофосфатной, каждая рибоза модифицирована в 2'-положении и каждое основание является модифицированным).

Как охватывается настоящей заявкой, термин «полимер нуклеиновой кислоты» или ПНК представляет собой любой одноцепочечный олигонуклеотид, который не содержит никакой функциональности, специфичной для последовательности, чтобы как гибридизироваться с нуклеиновой кислотой-мишенью, так и принимать специфическую для последовательности вторичную структуру, которая приводит в результате к связыванию со специфическим белком. Биохимическая активность ПНК не зависит от распознавания Toll-подобными рецепторами олигонуклеотидов, гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью или аптамерного взаимодействия, требующего специфической вторичной/третичной структуры олигонуклеотида, производной от специфического порядка расположения присутствующих нуклеотидов. ПНК могут включать модификации оснований, и/или связей, и/или сахаров, как описано выше. Для того, чтобы ПНК имели противовирусную активность, им необходимо тиофосфатирование. Примерные противовирусные соединения ПНК перечислены в табл. 1.

Таблица 1. Примеры противовирусных ПНК, которые могут быть полезными в настоящем описании

Тип нуклеиновой кислоты	Последовательность (5' – 3')	Модификация
ДНК	(dAdC) ₂₀ (SEQ ID NO: 2)	Все связи являются тиофосфатными
ДНК	(dCdA) ₂₀ (SEQ ID NO: 1)	Все связи являются тиофосфатными
ДНК	(dA-5' MedC) ₂₀ (SEQ ID NO: 3)	Все связи являются тиофосфатными
ДНК	(5' MedC-dA) ₂₀ (SEQ ID NO: 4)	Все связи являются тиофосфатными
РНК	(AC) ₂₀ (SEQ ID NO: 5)	Все связи являются тиофосфатными Все рибозы с 2'-ОМе-модификацией
РНК	(CA) ₂₀ (SEQ ID NO: 6)	Все связи являются тиофосфатными Все рибозы с 2'-ОМе-модификацией
ДНК	(dTdG) ₂₀ (SEQ ID NO: 7)	Все связи являются тиофосфатными
ДНК	(dGdT) ₂₀ (SEQ ID NO: 8)	Все связи являются тиофосфатными
РНК	(5' MeC-A) ₂₀ (SEQ ID NO: 9)	Все связи являются тиофосфатными Все рибозы с 2'-ОМе-модификацией
РНК	(A- 5' MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 10)	Все связи являются тиофосфатными Все рибозы с 2'-ОМе-модификацией
РНК/ДНК	(A-5' MedC) ₂₀ (SEQ ID NO: 11)	Все связи являются тиофосфатными Все рибозы в рибоаденозинах являются 2'-ОМе-модифицированными
РНК	(A-5' MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 12)	Все связи являются тиофосфатными Все рибозы с 2'-ОМе-модификацией, кроме рибоаденозинов в положениях 13 и 27 (которые имеют 2'-Н-модификацию)
РНК	(A-5' MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 13)	Все связи являются тиофосфатными Все рибозы с 2'-ОМе-модификацией, кроме рибоаденозинов в положениях 11, 21 и 31 (которые имеют 2'-Н-модификацию)
РНК	(A-5' MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 14)	Все связи являются тиофосфатными Все 5' MeC-рибозы являются 2'-ОМе-модифицированными
РНК/ДНК	(dA-5' MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 15)	Все связи являются тиофосфатными Все 5' MeC-рибозы являются 2'-ОМе-модифицированными
РНК/ДНК	(5' MedC-A) ₂₀ (SEQ ID NO: 16)	Все связи являются тиофосфатными Все рибозы А являются 2'-ОМе-модифицированными
РНК	(5' MeC-A) ₂₀ (SEQ ID NO: 17)	Все связи являются тиофосфатными Все рибозы с 2'-ОМе-модификацией, кроме рибоаденозинов в положениях 14 и 28 (которые имеют 2'-Н-модификацию)
РНК	(5' MeC-A) ₂₀ (SEQ ID NO: 18)	Все связи являются тиофосфатными Все рибозы с 2'-ОМе-модификацией, кроме рибоаденозинов в положениях 10, 20 и 30 (которые имеют 2'-Н-модификацию)
РНК	(5' MeC-A) ₂₀ (SEQ ID NO: 19)	Все связи являются тиофосфатными Все 5' MeC-рибозы являются 2'-ОМе-модифицированными
РНК/ДНК	(5' MeC-dA) ₂₀ (SEQ ID NO: 20)	Все связи являются тиофосфатными Все 5' MeC-рибозы являются 2'-ОМе-модифицированными

dA = дезоксиаденозин,

A = аденозин,

dC = дезоксицитидин,

C = цитидин,

dT = дезокситимидин, dG = дезоксигуанозин,

2'ОМе = 2'-О-метил,

5' MeC = 5'-метилцитозин -модифицированный цитидин,

5' MedC = 5'-метилцитозин - модифицированный дезоксицитидин

В настоящем описании термин "олигонуклеотидный хелатный комплекс" относится к двум или более олигонуклеотидам, соединенным межмолекулярно двухвалентным или поливалентным катионом металла, и может встречаться в случаях одноцепочечных или двухцепочечных олигонуклеотидов. Олигонуклеотидные хелатные комплексы нейтрализуют присущие олигонуклеотидам хелатные свойства, которые могут вносить вклад в связанные с введением побочные эффекты при применении этих соеди-

нений. Введение олигонуклеотидных хелатных комплексов представляет собой способ введения олигонуклеотида субъекту, где связанные с введением побочные эффекты, ассоциированные с нехелатированными олигонуклеотидами (которые являются олигонуклеотидами, вводимыми в виде солей натрия, как это широко применяют в данной области техники), уменьшены, как описано в патентах США №№ 8513211 и 8716259, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Эти побочные эффекты могут включать дрожь, лихорадку и озноб при применении внутривенной инфузии или индукцию, воспаление и боль в месте инъекции при применении подкожного введения. Введение олигонуклеотидных хелатных комплексов не влияет на биохимическую активность олигонуклеотидов, когда применяют обычным способом в виде солей натрия. Таким образом, любое ПНК, описанное в настоящей заявке, может быть необязательно получено в виде олигонуклеотидного хелатного комплекса без воздействия на его биохимическую активность.

Олигонуклеотидные хелатные комплексы могут содержать различные поливалентные катионы металлов, включая кальций, магний, кобальт, железо, марганец, барий, никель, медь, цинк, кадмий, ртуть и свинец. Дополнительно показано, что хелатирование этих поливалентных катионов металлов приводит к образованию олигонуклеотидных хелатных комплексов, состоящих из двух или более олигонуклеотидов, соединенных через катионы металлов, и происходит с олигонуклеотидами длиной больше 6 нуклеотидов и при наличии олигонуклеотидов либо с фосфодиэфирными, либо с тиофосфатными связями. У олигонуклеотидов необязательно каждая связь может быть тиофосфатной. Хелатирование происходит также с олигонуклеотидами, содержащими модификации в 2'-положении (такие как 2'-О-метил) в рибозе или содержащими модифицированные основания, такие как 5'-метилцитозин или 4-тиоурацил. Эти модификации в 2'-положении могут быть представлены на одной или нескольких или всех рибозах, и модифицированные основания могут быть представлены на месте одного или нескольких оснований или повсеместно присутствовать на месте каждого основания (то есть все цитозины представлены как 5'-метилцитозин). Дополнительно, олигонуклеотидные хелатные комплексы могут содержать олигонуклеотиды, которые содержат многочисленные модификации, например, каждая связь является тиофосфатной, каждая рибоза модифицирована в 2'-положении и каждое основание модифицировано. Модификации олигонуклеотидов, совместимые с образованием олигонуклеотидного хелатного комплекса, дополнительно определены ранее. Кроме того, хелатирование катионов металлов не зависит от последовательности представленных нуклеотидов, но вместо этого опирается на физико-химические свойства, общие для всех олигонуклеотидов.

Тогда как образование олигонуклеотидных хелатных комплексов можно достичь с любым двухвалентным катионом металла, олигонуклеотидные хелатные комплексы с целью применения в качестве лекарственных средств должны предпочтительно содержать только кальций и/или магний, но также могут содержать железо, марганец, медь или цинк в следовых количествах и не должны включать кобальт, барий, никель, кадмий, ртуть, свинец или любой другой двухвалентный металл, не перечисленный в настоящей заявке.

Как описано в заявке на патент США № 2014/0065192, удаление HBsAg из крови инфицированных пациентов с помощью тиофосфатных ПНК приводит к частичному восстановлению иммунного ответа, который в свою очередь удаляет е-антиген HBV (HBeAg) из крови и приводит к существенному снижению уровней вируса в крови в ходе лечения, но эти противовирусные эффекты не сохраняются у большинства пациентов после прекращения лечения. Тогда как это частичное восстановление иммунного ответа (в условиях отсутствия HBsAg и других вирусных антигенов) может приводить к установлению длительного иммунологического контроля над инфекцией HBV после прекращения лечения у малой части пациентов, требуется установить длительный иммунологический контроль над инфекцией у еще большей части пациентов. Улучшения в размере доли пациентов, у которых достигается длительный иммунологический контроль после лечения, можно достигнуть путем применения тиофосфатных ПНК в комбинации с другими противовирусными средствами для улучшения скорости и мощности противовирусного ответа на лечение. Было бы желательно избежать применения иммунотерапий, таких как лечение на основе интерферона или других видов иммунотерапии, так как они, как правило, связаны с побочными эффектами, которые осложняют их переносимость пациентами.

Термин "удаление HBsAg из крови", используемый в настоящей заявке, означает любое статистически значимое снижение концентрации HBsAg в крови относительно концентраций HBsAg в крови перед лечением, как измерено с помощью количественного анализа HBsAg Abbott Architect™ или другой клинически принятой количественной мерой сывороточного HBsAg.

Приводимые в качестве примера эффективные режимы дозирования для тиофосфатных ПНК подобны тем, что, как правило, применяют для других тиофосфатных олигонуклеотидов (таких как антисмысловые олигонуклеотиды), как описано в заявке на патент США № 2014/0065102; обычное использование ежедневного парентерального введения 100-500 мг соединения хорошо отработано в данной области техники для достижения в результате терапевтически активных уровней этих соединений в печени, как описано для ПНК в примере I ниже и для тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида вызывающего деградацию печени-специфической мРНК (для аполипопротеина B100), как описано в Akdim et al. (2010, Journal of the American College of Cardiology, 55: 1611-1618).

Следовательно, согласно описанию, представленному в настоящей заявке, является полезным осуществлять лечение субъекта с инфекцией HBV или коинфекцией HBV/HDV фармацевтически приемлемым препаратом тифосфатного ПНК в сочетании с фармацевтически приемлемым нуклеозидным/нуклеотидным ингибитором полимеразы HBV.

Также является полезным вводить оба фармацевтически приемлемых средства в одной композиции или вводить оба фармацевтически приемлемых средства в разных фармацевтических композициях в одно и то же время или в разное время.

Является полезным вводить данные фармацевтически приемлемые средства одним или разными способами введения.

Для обеспечения наилучшего противовирусного ответа у субъекта может быть необходимо применять более одного ингибитора полимеразы HBV, чтобы максимально заблокировать полимеразу HBV и, таким образом, иметь максимально большой эффект в отношении блокировки процесса воспроизведения кзкДНК. Таким образом, один или несколько ингибиторов полимеразы HBV можно выбрать из следующих нуклеозидных аналогов:

- ламивудин;
- адефовир дипивоксил;
- энтекавир;
- телбивудин;
- тенофовира дизопроксил фумарат;
- эмтрицитабин;
- клевудин;
- безифовир;
- тенофовира алафенамида фумарат;
- AGX-1009;
- элвучитабин;
- лагоцикловира валактат;
- прадефовира мезилат;
- валторцитабин и

любой нуклеозидный/нуклеотидный аналог, который ингибирует полимеразу HBV.

Композиции, описанные в настоящей заявке, можно вводить любым подходящим способом, например, перорально, например, в форме таблеток, капсул, гранул или порошков; сублингвально; буккально; парентерально, например, путем подкожных, внутривенных, инъекционных или инфузионных методов (например, в виде стерильных инъекционных водных или неводных растворов или суспензий); путем ингаляции; местно, например, в форме крема или мази; или ректально, например, в форме суппозитория или клизмы; в единичных дозированных лекарственных формах, содержащие нетоксичные, фармацевтически приемлемые носители или разбавители. Композиции согласно настоящему изобретению можно, например, вводить в форме, подходящей для немедленного высвобождения или пролонгированного высвобождения. Немедленного высвобождения или пролонгированного высвобождения можно достигнуть путем применения подходящих фармацевтических композиций, или, конкретно в случае пролонгированного высвобождения, путем применения устройств, таких как подкожные имплантаты или осмотические насосы. Таким образом, вышеупомянутые композиции можно адаптировать для введения любым из следующих способов: пероральный прием внутрь, ингаляция, подкожная инъекция, внутривенная инъекция или инфузия или местное применение.

Настоящее описание будет более понятно, если обратиться к следующему примеру.

Пример I. Действие комбинационной терапии ПНК/энтекавира (ЭТВ) на сывороточный HBsAg

Фармацевтически приемлемый препарат ПНК REP 2055 (SEQ ID NO: 2) вводили пациенту с хронической инфекцией HBV один раз еженедельно путем внутривенной (IV) инфузии 400 мг. Осуществляли мониторинг ответа в отношении сывороточного HBsAg у этого пациента в реальном времени с использованием квалифицированного проводимого на месте качественного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Такой метод ELISA является очень чувствительным к низким уровням HBsAg, но не может точно определить какую-либо значимую концентрацию HBsAg в крови. Несмотря на то, что не наблюдали детектируемого снижения сывороточного HBsAg с использованием такого анализа HBsAg в ходе монотерапии REP 2055 (фиг. 1, квадратики), у данного пациента происходил очень умеренный (примерно в 10 раз) спад сывороточной вирусемии (ДНК HBV в сыворотке), указывающий на то, что появился какой-то противовирусный ответ. Таким образом, после 29 недель монотерапии REP 2055 указанный пациент получал ингибирующее полимеразу HBV лечение в дополнении к существующей терапии REP 2055, которая состояла из 0,5 мг энтекавира, принимаемого перорально ежедневно.

Немедленное снижение концентраций сывороточного HBsAg обнаруживали качественным анализом в течение двух недель от начала комбинированной терапии REP 2055/ЭТВ, и сывороточный HBsAg перестал обнаруживаться при качественном ELISA в течение 4 недель после начала комбинированного лечения (фиг. 1, квадратики). Такой синергетический контроль над сывороточным HBsAg с помощью комбинированного лечения REP 2055/ЭТВ поддерживали в течение многих недель лечения.

Для подтверждения синергетической активности комбинированной терапии REP 2055/ЭТВ в отношении супрессии HBsAg, образцы сыворотки от указанного пациента повторно анализировали с использованием платформы IMPACT (Immunological Multi-Parameter Chip Technology, иммунологическая многопараметрическая чип-технология) для точного количественного определения уровней сывороточного HBsAg, как описано в de Neit et al. (2014, Antiviral Ther., 19: 259-267). Такой количественный анализ показал первоначальное снижение сывороточного HBsAg примерно в 100 раз, произошедшее при применении монотерапии REP 2055 (фиг. 1, кружки), которое не поддавалось обнаружению с помощью качественного ELISA и которое вероятно было причиной наблюдаемого спада примерно в 10 раз в вирусемии при монотерапии REP 2055, описанного выше. Важно, снижение сывороточного HBsAg у указанного пациента достигло плато, на котором устойчиво находилась значимая концентрация сывороточного HBsAg, начиная от 10 недели лечения REP 2055 до начала комбинированной терапии REP 2055/ЭТВ на 29 недели лечения. С началом комбинированной терапии REP 2055/ЭТВ количественный анализ сывороточного HBsAg показал почти идентичное и быстрое снижение сывороточного HBsAg, как наблюдали при применении проводимого на месте качественного анализа, с этими дополнительным снижением концентраций, превышающим 32 раза, которое также было достигнуто в течение 4 недель после начала комбинированного лечения REP 2055/ЭТВ.

Постоянство низких уровней сывороточного HBsAg при проведении монотерапии REP 2055 является признаком того, что кзкДНК все еще присутствовала в печени указанного пациента и была транскрипционно активна. Очень быстрая дополнительная очистка от сывороточного HBsAg при добавлении ЭТВ к существующей терапии REP 2055 является признаком того, что появился синергетический эффект в отношении контроля транскрипции кзкДНК и/или элиминации кзкДНК. Важно, развитие такого дополнительного контроля над кзкДНК произошло намного быстрее, чем наблюдают при применении ингибиторов полимеразы HBV, используемых в монотерапии, для его достижения потребовалось только 4 недели. Таким образом, эти наблюдения являются демонстрацией нового синергетического противовирусного эффекта от снижения сывороточного HBsAg (в данном случае достигнутого с использованием ПНК REP 2055) при комбинации с ингибитором полимеразы HBV (в данном случае энтекавиром).

Пример II. Противовирусное действие различных ПНК у инфицированных DHBV пекинских уток

Различные ПНК, включающие различные модификации нуклеиновых кислот, тестировали на пекинских утках, инфицированных DHBV, чтобы установить их противовирусную активность. Данные ПНК представляют собой REP 2055 (SEQ ID NO: 2), REP 2139 (SEQ ID NO: 10), REP 2163 (SEQ ID NO: 11) и REP 2165 (SEQ ID NO: 13). В табл. 2 представлено химическое описание этих ПНК.

Таблица 2. Описание ПНК, использованных в примере II

ПНК	Последовательность	Присутствующая олигонуклеотидная модификация
REP 2055 (SEQ ID NO: 2)	(dAdC) ₂₀	Каждая связь является тиофосфатной
REP 2139 (SEQ ID NO: 10)	(A, 5'MeC) ₂₀	Каждая связь является тиофосфатной Каждая рибоза 2'-О-метилирована
REP 2163 (SEQ ID NO: 11)	(A, 5'MedC) ₂₀	Каждая связь является тиофосфатной Только рибозы в аденозинах 2'-О-метилированы
	(A, 5'MeC) ₂₀	Каждая связь является тиофосфатной Каждая рибоза 2'-О-метилирована, кроме аденозинов в положении 11, 21 и 31, где рибозы имеют 2'-ОН-модификацию.

dA = дезоксирибоаденозин

dC = дезоксирибоцитозин

A = рибоаденозин

5'MeC = рибо-5'-метилцитидин

5'MedC = дезоксирибо-5'-метилцитидин

Пекинские утки в возрасте трех дней инфицировали 2×10 вирусными геном-эквивалентами (ВГЭ)/мл DHBV. Лечение ПНК начинали спустя 11 дней после формирования инфекции. ПНК вводили посредством интраперитонеальной инъекции с дозировкой 10 мг/кг ПНК (входящих в состав в виде хелатных комплексов с кальцием) 3 раза в неделю в течение трех недель с последующим анализом противовирусного действия в конце лечения. Контрольная группа получала лечение физиологическим раствором посредством того же способа введения и с тем же режимом дозирования. Противовирусную активность оценивали путем мониторинга сывороточного DHBsAg с помощью ELISA (фиг. 2А) и ДНК DHBV в печени с помощью количественного ПНР (фиг. 2В).

Все ПНК привели к снижению концентраций сывороточного DHBsAg и ДНК DHBV в печени, демонстрируя, что разные ПНК, содержащие различные олигонуклеотидные модификации будут иметь сравнимое противовирусное действие. Это в свою очередь указывает, что синергетическая противовирусная активность, наблюдаемая при применении специфического ПНК и одного или нескольких ингибиторов полимеразы HBV на основе нуклеозидных аналогов (как наблюдали с REP 2055 и энтекавиром в примере I ранее), будет проявляться с любым другим тиофосфатным ПНК, а также с любым указанным

тиофосфатным ПНК, входящим в состав лекарственного средства в виде хелатного комплекса (как описано в патентах США №№ 8513211 и 8716259).

Пример III. Противовирусное действие ПНК в комбинации с тенофировым дизопроксил фумаратом (ТДФ) и энтекавиром (ЭТВ) у пекинских уток, инфицированных ДНВВ

Противовирусное действие комбинированного лечения хелатным комплексом REP 2139 с кальцием (REP 2139-Са) и ТДФ или REP 2139-Са и ТДФ и ЭТВ у пекинских уток, инфицированных ДНВВ, изучали путем оценки изменений уровней ДНК ДНВВ в сыворотке и в печени в процессе и после лечения с помощью количественного ПЦР. Инфицирование уток осуществляли, как описано в примере II за исключением того, что лечение начинали спустя один месяц после инфицирования. Схемы лечения были следующими:

- 1) Физиологический раствор, вводимый посредством интраперитонеальной инъекции 3 раза в неделю в течение 4 недель.
- 2) ТДФ, вводимый дозой 15 мг/день через ротожелудочный зонд в течение 28 дней.
- 3) REP 2139-Са, вводимый с дозировкой 10 мг/кг посредством интраперитонеальной инъекции 3 раза в неделю в течение 4 недель.
- 4) REP 2139-Са и TDF (режим дозирования описан выше).
- 5) REP 2139-Са и TDF (режим дозирования описан выше) и ЭТВ, вводимый дозой 1 мг/день через ротожелудочный зонд в течение 28 дней.

ДНК ДНВВ в сыворотке оценивали перед началом лечения (момент времени А), на 14 день лечения (момент времени В), в конце лечения (момент времени С) и спустя один и два месяца после прекращения лечения (последующее наблюдение, момент времени D и момент времени E).

В группе, проходившей лечение физиологическим раствором, не наблюдали контроля над ДНК ДНВВ в процессе лечения, хотя ДНК ДНВВ спонтанно оказалось под контролем у 3 уток в этой группе в ходе последующего наблюдения (фиг. 3А). В группе, проходившей лечение ТДФ, ДНК ДНВВ в сыворотке снизилась у всех уток, но контроля не достигали у всех уток до конца лечения. Уровень ДНК ДНВВ восстановился у всех уток в этой группе в ходе последующего наблюдения (фиг. 3В). В группе, проходившей лечение REP 2139-Са, не наблюдали изменения в уровне ДНК ДНВВ у двух уток на протяжении всего исследования, ДНК ДНВВ было под контролем в конце лечения только у двух уток и спонтанно оказалось под контролем у двух дополнительных уток в ходе последующего наблюдения (фиг. 3С). Когда REP 2139-Са скомбинировали с ТДФ, контроль ДНК ДНВВ наступил у всех, кроме одной утки, на середине курса лечения и в целом был более быстрым, чем контроль, достигнутый в группах, проходивших лечение одним REP 2139-Са или одним ТДФ. Когда REP 2139-Са скомбинировали с ТДФ и ЭТВ, ДНВВ был под контролем у всех уток на середине курса лечения (фиг. 3Е). Доля уток, которые сохранили контроль над уровнем ДНК ДНВВ в сыворотке в ходе последующего наблюдения, было выше в случае комбинации REP 2139-Са и ТДФ (или ТДФ и ЭТВ), чем в случае применения одного ТДФ или одного REP 2139-Са (фиг. 3D и 3E).

Эти результаты наблюдений говорят о том, что противовирусный ответ в процессе лечения при инфекции HBV может быть улучшен синергетически путем комбинирования REP 2139-Са и ТДФ или ТДФ и ЭТВ и может привести к улучшенному устойчивому вирусологическому ответу в период без лечения по сравнению с противовирусным ответом, достигаемым при применении одного REP 2139-Са или одного ТДФ. Проявления синергетической активности, наблюдаемое в вышеупомянутых примерах, можно с надежностью ожидать при применении любого ПНК, активного против HBV, как описано в настоящей заявке, и при применении любого ингибитора полимеразы HBV на основе нуклеотидного/нуклеозидного аналога, как описано в настоящей заявке. Дополнительно, ПНК, применяемые в комбинации с более одним нуклеозидным/нуклеотидным ингибитором полимеразы HBV, также можно применять со схожим продуктивным синергетическим противовирусным действием.

Синергетические эффекты комбинированного лечения ПНК/ТДФ/ЭТВ привели к улучшенной скорости развития противовирусного ответа, демонстрируя потенциал для более коротких по времени схем лечения, способных достигать устойчивого вирусологического ответа в период без лечения. Указанный потенциал также может быть реализован с любой комбинированной терапией ПНК и нуклеотидным/нуклеозидным аналогом-ингибитором полимеразы HBV, как описано в настоящей заявке.

Таким образом, данные наблюдения говорят о том, что любая фармацевтически приемлемый препарат тиофосфатного ПНК, который снижает или удаляет HBsAg из крови (как описано в заявке на патент США №2014/0065102 и патентах США №№ 8008269, 8008270 и 8067385) может быть скомбинирована с любым нуклеозидным/нуклеотидным ингибитором полимеразы HBV, перечисленным выше, и ожидаемо достигнет синергетического действия на скорость, с которой можно достигнуть контроля над сывороточной вирусемией, и/или транскрипционной инактивации, и/или элиминации кзкДНК HBV. Наблюдаемые синергетические эффекты также говорят о том, что можно скомбинировать более низкие дозы указанных фармацевтически приемлемых средств и все равно достигать синергетической активности с полезным противовирусным действием.

С учетом синергетических противовирусных действий, наблюдаемых выше, при применении тиофосфатного ПНК, применяемого в комбинации с одним нуклеозидным/нуклеотидным ингибитором по-

лимеразы HBV, превосходящий синергетический эффект также можно достичь при применении одного или нескольких тиофосфатных ПНК, применяемых в комбинации с одним или несколькими нуклеозидными/нуклеотидными ингибиторами полимеразы HBV, как описано выше.

Вышеупомянутое описание предназначено быть только примером, и специалист в данной области техники обнаружит, что могут быть внесены изменения в описанные варианты реализации без отклонения от объема настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения. Все же другие модификации, попадающие в объем настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения, будут очевидными для специалистов в данной области техники в свете обзора настоящего описания без отклонения от объема настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения инфекции HBV или коинфекции HBV/HDV, включающий введение первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит хелатный комплекс по меньшей мере одного тиофосфатного полимера нуклеиновой кислоты, способного удалять HBsAg из крови, и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит по меньшей мере один нуклеозидный/нуклеотидный аналог-ингибитор полимеразы HBV.

2. Способ по п.1, в котором полимер нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну модификацию рибозы в 2'-положении.

3. Способ по любому из пп.1, 2, в котором все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, содержат модификации в 2'-положении.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором полимер нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну 2'-О-метил-модификацию рибозы.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, содержат 2'-О-метил-модификацию.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором полимер нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один 5'-метилцитозин.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором все цитозины, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, представлены в виде 5'-метилцитозина.

8. Способ по любому из пп.2, 4, 6, в котором полимер нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну 2'-О-метил-модификацию рибозы и по меньшей мере один 5'-метилцитозин.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, имеют 2'-О-метил-модификацию, и все цитозины, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, представлены в виде 5'-метилцитозина.

10. Способ по любому из пп.1-9, в котором хелатный комплекс представляет собой хелатный комплекс с кальцием, хелатный комплекс с магнием или хелатный комплекс с кальцием/магнием.

11. Способ по любому из пп.1-10 в котором указанные первое и второе фармацевтически приемлемые средства входят в состав одной фармацевтической композиции.

12. Способ по любому из пп.1-11 в котором указанные первое и второе фармацевтически приемлемые средства входят в состав разных фармацевтических композиций.

13. Способ по любому из пп.1-12 в котором указанные первое и второе фармацевтически приемлемые средства вводят одновременно.

14. Способ по любому из пп.1-13, в котором указанные первое и второе фармацевтические средства вводят разными путями.

15. Способ по любому из пп.1-14, в котором указанные первое и второе фармацевтически приемлемые средства вводят с использованием одного или нескольких следующих способов: пероральный прием внутрь, ингаляция аэрозоля, подкожная инъекция, внутривенная инъекция и внутривенная инфузия.

16. Способ лечения инфекции HBV или коинфекции HBV/HDV, включающий введение первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит хелатный комплекс по меньшей мере одного тиофосфатного полимера нуклеиновой кислоты, способного удалять HBsAg из крови, и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит по меньшей мере один нуклеозидный/нуклеотидный аналог-ингибитор полимеразы HBV, где хелатный комплекс по меньшей мере одного тиофосфатного полимера нуклеиновой кислоты выбран из

последовательности SEQ ID NO: 2;

последовательности SEQ ID NO: 10;

последовательности SEQ ID NO: 13;

последовательности SEQ ID NO: 1, 3-9, 11, 12 и 14-20;

тиофосфатного олигонуклеотида длиной от 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности AC;

тиофосфатного олигонуклеотида длиной от 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности CA;

тиофосфатного олигонуклеотида длиной от 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности TG, и

тиофосфатного олигонуклеотида длиной от 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности GT;

а второе фармацевтически приемлемое средство содержит одно или несколько следующих веществ:

ламивудин;

адефовир дипивоксил;

энтекавир;

телбивудин;

тенофовира дизопроксил фумарат;

эмтрицитабин;

клевудин;

безифовир;

тенофовира алафенамида фумарат;

AGX-1009;

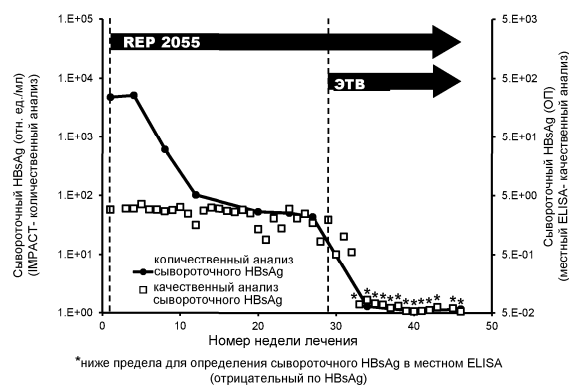
элвусцитабин;

лагоцикловира валактат;

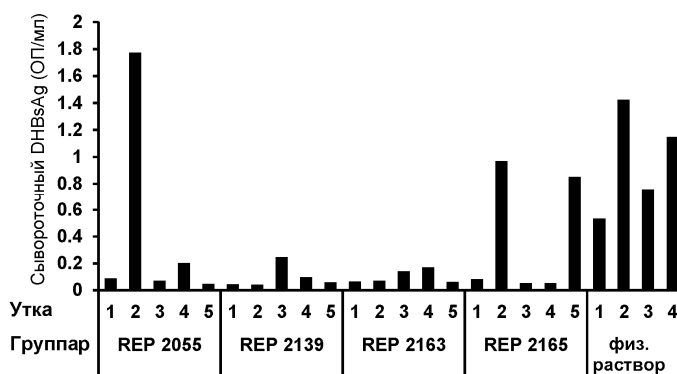
прадефовира мезилат;

валторцитабин и

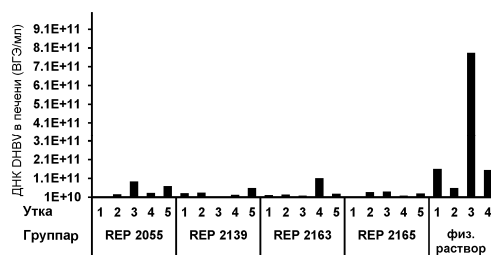
любой нуклеозидный/нуклеотидный аналог, который ингибирует полимеразу HBV.



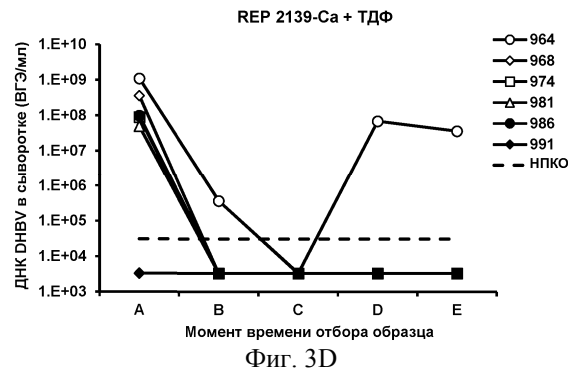
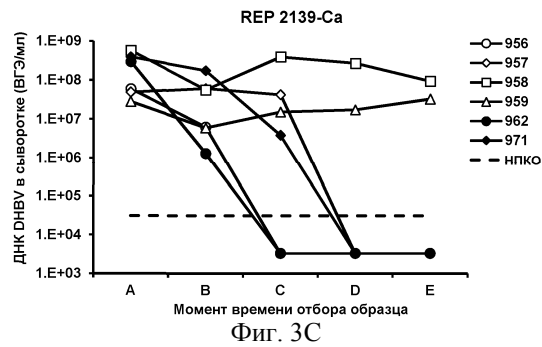
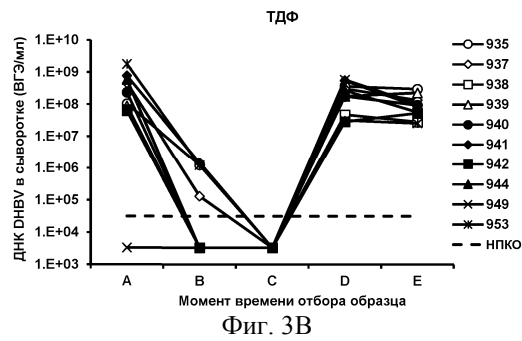
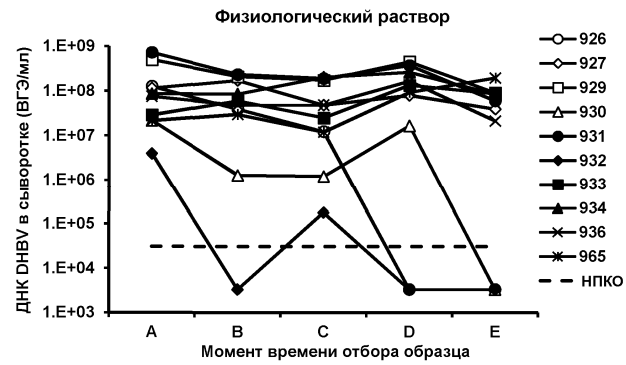
Фиг. 1

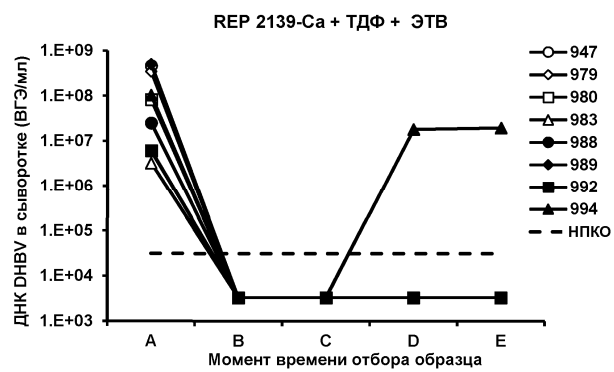


Фиг. 2А



Фиг. 2В





Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2