

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092397** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.02.26

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.07.22

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ кзкДНК
ВИРУСА ГЕПАТИТА В**

(31) 10-2015-0105277

(32) 2015.07.24

(33) KR

(62) 201890362; 2016.07.22

(71) Заявитель:

**ГРИН КРОСС КОРПОРЕЙШН;
МОГАМ ИНСТИТЬЮТ ФОР
БАЙОМЕДИКАЛ РИСЕРЧ (KR)**

(72) Изобретатель:

**Чан Ки-Хван, Ко Чун-Кё, Лю Ван-
Сик, Син Ён-Вон (KR)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение основано на обнаружении того, что антитело против вируса гепатита В ингибирует связывание поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В с гепарансульфатпротеогликаном, предотвращая тем самым образование кзкДНК вируса гепатита В. Предполагается, что применение фармацевтической композиции и способа подавления образования кзкДНК вируса гепатита В согласно настоящему изобретению может полностью вылечить хронический гепатит В, а также предотвратить рецидив гепатита у пациента с гепатитом В после операции по трансплантации печени. Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением соединение для предотвращения или лечения гепатита В может представлять собой новое соединение, идентифицированное путем подтверждения ингибирования образования кзкДНК. Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением дополнительное лекарственное средство, которое можно вводить в комбинации с антителом против вируса гепатита В, может представлять собой новое идентифицированное лекарственное средство.

A2

202092397

202092397

A2

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ КЗКДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для подавления образования кзкДНК вируса гепатита В.

Сведения о предшествующем уровне техники

Вирус гепатита В (HBV) представляет собой вирус, имеющий геном ДНК, принадлежащий к семейству гепаднавирусов *Hepadnaviridae*, и индуцирует острый и хронический гепатит. Во всем мире около 350 миллионов человек хронически инфицированы вирусом HBV и, в частности, около 5-8% населения Кореи и Китая хронически инфицировано HBV. Такая хроническая HBV-инфекция может стать причиной развития гепатита, цирроза печени и даже рака печени. Среди хронически инфицированных людей вероятность возникновения рака печени примерно в 300 раз выше по сравнению с неинфицированными людьми. В соответствии с исследованием ВОЗ, хронический HBV считается основной причиной развития примерно 80% случаев рака печени.

Благодаря разработке вакцин удалось создать частичную защиту от вируса гепатита В. Однако после проникновения HBV в клетки печени не существует способа полного удаления HBV, который проник в клетки печени пациента. Поэтому на сегодняшний день очень трудно полностью вылечить гепатит В. Кроме того, пациенты с печеночным трансплантатом, имеющие гепатит В, показывают высокую частоту рецидивов гепатита В. Причина состоит в том, что HBV, который полностью не удаляется, а остается в клетках, проникает в трансплантированные здоровые клетки печени.

При проникновении HBV в клетки печени в них образуется ковалентно замкнутая кольцевая (кзк) ДНК. Затем образовавшаяся кзкДНК служит матрицей для репликации генома ДНК HBV и непрерывно генерирует HBV до тех пор, пока не закончится продолжительность жизни соответствующих клеток печени. С помощью любого существующего в настоящее время способа лечения можно ингибировать репликацию генома ДНК HBV, чтобы, таким образом, ингибировать образование HBV в крови, однако полностью заблокировать репликацию HBV невозможно.

Таким образом, все еще существует высокая потребность в разработке фармацевтической композиции для подавления образования кзкДНК, которая способна

полностью блокировать репликацию HBV для обеспечения основного лечения хронического гепатита В и предупреждения рецидива гепатита после операции по трансплантации печени пациенту с гепатитом В, а также способа лечения с применением указанной фармацевтической композиции.

Документ предшествующего уровня техники

Патентный документ

Патентный документ 1. Корейский патент № 0467706 (13.01.2005)

Патентный документ 2. Корейский патент № 1072895 (06.10.2011)

Раскрытие изобретения

Техническая проблема

Целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции для подавления образования кзкДНК вируса гепатита В.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение нового способа лечения хронического гепатита В с применением фармацевтической композиции, описанной выше.

Кроме того, еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение способа предупреждения рецидива гепатита у пациента с гепатитом В после операции по трансплантации печени.

Техническое решение

Вышеуказанные цели настоящего изобретения могут быть достигнуты с помощью:

(1) Фармацевтическая композиция для подавления образования кзкДНК вируса гепатита В, включающая антитело против вируса гепатита В.

(2) Композиция по вышеуказанному пункту (1), отличающаяся тем, что антитело против вируса гепатита В ингибирует связывания поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В с гепарансульфатпротеогликаном.

(3) Композиция по вышеуказанному пункту (1), отличающаяся тем, что антитело против вируса гепатита В включает: аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, кодирующую вариабельную область тяжелой (H) цепи антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В; и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, кодирующую вариабельную область легкой (L) цепи антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В.

(4) Композиция по вышеуказанному пункту (1), отличающаяся тем, что антитело против вируса гепатита В включает: аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, кодирующую вариабельную область тяжелой (H) цепи

антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В; и любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4-6, кодирующую вариабельную область легкой (L) цепи антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В.

(5) Композиция по вышеуказанному пункту (1), отличающаяся тем, что композицию вводят в пределах 24 часов после заражения вирусом гепатита В.

(6) Способ подавления образования кзкДНК вируса гепатита В, включающий введение профилактически или терапевтически эффективного количества антитела к вирусу гепатита В.

(7) Способ по вышеуказанному пункту (6), отличающийся тем, что антитело против вируса гепатита В ингибирует связывания поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В с гепарансульфатпротеогликаном.

(8) Способ по вышеуказанному пункту (6), отличающийся тем, что антитело против вируса гепатита В включает: аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, кодирующую вариабельную область тяжелой (H) цепи антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В; и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, кодирующую вариабельную область легкой (L) цепи антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В.

(9) Способ по вышеуказанному пункту (6), отличающийся тем, что антитело против вируса гепатита В включает: аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, кодирующую вариабельную область тяжелой (H) цепи антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В; и любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4-6, кодирующую вариабельную область легкой (L) цепи антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В.

(10) Способ по вышеуказанному пункту (6), отличающийся тем, что композицию вводят в пределах 24 часов после заражения вирусом гепатита В.

(11) Способ лечения хронического гепатита, включающий введение фармацевтической композиции по вышеуказанному пункту (1) для блокирования репликации генома ДНК-содержащего вируса гепатита В.

(12) Способ по вышеуказанному пункту (11), отличающийся тем, что хронический гепатит представляет собой хронический гепатит В.

(13) Способ по вышеуказанному пункту (11), отличающийся тем, что антитело против вируса гепатита В включает: аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 1, кодирующую вариабельную область тяжелой (H) цепи антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В; и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, кодирующую вариабельную область легкой (L) цепи антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В.

(14) Способ по вышеуказанному пункту (11), отличающийся тем, что антитело против вируса гепатита В включает: аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, кодирующую вариабельную область тяжелой (H) цепи антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В; и любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4-6, кодирующую вариабельную область легкой (L) цепи антитела человека к поверхностному антигену вируса гепатита В.

(15) Способ скрининга соединения для предупреждения или лечения гепатита В, включающий: инокуляцию вируса гепатита В в клетки печени; и после лечения клеток печени исследуемым соединением получение подтверждения ингибирования образования кзкДНК.

(16) Способ по вышеуказанному пункту (15), отличающийся тем, что клетки печени представляют собой HepG2-NTCP.

(17) Способ по вышеуказанному пункту (15), отличающийся тем, что лечение исследуемым соединением осуществляют в пределах 24 часов после инокуляции вируса гепатита В.

(18) Способ по вышеуказанному пункту (15), отличающийся тем, что подтверждение ингибирования образование кзкДНК выполняют путем: (а) экстракции эписомальной ДНК из клеток печени через 2-10 дней после лечения исследуемым соединением; и (b) измерения количества кзкДНК, включенной в эписомальную ДНК.

(19) Способ скрининга дополнительного лекарственного средства для лечения гепатита В, включающий: (а) приведение в контакт антитела против вируса гепатита В и исследуемого соединения с биологическим образцом, содержащим вирус гепатита В; и (b) подтверждение ингибирования образование кзкДНК, и если образование кзкДНК уменьшено больше, чем в случае, когда исследуемое соединение не контактирует с образцом, подтверждение исследуемого соединения в качестве дополнительного лекарственного средства, которое вводят в комбинации с антителом против вируса гепатита В.

Полезные эффекты изобретения

В соответствии с настоящим изобретением, если предотвращено образование

кзкДНК вируса гепатита В (HBV), репликации генома ДНК-содержащего HBV не происходит, и репродукция HBV невозможна, следовательно, дальнейшего распространения HBV в неинфицированные клетки печени не происходит.

Между тем, когда в клетке печени уже произошло образование кзкДНК, после окончания продолжительности жизни (около 5 месяцев) клетки печени с наступлением гибели клетки кзкДНК также деградирует и исчезает. Соответственно, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может полностью удалить HBV из клеток печени пациента, делая возможным существенное и полное излечение от хронического гепатита В. Кроме того, может быть также существенно блокирован рецидив гепатита у пациента с гепатитом В после операции по трансплантации печени.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно эффективно применять для предупреждения цирроза печени и рака печени, вызванных хроническим гепатитом В.

В соответствии с настоящим изобретением соединение, предназначенное для предупреждения или лечения гепатита В, может быть идентифицировано путем подтверждения ингибирования образования кзкДНК.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением может быть идентифицировано дополнительное лекарственное средство, которое можно вводить в комбинации с антителом против HBV.

Описание фигур

На фигуре 1 показаны диаграммы, иллюстрирующие результаты оценки эффективности GC1102 в отношении ингибирования HBV-инфекции с помощью Саузерн-блот анализа и HBsAg ELISA.

На фигуре 2 показаны фотографии, иллюстрирующие результаты оценки эффективности ингибирования HBV с помощью GC1102 в соответствии с иммунофлуоресцентным методом.

На фигуре 3 показана диаграмма, иллюстрирующая результаты оценки эффективности GC1102 в отношении ингибирования образования кзкДНК HBV.

На фигуре 4 показаны диаграммы, иллюстрирующие результаты анализа «доза-ответ» для ингибирования инфекции HBV с помощью GC1102.

На фигуре 5 показан график, иллюстрирующий результаты оценки EC50 (эффективная концентрация) с помощью GC1102.

На фигуре 6 показаны диаграммы, иллюстрирующие результаты оценки эффективности ингибирования HBV-инфекции в зависимости от времени лечения с

помощью GC1102 (анти-HBsAg).

Наилучший способ осуществления изобретения

Настоящее изобретение основано на обнаружении того, что путем использования антитела против вируса гепатита В можно ингибировать связывание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) с гепарансульфатпротеогликаном клетки печени; блокировать проникновение HBV в клетки печени; и предотвратить образование кзкДНК HBV.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция для предотвращения образования кзкДНК HBV, которая включает антитело против HBV.

Вирус гепатита В (HBV) представляет собой вирус, принадлежащий к семейству *Нерадnaviridae*, и проникает в клетки печени, индуцируя острый и хронический гепатит.

Вирус HBV имеет жизненный цикл, включающий: процесс проникновения, состоящий в прикреплении к поверхности клетки печени и проникновении в клетку; процесс пролиферации, состоящий в «отшелушивании» слоя цитоплазмы, проникновении в ядро клетки и репликации ДНК; процесс сборки, состоящий в формировании слоя в цитоплазме и образовании полной формы вируса; процесс испускания, состоящий в высвобождении из клетки печени; и процесс прикрепления к другой клетке печени с повторением описанных выше процессов пролиферации.

HBV имеет геном, представленный частично двухцепочечной молекулой ДНК, и геном ДНК HBV имеет гЭп и белок (овальной формы) или РНК (волнистая линия), соединенные ковалентной связью на обоих концах ДНК. Поскольку оба конца ДНК соединены без возникновения торсионного напряжения, указанная выше ДНК также называется релаксированной кольцевой ДНК (RC ДНК).

Для пролиферации HBV в клетке печени в ядро клетки печени должен быть введен геном ДНК HBV (RC-ДНК) и затем должно произойти образование кзкДНК (то есть ковалентно замкнутой кольцевой ДНК). После образования кзкДНК HBV может непрерывно пролиферировать до окончания продолжительности жизни клетки.

Для образования кзкДНК, прежде всего, должно произойти проникновение HBV в клетку печени.

Оболочка HBV включает HBsAg, и для проникновения HBV в клетку печени необходимо, чтобы HBsAg был связан с гепарансульфатпротеогликаном на поверхности клетки печени, чтобы обеспечить прикрепление HBV к поверхности клетки печени. После

прикрепления HBV к поверхности клетки печени домен Pre-S1 в HBsAg связывается с рецептором, присутствующим на поверхности клетки печени, то есть котранспортным полипептидом таурохолатом натрия (NTCP) для обеспечения проникновения HBV в клетку печени.

Антитело против вируса гепатита В (антитело против HBV) может представлять собой природное или рекомбинантное антитело и предпочтительно антитело (HBIG-Gene) к поверхностному антигену HBV, продуцируемое из клеточной линии ВНАb-49 (KCLRFBP-00054).

Антитело против HBV согласно настоящему изобретению может представлять собой рекомбинантное антитело, которое включает: аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, кодирующую вариабельную область тяжелой (H) цепи антитела человека к поверхностному антигену HBV; и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, кодирующую вариабельную область легкой (L) цепи антитела человека к поверхностному антигену HBV.

Кроме того, антитело против HBV согласно настоящему изобретению может представлять собой рекомбинантное антитело, которое включает: аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, кодирующую вариабельную область тяжелой (H) цепи антитела человека к поверхностному антигену HBV; и любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4-6, кодирующую вариабельную область легкой (L) цепи антитела человека к поверхностному антигену HBV.

Антитело против HBV может предотвращать образование кзкДНК HBV. Антитело против HBV может ингибировать связывание поверхностного антигена (HBsAg) HBV с гепарансульфатпротеогликаном. При ингибировании связывания HBsAg с гепарансульфатпротеогликаном блокируется проникновение HBV в клетки печени, предотвращая, таким образом, образование кзкДНК.

Предотвращение образования кзкДНК HBV является одним из способов лечения, который напрямую воздействует на жизненный цикл вируса. Этот способ отличается от иммунотерапии, например, лечения интерфероном, лечения цитокинами, восстановления клеточного иммунитета и т.д.

Кроме того, предотвращение образования кзкДНК HBV отличается от способа подавления образования кзкДНК вируса гепатита В (кзкДНК HBV). Способ подавления образования кзкДНК HBV имеет проблему, связанную с необходимостью разработки подходящего носителя для его применения в клинических испытаниях.

В случае подавления образования кзкДНК HBV, не происходит репликации генома ДНК HBV, и репродукция HBV становится невозможной, следовательно, дальнейшего распространения HBV в незараженные клетки печени не происходит. Для клеток печени, в которых уже произошло образование кзкДНК, после окончания продолжительности жизни (около 5 месяцев) клетки печени с наступлением клеточной гибели кзкДНК также деградирует и исчезает.

Следовательно, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может обеспечить более комплексное и полное лечение гепатита В. Кроме того, композиция согласно изобретению может быть более подходящей для лечения хронического гепатита В, требующего длительного лечения.

Период введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению конкретно не определен, однако для максимального увеличения лечебных эффектов в отношении подавления образования кзкДНК HBV композицию предпочтительно вводить как можно скорее после заражения HBV. Композицию согласно изобретению можно вводить в пределах 72 часов, 48 часов или 24 часов после заражения HBV.

Композиция согласно изобретению может быть получена в соответствии с любым общепринятым способом. При получении композиции антитело против HBV смешивают с носителем или разбавляют в носителе, или заключают в носитель, который может быть в виде контейнера. В случае, если носитель служит разбавителем, то он может быть твердым, полутвердым или жидким материалом, действующим как носитель, наполнитель или среда для антитела.

Композиция может быть изготовлена в любой форме: таблетки, драже, порошка, саше, эликсира, суспензии, эмульсии, раствора, сиропа, аэрозоля, мягкой или твердой желатиновой капсулы, стерильного инъекционного раствора и стерильного порошка, или т.п.

Примерами подходящих носителей, наполнителей и разбавителей являются лактоза, декстроза, сахароза, сорбит, маннит, силикат кальция, целлюлоза, метилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, поливинилпирролидон, вода, метилгидроксibenзоат, пропилогидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло.

Композиции могут, кроме того, включать наполнители, антикоагулянты, смазывающие агенты, смачивающие агенты, ароматизирующие агенты, эмульгаторы, консерванты и т.п. Композиция согласно изобретению может быть изготовлена в виде

препарата с быстрым, замедленным или пролонгированным высвобождением антитела после его введения млекопитающему с использованием способов, хорошо известных в данной области.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может, кроме того, включать анти-НВV моноклональное антитело, анти-НВV поликлональное антитело, нуклеозидный аналог, ингибитор ДНК-полимеразы, состав, содержащий миРНК, или терапевтическую вакцину в качестве противовирусного агента.

Кроме того, в одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ подавления образования кзкДНК НВV, который включает введение профилактически или терапевтически эффективного количества антитела против вируса гепатита В.

Способ подавления образования кзкДНК НВV согласно настоящему изобретению может включать введение профилактически или терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, описанной выше. Вышеупомянутое антитело против НВV также может быть использовано в способе подавления образования кзкДНК НВV.

В настоящем документе эффективное количество антитела против НВV означает количество, достаточное для достижения лечебных эффектов по предотвращению образования кзкДНК НВV. Например, антитело против НВV может быть включено в любую подходящую композицию при концентрации от 0,1 до 50 мг/мл, предпочтительно от 2 до 10 мг/мл и более предпочтительно от 3 до 7 мг/мл.

Для максимального увеличения лечебных эффектов в отношении подавления образования кзкДНК НВV, предпочтительно антитело против НВV вводить как можно скорее после заражения НВV. Например, антитело против НВV можно вводить в пределах 72 часов, 48 часов или 24 часов после заражения НВV.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения гепатита В, особенно хронического гепатита В, который включает введение описанной выше фармацевтической композиции для блокирования репликации генома ДНК НВV.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ скрининга соединения, предназначенного для предупреждения или лечения гепатита В, при этом способ включает: инокуляцию НВV в клетки печени; и после лечения клеток печени исследуемым соединением, подтверждение ингибирования образования кзкДНК.

В соответствии с одним вариантом осуществления клетка печени может представлять собой HepG2-NTCP.

Исследуемое соединение может быть использовано для лечения в пределах 24 часов, более предпочтительно в пределах 12 часов и наиболее предпочтительно в пределах 6 часов после инокуляции HBV.

Исследуемое соединение может представлять собой соединение, предназначенное для ингибирования проникновения HBV в клетку печени, или может представлять собой соединение, предназначенное для ингибирования связывания поверхностного антигена (HBsAg) HBV с гепарансульфатпротеогликаном или котранспортным полипептидом таурохолатом натрия (NTCP).

Кроме того, например, подтверждение ингибирования образования кзкДНК может быть получено путем экстракции эписомальной ДНК из клеток печени через 2-10 дней после лечения с использованием исследуемого соединения, затем измерения количества кзкДНК, включенного в эписомальную ДНК.

Вышеупомянутые способы экстракции эписомальной ДНК из клеток печени и измерения количества кзкДНК, включенного в эписомальную ДНК, могут быть осуществлены с помощью различных общепринятых способов, используемых в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается способ скрининга дополнительного лекарственного средства, которое можно вводить в комбинации с антителом против HBV. Согласно одному варианту осуществления биологический образец, включающий HBV, подвергают лечению антителом против HBV и исследуемым соединением с последующим подтверждением ингибирования образования кзкДНК. Если образование кзкДНК уменьшено в большей степени, чем в случае, когда исследуемое соединение не контактирует с образцом, исследуемое соединение можно рассматривать в качестве дополнительного лекарственного средства, которое можно вводить в комбинации с антителом против HBV, описанным выше. В указанном выше способе скрининга антитело против HBV относится к антителу, обладающему эффектами в отношении предупреждения и лечения HBV, которое включает антитело против HBV, описанное выше.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно при помощи примеров. Однако специалисты в данной области должны понимать, что такие примеры представлены для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают область, защищаемую настоящим изобретением, как описано в подробном описании и прилагаемой формуле изобретения.

Пример: Оценка эффективности ингибирования HBV-инфекции с помощью

антитела против HBsAg HBV человека (GC 1102)

Материалы и способы

1) Анти-HBsAg антитело: Антитело (GC1102), используемое в настоящем эксперименте, представляет собой человеческое антитело, представленное: аминокислотной последовательностью (HBAb-H4) SEQ ID NO: 1, кодирующей переменную область тяжелой (H) цепи антитела человека к поверхностному антигену HBV; и аминокислотной последовательностью (HBAb-L9) SEQ ID NO: 2, кодирующей переменную область легкой (L) цепи антитела человека к поверхностному антигену HBV.

2) Контрольная группа: Образец, обработанный IgG, в качестве отрицательного контроля, а также образец, обработанный препаратом Mygcludex B (MygB), в качестве положительного контроля в эксперименте получали для минимизации погрешности эксперимента. Препарат MygB, используемый в качестве положительного контроля, представляет собой липопептид, состоящий из 47 аминокислот в домене pre-S1 HBsAg, и в настоящее время проходит клинические испытания в качестве ингибитора проникновения HBV.

3) Клеточная культура: Линия клеток HepG2-NTCP, используемая в настоящем эксперименте, представляет собой клеточную линию, стабильно экспрессирующую NTCP человека, и описана в документах, опубликованных настоящей лабораторией (Ko et al., 2014). Кроме того, линия клеток HepAD38 представляет собой клеточную линию, непрерывно продуцирующую инокулят HBV, и ее использовали для получения инокулята HBV, требуемого в экспериментах по инфицированию.

4) Саузерн-блот анализ: Саузерн-блот анализ, используемый в настоящем эксперименте, представляет собой метод анализа вирусной ДНК, выделенной из капсидов HBV, присутствующих в клетках, и был проведен в настоящей лаборатории (Ko et al., 2014).

5) ELISA: ELISA – представляет собой другой метод определения HBV-инфекции путем прямого измерения HBsAg или HBeAg, секретируемого в супернатант культуры. В частности, супернатанты получали на 5-7 день после инфицирования и исследовали с помощью диагностического реагента для гепатита В «Genedia HBsAg Elisa 3.0». В ходе выполнения эксперимента строили стандартную кривую с использованием международного стандарта HBV, а затем сравнивали ее с измеренными величинами, чтобы, таким образом, оценить абсолютное количество HBsAg, секретируемого в супернатант.

6) Иммунофлуоресцентный анализ. Иммунофлуоресценция имеет значительное преимущество, состоящее в том, что HBV-инфекцию можно наблюдать напрямую, используя флуоресцентный микроскоп, без процесса лизиса клеток. Инфицированную клетку фиксировали параформальдегидом, затем подвергали процессу пермеабилзации, используя тритон X-100. Затем с помощью антитела к HBsAg подтверждали наличие HBsAg-инфекции.

7) Инфицирование HBV: Инфицирование HBV выполняли на клеточной линии HepG2-NTCP. В частности, после высевания клеток HepG2-NTCP в чашке для культивирования и через 24 часа инокулят HBV использовали для инфицирования клеток HepG2-NTCP. Через 16-24 часа после инфицирования среду заменяли новой средой, содержащей 2,5% DMSO. Среду меняли через день, и через 8-10 дней после инфицирования подтверждали наличие инфекции с использованием различных экспериментальных методов.

2. Оценка эффективности GC1102 в отношении ингибирования HBV-инфекции

Сначала способность GC1102 ингибировать HBV-инфекцию изучали с помощью Саузерн-блот анализа и измерения HBsAg с применением ELISA.

Результаты эксперимента показаны на фигуре 1. (А) Саузерн-блот анализ: через 9 дней после инфицирования HBV клеток HepG2-NTCP анализировали ДНК с помощью Саузерн-блот анализа. Клетки обрабатывали МугВ (1 мкг/мл), IgG (1 мкг/мл) или GC1102 (1 мкг/мл) одновременно с инфицированием HBV. В качестве маркера длин использовали 3,2 kb ДНК HBV. RC: релаксированная кольцевая ДНК; DL: двухцепочечная линейная ДНК; (В) HBsAg ELISA: после инфицирования HBV измеряли концентрацию HBsAg в супернатанте культуры, культивированной в течение 2 дней, через 5-7 дней после инфицирования, и через 7-9 дней после инфицирования, соответственно. Используя стандартный продукт HBsAg при известной концентрации, измеряли абсолютное количество HBsAg (МЕ/мл) в супернатанте культуры.

В результате эксперимента было получено подтверждение того, что GC1102 (1 мкг/мл) может эффективно ингибировать продукцию интермедиатов репликации HBV (RC и DL ДНК). Кроме того, при количественном определении HBsAg, присутствующего в супернатанте культуры, было получено подтверждение того, что образец, обработанный GC1102, проявляет очень низкую продукцию HBsAg. В образце, обработанном МугВ в качестве положительного контроля, интермедиаты репликации и HBsAg не наблюдались. Альтернативно, в образце, обработанном IgG в качестве отрицательного контроля, интермедиаты репликации и HBsAg наблюдались аналогично образцу, подвергнутому

только инфицированию HBV. На основании вышеуказанных результатов экспериментов можно утверждать, что GC1102 может эффективно ингибировать HBV-инфекцию.

Кроме того, эффекты GC1102 в отношении ингибирования HBV-инфекции наблюдали в иммунофлуоресцентном анализе. В частности, через 7 дней после инфицирования HBV клеточной линии HepG2-NTCP коровый белок HBV наблюдали при помощи конфокального микроскопа. Клетки обрабатывали 1 мкг/мл МугВ, 2 мкг/мл МугВ, 100 нг/мл GC1102 или 200 нг/мл GC1102, одновременно с инфицированием HBV. Ядро клетки окрашивали DAPI (показано синим или серым цветом на фигуре 2), при этом коровый белок окрашивали анти-HBcAg (показано красным или светло-серым цветом на фигуре 2). Фоновый уровень, когда отсутствует сигнал флуоресценции, показан темно-серым цветом на фигуре 2.

Результаты эксперимента показаны на фигуре 2. Окрашивание анти-HBcAg показано светло-серым цветом; окрашивание DAPI показано серым цветом средней яркости, и фон показан темно-серым цветом. Как показано на фигуре, клетки обрабатывали 1 мкг/мл МугВ, 2 мкг/мл МугВ, 100 нг/мл GC1102 или 200 нг/мл GC1102 одновременно с инфицированием HBV. В результате обработки уровень экспрессии корового белка (окрашивание анти-HBcAg, показанное светло-серым цветом) в клетке значительно снизился пропорционально концентрации GC1102. Кроме того, наблюдалось, что экспериментальная группа, обработанная МугВ в качестве положительного контроля, также показала понижение уровня экспрессии корового белка HBV пропорционально концентрации МугВ. Таким образом, на основании результатов, показанных на фигурах 1 и 2, можно утверждать, что GC1102 ингибирует HBV-инфекцию, эффективно предотвращая экспрессию белка HBV, а также интермедиатов репликации.

3. Оценка эффективности GC1102 в отношении ингибирования образования кзкДНК HBV

На основании вышеуказанных результатов для дополнительного изучения эффектов GC1102 на образование ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК), которая является определяющим фактором хронической HBV-инфекции, выполняли следующий эксперимент.

Вкратце, кзкДНК HBV относится к эписоме ДНК, в которой геном ДНК HBV превращается в плазмидную форму после проникновения HBV у индивидуумов в клетки печени клетки-мишени, которая служит матрицей для транскрипции. Другими словами, процесс преобразования генома ДНК HBV в кзкДНК обязательно требуется для репликации генома HBV.

На основании вышеизложенной теории дополнительно проводили эксперимент для изучения эффектов GC1102 на образование ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК), которая является определяющим фактором хронической HBV-инфекции. В частности, через 3 дня после обработки HepG2-NTCP с применением GC1102 (100 нг/мл или 200 нг/мл) или МугВ (1 мкг/мл) получали ДНК путем экстракции по методу Хирта, а затем измеряли PF-RC ДНК и кзкДНК с помощью Саузерн-блот анализа. В качестве маркера длин использовали 3,2 kb, 2,1 kb, 1,9 kb и 1,4 kb ДНК HBV.

Результаты эксперимента показаны на фигуре 3. Согласно результатам эксперимента, по сравнению с полосой 2, в которой протекала только HBV-инфекция, в образце, обработанном МугВ, используемом в качестве положительного контроля, и в образце, обработанном GC1102, не было обнаружено кзкДНК. Это означает, что превращение генома ДНК HBV из PF-RC ДНК в кзкДНК было ингибировано путем обработки GC1102.

4. Анализ зависимости доза-ответ в отношении ингибирования HBV-инфекции с помощью GC1102

Далее, используя различные методики исследования HBV, изучали эффекты ингибирования HBV-инфекции при различных концентрациях GC1102 для оценки его терапевтической эффективности. Исследование зависимости доза-ответ выполняли в 6 точках, увеличивая концентрацию GC1102 в клетках HepG2-NTCP с 6,25 нг/мл до 200 нг/мл. Было получено подтверждение того, что при концентрации, используемой в предыдущем эксперименте, проведенном перед настоящим экспериментом, цитотоксичности не было выявлено и подтверждено с помощью анализа жизнеспособности клеток (данные не показаны).

Результаты эксперимента показаны на фигуре 4. Выполняли (A) Саузерн-блот анализ; (B) Вестерн-блот анализ; (C) HBsAg ELSIA; и (D) HBeAg ELISA. Саузерн-блот анализ и ELISA выполняли согласно такой же процедуре, которая показана на фигуре 1. В свою очередь, Вестерн-блот (B) является результатом измерения количества корового белка в клетке с использованием части (6% input) клеточного лизата, полученного для проведения Саузерн-блот анализа. β -Актин является контролем нагрузки, показывающим, что было использовано одинаковое количество клеточного лизата.

Согласно результатам экспериментов уровень экспрессии немедленных продуктов репликации и вирусного корового белка в клетке, а также HBsAg и HBeAg, секретируемых в супернатант культуры, уменьшался дозозависимым образом пропорционально увеличению количества GC1102. Вышеуказанные результаты

эксперимента показали, что GC1102 является эффективным агентом против вируса HBV, не обладающим цитотоксичностью и проявляющим зависимость доза-ответ в соответствии с концентрацией.

5. Оценка EC50 (эффективной концентрации) GC1102

В соответствии с количественной оценкой результатов, полученных в эксперименте, показанном на фигуре 4, рассчитывали значение EC50. При выполнении инфицирования HBV степень инфицирования HBV образца, обработанного только IgG, была установлена равной 100%. Затем значения для образцов, обработанных GC1102 при разных концентрациях, корректировали относительно вышеуказанного образца с последующим построением кривой ингибирования (%).

Проанализированные результаты показаны на фигуре 5. При обработке клетки GC1102 при концентрации 14,97 нг/мл, HBV-инфекции была ингибирована на 50%. Эта концентрация приблизительно соответствовала 100 пМ при пересчете концентрации на молярную концентрацию («молярность») путем применения молекулярной массы GC1102 (150 кДа). Вышеуказанные результаты эксперимента показали, что GC1102 может эффективно ингибировать HBV-инфекцию даже при очень низкой концентрации (EC50 = 100 пМ).

6. Оценка эффективности ингибирования HBV-инфекции в зависимости от времени обработки GC1102 (анти-HBsAg)

Затем выполняли следующий эксперимент для определения времени, необходимого для лечения с применением GC1102 (анти-HBsAg), при котором HBV-инфекция является наиболее эффективно ингибированной.

Результаты эксперимента показаны на фигуре 6. На (А) показана схема эксперимента для исследования степени воздействия GC1102 на HBV-инфекцию. Инфицирование HBV и схема лечения с помощью GC1102 обозначены сплошными линиями. (В) Саузерн-блот анализ: клетки HepG2-NTCP подвергали такому же инфицированию HBV и лечению с помощью GC1102, как описано в (А). Затем, через 9 дней после указанной выше обработки «car seed» ДНК измеряли с помощью саузерн-блот анализа. 6% input является результатом измерения количества корового белка в клетке с использованием части клеточного лизата, полученного для проведения Саузерн-блот анализа. β-Актин является контролем нагрузки, показывающим, что было использовано одинаковое количество клеточного лизата.

Из результатов эксперимента можно утверждать, что при введении GC1102 одновременно с инфицированием HBV, ингибирование HBV-инфекции с помощью

GC1102 происходит наиболее эффективно. Это может объясняться тем, что GC1102 напрямую связывается со специфическим эпитопом SORF в HBV во время инфицирования HBV для ингибирования прикрепления к гепатоциту в HBV, тем самым эффективно уменьшая инфекцию.

7. Заключение

С помощью вышеуказанных экспериментов было продемонстрировано, что антитело против вируса гепатита В человека (GC1102) согласно настоящему изобретению является высоко эффективным в отношении полного ингибирования HBV-инфекции. GC1102 имеет значение EC50 при очень низкой концентрации, и эффективно ингибирует не только репликацию генома ДНК HBV, но также образование кзкДНК, являющейся матрицей для транскрипции генома HBV. Таким образом, эти результаты предлагают новую возможность того, что GC1102 может с высокой эффективностью ингибировать HBV-инфекцию у пациента с печеночным трансплантатом, чтобы, таким образом, с высокой эффективностью предотвратить рецидив HBV после трансплантации печени; кроме того, пациент с хроническим гепатитом может быть подвергнут эффективному лечению путем введения GC1102, взятого в отдельности или в комбинации с противовирусным средством.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ скрининга соединения, предназначенного для предупреждения или лечения хронического гепатита В, включающий: инокуляцию вируса гепатита В в клетки печени, и, после лечения клеток печени исследуемым соединением, подтверждение ингибирования образования ковалентно замкнутой кольцевой ДНК.

2. Способ по п. 1, в котором клетки печени представляют собой HepG2-NTCP.

3. Способ по п. 1, в котором исследуемое соединение применяют в пределах 24 часов после инокуляции вируса гепатита В.

4. Способ по п. 1, в котором подтверждение ингибирования образования кзкДНК включает:

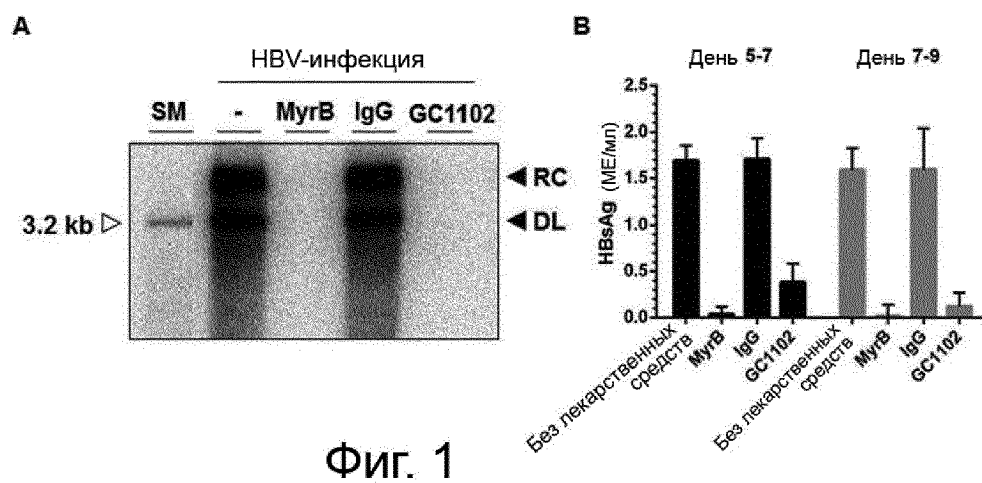
(а) экстракции эписомальной ДНК из клеток печени через 2-10 дней после лечения исследуемым соединением, и

(b) измерение количества кзкДНК, включенного эписомальную ДНК.

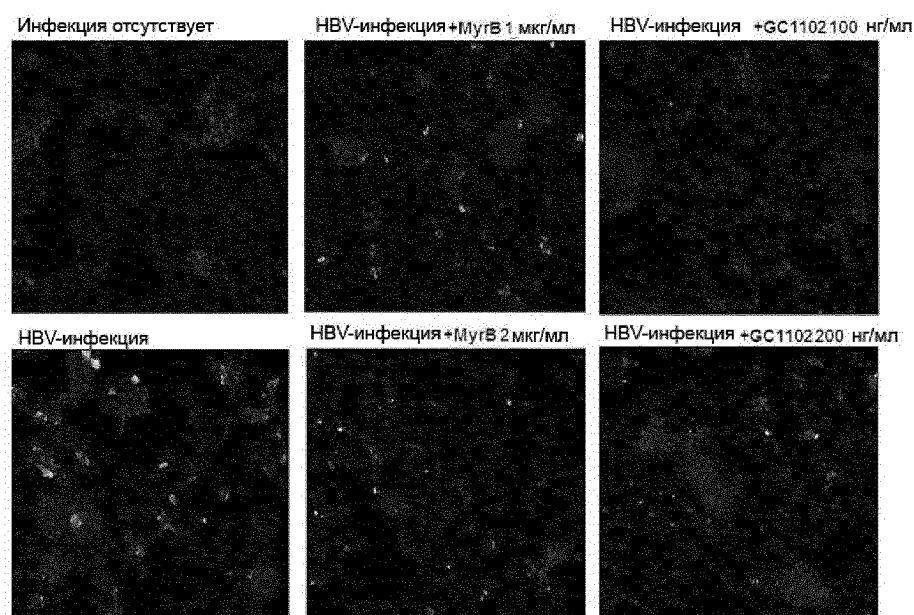
5. Способ скрининга дополнительного лекарственного средства для лечения хронического гепатита В, включающий:

(а) приведение в контакт антитела против вируса гепатита В и исследуемого соединения с биологическим образцом, включающим вирус гепатита В, и

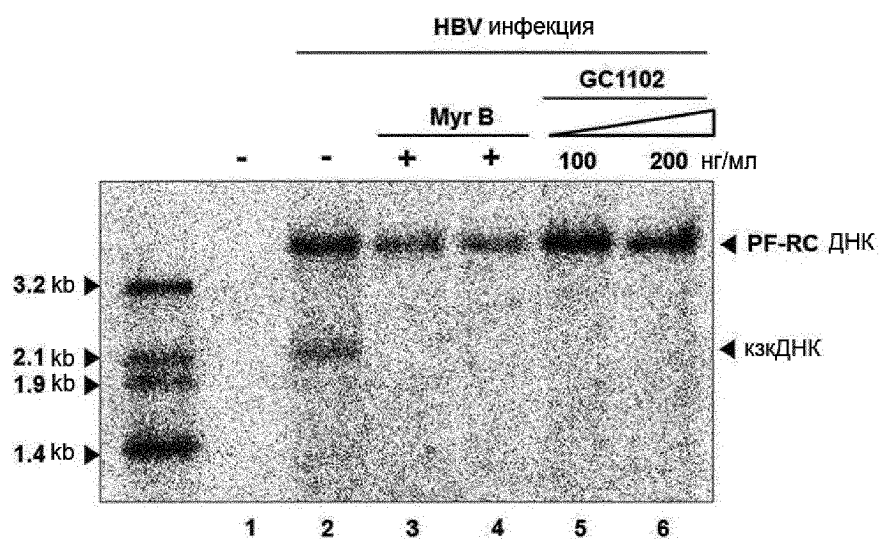
(b) подтверждение ингибирования образования кзкДНК, и, если образование кзкДНК уменьшено в большей степени, чем в случае отсутствия контактирования исследуемого соединения с образцом, определение исследуемого соединения в качестве дополнительного лекарственного средства, которое вводят в комбинации с антителом против вируса гепатита В.



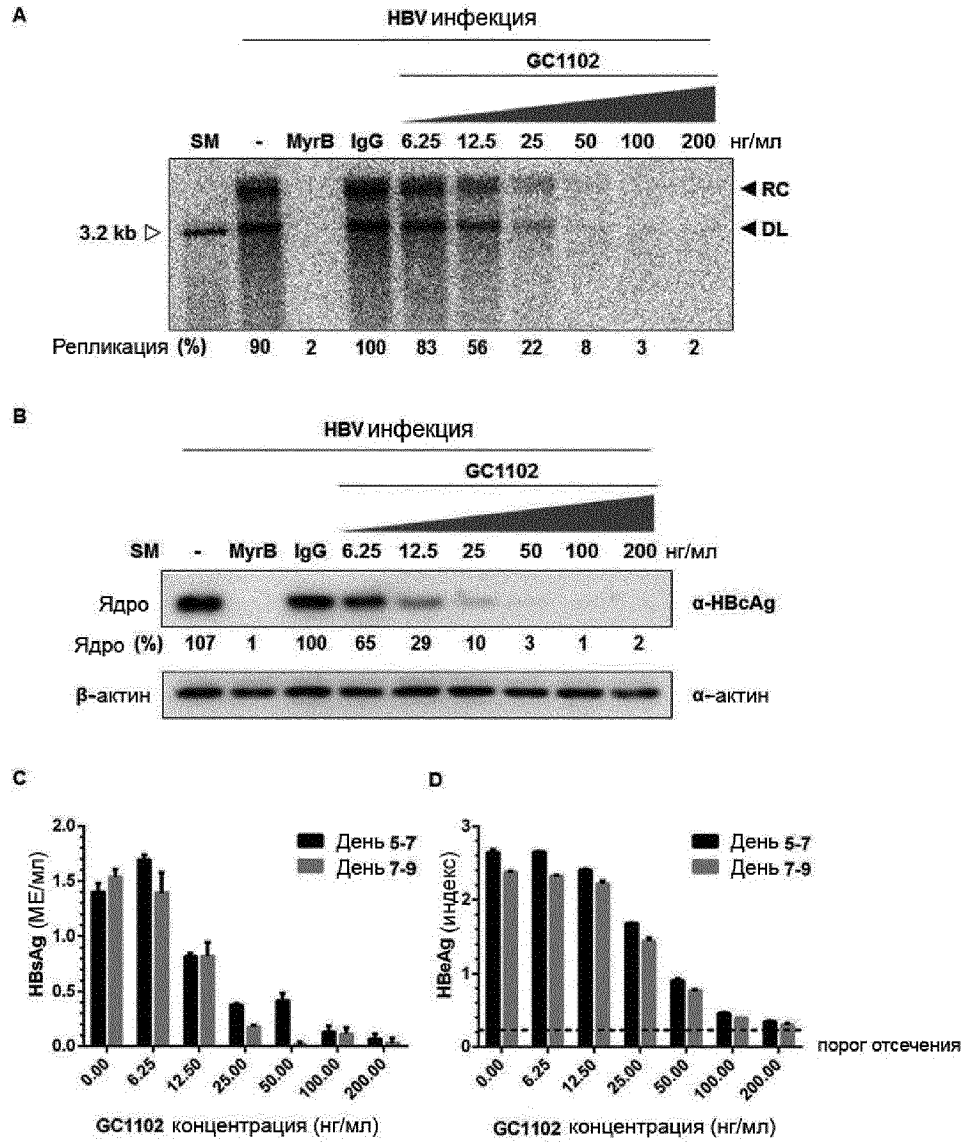
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

