

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090597 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.06.11

(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)  
A61P 37/02 (2006.01)  
A61P 31/20 (2006.01)  
A61K 31/522 (2006.01)  
A61K 31/52 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.09.07

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ПАЦИЕНТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В (HBV), С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ PARAROXVIRUS OVIS (PPVO) И ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ОДНОГО ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО СРЕДСТВА

(31) 17189890.1; 17196684.9

(72) Изобретатель:

(32) 2017.09.07; 2017.10.16

Паульсен Даниэла, Урбан Андреас,  
Адди Ибиронке, Пфафф Тамара (DE),  
Менне Стефан (US), Слоот Виллем  
(DE)

(33) EP

(86) PCT/EP2018/074202

(87) WO 2019/048640 2019.03.14

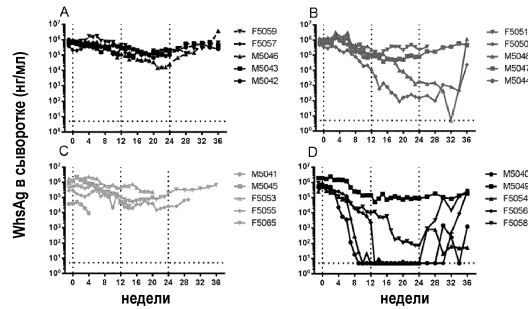
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

АЙКУРИС ГМБХ УНД КО. КГ (DE)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новой комбинированной терапии HBV-инфицированных пациентов с использованием Pararoxvirus ovis (PPVO) и по меньшей мере одного дополнительного противовирусного средства, например нуклеозидных ингибиторов, таких как энтекавир. Способы и комбинированные продукты по настоящему изобретению являются безопасными и пригодными для индукции функционального излечения хронически HBV-инфицированных пациентов.



A1

202090597

202090597

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561866EA/018

### **КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ПАЦИЕНТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В (HBV), С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ PARAROXVIRUS OVIS (PPVO) И ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ОДНОГО ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО СРЕДСТВА**

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к новой комбинированной терапии HBV-инфицированных пациентов с использованием Pararoxvirus ovis (PPVO) и по меньшей мере одного дополнительного противовирусного средства, например, нуклеозидных ингибиторов, таких как энтекавир. Способы и комбинированные продукты по настоящему изобретению являются безопасными и пригодными для индукции функционального излечения у хронически HBV-инфицированных пациентов.

#### **Уровень техники**

Вирус гепатита В (HBV) представляет собой оболочечный вирус с частично двухцепочечной ДНК (dsDNA), относящийся к семейству гепаднавирусов (Hepadnaviridae). Хроническая HBV-инфекция является серьезной глобальной проблемой здравоохранения, затрагивающей более 5% населения мира (более 350 млн. человек во всем мире и 1,25 млн. человек в США).

Несмотря на наличие профилактической вакцины против HBV, нагрузка при хронической HBV-инфекции продолжает оставаться существенной, нерешенной медицинской проблемой во всем мире за счет неоптимальных вариантов лечения и устойчивых уровней возникновения новых инфекций в большинстве развивающихся стран мира. Современные способы лечения не обеспечивают излечения и ограничиваются только двумя классами агентов (интерферон альфа и нуклеозидные/нуклеотидные аналоги/ингибиторы вирусной полимеразы); проблемы с лекарственной устойчивостью, низкой эффективностью и переносимостью ограничивают их терапевтическое действие.

Низкие показатели излечения HBV объясняются, по меньшей мере частично, тем, что трудно полностью подавить продукцию вируса с помощью одного противовирусного средства, а также наличием и персистенцией ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (cccDNA) в ядре инфицированных гепатоцитов. Однако устойчивая супрессия ДНК HBV замедляет прогрессирование заболеваний печени и помогает предотвратить гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК).

В настоящее время цели терапии HBV-инфицированных пациентов направлены на снижение уровня сывороточной ДНК HBV до низкого или неопределяемого уровня и, в конечном итоге, на снижение или предотвращение развития цирроза и ГЦК.

В настоящее время самый высокий показатель функционального излечения при HBV наблюдается после терапии иммуномодулятором интерфероном альфа (IFN-альфа). Но даже лечение интерфероном альфа в течение 48-52 недель приводит к тому, что доля респондеров в лучшем случае составляет примерно 3-7% при оценке по длительной

элиминации HBsAg.

Однако количественные показатели HBsAg связывали с ответом на лечение и, как было показано, они являются прогнозом ответа: низкий титр HBsAg (примерно или <100 МЕ/мл) в конце лечения нуклеозидными или нуклеотидными ингибиторами ассоциировался с наличием ответа или более низкого риска развития рецидива после прекращения терапии. Кроме того, было показано, что количественный показатель HBsAg является прогностическим показателем ответа на лечение IFN-альфа.

Следовательно, снижение или элиминация HBsAg используется в качестве прогностического показателя для функционального излечения и используется в Международных клинических рекомендациях по лечению HBV-инфекции EASL (EASL clinical practice guidelines, апрель 2017 г.).

Существует необходимость в разработке новых стратегий лечения HBV-инфекций и/или достижения функционального излечения у хронически HBV-инфицированных пациентов. Эта цель достигается в настоящем изобретении с использованием наилучшей экспериментальной модели на животных для изучения иммуноопосредованного функционального излечения HBV, т. е. лесных сурков, хронически инфицированных вирусом гепатита лесных сурков (WHV).

### **Сущность изобретения**

Изобретение относится к комбинированным продуктам и способам лечения HBV-инфекции у пациента. Объект изобретения раскрыт в следующих вариантах осуществления.

Объектом изобретения является композиция, содержащая *Parapoxvirus ovis*, выбранный из группы, включающей:

- необязательно инактивированные вирионы *Parapoxvirus ovis* (PPVO) и/или их активные фрагменты, и/или
- нуклеиновокислотные векторы или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент, и/или
- клетки, содержащие вирионы PPVO или их фрагменты, и/или нуклеиновокислотные векторы и/или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент,

для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV).

В рамках изобретения сначала можно использовать по меньшей мере одно противовирусное средство (например, нуклеозидный/нуклеотидный аналог, такой как энтекавир, тенофовир и т. д.), или сначала можно использовать PPVO, и затем (во-вторых) лечить пациента с использованием PPVO в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным противовирусным средством, и затем впоследствии (в-третьих) продолжать лечение PPVO, как здесь описано, либо в течение короткого периода (от суток до недель), либо в течение нескольких месяцев или даже лет до бесконечности в качестве

поддерживающей терапии. Альтернативно, лечение может быть продолжено по меньшей мере одним противовирусным средством. Кроме того, комбинированное лечение по настоящему изобретению можно повторять при необходимости, например, по меньшей мере один раз, два, три раза и т. д. Кроме того, комбинированная терапия может быть начата в одно и то же время и/или прекращена в одно и то же время.

Объектом изобретения является композиция, содержащая *Pararoxvirus ovis*, выбранный из группы, включающей:

- необязательно инактивированные вирионы *Pararoxvirus ovis* (PPVO) и/или их активные фрагменты, и/или

- нуклеиновокислотные векторы или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент, и/или

- клетки, содержащие вирионы PPVO или их фрагменты, и/или нуклеиновокислотные векторы и/или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент,

для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV), согласно предшествующему варианту осуществления,

где другое противовирусное средство представляет противовирусное средство против HBV.

Объектом изобретения является композиция, содержащая *Pararoxvirus ovis* (PPVO) для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV), согласно предшествующим вариантам осуществления изобретения, где PPVO представляет рекомбинантную нуклеиновую кислоту вируса или по меньшей мере один ее активный фрагмент, и/или где PPVO представляет рекомбинантно-полученный вирион, и/или по меньшей мере один его активный фрагмент.

Объектом изобретения является композиция, содержащая *Pararoxvirus ovis* (PPVO) для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV), согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где PPVO выбран из группы штаммов PPVO, включающей NZ2, NZ7, NZ10, D1701, OV/20, OV/7, OV/C2, OV/mi-90, OV-Torino, SA00, Bo29 или orf11, штамм Greek orf 155 и/или штамм Greek orf 176, или таксономически близкий штамм *Pararoxvirus ovis* orf.

Объектом изобретения является композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где противовирусное средство выбрано из группы лекарственных препаратов, включающей нуклеотидные/нуклеозидные аналоги в качестве активных ингредиентов, ингибиторы или модуляторы сборки капсида, ингибиторы или модуляторы

капсида/ядра, ингибиторы или модуляторы инкапсидирования, РНКi, терапевтическую вакцинацию, агонисты и антагонисты Toll-подобного рецептора (TLR), эпигенетические модификаторы, ингибиторы или модуляторы проникновения, ингибиторы или модуляторы циклофилина, ингибиторы секреции HBsAg, ингибиторы HBsAg, ингибиторы или модуляторы проникновения HBV, ингибиторы cccDNA, иммуномодуляторы (например, интерфероны и другие цитокины), и/или ингибиторы иммунных контрольных точек (например, PD-1).

Объектом изобретения является композиция, содержащая PPVO, для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где группа лекарственных препаратов, включающая нуклеотидные/нуклеозидные аналоги в качестве активных ингредиентов, включает тенофовир, тенофовира дизопроксила фумарат (TDF), тенофовира алафенамид (TAF), энтекавир, ламивудин, телбивудин, адефовир, эмтрицитабин и/или клевудин.

Объектом изобретения является композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство составлены для раздельного/последовательного введения, или где PPVO и по меньшей мере одно другое лекарственное средство, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления, составлены для сопутствующего/одновременного введения.

Объектом изобретения является композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство составлены для раздельного/последовательного введения, или где PPVO и по меньшей мере одно другое лекарственное средство, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления, составлены для сопутствующего/одновременного введения.

Объектом изобретения является композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство присутствуют в виде отдельных разовых лекарственных форм или комбинированных продуктов, выбранных из группы, включающей: таблетки, капсулы, пастилки, в частности, кислотоустойчивые капсулы, капли, пластыри, депо-формы для введения, растворы, растворы для инъекций, раствор для инфузий, разведения, кремы, мази, бальзамы, порошки, порошок для восстановления, порошок для восстановления и инфузии и/или спреи.

Объектом изобретения является композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения

пациента с HBV-инфекцией согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где указанный пациент выбран из группы пациентов с острой HBV-инфекцией, пациентов с хронической HBV-инфекцией, пациентов с детектируемым HBsAg, пациентов с детектируемой РНК HBV, пациентов с детектируемой ДНК HBV, пациентов с детектируемой cccDNA, пациентов с воспалением печени, пациентов со стеатозом печени, пациентов с фиброзом печени, пациентов с циррозом печени, пациентов с раком печени, пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, остро или бессимптомно или хронически инфицированных пациентов, пациентов, подвергшихся противовирусному лечению, пациентов, которые не отвечают на противовирусное лечение противовирусными средствами согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, или пациентов, которые имеют приобретенную резистентность по меньшей мере к одному противовирусному средству и/или пациентов, коинфицированных по меньшей мере одним дополнительным патогенным вирусом, выбранным из группы, включающей семейства deltavirus, retroviridae, herpesviridae, poxviridae, parvoviridae, adenoviridae, picornaviridae, hepadnaviridae, flaviviridae, orthomyxoviridae, paramyxoviridae, papovaviridae, polyomaviridae, rhabdoviridae, coronaviridae, bunyaviridae, arenaviridae, reoviridae и togaviridae.

Объектом изобретения является композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где доза PPVO находится в диапазоне  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц и доза по меньшей мере одного другого противовирусного средства выбрана в соответствии с инструкциями изготовителя.

Объектом изобретения является композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией, как определено в предшествующих вариантах осуществления, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство вводят в течение <72 недель, предпочтительно <60 недель, более предпочтительно <48 недель, <36 недель, <24 недель, <12 недель, <6 недель, <4 недель, <2 недель или <1 недели.

Объектом изобретения является композиция согласно любому из предшествующих вариантов осуществления для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где PPVO инактивирован.

Объектом изобретения является композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где по меньшей мере одно другое противовирусное средство представляет собой энтекавир.

Объектом изобретения является композиция, содержащая PPVO для применения в

комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где пациент, подвергшийся лечению указанной композицией и по меньшей мере одним другим противовирусным средством, представляет собой пациента, который является HBsAg- и/или HBeAg-позитивным, и где нагрузка HBsAg и/или HBeAg снижается, или происходит элиминация HBsAg и/или HBeAg в течение курса лечения, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где композиция составлена для внутривенного, внутримышечного, перорального, парентерального, внутрикожного и/или подкожного введения.

Объектом изобретения является способ лечения HBV-инфицированного пациента эффективным количеством PPVO и эффективным количеством по меньшей мере одного другого противовирусного средства, где PPVO выбран из группы, включающей:

- необязательно инактивированные вирионы Parapoxvirus ovis (PPVO) и/или их активные фрагменты, и/или
- нуклеиновокислотные векторы или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент, и/или
- клетки, содержащие вирионы PPVO или их фрагменты, и/или нуклеиновокислотные векторы и/или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент.

Объектом изобретения является способ лечения согласно предшествующему варианту осуществления, где PPVO представляет рекомбинантную нуклеиновую кислоту вируса или по меньшей мере один ее активный фрагмент, и/или где PPVO представляет рекомбинантно-полученный вирион и/или его активные фрагменты.

Объектом изобретения является способ согласно предшествующим вариантам осуществления, где другое противовирусное средство выбрано из группы лекарственных препаратов, включающей нуклеотидные/нуклеозидные аналоги в качестве активных ингредиентов, ингибиторы или модуляторы сборки капсида, ингибиторы или модуляторы капсида/ядра, ингибиторы или модуляторы инкапсидирования, РНКi, терапевтическую вакцинацию, агонисты и антагонисты Toll-подобного рецептора (TLR), эпигенетические модификаторы, ингибиторы или модуляторы проникновения, ингибиторы или модуляторы циклофилина, ингибиторы секреции HBsAg, ингибиторы HBsAg, ингибиторы или модуляторы проникновения HBV, ингибиторы cccDNA, иммуномодуляторы (например, интерфероны и другие цитокины), и/или ингибиторы иммунных контрольных точек (например, PD-1).

Объектом изобретения является способ согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где группа лекарственных средств, включающая

нуклеотидные/нуклеозидные аналоги в качестве активных ингредиентов, включает тенофовир, тенофовира дизопроксила фумарат (TDF), тенофовира алафенамид (TAF), энтекавир, ламивудин, телбивудин, адефовир, эмтрицитабин и/или клевудин.

Объектом изобретения является способ согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где противовирусное средство представляет собой энтекавир.

Объектом изобретения является способ согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство вводят отдельно/последовательно.

Объектом изобретения является способ согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство вводят сопутствующе/одновременно.

Объектом изобретения является способ согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство присутствует в виде отдельной разовой лекарственной формы или комбинированных продуктов, выбранных из группы, включающей: таблетки, капсулы, пастилки, в частности, кислотоустойчивые капсулы, капли, пластыри, депо-формы для введения, растворы, растворы для инъекций, раствор для инфузий, разведения, кремы, мази, бальзамы, порошки, порошок для восстановления, порошок для восстановления и инфузии и/или спреи.

Объектом изобретения является способ согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где PPVO и/или по меньшей мере одно другое противовирусное средство составлены для внутривенного, внутримышечного, перорального, парентерального, местного, внутрикожного и/или подкожного введения.

Объектом изобретения является способ согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где указанный пациент выбран из группы пациентов с острой HBV-инфекцией, пациентов с хронической HBV-инфекцией, пациентов с детектируемым HBsAg, пациентов с детектируемой РНК HBV, пациентов с детектируемой ДНК HBV, пациентов с детектируемой сссDNA, пациентов с воспалением печени, пациентов со стеатозом печени, пациентов с фиброзом печени, пациентов с циррозом печени, пациентов с раком печени, пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, остро или бессимптомно или хронически инфицированных пациентов, пациентов, подвергшихся противовирусному лечению, пациентов, которые не отвечают на противовирусное лечение противовирусными лекарственными средствами согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, или пациентов, которые имеют приобретенную резистентность по меньшей мере к одному противовирусному средству, и/или пациентов, коинфицированных, по меньшей мере, одним дополнительным патогенным вирусом, выбранным из группы, включающей семейства deltavirus, retroviridae, herpesviridae, poxviridae, parvoviridae, adenoviridae, picornaviridae, hepadnaviridae, flaviviridae, orthomyxoviridae, paramyxoviridae, papovaviridae, polyomaviridae, rhabdoviridae, coronaviridae, bunyaviridae, arenaviridae, reoviridae и



togaviridae.

Объектом изобретения является способ согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где доза PPVO находится в диапазоне  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц, и/или где доза по меньшей мере одного другого противовирусного средства выбрана в соответствии с инструкциями изготовителя.

Объектом изобретения является способ согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство вводят в течение <72 недель, предпочтительно, <60 недель, более предпочтительно, <48 недель, <36 недель, <24 недели, <12 недель, <6 недель, <4 недель, <2 недель или <1 недели.

Объектом изобретения является способ снижения вирусной нагрузки HBV у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ снижения нагрузки HBsAg у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ ослабления повреждения печени, цирроза печени и/или фиброза печени у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ индукции регенерации ткани печени у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ уменьшения побочных эффектов, ассоциированных с лечением HBV-инфицированного пациента, где указанные побочные эффекты вызваны лечением интерферонами и/или нуклеотидными/нуклеозидными аналогами, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления, в частности, уменьшения побочных эффектов, выбранных из группы, включающей лихорадку, воспаление ткани, психические расстройства и/или гематологические нарушения.

Объектом изобретения является способ снижения нагрузки HBeAg у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ восстановления и/или реактивации

иммунного ответа у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ уменьшения количества ДНК HBV, элиминации ДНК HBV и/или сайленсинга ДНК HBV, в частности cccDNA у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ предотвращения образования cccDNA de novo у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ ингибирования или снижения экспрессии белков HBV у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ подавления репликации HBV у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ выведения HBV у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ отмены иммунологической толерантности к инфекциям, вызванным HBV, у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ отмены толерантности к HBsAg и/или HBeAg у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ индукции HBsAg-специфических антител у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ индукции HBeAg-специфических антител у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ замедления или ингибирования прогрессирования стеатоза у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

Объектом изобретения является способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство вводят в течение <72 недель, предпочтительно, <60 недель, более предпочтительно, <48 недель, <24 недель, <12 недель, <6 недель, <4 недель, <2 недель или <1 недели.

Объектом изобретения является лечебный набор-продукт, содержащий первый контейнер, включающий фармацевтические композиции, содержащие PPVO, предпочтительно инактивированный PPVO, и второй контейнер, включающий фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно другое противовирусное средство, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления, или фармацевтическую композицию, содержащую PPVO, предпочтительно инактивированный PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления, в форме комбинированного состава и, необязательно, инструкции по применению, фармацевтически приемлемый носитель для восстановления, шприцы и/или микроиглы и т. д.

Объектом изобретения является лечебный набор-продукт согласно предшествующему варианту осуществления, где композиции, содержащие PPVO, предпочтительно инактивированный PPVO, и фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно другое противовирусное средство, составлены в виде таблеток, капсул, пастилок, в частности, кислотоустойчивых капсул, капель, пластырей, депо-форм для введения, растворов, растворов для инъекций, растворов для инфузий, разведений, кремов, мазей, бальзамов, порошков, порошка для восстановления раствора, порошка для восстановления и инфузий и/или спреев и т. д.

### **Эксперименты**

На животной модели хронического гепатита В на лесных сурках было показано, что внутримышечная обработка животных иммуномодулятором AIC649 в течение 8 недель индуцирует уникальный паттерн бифазного ответа с уменьшением уровня ДНК вируса гепатита сурков (WHV) и поверхностного антигена (WHsAg) (Paulsen et al. (2015)).

В настоящем примере исследовали противовирусную активность AIC649, одного или в комбинации с энтекавиром (ETV), а также при различных путях введения и более длительных периодах обработки на лесных сурках. Цель состояла в том, чтобы также

оценить безопасность и способность АІС649 для индукции функционального излечения при хронической инфекции, вызванной вирусом гепатита В.

Лесным суркам в течение 36-недельного периода АІС649 вводили внутривенно, и затем внутримышечно, один или в комбинации, в течение начальных 12 недель, с ETV с прямым противовирусным действием, который вводили перорально. Эффективность монотерапии АІС649, монотерапии ETV или комбинированной терапии АІС649+ETV сравнивали с контрольной группой, получавшей плацебо.

Вызванные обработкой изменения в виремии, антигенемии, иммунологических показателях, а также индукцию сероконверсии анти-WHsAg-антител определяли для оценки противовирусных эффектов. Результаты ежедневных наблюдений, изменения массы и температуры тела, изменения гематологических показателей и клинико-биохимических показателей, а также результаты вскрытия и данные гистопатологии использовали для оценки безопасности.

Был подтвержден паттерн бифазного ответа, индуцированный монотерапией АІС649, который наблюдали ранее. Обработка только одним АІС649 уже приводила к очевидному снижению ДНК WHV, а также WHsAg по сравнению с уровнями до обработки. Достоверный и даже более сильный и устойчивый противовирусный эффект наблюдали в группе с комбинацией АІС649+ETV: ДНК WHV и WHsAg оставались заметно супрессированными или даже не детектируемыми в течение нескольких месяцев. Клеточно-опосредованные иммунные ответы, а также ответную выработку анти-WHsAg-антител наблюдали в двух группах, получавших АІС649, но не в группе с монотерапией ETV. Изменения маркеров, специфичных для заболеваний печени, были сопоставимы между группами, но прогрессирование стеатоза во время настоящего опыта протекало медленнее в группе с одним АІС649 и в группе с комбинацией АІС649+ETV. Наблюдаемая устойчивая элиминация WHsAg и индукция анти-WHsAg-антител, сопровождаемая клеточно-опосредованными иммунными реакциями, подтверждают гипотезу о том, что АІС649 индуцирует физиологически «согласованный» восстановленный иммунный ответ на WHV. АІС649 в качестве партнера в комбинации с ETV существенно повышает эффективность лечения. Способность АІС649 для индукции функционального излечения у HBV-инфицированных пациентов неожиданно подтверждается результатами данного доклинического исследования.

### **Пример 1**

В настоящем опыте исследовали противовирусную активность АІС649, одного или в комбинации с энтекавиром (ETV), а также при различных путях введения и более длительных периодах обработки на хронически WHV-зараженных лесных сурках. Цель состояла в том, чтобы также оценить безопасность и способность АІС649 для индукции функционального излечения при хронической инфекции, вызванной вирусом гепатита В.

### **Методы**

Лесным суркам в течение 36 недель АІС649 вводили внутривенно, и затем внутримышечно, один или в комбинации, в течение начальных 12 недель, с ETV с прямым

противовирусным действием, который вводили перорально. См. фиг. 1: дизайн исследования.

Эффективность монотерапии АІС649, монотерапии ETV или комбинированной терапии АІС649+ETV сравнивали с контрольной группой, получавшей плацебо (n=5 животных/группу). Вызванные обработкой изменения в виремии, антигенемии, иммунологических показателях, а также индукцию сероконверсии анти-WHsAg-антител определяли для оценки противовирусных эффектов. Результаты ежедневных наблюдений, изменения массы и температуры тела, изменения гематологических показателей и клинико-биохимических показателей, а также результаты вскрытия и данные гистопатологии использовали для оценки безопасности.

### Животные

Всем 20 лесным суркам (10 самцам, 10 самкам), использованным в данном исследовании, рожденным в неволе, в возрасте 3 суток вводили инокулят сWHV7P2a, содержащий штамм вируса гепатита сурков (WHV) WHV7-11 (Fletcher et al. (2015): PLOSPath, 11, e1005103). Детенышей, инокулированных сWHV7P2a, выращивали и содержали до достижения возраста примерно 15-17 месяцев. Лесных сурков размещали парами или индивидуально, и они имели свободный доступ к корму и воде в течение периода до и во время проведения исследования. Все лесные сурки получали перорально, один раз в день фенбендазол (панакур) в дозе 50 мг/кг в течение 10 суток для лечения возможной инвазии *Giardia*. Лесных сурков скринировали на наличие аномальных биохимических и гематологических показателей. Сурков также тестировали на WHsAg, анти-WHsAg-антитела (анти-WH) и ДНК WHV. Было подтверждено, что все лесные сурки являются хроническими WHV-носителями на основе общепринятых критериев, разработанных за последние 30 лет опыта работы по воспроизведению экспериментальных WHV-инфекций новорожденных (т. е. наличие ДНК WHV и WHsAg-позитивный статус, анти-WHs-антитела-негативный статус в возрасте от 9 до 12 месяцев и старше). Отсутствие опухолей печени у лесных сурков с низкой сывороточной активностью гамма-глутамилтрансферазы (GGT) подтверждали УЗИ у 16 из 20 полученных лесных сурков. Три других лесных сурка имели слегка или умеренно повышенную активность GGT в сыворотке крови, но у них отсутствовали опухоли печени во время первоначального УЗИ. Всем суркам имплантировали микрочипы (в дорсальной части основания хвоста), которые были запрограммированы с идентификационным номером животного (DASHost Software, Biomedical Data Systems Inc.). Животных рандомизировали вручную в 1 из 4 групп обработки, стратифицировали по полу, массе тела, сывороточным маркерам перед обработкой (уровни WHsAg, ДНК WHV, титры анти-WHsAg-антител), общему анализу крови (CBC), уровням активности GGT и сорбитолдегидрогеназы (SDH) в сыворотке крови.

### АІС649 (и растворитель для АІС)





Обра ботк а (1×/н едел ю)	25	х							
	26	х	х		х				
	27	х							
	28	х	х		х				
	29	х							
	30	х	х		х	х	х	х	х
	31	х							
	32	х	х		х				
	33	х							
	34	х	х		х				
	35	х							
	36	х	х	х	х	х	х	х	х
		аРТТ=активированное			частичное		тромбопластиновое		время;

ДНК=дезоксирибонуклеиновая кислота; РТ=протромбиновое время; WHV=вирус гепатита сурков

а) биопсия печени и анализ включали: ДНК WHI RI, сссDNA WHV, РНК WHV (саузерн- и нозерн-блоты), гистологию, WHcAg, WHsAg, анти-WHsAg-Ab

б) ДНК и серология включали: ДНК WHV (слот-блот и ПЦР), HBsAg, анти-HBsAg-Ab.

с) Т-клеточные ответы определяли после стимуляции РВМС пептидами, покрывающими всю WHsAg, WHcAg, WHVxAg

д) Образцы хранили при -80°С до анализа маркеров клеточной дифференцировки и цитокинов

Смертность оценивали ежедневно для всех животных.

- Массу /температуру тела и клинические признаки оценивали раз в неделю.

- Образцы крови отбирали на серологию в период до обработки, раз в неделю от рандомизации (T0) до недели 24 и раз в две недели с недели 25 до недели 36.

- Образцы крови отбирали для определения гематологических и клинико-биохимических показателей до обработки, на время T0 и на неделе 4, 8, 12, 16, 21, 24, 30 и 36.

- Образцы крови отбирали для оценки аРТТ и РТ на время T0, и на неделе 12, 21, 24, 30 и 36.

- Образцы крови отбирали для оценки Т-клеточных ответов на время T0, и на неделе 6, 12, 21, 24, 30 и 36.

- Образцы крови отбирали для оценки маркеров клеточной дифференцировки и измерения уровня цитокинов до обработки и на неделе 6, 12, 21, 24, 30 и 36. Отбор крови в течение периода обработки проводили примерно через 16 ч после введения «растворителя



для ETV», «растворителя для АИС», ETV и/или АИС649.

- Биопсии печени проводили в 2-недельный период до обработки, и на неделе 6, 12, 16, 24 и 36.

#### Сроки забора крови в период обработки

Образцы крови для анализа цитокинов и клеточных маркеров отбирали примерно через 16 ч после обработки.

Образцы крови для серологического, вирусологического, гематологического (включая aPTT и PT) или клинико-биохимического анализа и определения Т-клеточных ответов отбирали примерно через 0,5-1,0 ч после перорального введения (ETV/растворителя для ETV) и до в/в введения (АИС649/растворителя для АИС), для обеспечения забора крови и внутривенного введения во время одного события анестезии. Для внутривенных инъекций АИС649 или растворителя для АИС животных анестезировали с использованием кетамина/ксилазина внутримышечной инъекцией, смесь 10:1, от 25 до 50 мг/кг кетамина/от 1,0 до 5,0 мг/кг ксилазина и/или ингаляцией изофлураном (т.е. 1-3% через носовую конусную насадку). Внутримышечные инъекции АИС649 или растворителя для АИС выполняли без анестезии.

#### Клинические наблюдения и лабораторные исследования

##### Наблюдение клинических признаков

##### Смертность

Смертность оценивали ежедневно для всех животных.

##### Температура и масса тела

Определение температуры и массы тела проводили одновременно, один раз в неделю. Идентификационный номер животного и температуру тела считывали с микрочипа, имплантированного в дорсальную часть основания хвоста, с использованием ручного чип-ридера (Biomedical Data Systems Inc.). Данные представлены в виде индивидуальных значений и обобщены по группам в виде среднего значения  $\pm$  стандартного отклонения.

##### Гематология

Некоагулированную цельную кровь собирали в пробирки с ЭДТА. Образцы транспортировали в охлаждающих пакетах для доставки в тот же день в лабораторию для анализа. Образцы анализировали на следующий день с использованием автоматизированной системы подсчета клеток (счетчика) с программными настройками для лесных сурков (Bellezza, C.A., et al., 2002, Elsevier. P. 309-328).

Общий анализ крови включал следующие параметры:

Лейкоциты (WBC)	Гематокрит (Hct)
Сегментированные нейтрофилы	Средний объем эритроцита (MCV)
Палочкоядерные нейтрофилы	Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH)
Лимфоциты	Средняя концентрация гемоглобина в
Моноциты	

Эозинофилы	эритроците (МСНС)
Базофилы	Ширина распределения эритроцитов (RDW)
Эритроциты (RBC)	Количество тромбоцитов (PLT)
Гемоглобин (Hb)	Средний объем тромбоцита (MPV)
	Ретикулоциты (RETI)

#### Клинико-биохимический анализ

Сыворотку собирали и замораживали для транспортировки на сухом льду в течение недели после отбора образцов. Образцы оттаивали один раз перед анализом. aPTT и PT определяли на цитратной плазме. Образцы анализировали с использованием автоматического анализатора (Hitachi), используя установленные клинико-биохимические анализы для сурков (Peek S.F. et al.: Hepatology, 2001. 33 (1): p. 254-66).

Определяли следующие клинико-биохимические показатели:

Аланинаминотрансфераза (АЛТ)	Альбумин
Аспаратаминотрансфераза (АСТ)	Глобулин
Сорбитолдегидрогеназа (SDH)	Соотношение альбумин/глобулин
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	(соотношение А/Г)
Гамма-глутамилтрансфераза (GGT)	Активированное частичное
Глутаматдегидрогеназа (GLDH)	тромбопластиновое время (aPTT)
Натрия	Протромбиновое время (PT)
Калий	Глюкоза
Хлориды	Общий билирубин (T. bili)
Бикарбонат	Прямой билирубин (D. bili)
Анионный промежуток (AG)	Непрямой билирубин (In. bili)
Соотношение Na/K	Амилаза
Мочевина	Холестерин
Креатинин	Креатининкиназа (СК)
Кальций	Железо (Fe)
Фосфат	Общая железосвязывающая способность
Магний	(ТІВС)
Общий белок (TP)	% насыщения (железа)
	Липемия
	Гемолиз
	Показатели желтухи

#### Гистопатология

Ткани от подвергнутых эвтаназии животных фиксировали в 10% формалине в фосфатном буфере и отправляли на гистопатологический анализ.

Выбранные образцы органов и тканей, отобранные и фиксированные при вскрытии, обрабатывали, заливали в парафин, готовили срезы с номинальной толщиной примерно 2-4 мкм и окрашивали гематоксилином-эозином. Предметные стекла обрабатывали и окрашивали и исследовали под световым микроскопом.

#### Анализируемые органы

Для гистологического анализа собирали коллекцию следующих органов и тканей:

надпочечники, аорта, кость (бедренная кость) и сустав, кость (грудина) с костным мозгом, мазки костного мозга (фиксированные в метаноле и окрашенные по методу Грюнвальд-Гимза), головной мозг, бронхи (главные), слепая кишка, толстая кишка, двенадцатиперстная кишка, эпидидимис, глаза, желчный пузырь, сердце, подвздошная кишка, место(а) инъекции (образец ткани отобран из места инъекции), тонкая кишка, почки и мочеточники, гортань, печень, легкие, лимфатический узел (нижнечелюстной), лимфатический узел (брыжеечный), молочная железа, пищевод, зрительные нервы, яичники и яйцеводы, поджелудочная железа, паразитовидная железа, пейеровы бляшки, гипофиз, предстательная железа, прямая кишка, слюнные железы (подчелюстная, околоушная, подъязычная), седалищные нервы, семенные пузырьки, скелетные мышцы, кожа, спинной мозг (шейный, грудной, поясничный отделы), селезенка, желудок, семенники, тимус, щитовидная железа, язык, трахея, мочеточники, мочевого пузыря, матка (рога+шейка матки), влагалище, все патологические очаги.

#### Эффективность/вирусологический анализ

WHV антиген/антитела в сыворотке

#### ДНК WHV в сыворотке крови

Уровни ДНК WHV в сыворотке крови определяли количественно в виде геномных эквивалентов (ГЭ) с использованием слот-блот-гибридизации со стандартизованным 32P-меченным зондом фрагмента ДНК WHV на нитроцеллюлозной мембране. Нижний предел количественного определения (LLOQ) в анализе составлял примерно  $10^7$  ГЭ/мл сыворотки. Образцы с уровнями ниже LLOQ в слот-блоте также оценивали с использованием количественного ПЦР-анализа в режиме реального времени (Menne S. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008; 52 (10): p. 3617-32) с LLOQ примерно от  $5,0$  до  $7,0 \pm 10^2$  WHV ГЭ/мл сыворотки.

#### Сывороточный WHsAg

Уровни WHsAg в сыворотке крови определяли количественно с использованием известного ELISA с LLOQ примерно 5 нг WHsAg/мл сыворотки (Cote P.J. et al., *Viral Immunol.*, 1993. 6 (2): p. 161-9).

#### Сывороточные анти-WHs-антитела

Уровни анти-WHs-антител в сыворотке определяли количественно с использованием известной методики ELISA (Cote P.J. et al., *Viral Immunol.*, 1993. 6 (2): p. 161-9). LLOQ анализа с использованием разведения образца 1:100 составлял примерно 100 ст. ед./мл сыворотки. Образцы оценивали следующим образом:

100-200 ст. ед./мл принимали за следовые уровни

200-300 ст. ед./мл принимали за очень низкие уровни

300-500 ст. ед./мл принимали за низкие уровни

500-2000 ст. ед./мл принимали за средние уровни

> 2000 ст. ед./мл принимали за высокие уровни (например, которые можно было ожидать после 3-кратной иммунизации наивных лесных сурков вакциной WHsAg-alum)

Следует проявлять осторожность при интерпретации результатов данного анализа, поскольку у необработанных хронически инфицированных животных имеет место значительный избыток циркулирующего WHsAg, что делает детектирование несвязанных анти-WHs-Ab маловероятным. Следовательно, отрицательные результаты детектирования анти-WHsAg-антител демонстрируют отсутствие несвязанного WHs-специфического антитела, а не отсутствие общего WHs-специфического антитела.

#### Т-клеточные пролиферативные ответы

РВМС выделяли из цельной крови и культивировали в течение 5 суток в присутствии ДМСО (отрицательный контроль), липополисахарида (LPS, положительный контроль), рекомбинантного человеческого IL-2 (положительный контроль) или пептидных пулов, охватывающих все WHcAg, WHsAg, или WHxAg соответственно. Используя анализ CellTiter-Glo<sup>®</sup>, определяли количество жизнеспособных клеток в каждой опытной лунке с использованием люминесцентного сигнала, который пропорционален количеству присутствующего АТФ и, таким образом, количеству жизнеспособных клеток. Культуры оценивали через 5 суток и определяли индекс стимуляции (SI) относительно отрицательных контролей в качестве показателя Т-клеточных ответов на специфические антигены/стимулы:

SI=люминесценция в опыте/люминесценция в отрицательном контроле

#### Цитокины и клеточные маркеры

Иммунные ответы, связанные с обработкой, определяли по изменениям в уровнях РНК-транскриптов IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\beta$ , интерлейкина 6 (IL-6), CD3, CD4, CD8, CD14, CD56 и CD79B в крови и печени с использованием ПЦР. Вкратце, цельную кровь собирали в пробирки для забора крови PAXgene (Qiagen, Redwood City, CA) на временные точки, указанные выше. Образцы хранили при -70°C до использования. Общую РНК дополнительно выделяли из биопсийных образцов печени, отобранных, как описано выше, с использованием набора RNeasy Mini (Qiagen) с расщеплением ДНКазой I на колонке с использованием ДНКазы, не содержащей РНКазу (Qiagen).

После обратной транскрипции мРНК амплифицировали с помощью набора High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) с использованием oligo(dT), комплементарных образцам (с) ДНК, на приборе 7500 Real PCR System (Applied Biosystems), используя мастер-микс TaqMan Gene Expression (Applied Biosystems) и специфические для сурков праймеры и зонды (таблица 2). Экспрессию рРНК 18S сурков использовали для нормализации экспрессии гена-мишени. Уровни транскрипции генов-мишеней рассчитывали в виде кратного изменения относительно уровня до обработки на неделе -1 (печень) или на T0 (кровь) с использованием формулы  $2^{\Delta Ct}$ .

Олигонуклеотиды, использованные для анализа экспрессии генов в крови и печени

Ген	Праймеры и зонды	Последовательность
IFN- $\alpha$	F (SEQ ID NO: 1)	5'- CTCAAGCTGTTGCTGTCCTC-3'
	R (SEQ ID NO: 2)	5'- CTTCTGGGTGCTGAAGAGGT-3'
	P (SEQ ID NO: 3)	5'- CCAGATGACCCAGCAGATCCTCA-3'
IFN- $\gamma$	F (SEQ ID NO: 4)	5'- ATCCAAAGGAGCATGGACAC-3'
	R (SEQ ID NO: 5)	5'- TGAACTTGAGACACCTTTAGGAA-3'
	P (SEQ ID NO: 6)	5'- CAACAGCAGTACCAATAAGCTGCAGGA-3'
TNF- $\alpha$	F (SEQ ID NO: 7)	5'- CCTGCAAACGGGCTATACCTT-3'
	R (SEQ ID NO: 8)	5'- GTGTGGGTGAGGAGCACGTA-3'
	P (SEQ ID NO: 9)	5'- CAGCCTTGGCCCTTGAAGAGGACCT-3'
IL-6	F (SEQ ID NO: 10)	5'- CCATGCAACTCATCTTGAGC-3'
	R (SEQ ID NO: 11)	5'- ATGCCCATGAACCAATAAGC-3'
	P (SEQ ID NO: 12)	5'- ATTTCTGCAGTTCACCC-3'
CD3	F (SEQ ID NO: 13)	5'- CGGAGTTCGCCAGTCAAGA-3'
	R (SEQ ID NO: 14)	5'- TTGGTGGTTTCCTTGAAGACG-3'
	P (SEQ ID NO: 15)	5'- CTCAGACAAGCAGACTCTGTTGCCCAA-3'
CD4	F (SEQ ID NO: 16)	5'- AGGTCTCAAAGCCCGAGAAGA-3'
	R (SEQ ID NO: 17)	5'- GTAGGCACTGCCACATCCCT-3'
	P (SEQ ID NO: 18)	5'- ATTCGGGTGCCAAACCCCAAGG-3'
CD8	F (SEQ ID NO: 19)	5'- TGGACTTCGCCTGTGATATCTAC-3'
	R (SEQ ID NO: 20)	5'- GTTTCGGGTGGTGACAGATGA-3'
	P (SEQ ID NO: 21)	5'- TGCGCGGTCCTTCTGTTGTCAGT-3'
CD14	F (SEQ ID NO: 22)	5'- AAACCTCCCTGGATCTGTCATTT-3'
	R (SEQ ID NO: 23)	5'- CTGACCGTGGCTTCCTATTT-3'
	P (SEQ ID NO: 24)	5'- TCCCTTAGGCACTTGCTCCAACC-3'
CD56	F (SEQ ID NO: 25)	5'- AAACCATGACGGAGGGAAAC-3'
	R (SEQ ID NO: 26)	5'- GACTCCGACTTTGCTTCTACAG-3'
	P (SEQ ID NO: 27)	5'- ACACAGAACCCAATGAGACCACG-3'
CD79B	F (SEQ ID NO: 28)	5'- ACCCTCCTCATCATCCTCTT -3'
	R (SEQ ID NO: 29)	5'- CAATGTCCAGGCCCTCATAG -3'
	P (SEQ ID NO: 30)	5'- ATCGTGCCCATCTTCCTGTTGCT -3'

18S pPHK	F (SEQ ID NO: 31)	5'- GTAACCCGTTGAACCCCATТ-3'
	R (SEQ ID NO: 32)	5'- GGGACTTAATCAACGCAAGC-3'
	P (SEQ ID NO: 33)	5'- GCAATTATTCCCCATGAACG-3'

F: прямой праймер; R: обратный праймер; P: зонд

#### Биопсия печени

Трепанобиопсию печени проводили под ультразвуковым контролем на анестезированных животных с использованием набора одноразовых игл для биопсии 16 размера, установленных на коллекторе изображений на ультразвуковом аппарате. При каждом отборе образцов получали 2-3 кора, каждый размером 16×1-2 см. После проведения биопсии животных профилактически обрабатывали внутримышечно бензатина пенициллином длительного действия.

#### Вирусные нуклеиновые кислоты

Биопсийные образцы печени анализировали количественно на наличие ДНК WHV RI, ссcDNA WHV и РНК WHV (саузерн-блот и нозерн-блот гибридизация), как описано в литературе (Menne S. et al., Antimicrob. Agents Chemother., 2008; 52 (10): p 3617-32).

#### Прогрессирование заболевания

Биопсии оценивали на предмет прогрессирования заболевания печени (гистология) с использованием критериев, разработанных для срезов печени лесных сурков (Peek S.F. et al., Hepatology, 2001; 33 (1): p. 254-66. Tennant B.C. et al. Hepatology, 1998. 28(1): p. 179-91. Cote P.J. et al. Hepatology, 2000. 31(1): p. 190-200), а также с использованием шкалы METAVIR для оценки образцов печени на фиброз печени человека. Кроме того, оценивали фиксированные в формалине парафиновые срезы, окрашенные Н & Е.

#### Иммуногистохимия

Экспрессию WHcAg и WHsAg (иммуногистохимия) оценивали в образцах биопсии печени. Фиксированные в формалине парафиновые срезы готовили и окрашивали, как описано в литературе (Peek S.F. et al., Hepatology, 2001. 33(1): p. 254-66. Tennant B.C., et al. Hepatology, 1998. 28(1): p. 179-91. Cote P.J. et al. Hepatology, 2000. 31(1): p. 190-200) и проводили их оценку.

#### Статистический анализ

Межгрупповые статистические сравнения выполняли по следующим показателям: средняя масса тела, температура тела, вирусные серологические параметры и показатели состояния печени, гематологические показатели, клинико-биохимические показатели, пролиферативные ответы РВМС, и баллы по гистологии и иммуногистохимии печени.

Результаты, полученные на лесных сурках, обработанных АИС649 плюс ETV (группа 4), сравнивали со значениями на Т0 или до обработки, а также с результатами, полученными на сурках, обработанных «растворителем для АИС» плюс «растворителем для ETV» (группа 1), с АИС649 плюс «растворитель ETV» (группа 2) и с «растворителем для АИС» плюс ETV (группа 3) с использованием непарного t-критерия Стьюдента с равной дисперсией.

Там, где указано, для геометрических средних рассчитывали лог-трансформированные значения для сывороточной ДНК WHV и сывороточного WHsAg, определяли средние арифметические значения и анализировали с использованием t-критерия Стьюдента. Значения  $P < 0,05$  считались статистически значимыми.

### Результаты

Был подтвержден паттерн бифазного ответа, индуцированного монотерапией AIC649, который наблюдали ранее (Paulsen et al. (2015): PLOSOne, 10, e0144383). Обработка только одним AIC649 уже приводила к очевидному снижению ДНК WHV, а также WHsAg по сравнению с уровнями до обработки. Достоверный и неожиданно даже более сильный и устойчивый противовирусный эффект наблюдали в группе с комбинацией AIC649+ETV: ДНК WHV и WHsAg оставались заметно супрессированными или даже не детектируемыми в течение нескольких месяцев у животных-респондеров (фиг. 2 и 3). Клеточно-опосредованные иммунные ответы (фиг. 4), а также ответную выработку анти-WHsAg-антител наблюдали в двух группах, получавших AIC649, но не в группе с монотерапией ETV. Изменения маркеров, специфичных для заболеваний печени, были сопоставимы между группами, но прогрессирование стеатоза и повышение активности GGT (фиг. 6) во время исследования протекало медленнее в группе с одним AIC649 и в группе с комбинацией AIC649+ETV. Анализ иммунологических показателей показал, что обработка AIC649 индуцирует цитокины и клеточные маркеры в печени хронических сурков-носителей WHV (фиг.7). Обработка AIC649 хорошо переносилась.

### **Краткое описание фигур**

#### **Фиг. 1**

Дизайн исследования

Обработка/комбинация (неделя 0-12):

AIC649 или «растворитель для AIC»: обработка в/в, два раза в неделю в течение 12 недель

ETV или «растворитель для ETV»: обработка один раз в день, в течение 12 недель

Поддержание:

Неделя 13-24: AIC649 или «растворитель для AIC»: обработка в/м, два раза в неделю в течение 12 недель

Неделя 25-36: AIC649 или «растворитель для AIC»: обработка в/м, один раз в неделю в течение 12 недель

ETV=Энтекавир

#### **Фиг. 2**





Комбинация AIC649 с энтекавиром приводит к синергетическому снижению уровня виремии у сурков-носителей с хронической инфекцией WHV. AIC649, ETV или растворитель для AIC, растворитель для ETV вводили в соответствии с дизайном опыта. На указанные временные точки у лесных сурков отбирали образцы крови, и сыворотку анализировали на нагрузку ДНК WHV. n=5/группу в начале эксперимента (гибель в группе 1: 1 животное на неделе 21; группа 2: 1 животное на каждой неделе 12, 26; группа

3: 1 животное на каждой неделе 4, 14, 21, 29; группа 4: отсутствие гибели). Горизонтальная пунктирная линия представляет средние значения вирусных геномных эквивалентов (ГЭ/мл) во всех группах на T0 ( $6,36 \times 10^{10}$  вирусных ГЭ/мл). Вертикальные пунктирные линии на неделе 0 указывают на начало обработки или изменения в режиме обработки (недели 12 и 24). (A) сывороточные концентрации ДНК WHV у отдельных сурков (обозначены разными символами) в группе 1 (растворитель), (B) в группе 2 (только AIC649); (C) в группе 3 (только ETV), (D) в группе 4 (ETV+AIC649).

### Фиг. 3

Комбинация AIC649 с энтекавиром приводит к синергетическому снижению уровней антигенемии у сурков-носителей с хронической инфекцией WHV. AIC649, ETV или растворитель для AIC, растворитель для ETV вводили в соответствии с дизайном опыта. На указанные временные точки у лесных сурков отбирали образцы крови и сыворотку анализировали на нагрузку WHsAg.  $n=5$ /группу в начале эксперимента (гибель в группе 1: 1 животное на неделе 21; группа 2: 1 животное на каждой неделе 12, 26; группа 3: 1 животное на каждой неделе 4, 14, 21, 29; группа 4: отсутствие гибели). Горизонтальная пунктирная линия указывает предел обнаружения WHsAg. Вертикальные пунктирные линии на неделе 0 указывают на начало обработки или изменения в режиме обработки (недели 12 и 24). (A) концентрации WHsAg в сыворотке крови отдельных лесных сурков (обозначенных разными символами) в группе 1 (растворитель), (B) в группе 2 (только AIC649); (C) в группе 3 (только ETV), (D) в группе 4 (AIC649+ETV).





### Фиг. 4

Обработка только AIC649 стимулирует клеточно-опосредованный иммунитет у сурков-носителей с хронической инфекцией WHV - еще более выраженный в комбинации с ETV. AIC649, ETV или растворитель для AIC, растворитель для ETV вводили в соответствии с дизайном опыта. На указанные временные точки у лесных сурков отбирали образцы крови и РВМС стимулировали пептидами WHsAg. Значения нормализовали к индивидуальной базовой линии на T0 и представлены в виде кратного изменения от исходного уровня.  $n=5$ /группу в начале эксперимента (гибель в группе 1: 1 животное на неделе 21; группа 2: 1 животное на каждой неделе 12, 26; группа 3: 1 животное на каждой неделе 4, 14, 21, 29; группа 4: отсутствие гибели). Представлено среднее геометрическое значение для каждой группы. Вертикальные пунктирные линии на неделе 0 указывают на начало обработки или изменения в режиме обработки (недели 12 и 24). (  ) группа 1 (растворитель), (  ) группа 2 (только AIC649); (  ) группа 3 (только ETV), (  ) группа 4 (ETV+AIC649).





### Фиг. 5

Обработка только AIC649 стимулирует выработку анти-WHsAg-антител у сурков-носителей с хронической инфекцией WHV - еще более выраженную в комбинации с ETV. AIC649, ETV или растворитель для AIC, растворитель для ETV вводили в соответствии с







дизайном опыта. На указанные временные точки у лесных сурков отбирали образцы крови и определяли уровни анти- WHs-антител в сыворотке. Значения нормализовали к индивидуальному исходному уровню на T0 и приведены в %. n=5/группу в начале эксперимента (гибель в группе 1: 1 животное на неделе 21; группа 2: 1 животное на каждой неделе 12, 26; группа 3: 1 животное на каждой неделе 4, 14, 21, 29; группа 4: отсутствие гибели). Представлено среднее геометрическое значение для каждой группы. Вертикальные пунктирные линии на неделе 0 указывают на начало обработки или изменения в режиме обработки (недели 12 и 24). (  ) группа 1 (растворитель), (  ) группа 2 (только AIC649); (  ) группа 3 (только ETV), (  ) группа 4 (ETV+AIC649).

### Фиг. 6

Обработка AIC649 замедляет повышение активности GGT у сурков-носителей с хронической инфекцией WHV. ETV или растворитель для AIC, растворитель для ETV вводили в соответствии с дизайном опыта. На указанные временные точки у лесных сурков отбирали образцы крови и определяли активность GGT в сыворотке крови. Значения нормализовали к индивидуальному исходному уровню на T0 и приведены в %. n=5/группу в начале эксперимента (гибель в группе 1: 1 животное на неделе 21; группа 2: 1 животное на каждой неделе 12, 26; группа 3: 1 животное на каждой неделе 4, 14, 21, 29; группа 4: отсутствие гибели). Представлено среднее геометрическое значение для каждой группы. Горизонтальная пунктирная линия указывает исходный уровень (100%). Вертикальные пунктирные линии на неделе 0 указывают на начало обработки или изменения в режиме обработки (недели 12 и 24). (  ) группа 1 (растворитель), (  ) группа 2 (только AIC649); (  ) группа 3 (только ETV), (  ) группа 4 (ETV+AIC649).

### Фиг. 7

Обработка AIC649, но не обработка плацебо, индуцировала IFN-β в печени у сурков-носителей с хронической инфекцией WHV. AIC649, ETV или растворитель для AIC, растворитель для ETV вводили в соответствии с дизайном опыта. Биопсии печени были взяты на указанные временные точки и определяли уровни транскриптов цитокинов. Значения нормализовали к индивидуальному исходному уровню на неделе -1. n=5/группу в начале эксперимента (гибель в группе 1: 1 животное на неделе 21; группа 2: 1 животное на каждой неделе 12, 26; группа 3: 1 животное на каждой неделе 4, 14, 21, 29; группа 4: отсутствие гибели). По результатам строили график только тогда, когда были доступны, по меньшей мере, 3 значения на каждую временную точку. В группе 2 (только ETV) это имело место только на неделе -1, поэтому для этой группы кривая отсутствует. Результаты

приведены в виде среднего кратного изменения по группе +/- SEM. Вертикальные пунктирные линии на неделе 0 указывают на начало обработки или изменения в режиме обработки (недели 12 и 24). (  ) группа 1 (растворитель), (  ) группа 2 (только AIC649); (  ) группа 3 (только ETV), (  ) группа 4 (ETV+AIC649).

### **Выводы**

Не было выявлено токсических эффектов, связанных с обработкой AIC649.

Обработка AIC649 усиливала и удлиняла подавление вирусных нуклеиновых кислот под действием ETV в печени и крови в течение нескольких месяцев, и AIC649, по-видимому, стимулировал иммунные ответы на антигены WHV: были выявлены клеточно-опосредованные иммунные ответы на антигены WHV, а также анти-WHV-антитела и индукция цитокинов.

Клеточно-опосредованные ответы на WHsAg коррелировали с элиминацией или снижением циркулирующего WHsAg.

Один AIC649 индуцировал снижение WHsAg, несмотря на очевидное незначительное снижение уровня циркулирующей ДНК WHV.

Обработка AIC649 приводила к длительной элиминации экспрессии антигена WHc или WHs в печени, которая была более частой и более выраженной в комбинации с ETV, но отсутствовала без обработки AIC649.

Вирусологические показатели, такие как ДНК WHV и WHsAg, указывали на возможное синергетическое взаимодействие между AIC649 и ETV.

Наблюдаемая длительная элиминация WHsAg и индукция выработки анти-WHsAg-антител, сопровождаемая клеточно-опосредованными иммунными реакциями, подтверждают гипотезу о том, что AIC649 индуцирует физиологически «согласованный» восстановленный иммунный ответ на WHV. AIC649 в виде партнера в комбинации с ETV существенно повышает эффективность лечения. Способность AIC649 в индукции функционального излечения у HBV-инфицированных пациентов подтверждается результатами данного доклинического исследования.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая *Pararoxvirus ovis*, выбранный из группы, включающей:
  - необязательно инактивированные вирионы *Pararoxvirus ovis* (PPVO) и/или их активные фрагменты, и/или
  - нуклеиновокислотные векторы или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент, и/или
  - клетки, содержащие вирионы PPVO или их фрагменты, и/или нуклеиновокислотные векторы и/или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент,
 для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV).
2. Композиция, содержащая *Pararoxvirus ovis*, выбранный из группы, включающей:
  - необязательно инактивированные вирионы *Pararoxvirus ovis* (PPVO) и/или их активные фрагменты, и/или
  - нуклеиновокислотные векторы или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент, и/или
  - клетки, содержащие вирионы PPVO или их фрагменты, и/или нуклеиновокислотные векторы и/или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент,
 для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV), по п.1,
 

где другое противовирусное средство представляет собой противовирусное средство против HBV.
3. Композиция, содержащая *Pararoxvirus ovis* (PPVO) для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV), по пп.1 или 2, где PPVO представляет рекомбинантную нуклеиновую кислоту вируса или по меньшей мере один ее активный фрагмент, и/или где PPVO представляет рекомбинантно-полученный вирион, и/или по меньшей мере один его активный фрагмент.
4. Композиция, содержащая *Pararoxvirus ovis* (PPVO) для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV), по любому из пп. 1-3, где PPVO выбран из группы штаммов PPVO, включающей NZ2, NZ7, NZ10, D1701, OV/20, OV/7, OV/C2, OV/mi-90, OV-Torino, SA00, Bo29 или orf11, штамм Greek orf 155 и/или штамм Greek orf 176, или таксономически близкий штамм *Pararoxvirus ovis* orf.
5. Композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по

любому из пп. 1-4, где противовирусное средство выбрано из группы лекарственных средств, включающей нуклеотидные/нуклеозидные аналоги в качестве активных ингредиентов, ингибиторы или модуляторы сборки капсида, ингибиторы или модуляторы капсида/ядра, ингибиторы или модуляторы инкапсидирования, РНКi, терапевтическую вакцинацию, агонисты и антагонисты Toll-подобного рецептора (TLR), эпигенетические модификаторы, ингибиторы или модуляторы проникновения, ингибиторы или модуляторы циклофилина, ингибиторы секреции HBsAg, ингибиторы HBsAg, ингибиторы или модуляторы проникновения HBV, ингибиторы сссDNA, иммуномодуляторы, в частности, интерфероны и другие цитокины, и/или ингибиторы иммунных контрольных точек, в частности, PD-1.

6. Композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по любому из пп. 1-5, где группа лекарственных средств, включающая нуклеотидные/нуклеозидные аналоги в качестве активных ингредиентов, включает тенофовир, тенофовира дизопроксила фумарат (TDF), тенофовира алафенамид (TAF), энтекавир, ламивудин, телбивудин, адефовир, эмтрицитабин и/или клевудин.

7. Композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по любому из пп. 1-6, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство составлены для раздельного/последовательного введения, или где PPVO и по меньшей мере одно другое лекарственное средство, как определено в любом из предшествующих пунктов, составлены для сопутствующего/одновременного введения.

8. Композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по любому из пп. 1-6, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство составлены для раздельного/последовательного введения, или где PPVO и по меньшей мере одно другое лекарственное средство, как определено в любом из предшествующих пунктов, составлены для сопутствующего/одновременного введения.

9. Композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по любому из пп. 1-8, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство обеспечены в виде отдельных разовых лекарственных форм или комбинированных продуктов, выбранных из группы, включающей: таблетки, капсулы, пастилки, в частности, кислотоустойчивые капсулы, капли, пластыри, депо-формы для введения, растворы, растворы для инъекций, раствор для инфузий, разведения, кремы, мази, бальзамы, порошки, порошок для восстановления, порошок для восстановления и инфузии и/или спреи.

10. Композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по любому из пп. 1-9, где указанный пациент выбран из группы пациентов с

острой HBV-инфекцией, пациентов с хронической HBV-инфекцией, пациентов с детектируемым HBsAg, пациентов с детектируемой РНК HBV, пациентов с детектируемой ДНК HBV, пациентов с детектируемой cccDNA, пациентов с воспалением печени, пациентов со стеатозом печени, пациентов с фиброзом печени, пациентов с циррозом печени, пациентов с раком печени, пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, остро или бессимптомно или хронически инфицированных пациентов, пациентов, подвергшихся противовирусному лечению, пациентов, которые не отвечают на противовирусное лечение противовирусными средствами по любому из пп. 1-9, или пациентов, которые имеют приобретенную резистентность по меньшей мере к одному противовирусному средству и/или пациентов, коинфицированных по меньшей мере одним дополнительным патогенным вирусом, выбранным из группы, включающей семейства deltavirus, retroviridae, herpesviridae, poxviridae, parvoviridae, adenoviridae, picornaviridae, hepadnaviridae, flaviviridae, orthomyxoviridae, paramyxoviridae, papovaviridae, polyomaviridae, rhabdoviridae, coronaviridae, bunyaviridae, arenaviridae, reoviridae и togaviridae.

11. Композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по любому из пп. 1-10, где доза PPVO находится в диапазоне  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц и доза по меньшей мере одного другого противовирусного средства выбрана в соответствии с инструкциями изготовителя.

12. Композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по любому из пп. 1-11, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство вводят в течение <72 недель, предпочтительно <60 недель, более предпочтительно <48 недель, <36 недель, <24 недель, <12 недель, <6 недель, <4 недель, <2 недель или <1 недели.

13. Композиция по любому из пп. 1-12 для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по любому из пп. 1-12, где PPVO инактивирован.

14. Композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по любому из пп. 1-13, где по меньшей мере одно другое противовирусное средство представляет собой энтекавир.

15. Композиция, содержащая PPVO, для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по любому из пп. 1-14, где пациент, подвергшийся лечению указанной композицией и по меньшей мере одним другим противовирусным средством, представляет собой пациента, который является HBsAg- и/или HBeAg-позитивным, и где нагрузка HBsAg и/или HBeAg снижается, или происходит элиминация HBsAg и/или HBeAg в течение курса лечения, как определено в любом из предшествующих пунктов.

16. Композиция, содержащая PPVO для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством для лечения пациента с HBV-инфекцией по любому из пп. 1-15, где композиция составлена для внутривенного, внутримышечного, перорального, парентерального, внутрикожного и/или подкожного введения.

17. Способ лечения HBV-инфицированного пациента эффективным количеством PPVO и эффективным количеством по меньшей мере одного другого противовирусного средства, где PPVO выбран из группы, включающей:

- необязательно инактивированные вирионы *Parapoxvirus ovis* (PPVO) и/или их активные фрагменты, и/или

- нуклеиновокислотные векторы или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент, и/или

- клетки, содержащие вирионы PPVO или их фрагменты, и/или нуклеиновокислотные векторы и/или молекулы синтетической нуклеиновой кислоты, экспрессирующие PPVO и/или по меньшей мере один их активный фрагмент.

18. Способ лечения по п. 17, где PPVO представляет рекомбинантную нуклеиновую кислоту вируса или по меньшей мере один ее активный фрагмент, и/или где PPVO представляет рекомбинантно-полученный вирион и/или его активные фрагменты.

19. Способ по пп. 17 или 18, где другое противовирусное средство выбрано из группы лекарственных средств, включающей нуклеотидные/нуклеозидные аналоги в качестве активных ингредиентов, ингибиторы или модуляторы сборки капсида, ингибиторы или модуляторы капсида/ядра, ингибиторы или модуляторы инкапсидирования, РНКi, терапевтическую вакцинацию, агонисты и антагонисты Toll-подобного рецептора (TLR), эпигенетические модификаторы, ингибиторы или модуляторы проникновения, ингибиторы или модуляторы циклофилина, ингибиторы секреции HBsAg, ингибиторы HBsAg, ингибиторы или модуляторы проникновения HBV, ингибиторы сссDNA, иммуномодуляторы, в частности, интерфероны и другие цитокины, и/или ингибиторы иммунных контрольных точек, в частности, PD-1.

20. Способ по любому из пп. 17-19, где группа лекарственных средств, включающая нуклеотидные/нуклеозидные аналоги в качестве активных ингредиентов, включает тенофовир, тенофовира дизопроксила фумарат (TDF), тенофовира алафенамид (TAF), энтекавир, ламивудин, телбивудин, адефовир, эмтрицитабин и/или клевудин.

21. Способ по любому из пп. 17-20, где противовирусное средство представляет собой энтекавир.

22. Способ по любому из пп. 17-21, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство вводят отдельно/последовательно.

23. Способ по любому из пп. 17-21, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство вводят сопутствующе/одновременно.

24. Способ по любому из пп. 17-23, где PPVO и по меньшей мере одно другое

противовирусное средство представлены в виде отдельной разовой лекарственной формы или комбинированных продуктов, выбранных из группы, включающей: таблетки, капсулы, пастилки, в частности, кислотоустойчивые капсулы, капли, пластыри, депо-формы для введения, растворы, растворы для инъекций, раствор для инфузий, разведения, кремы, мази, бальзамы, порошки, порошок для восстановления, порошок для восстановления и инфузии и/или спреи.

25. Способ по любому из пп. 17-24, где PPVO и/или по меньшей мере одно другое противовирусное средство составлены для внутривенного, внутримышечного, перорального, парентерального, топического, внутрикожного и/или подкожного введения.

26. Способ по одному из пп. 17-25, где указанный пациент выбран из группы пациентов с острой HBV-инфекцией, пациентов с хронической HBV-инфекцией, пациентов с детектируемым HBsAg, пациентов с детектируемой РНК HBV, пациентов с детектируемой ДНК HBV, пациентов с детектируемой cccDNA, пациентов с воспалением печени, пациентов со стеатозом печени, пациентов с фиброзом печени, пациентов с циррозом печени, пациентов с раком печени, пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, остро или бессимптомно или хронически инфицированных пациентов, пациентов, подвергшихся противовирусному лечению, пациентов, которые не отвечают на противовирусное лечение противовирусными лекарственными средствами по любому из пп. 1-25, или пациентов, которые имеют приобретенную резистентность по меньшей мере к одному противовирусному средству, и/или пациентов, коинфицированных по меньшей мере одним дополнительным патогенным вирусом, выбранным из группы, включающей семейства deltavirus, retroviridae, herpesviridae, poxviridae, parvoviridae, adenoviridae, picornaviridae, hepadnaviridae, flaviviridae, orthomyxoviridae, paramyxoviridae, papovaviridae, polyomaviridae, rhabdoviridae, coronaviridae, bunyaviridae, arenaviridae, reoviridae и togaviridae.

27. Способ по любому из пп. 17-26, где доза PPVO находится в диапазоне  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц, и/или где доза по меньшей мере одного другого противовирусного средства выбрана в соответствии с инструкциями изготовителя.

28. Способ по любому из пп. 17-27, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство вводят в течение <72 недель, предпочтительно, <60 недель, более предпочтительно, <48 недель, <36 недель, <24 недели, <12 недель, <6 недель, <4 недель, <2 недель или <1 недели.

29. Способ снижения вирусной нагрузки HBV у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-28.

30. Способ снижения нагрузки HBsAg у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-29.

31. Способ ослабления повреждения печени, цирроза печени и/или фиброза печени у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-30.

32. Способ индукции регенерации ткани печени у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-31.

33. Способ уменьшения побочных эффектов, ассоциированных с лечением HBV-инфицированного пациента, где указанные побочные эффекты вызваны лечением интерферонами и/или нуклеотидными/нуклеозидными аналогами, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-32, в частности, уменьшения побочных эффектов, выбранных из группы, включающей лихорадку, воспаление ткани, психические расстройства и/или гематологические нарушения.

34. Способ снижения нагрузки HBeAg у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-33.

35. Способ восстановления и/или реактивации иммунного ответа у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-34.

36. Способ уменьшения количества ДНК HBV, элиминации ДНК HBV и/или сайленсинга ДНК HBV, в частности сссDNA у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-35.

37. Способ предотвращения образования сссDNA de novo у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-36.

38. Способ ингибирования или снижения экспрессии белков HBV у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-37.

39. Способ подавления репликации HBV у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-38.



40. Способ выведения HBV у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-39.

41. Способ отмены иммунологической толерантности к инфекциям, вызванным HBV, у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-40.

42. Способ отмены толерантности к HBsAg и/или HBeAg у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-41.

43. Способ индукции HBsAg-специфических антител у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-42.

44. Способ индукции HBeAg-специфических антител у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-43.

45. Способ замедления или ингибирования прогрессирования стеатоза у HBV-инфицированного пациента, включающий введение эффективного количества PPVO и эффективного количества по меньшей мере одного другого противовирусного средства, как определено в любом из пп. 1-44.

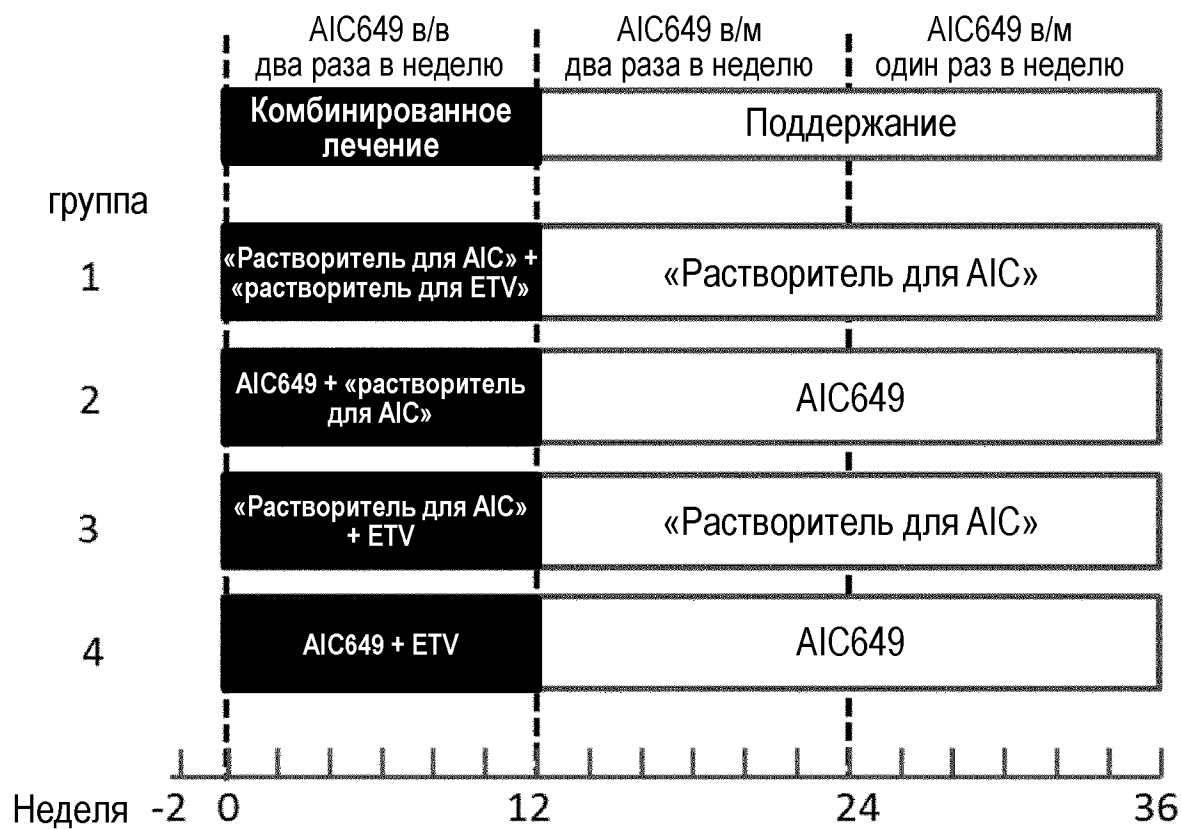
46. Способ по любому из пп. 17-45, где PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство вводят в течение <72 недель, предпочтительно, <60 недель, более предпочтительно, <48 недель, <24 недель, <12 недель, <6 недель, <4 недель, <2 недель или <1 недели.

47. Лечебный набор-продукт, содержащий первый контейнер, включающий фармацевтические композиции, содержащие PPVO, предпочтительно инактивированный PPVO, и второй контейнер, включающий фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно другое противовирусное средство, как определено в любом из пп. 1-46, или фармацевтическую композицию, содержащую PPVO, предпочтительно инактивированный PPVO и по меньшей мере одно другое противовирусное средство, как определено в любом из пп. 1-46, в форме комбинированного состава и, необязательно, инструкции по применению, фармацевтически приемлемый носитель для восстановления, шприцы и/или микроиглы.

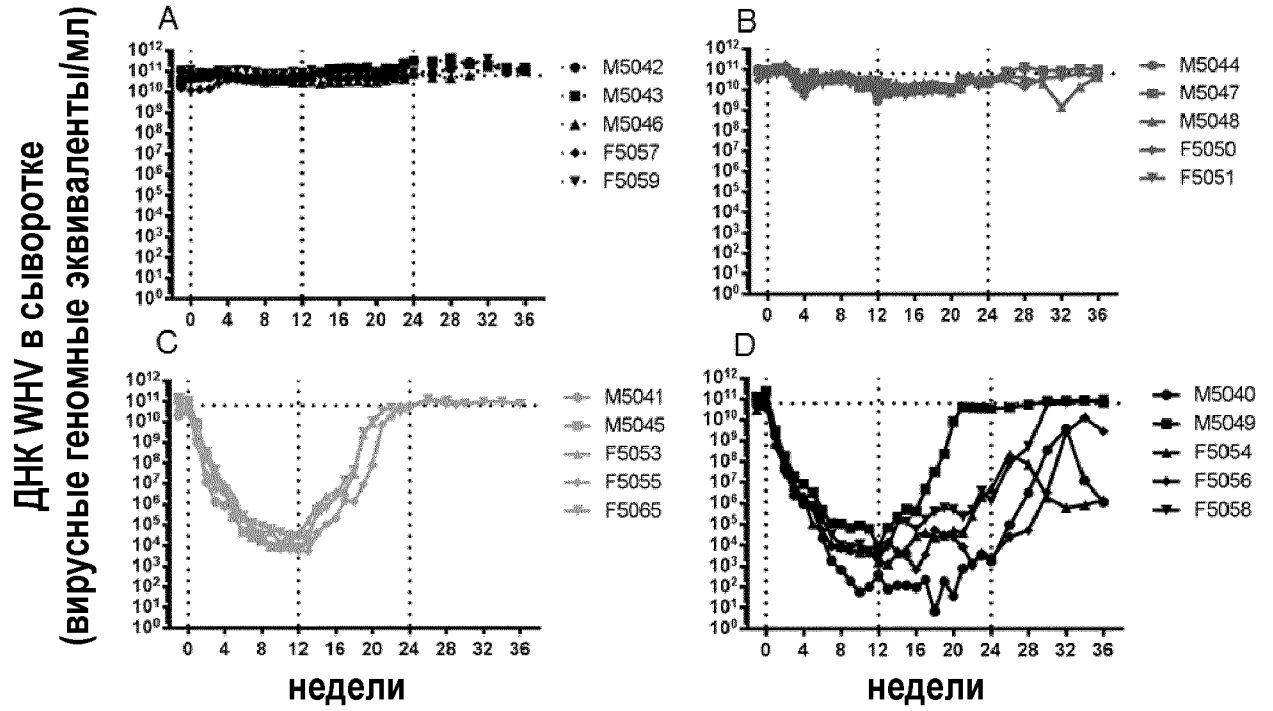
48. Лечебный набор-продукт по п.47, где композиции, содержащие PPVO, предпочтительно инактивированный PPVO, и фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно другое противовирусное средство, составлены в виде таблеток, капсул, пастилок, в частности, кислотоустойчивых капсул, капель, пластырей, депо-форм

для введения, растворов, растворов для инъекций, растворов для инфузий, разведений, кремов, мазей, бальзамов, порошков, порошка для восстановления раствора, порошка для восстановления и инфузий и/или спреев.

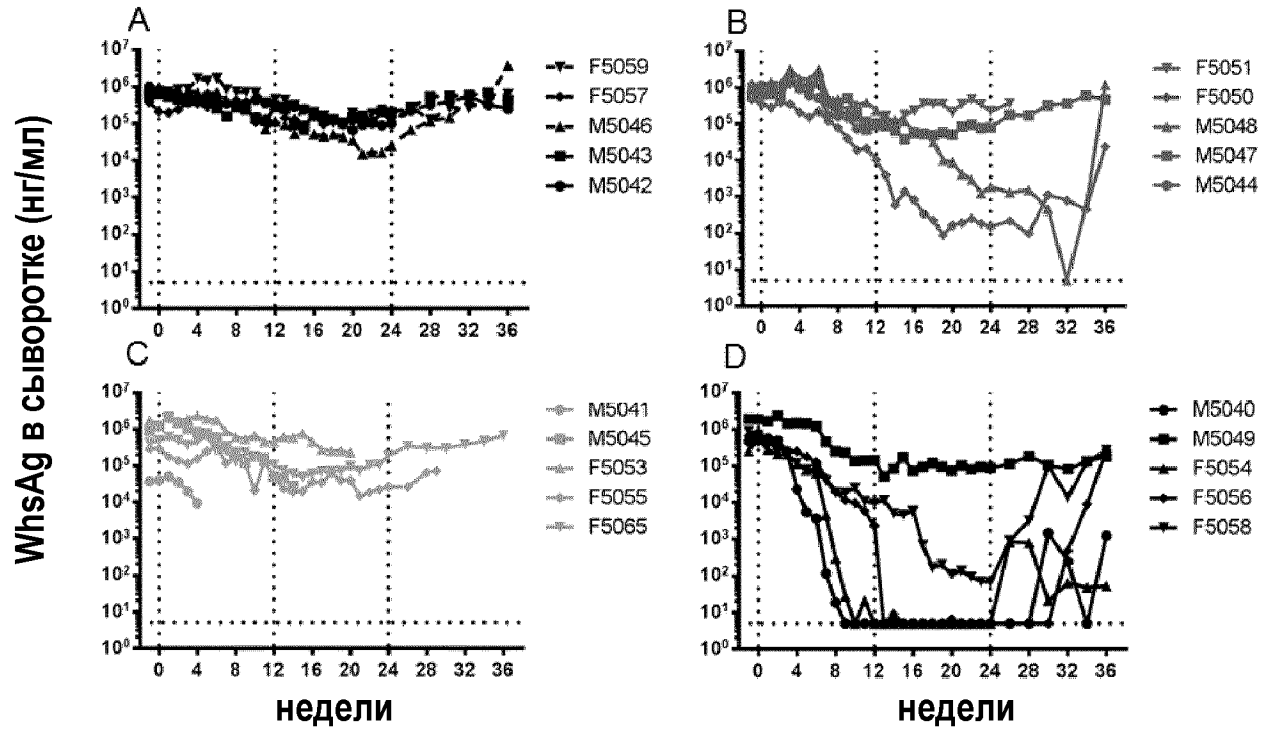
ФИГ.1



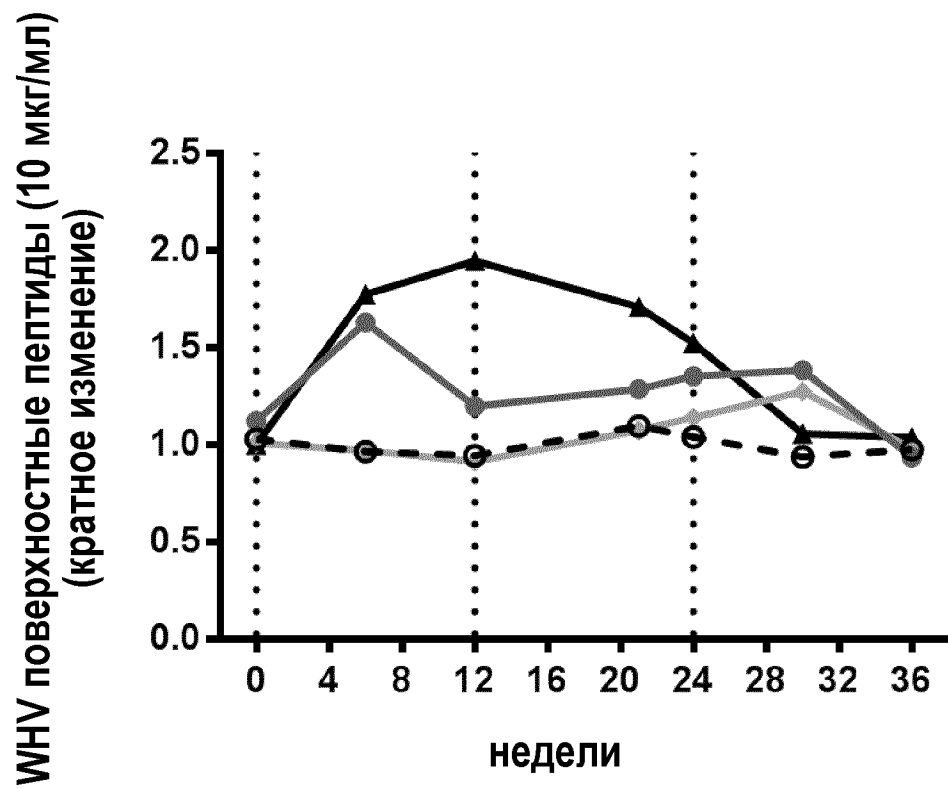
ФИГ.2



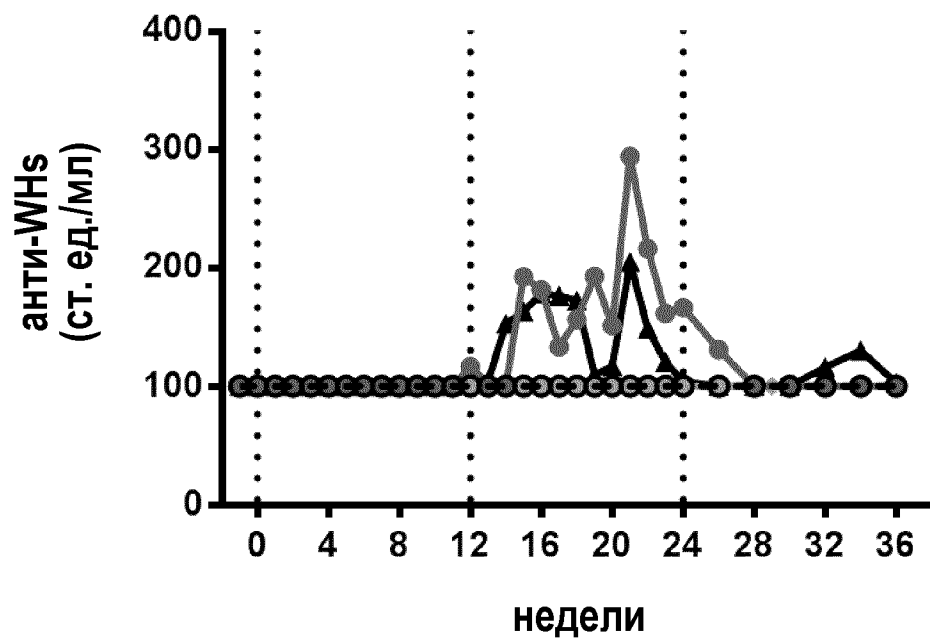
ФИГ.3



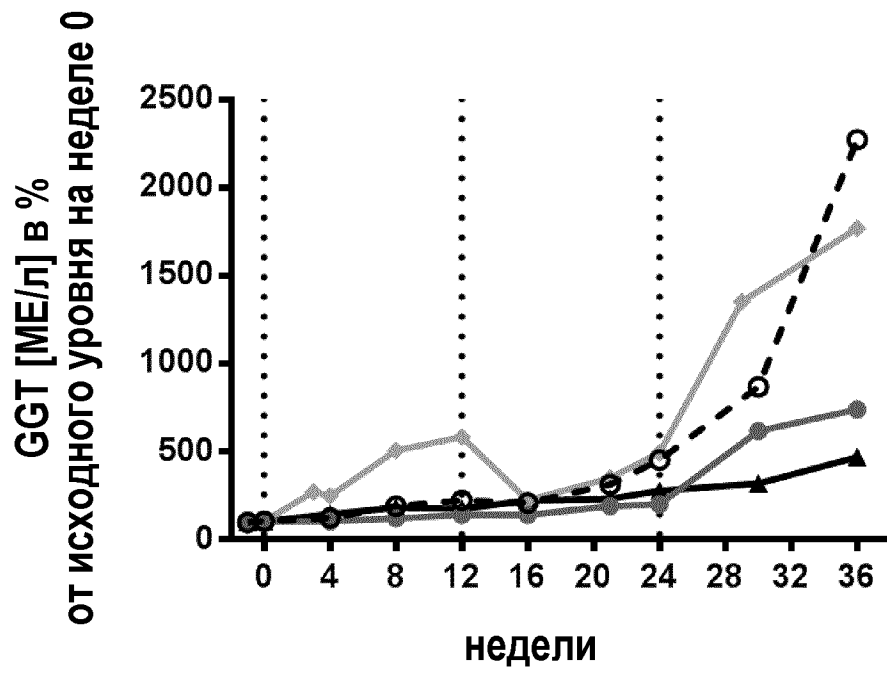
ФИГ.4



ФИГ.5



ФИГ.6





ФИГ.7

Экспрессия гена IFN-гамма в печени  
(кратное изменение по сравнению с неделей -1)

