



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.31

(21) Номер заявки
201500273

(22) Дата подачи заявки
2013.05.17

(51) Int. Cl. *A61K 47/48* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В И ГЕПАТИТА D

(31) 61/695,040; 61/703,816

(32) 2012.08.30; 2012.09.21

(33) US

(43) 2015.07.30

(86) PCT/CA2013/050377

(87) WO 2014/032176 2014.03.06

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

(72) Изобретатель:
Базине Мишель, Вайан Эндрю (CA)

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

(56) AL-МАНТАВ et al. "Establishment of a potent anti-HBsAg response and durable immunological control of viremia with short term immunotherapy after REP 9AC'-induced HBsAg seroclearance in chronic HBV infection" Journal of Hepatology, April 2013, 58(S1), Abstract 776, page S316 (see entire document)

МАНТАВ et al. "REP 9AC': A second generation HBsAg release inhibitor with improved stability" Hepatology, October 2012, 56(S1), Abstract 424, pages 401A-402A (see entire document)

US-A1-20040162253

МАНТАВ et al. "REP 9AC: A potent HBSAG release inhibitor that elicits durable immunological control of chronic HBV infection" Hepatology, 2011, 54(S1), Abstract 235, pages 478A-479A (see entire document)

WO-A2-2012047856

YU et al. "Design, synthesis and biological evaluation of triazolo-pyrimidine derivatives as novel inhibitors of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) secretion", Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 54, 5660-5670 (see entire document)

CA-A1-2405502

MENNE et al. "Immunization with surface antigen vaccine alone and after treatment with 1-(2-fluoro-5-methyl-β-L-arabinofuranosyl)-uracil (L-FMAU) breaks humoral and cell-mediated immune tolerance in chronic woodchuck hepatitis virus infection", Journal of Virology, 2002, 76(11), 5305-5314 (see entire document)

CA-A1-2254931

OP DEN BROUW et al. "Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: A possible immune escape mechanism of hepatitis B virus", Immunology, 2008, 126, 280-289 (see entire document)

CHEN et al. "Potent hepatitis B surface antigen response to treatment of hepatitis B-e-antigen-positive chronic hepatitis B with α-interferon plus a nucleos(t)ide analog", Journal of Gastroenterology and Hepatology, March 2012, 27(3), 481-486 (see entire document)

WEEGAND et al. "Quantification of HbSAg and HBV-DNA during therapy with PEGinterferon alpha-2b plus lamivudine and PEGinterferon alpha in a German chronic hepatitis B cohort", Z Gastroenterol., 2011, 49, 1463-1469 (see entire document)

BRUNETTO et al. "Hepatitis B virus surface antigen levels: A guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B", Hepatology, 2009, 49(4), 1141-1150 (see entire document)

(57) Раскрывается способ лечения инфекции HBV или коинфекции HBV/HDV, данный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, устраняющего поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, и второго фармацевтически приемлемого средства, стимулирующего иммунную функцию.

Область техники, к которой относится изобретение

Описание имеет отношение к способам лечения субъекта, зараженного вирусом гепатита В или коинфицированного вирусом гепатита В/гепатита D; лечение включает первое фармацевтически приемлемое средство, которое удаляет поверхностный антиген гепатита В из крови, и второе фармацевтически приемлемое иммунотерапевтическое средство, стимулирующее иммунную функцию.

Уровень техники

По оценкам вирус гепатита В (HBV) поражает 400 миллионов человек по всему миру и является причиной 600000 смертельных случаев ежегодно в результате осложнений, возникающих вследствие HBV-инфекции. Несмотря на то что одобрено для применения несколько вариантов противовирусного лечения, ни один из них не в состоянии вызывать терапевтически эффективный иммунный ответ, способный обеспечить надежный контроль над инфекцией за исключением небольшой части пациентов, проходивших лечение. Фактически, существует явная нереализованная потребность медицины в режиме лечения, который сможет установить надежный иммунологический контроль над HBV-инфекцией у большей части пациентов, получающих это лечение.

HBV-инфекция приводит к выработке двух разных частиц: 1) собственно вируса HBV (или частиц Дейна), содержащего вирусный капсид, собранный из белка корового антигена HBV (HBcAg), покрытого поверхностным антигеном вируса гепатита В (HBsAg) и способного повторно инфицировать клетки и 2) субвирусных частиц (или SVP), представляющих собой частицы, подобные липопротеинам высокой плотности, состоящие из липидов, холестерина, сложных эфиров холестерина и небольших и средних форм поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), которые не являются инфекционными. На каждую продуцированную вирусную частицу в кровь высвобождаются 1000-10000 SVP. Фактически, SVP (и HBsAg белок, который они несут) представляют подавляющую часть вирусного белка в крови. Кроме того, инфицированные HBV клетки секретируют растворимый протеолитический продукт предшественника корового белка, называемый HBV е-антигеном (HBeAg).

Вирус гепатита D (HDV) для образования своей вирусной структуры использует HBsAg (Taylor, 2006, Virology, 344: 71-76) и, фактически, HDV-инфекция может наблюдаться у субъектов с сопутствующей HBV инфекцией. В странах с низкой заболеваемостью HBV-инфекцией частота случаев HDV-коинфекции у бессимптомных HBV-носителей и у пациентов с хронической болезнью печени, связанной с HBV, является низкой, тогда как в странах с высокой частотой случаев инфицирования HBV HDV-коинфекция представляет собой значительное осложнение у HBV-инфицированных субъектов и может увеличить скорость прогрессирования болезни до молниеносного гепатита. В связи с этим существует явная нереализованная потребность медицины в способах лечения HBV-инфекции, которая является еще более неотложной в случае субъектов, коинфицированных HBV/HDV.

Современные стандартные методы лечения HBV включают иммунотерапию на основе интерферона или тимозина $\alpha 1$ и подавление продуцирования вирусов путем ингибирования полимеразы HBV. Ингибиторы HBV-полимеразы являются эффективными в отношении уменьшения продуцирования вирусов, однако практически не вызывают быстрого уменьшения HBsAg или могут медленно уменьшать HBsAg в течение длительного лечения у ограниченного числа пациентов (как в случае с тенофовиром и диспроксилом). Иммунотерапия на основе интерферона может способствовать уменьшению как продуцирования вирусов так и раннего удаления HBsAg из крови, однако только у небольшого процента субъектов, подвергнутых лечению. Общепризнанная роль HbsAg в крови состоит в том, чтобы блокировать анти-HBsAg антитела и дать возможность инфекционным вирусным частицам избежать обнаружения иммунной системой, что вероятно является одной из причин, почему HBV-инфекция сохраняется в хроническом состоянии. Кроме того, HBsAg, HBeAg и HBcAg все обладают иммуно-ингибирующими свойствами, как обсуждается ниже, и персистенция этих вирусных белков в крови пациентов после введения любого из доступных в настоящее время видов лечения HBV, как описано далее, вероятно оказывает значительное воздействие, препятствуя достижению иммунологического контроля над HBV-инфекцией у пациентов.

Хотя все три первичных HBV белка (HBsAg, HBeAg и HBcAg) обладают иммуно-ингибирующими свойствами (см. ниже), HBsAg составляет подавляющую часть HBV белка в кровотоке HBV-инфицированных субъектов. Кроме того, несмотря на то что удаление (посредством сероконверсии) HBeAg или уменьшение в сыворотке вирусемии не коррелируют с развитием устойчивого контроля над HBV-инфекцией без лечения, удаление сывороточного HBsAg из крови (и сероконверсия) при HBV-инфекции является хорошо известным превосходным прогностическим признаком противовирусного ответа на лечение, который будет приводить к контролю над HBV-инфекцией без лечения (хотя это наблюдается только у небольшой части пациентов, получающих иммунотерапию). Таким образом, в то время как уменьшение всех трех основных HBV белков (HBsAg, HBeAg и HBcAg) может давать в результате оптимальное "снятие" ингибирующего действия, удаление одного HBsAg самого по себе достаточно для "снятия" основного вирусного ингибирования иммунной функции у субъектов с HBV инфекцией.

Следовательно, в условиях отсутствия в настоящее время режима лечения, который может восстановить иммунологический контроль над HBV у большей части пациентов, необходимо обеспечить эффективное лечение HBV-инфекции и совместной инфекции HBV/HDV, которое может восстановить иммунологический контроль у большинства пациентов.

Раскрытие изобретения

В соответствии с описанием предлагается способ лечения HBV инфекции или HBV/HDV коинфекции у субъекта, испытывающего необходимость в таком лечении, включающий введение первого фармацевтически приемлемого средства, которое устраняет HBsAg из крови хозяина, инфицированного HBV, и второго фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства, стимулирующего иммунную функцию.

Также предлагается способ лечения HBV инфекции или HBV/HDV коинфекции у субъекта, испытывающего необходимость в таком лечении, включающий введение первого фармацевтически приемлемого средства, ингибирующего высвобождение HBsAg из инфицированных клеток, и второго фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства, стимулирующего иммунную функцию.

Также предлагается способ лечения HBV инфекции или HBV/HDV коинфекции у субъекта, испытывающего необходимость в таком лечении, включающий применение эффективного режима дозирования первого фармацевтически приемлемого средства, ингибирующего высвобождение HBV субвирусных частиц из инфицированных клеток, и эффективного режима дозирования второго фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства, стимулирующего иммунную функцию.

Также предлагается способ лечения HBV инфекции или HBV/HDV коинфекции у субъекта, испытывающего необходимость в таком лечении, включающий введение первого фармацевтически приемлемого средства, ингибирующего образование HBV субвирусных частиц в инфицированных клетках, и второго фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства, стимулирующего иммунную функцию.

Также предлагается способ лечения HBV инфекции или HBV/HDV коинфекции у субъекта, испытывающего необходимость в таком лечении, включающий введение первого фармацевтически приемлемого средства, которое ингибирует синтез или понижает внутриклеточную концентрацию HBsAg в инфицированных клетках, и второго фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства, которое стимулирует иммунную функцию.

Также предлагается способ лечения HBV инфекции или HBV/HDV коинфекции у субъекта, испытывающего необходимость в таком лечении, включающий введение первого и второго фармацевтически приемлемых средств, описанных выше, вместе в одной фармацевтической композиции или в двух разных фармацевтических композициях, которые вводятся одним и тем же путем.

Также предлагается способ лечения HBV инфекции или HBV/HDV коинфекции у субъекта, испытывающего необходимость в таком лечении, включающий одновременное введение пациенту первого и второго описанных выше фармацевтических средств, которые вводятся одинаковым способом или разными способами.

В соответствии с настоящим описанием предлагается применение первого фармацевтически приемлемого средства, удаляющего поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, в сочетании со вторым фармацевтически приемлемым иммунотерапевтическим средством, стимулирующим иммунную функцию, для лечения инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусами гепатита В/гепатита D.

Также предлагается применение первого фармацевтически приемлемого средства, ингибирующего высвобождение HBsAg из инфицированных клеток, и второго фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства, стимулирующего иммунную функцию, для лечения инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусами гепатита В/гепатита D.

Также предлагается применение первого фармацевтически приемлемого средства, ингибирующего высвобождение HBV субвирусных частиц из инфицированных клеток, и второго фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства, стимулирующего иммунную функцию, для лечения инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусами гепатита В/гепатита D.

Также предлагается применение первого фармацевтически приемлемого средства, ингибирующего образование HBV субвирусных частиц в инфицированных клетках, и второго фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства, стимулирующего иммунную функцию, для лечения инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусами гепатита В/гепатита D.

Также предлагается применение первого фармацевтически приемлемого средства, которое ингибирует синтез или понижает внутриклеточную концентрацию HBsAg в инфицированных клетках, и второго фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства, которое стимулирует иммунную функцию, для лечения инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусами гепатита В/гепатита D.

Также предлагается применение первого фармацевтически приемлемого средства, удаляющего поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, в сочетании со вторым фармацевтически приемлемым иммунотерапевтическим средством, стимулирующим иммунную функцию, при производстве медикамента, предназначенного для лечения инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусами гепатита В/гепатита D.

В соответствии с настоящим описанием также предлагается композиция для лечения инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусами гепатита В/гепатита D, содержащая эффективную дозу первого фармацевтически приемлемого средства, удаляющего поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, и эффективную дозу второго фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства,

стимулирующего иммунную функцию.

В одном варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, ингибирует образование HBV субвирусных частиц.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, ингибирует внутриклеточный транспорт HBV субвирусных частиц.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, ингибирует высвобождение HBV субвирусных частиц в кровь.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, ингибирует высвобождение поверхностного антигена вируса гепатита В из инфицированной клетки.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, ингибирует синтез HBsAg и/или другого вирусного белка.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, ингибирует синтез или функцию аполипопротеина Н.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, является низкомолекулярным средством (малой молекулой).

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, является полимером нуклеиновой кислоты, содержащим фосфоротиоатный олигонуклеотид длиной 20-120 нуклеотидов, содержащий повторы последовательности АС.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, является полимером нуклеиновой кислоты, содержащим фосфоротиоатный олигонуклеотид длиной 20-120 нуклеотидов, содержащий повторы последовательности СА.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, является полимером нуклеиновой кислоты, содержащим фосфотиоатный олигонуклеотид длиной 20-120 нуклеотидов, содержащий повторы последовательности TG.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, является полимером нуклеиновой кислоты, содержащим фосфоротиоатный олигонуклеотид длиной 20-120 нуклеотидов, содержащий повторы последовательности GT.

В другом варианте осуществления полимер нуклеиновой кислоты дополнительно содержит по меньшей мере одну модификацию 2' рибозы.

В другом варианте осуществления все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, имеют 2' модификацию.

В другом варианте осуществления полимер нуклеиновой кислоты дополнительно содержит по меньшей мере одну модификацию 2'-О-метилрибозы.

В другом варианте осуществления все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, имеют модификацию 2'-О-метила.

В другом варианте осуществления полимер нуклеиновой кислоты дополнительно содержит по меньшей мере один 5'-метилцитозин.

В другом варианте осуществления все цитозины в полимере нуклеиновой кислоты присутствуют в виде 5' метилцитозина.

В другом варианте осуществления полимер нуклеиновой кислоты дополнительно содержит по меньшей мере одну модификацию 2' рибозы и по меньшей мере один 5' метилцитозин.

В другом варианте осуществления все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, имеют модификацию 2'-О-метила, а все цитозины присутствуют в виде 5' метилцитозина.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой олигонуклеотидный хелатный комплекс, содержащий олигонуклеотид выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой олигонуклеотидный хелатный комплекс, содержащий SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 3.

В крови, представляет собой олигонуклеотидный хелатный комплекс, содержащий олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 10.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой олигонуклеотидный хелатный комплекс, содержащий олигонуклеотид,

выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на любой участок любой HBV мРНК.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на любой участок мРНК человеческого аполипопротеина Н.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой siRNA, нацеленную на любой участок любой мРНК HBV.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой siRNA, нацеленную на любой участок мРНК человеческого аполипопротеина Н.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой shRNA, нацеленную на любой участок любой HBV мРНК или мРНК человеческого аполипопротеина Н.

В другом варианте осуществления полимер нуклеиновой кислоты, антисмысловой олигонуклеотид или siRNA создаются в виде олигонуклеотидного хелатного комплекса.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой олигонуклеотидный аптамер или шпигельмер, нацеленный на поверхностный антиген вируса гепатита В.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой олигонуклеотидный аптамер или шпигельмер, нацеленный на аполипопротеин Н.

В другом варианте осуществления средство, устраняющее поверхностный антиген вируса гепатита В из крови, представляет собой антитело или фрагмент антитела, который распознает поверхностный антиген вируса гепатита В.

В другом варианте осуществления иммунотерапевтическое средство, стимулирующее иммунную функцию, содержит одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из

тимозина $\alpha 1$;

любого α -интерферона или его пегилированных производных;

любого β -интерферона или его пегилированных производных;

любого γ -интерферона или его пегилированных производных;

любого λ -интерферона или его пегилированных производных;

интерферона α -2a или α -2b или α -N3;

интерферона β -1a или β -1b;

интерферона γ -1b;

интерферона $\lambda 1$ или $\lambda 2$ или $\lambda 3$;

пегилированного интерферона α -2a или α -2b или $\lambda 1$ или $\lambda 2$;

любого противовирусного цитокина или его пегилированных производных;

тимусного белка А;

любого полипептида, обладающего противовирусной активностью или иммуностимулирующей активностью;

иммуностимулирующего non-CpG-олигонуклеотида, включая IMO-2055 или IMO-2125;

низкомолекулярного агониста Toll-подобного рецептора (TLR), включая GS-9620 или ANA-773; и

любого противовирусного или иммуностимулирующего гормона, включая DHEA или его метаболиты.

В другом варианте осуществления иммунотерапевтическое средство, стимулирующее иммунную функцию, содержит одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из

иммуностимулирующего олигонуклеотида, включая IMO-2055 или IMO-2125;

низкомолекулярного агониста Toll-подобного рецептора (TLR), включая GS-9620 или ANA-773; и

любого противовирусного или иммуностимулирующего гормона, включая DHEA или его метаболиты.

В дополнительном варианте осуществления первое и второе фармацевтически приемлемые средства заключаются в состав одной фармацевтической композиции.

В дополнительном варианте осуществления первое и второе фармацевтически приемлемые средства заключаются в состав отдельных фармацевтических композиций.

В дополнительном варианте осуществления первое и второе средства предназначены для однократного введения.

В дополнительном варианте осуществления первое и второе средства предназначены для введения разными способами (путями).

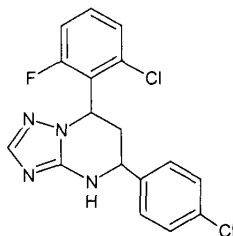
В дополнительном варианте осуществления первое и второе средства создаются для применения с помощью одного или более из перечисленных ниже способов: перорального приема внутрь, аэрозольной ингаляции, подкожной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутривен-

ной инъекции и внутривенного вливания.

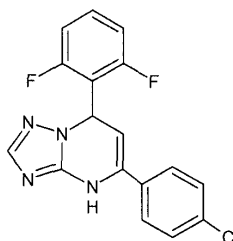
В дополнительном варианте осуществления средство, устраняющее HBsAg из крови, содержит одну или более молекул, выбранных из группы, состоящей из

антитела или фрагмента антитела, который связывается с поверхностным антигеном вируса гепатита В;

перечисленных ниже производных триазолопиримидина



7-(2-хлор-6-фторфенил)-5-(4-хлорфенил)-4,5,6,7-тетрагидро[1,2,4]триазоло[1,5-α]пиримидин;



5-(4-хлорфенил)-7-(2,6-дифторфенил)-4,7-дигидро[1,2,4]триазоло[1,5-α]пиримидин;

олигонуклеотида, выбранного из числа

SEQ ID NO: 2;

SEQ ID NO: 3;

SEQ ID NO: 10;

SEQ ID NOs: 1 и 4-9;

полимера нуклеиновой кислоты, выбранного из числа

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

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

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

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

антисмыслового олигонуклеотида, нацеленного на любую часть любой мРНК HBV;

антисмыслового олигонуклеотида, нацеленного на любую часть мРНК человеческого аполипопротеина Н;

siRNA, нацеленной на любой участок любой мРНК HBV;

siRNA, нацеленной на любой участок мРНК человеческого аполипопротеина Н;

shRNA, нацеленной на любой участок любой мРНК HBV;

shRNA, нацеленной на любой участок мРНК человеческого аполипопротеина Н;

шпигельмера или аптамера, нацеленного на поверхностный антиген вируса гепатита В; и

шпигельмера или аптамера, нацеленного на человеческий аполипопротеин Н;

и второе иммунотерапевтическое средство содержит одну или более молекул из группы, состоящей из тимозина α1;

любого α-интерферона или его пегилированных производных;

любого β-интерферона или его пегилированных производных;

любого γ-интерферона или его пегилированных производных;

любого λ-интерферона или его пегилированных производных;

интерферона α-2a или α-2b или α-N3;

интерферона β-1a или β-1b;

интерферона γ-1b;

интерферона λ1 или λ2 или λ3;

пегилированного интерферона α-2a или α-2b или λ1 или λ2;

любого противовирусного цитокина или его пегилированных производных;

тимусного белка А;

любого полипептида, обладающего антивирусной активностью или иммуностимулирующей активностью;
 иммуностимулирующего олигонуклеотида, включая IMO-2055 или IMO-2125;
 низкомолекулярного агониста Toll-подобного рецептора (TLR), включая GS-9620 или ANA-773; и
 любого антивирусного или иммуностимулирующего гормона, включая DHEA, или его метаболитов.

Кроме того, в дополнительном варианте осуществления следующие олигонуклеотиды могут быть созданы в виде олигонуклеотидного хелатного комплекса:

SEQ ID NO: 2;

SEQ ID NO: 3;

SEQ ID NO: 10;

SEQ ID NOs: 1 и 4-9;

Полимер нуклеиновой кислоты выбирают из следующего:

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

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

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

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

антисмыслового олигонуклеотида, нацеленного на любую часть любой мРНК HBV;

антисмыслового олигонуклеотида, нацеленного на любую часть мРНК человеческого аполипопротеина H;

siRNA, нацеленной на любую часть любой мРНК HBV; и

siRNA, нацеленной на любую часть мРНК человеческого аполипопротеина H.

В другом варианте осуществления варианты применения или способы лечения, описанные выше, дополнительно включают введение или одновременное использование третьего фармацевтически приемлемого средства, выбранного из следующего:

тенофовира зисопроксил fumarata;

энтекавира;

телбувидина;

адефовир дипивоксила; и

ламивудина.

Также предоставляется способ лечения или применение перечисленного при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит SEQ ID NO: 2, и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит пегилированный интерферон α -2a.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 2, и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит пегилированный интерферон α -2a.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит SEQ ID NO: 3, и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит пегилированный интерферон α -2a.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 3, и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит пегилированный интерферон α -2a.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит SEQ ID NO: 10, и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит пегилированный интерферон α -2a.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 10, и второго фармацевтически приемлемого средства, которое со-

в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 2, и второго фармацевтически приемлемого средства, содержащего пегилированный интерферон $\lambda 1$.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит SEQ ID NO: 3, и второго фармацевтически приемлемого средства, содержащего пегилированный интерферон $\lambda 1$.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 3, и второго фармацевтически приемлемого средства, содержащего пегилированный интерферон $\lambda 1$.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит SEQ ID NO: 10, и второго фармацевтически приемлемого средства, содержащего пегилированный интерферон $\lambda 1$.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 10, и второго фармацевтически приемлемого средства, содержащего пегилированный интерферон $\lambda 1$.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит SEQ ID NO: 2, и второго фармацевтически приемлемого средства, содержащего GS-9620.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 2, и второго фармацевтически приемлемого средства, содержащего GS-9620.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит SEQ ID NO: 3, и второго фармацевтически приемлемого средства, содержащего GS-9620.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 3, и второго фармацевтически приемлемого средства, содержащего GS-9620.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит SEQ ID NO: 10, и второго фармацевтически приемлемого средства, содержащего GS-9620.

Также предоставляется способ лечения или применение при лечении инфекции вирусом гепатита В или коинфекции вирусом гепатита В/гепатита D, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 10, и второго фармацевтически приемлемого средства, содержащего GS-9620.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет два производных триазолопиримидина, блокирующих высвобождение HBsAg из HBV-продуцирующей линии клеток HepG2.2.15, как описано в Yu et al., 2011, J. Med. Chem. 54: 5660-5670;

фиг. 1A - основное потенциальное соединение 1a (PBHBV-001); и

фиг. 1B - основное потенциальное соединение 3c (PBHBV-2-15), установленные в данной работе.

Осуществление изобретения

HBsAg играет ключевую роль в HBV-инфекции и коинфекции HBV/HDV. Помимо его роли в качестве основного структурного компонента для формирования вириона, HBsAg также высвобождается в больших количествах в кровь инфицированных субъектов в форме субвирусных частиц (SVP), у которых отсутствует вирусный капсид и геном, и функция которых, по-видимому, главным образом заключается в доставке HBsAg в кровь. SVP секретируются из инфицированных клеток с превышением в 1000-10000 раз по сравнению с секрецией вируса, что позволяет SVP эффективно блокировать HBsAg антитела (ан-

ти-HBs), так что вирус HBV или HDV в крови может избежать распознавания адаптивной иммунной системой. Хотя некоторые исследования показали, что действие HBsAg также может быть связано с непосредственным блокированием активации адаптивного и врожденного иммунных ответов на HBV-инфекцию (Cheng et al., 2005, Journal of hepatology, 43:4 65-471; Op den Brouw et al., 2009, Immunology, 126: 280-289; Vanlandschoot et al., 2002, The Journal of general virology, 83: 1281-1289; Wu et al., 2009, Hepatology, 49: 1132-1140; Xu et al., 2009, Molecular immunology, 46: 2640-2646), наличие этой функциональной возможности при HBV инфекции и HBV/HDV коинфекции у человека и ее действие на активность иммунотерапевтических средств не изучено или не установлено. Также показано, что HBeAg и HBcAg обладают иммуноингибирующими свойствами (Kanda et al., 2012 J. Inf. Dis. 206: 415-420; Lang et al., 2011 J. Hepatol. 55: 762-769; Gruffaz et al. 2013, J. Hepatol. 58 (suppl), p s155, Abstract 378).

В дополнение к признанной активности избытка HBsAg в крови (в виде SVPs) в отношении изолирования анти-HB, способность HBsAg блокировать цитокиновые сигналы в некоторых системах *in vitro* и *in vivo* указывает на то, что эти иммуноингибирующие свойства HBsAg также могут присутствовать при HBV инфекции и HBV/HDV коинфекции у людей. Вследствие большого избытка HBsAg в крови инфицированных пациентов, вероятно, имеет место действительное ухудшение многих сигнальных механизмов, важных для оптимального функционирования иммунной системы (и адаптивной и врожденной). В дополнение к этому представленные в данном документе новые сведения впервые подтверждают, что многие из этих сигнальных механизмов также являются существенными для полной реализации эффектов иммунотерапевтических средств. Кроме того, эти раскрытия впервые обосновывают существенно важное участие циркулирующего HBsAg в ингибировании действия иммунотерапевтических средств.

Данный документ содержит демонстрацию эффективного лечения инфекции HBV и HBV/HDV коинфекции, которое включает в себя первое фармацевтически приемлемое средство, способное устранять HBsAg из крови, и иммунотерапевтическое средство, стимулирующее иммунную функцию. Такое комбинированное лечение дает возможность циркулирующим анти-HBsAg антителам напрямую "атаковать" циркулирующий вирус и клетки, продуцирующие вирус, что в отсутствие иммуно-ингибирующих свойств HBsAg ведет к значительному улучшению эффекта иммунотерапии, что, в свою очередь, приводит к значительному увеличению части пациентов, достигающих иммунологического контроля над HBV-инфекцией, чем при использовании одной иммунотерапии.

В данном документе содержится новая демонстрация того, что в дополнение к его ранее описанной способности блокировать цитокиновые сигналы *in vitro*, циркулирующий HBsAg неожиданно также напрямую ингибирует функцию разрешенной для лечения HBV иммунотерапии в дополнение к подавлению иммунного ответа хозяина против HBV инфекции. Таким образом, терапия, объединяющая первое средство, способное устранять HBsAg из крови, и второе средство, стимулирующее иммунную функцию, в результате приводит к впервые показанному синергическому действию между этими двумя средствами, что значительно улучшает воздействие, связанное с восстановлением иммунологического контроля над HBV-инфекцией.

Данный документ предоставляет полученные на пациентах-людях результаты, показывающие, что удаление HBsAg (и других антигенов HBV) из крови пациентов с хроническим HBV (с использованием полимеров нуклеиновой кислоты или NAP) может обеспечить некоторый критерий иммунологического восстановления, однако этот уровень иммунологической реактивации не является достаточным для создания надежного контроля у большей части пациентов. Эти данные явно показывают, что не предполагается, что с помощью какого-либо другого фармацевтически приемлемого средства или способа, приводящего к уменьшению или удалению HBsAg (или дополнительно других HBV белков) в крови инфицированных пациентов, может быть достигнут лучший исход лечения по сравнению с тем, который достигается при использовании NAP.

Данный документ дополнительно предоставляет полученные на пациентах-людях результаты, впервые показывающие, что присутствие HBsAg в крови пациентов с HBV инфекцией подавляет биохимическую активность иммунотерапевтических средств, подобных тимозину $\alpha 1$ или пегилированному интерферону α -2a. При использовании NAP REP 2139 HBsAg в крови пациентов с HBV-инфекцией был удален до лечения тимозином $\alpha 1$ или пегилированным интерфероном α -2a. В HbsAg-негативной окружающей среде лечение любым из этих двух иммунотерапевтических средств приводило к значительному и неожиданному синергизму активизации иммунологического ответа (что определяется по выработке анти-HBsAg антител в крови), при этом ответ был значительно более сильным и происходил намного быстрее, чем ответ при использовании этих иммунотерапевтических средств в монотерапии. Самое главное, удаление HBsAg из крови у этих пациентов обеспечило возможность появления этих очень сильных ответов на иммунотерапию у большинства пациентов. Любой тип положительного иммунологического ответа редко встречается у пациентов, которых лечили иммунотерапевтическими средствами в виде монотерапии.

Эти результаты также впервые демонстрируют, что удаление HBsAg из крови пациентов с инфекцией HBV или HBV/HDV инфекцией будет оказывать синергетическое воздействие на способность какого-либо иммунотерапевтического средства вызывать более сильный иммунологический ответ у боль-

шинства или у всех пациентов, получающих иммунотерапию, при более коротком режиме лечения, чем используемый обычно. Эти результаты явно показывают специалисту в данной области техники, что можно ожидать, что любой способ или фармацевтически приемлемое средство, удаляющее HBsAg из крови инфицированных HBV или HBV/HDV коинфицированных пациентов, может иметь аналогичный полезный и синергетический эффект на улучшение биохимической активности какого-либо фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства. Это улучшение активности иммунотерапевтического средства может быть реализовано, когда уменьшение или удаление HBsAg было достигнуто до иммунотерапии или одновременно с иммунотерапией или когда уменьшение или удаление HBsAg было достигнуто после иммунотерапии, которая была начата ранее и продолжается.

Выявление значительного синергетического антивирусного эффекта у пациентов, которых лечили фармацевтически приемлемым средством, устраняющим HBsAg из крови (любыми способами), в сочетании с фармацевтически приемлемым средством, стимулирующим иммунную функцию, представляет новый подход для достижения существенно улучшенного антивирусного ответа при использовании имеющейся иммунотерапии, который не был предсказан и о котором не сообщалось в предшествующем уровне техники.

Термин "олигонуклеотид" (ON) относится к олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) и/или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Этот термин включает ON, содержащие модифицированные нуклеотидные основания (включая 5' метилцитозин и 4' тиюрацил), сахара и ковалентные межнуклеозидные (в остовете) связи, а также ON, имеющие участки неприродного происхождения с аналогичной функцией.

Такие модифицированные или замещенные ON могут быть предпочтительными по сравнению с нативными формами вследствие желательных свойств, таких как, например, уменьшенная иммунореактивность, повышенное клеточное поглощение, повышенная аффинность к нуклеиновокислотной мишени (в контексте антисмысловых ON, siRNA и shRNA) и/или повышенная стабильность к деградации, опосредованной нуклеазой. ON также могут быть двухцепочечными. ON также включают одноцепочечные молекулы, такие как антисмысловые олигонуклеотиды, шпигельмеры и аптамеры, а также двухцепочечные молекулы, такие как малые интерферирующие RNA (siRNA) или небольшие шпигельные РНК (shRNA).

ON могут содержать различные модификации, например стабилизирующие модификации, и таким образом, могут содержать по меньшей мере одну модификацию фосфодиэфирной связи и/или сахара и/или основания. Например, ON может содержать, без ограничения, одну или более модификаций, или может быть полностью модифицирован таким образом, чтобы все связи или сахара или основания содержали перечисленные модификации. Модифицированные связи могут включать тиюфосфатные связи, дитиюфосфатные связи и/или метилфосфонатные связи. Поскольку используются модифицированные связи, ON могут содержать фосфодиэфирные связи. Дополнительные подходящие модификации включают, без ограничения, модификации в 2'-положении сахара, включая модификации 2'-О-алкила, такие как 2'-О-метил модификации, 2'-О-метоксиэтил (2' MOE), 2'-амино модификации, 2'-гало модификации, такие как 2'-фтор; ациклические нуклеотидные аналоги. Также в данной области техники известны и могут использоваться другие 2' модификации, такие как "запертые" нуклеиновые кислоты. В частности, ON имеет модифицированные связи везде или каждая его связь модифицирована, например, тиюфосфат; имеет 3'- и/или 5'-кэп; включает концевую 3'-5' связь; ON представляет собой или включает конкатемер, состоящий из двух или более ON последовательностей, соединенных линкером(ами). Модификации основания могут включать 5' метилирование цитозинового основания (5' метилцитозин или в случае нуклеотида 5' метилцитидин) и/или 4' тионирование урацилового основания (4' тиюрацил или в случае нуклеотида 4' тиюридин). В тех случаях, когда условия синтеза являются химически совместимыми, могут быть скомбинированы различные химически совместимые модифицированные связи, например олигонуклеотид с тиюфосфатными связями, модификация 2' рибозы (такая как 2'-О-метилирование) и модифицированное основание (такое как 5' метилцитозин). ON может быть полностью модифицирован с помощью всех этих различных модификаций (например, каждая связь является тиюфосфатной, модифицированными являются каждая 2' рибоза и каждое основание).

В настоящей заявке термин "полимер нуклеиновой кислоты" или NAR определяет любой одноцепочечный ON, не содержащий последовательность со специальными функциональными возможностями, предназначенный для того, чтобы или гибридизоваться с нуклеиновокислотной мишенью или адаптировать специфическую вторичную структуру последовательности, что приводит к связыванию со специфическим белком. Биохимическая активность NAR не зависит от распознавания ON на Toll-подобном рецепторе, гибридизации с целевой нуклеиновой кислотой или аптамерного взаимодействия, требующего специфической вторичной/третичной ON структуры, проистекающей из конкретного порядка присутствующих нуклеотидов. NAR могут включать основание или связь и/или модификации сахара, как описано выше. Примеры NAR соединений включают

фосфоротиоатный олигонуклеотид длиной 20-120 нуклеотидов, содержащий повторы последовательности AC;

фосфоротиоатный олигонуклеотид длиной 20-120 нуклеотидов, содержащий повторы последовательности CA;

фосфоротиоатный олигонуклеотид, длиной 20-120 нуклеотидов, содержащий повторы последовательности TG;

фосфоротиоатный олигонуклеотид, длиной 20-120 нуклеотидов, содержащий повторы последовательности GT;

фосфоротиоатный олигонуклеотид, длиной 20-120 нуклеотидов, содержащий повторы последовательности UG;

фосфоротиоатный олигонуклеотид, длиной 20-120 нуклеотидов, содержащий повторы последовательности; и

SEQ ID NO: 1-10.

ON хелатные комплексы представляют собой два или более ON, межмолекулярно связанных посредством двухвалентного или многовалентного катиона металла. ON хелатные комплексы нейтрализуют собственные хелатные свойства ON, которые могут способствовать побочным действиям, связанным с введением этих соединений. Введение ON хелатных комплексов - это способ введения ON субъекту, при котором уменьшаются связанные с введением побочные эффекты, обусловленные нехелатными ON (которые представляют собой ON, вводимые в виде солей натрия, как обычно используется в данной области техники). Эти побочные эффекты могут включать тремор, лихорадку и озноб при внутривенном вливании или уплотнение, воспаление и боль в месте инъекции при подкожном введении. Кроме того, путем получения ON в виде хелатных комплексов может быть улучшено их фармакокинетическое поведение, что обеспечивает повышение терапевтической активности при использовании одинакового дозирования по сравнению с нехелатными ON, как описано в опубликованной международной заявке № WO 2012/021985 и опубликованной заявке США № 2012/0046348, которые полностью включаются в данное описание путем отсылки. Введение ON хелатных комплексов не препятствует биохимической активности ON при обычном использовании в виде натриевых солей. Таким образом, любые антисмысловые ON, siRNA или NAP, описанные в данной работе, необязательно могут быть получены в виде ON хелатного комплекса, без воздействия на их биохимическую активность.

ON хелатные комплексы могут содержать различные многовалентные катионы металлов, включая кальций, магний, кобальт, железо, марганец, барий, никель, медь, цинк, кадмий, ртуть и свинец. Это дополнительно показывает, что хелирование этих многовалентных катионов металлов приводит к образованию ON хелатных комплексов, состоящих из двух или более ON, связанных через катионы металлов, и встречается в ON, длиной более 6 нуклеотидов, и в присутствии ON или с фосфодиэфирными или тиофосфатными связями. Необязательно каждая связь ON может быть фосфоротиоатной. Хелирование может происходить в ON, содержащих 2' модификации (такие как 2'О метил) рибозы, или содержащих модифицированные основания, такие как 5' метилцитозин или 4-тиоурацил. Эти 2' модификации могут присутствовать на одной или более или на всех рибозах, а модифицированные основания могут присутствовать у одного или более оснований или присутствовать повсеместно на каждом основании (т.е. все цитозины присутствуют в виде 5' метилцитозина). В дополнение к этому ON хелатные комплексы могут включать ON, содержащие несколько модификаций, например, таких, когда каждая связь является тиофосфатной, каждая 2' рибоза и каждое основание являются модифицированными. ON модификации, совместимые с образованием ON хелатного комплекса, уточнены выше. Более того, хелирование катионов металлов не зависит от последовательности присутствующих нуклеотидов, но вместо этого зависит от физикохимических свойств, характерных для всех ON.

Хотя образование ON хелатных комплексов может достигаться при использовании любого двухвалентного катиона металла, ON хелатные комплексы, предназначенные для использования в качестве медикаментов, предпочтительно должны содержать только кальций и/или магний, однако также могут содержать железо, марганец, медь или цинк в следовых количествах, но не должны включать кобальт, барий, никель, кадмий, ртуть, свинец или любой другой двухвалентный металл, не перечисленный здесь.

ON могут проявлять свои терапевтические эффекты посредством многочисленных механизмов, которые являются зависимыми от последовательности или независимыми от последовательности. Механизмами, зависимыми от последовательности, являются такие, которые нуждаются в специфической нуклеотидной последовательности для их активности, и в случае, когда активность уменьшается при одном или более изменениях в присутствующей последовательности нуклеотидов. Эта специфическая последовательность может включать полную длину ON или только его участок (мотив последовательности). Примеры зависимых от последовательности ON включают:

1) антисмысловые ON или одноцепочечные или двухцепочечные (например, синтетическая интерферирующая РНК (siRNA) или небольшая шпилечная РНК (shRNA)) создаются для нацеливания на специфический участок представляющей интерес информационной РНК (мРНК) или микро РНК (miRNA) посредством специфической гибридизации между антисмысловым ON и последовательностью в целевом участке представляющей интерес мРНК. Введение антисмысловых ON в клетку приводит к формированию двойного участка на мРНК или с miRNA, который определяет деградацию этой специфической мРНК или miRNA при помощи RNase H. Когда siRNA вводится в клетку (или shRNA экспрессируется в клетке), антисмысловая цепь (или направляющая, гидовая цепь) встраивается в RISC (РНК-индуцированный комплекс сайленсинга), который использует направленную гидовой цепью гибридиза-

цию с комплементарным участком на целевой мРНК, чтобы осуществить ее расщепление при помощи каталитического компонента RISC, называемого Argonaute;

2) стерические блокирующие ON представляют собой одноцепочечные антисмысловые ON, комплементарные к специфическому участку мРНК или незрелой мРНК, которые создаются таким образом, чтобы не активировать РНКазу H, или путем включения 2' модификации каждой рибозы, как известно, эта модификация предотвращает действие РНКазы H, или путем использования химически модифицированных ON (таких как морфолино ON), которые не распознаются РНКазой H. Гибридизация этих ON с их целевыми мРНК дает в результате двухцепочечный участок, который обеспечивает стерическое препятствие для белков, обычно воздействующих на РНК (таких как белки сплайсинга или рибосомы). Такие ON могут использоваться для блокирования трансляции конкретной мРНК или для модификации пост-транскрипционного сплайсинга и созревания определенной мРНК;

3) аптамеры представляют собой ON, которые принимают специфическую трехмерную конформацию, которая способна к взаимодействию со специфическими белками и с трудом взаимодействует с ДНК или РНК хозяина. Аптамеры также могут включать шпигельмеры, которые используют L-нуклеотиды вместо D-нуклеотидов, чтобы придать ON высокую устойчивость к воздействию ферментов;

4) иммуностимулирующие ON содержат специфические модификации, которые приводят к связыванию с или активации toll-подобных рецепторов 7, 8 и 9 через механизм, опосредованный не-CpG мотивом, и способны стимулировать иммунную функцию (Kandimalla et al., 2011. *Cell. Immunol.* 270: 126-134; Struthers et al., 2010. *Cell. Immunol.* 263: 105-113).

При разработке антисмысловых ON, siRNA или shRNA последовательность этих молекул конструируется так, чтобы она была на 100% комплементарной наметченной последовательности-мишени специфической РНК в пределах следующих методических указаний:

Антисмысловые ON имеют 15-25 нуклеотидов в длину и содержат последовательности, которые являются на 100% комплементарными наметченной последовательности-мишени.

Направляющая (гидовая) цепь siRNA содержит один олигорибонуклеотид, длиной 19-21 нуклеотидов, который является комплементарным на 100% целевому участку представляющей интерес мРНК, при этом "сопровождающая" цепь (другая цепь в дуплексе) содержит ту же самую длину рибонуклеотидной последовательности, которая является на 100% комплементарной с гидовой цепью. И направляющая цепь и "сопровождающая" цепь также имеют два дополнительных дезокситимидиновых нуклеотида на 3' конце каждой цепи.

shRNA молекулы продуцируются экспрессирующим вектором, таким как плазида или экспрессирующий конструкт на основе вируса (например, лентивируса или аденовируса), который продуцирует длинную РНК, содержащую последовательность направляющей и "сопровождающей" цепей (как описано выше для siRNA, но которая может быть длиной 19-29 нуклеотидов), в одном смежном олигонуклеотиде, но отделенном короткой некомплементарной олигонуклеотидной последовательностью, предназначенной для образования шпильки. Транскрипция РНК из этого экспрессирующего конструкта приводит к формированию короткой шпильчатой РНК, которая процессируется дайсер ферментом и вводится в RISC, как описано выше для siRNA.

В настоящем описании термин "антивирусный ON" относится к любому антисмысловому ON, siRNA, shRNA или NAP, который за счет своей специфической биохимической активности (зависимой от последовательности или независимой от последовательности) обладает способностью прямо или опосредованно ингибировать некоторый аспект вирусной репликации или прямо или опосредованно усиливать способность хозяина устранять вирусную инфекцию с помощью иммунологического или других механизмов.

В настоящем раскрытии термин "ON хелатный комплекс" относится к комплексу из двух или более ON в растворе, связанных межмолекулярно катионом двухвалентного металла, как описано в опубликованной международной заявке № WO 2012/021985 и опубликованной заявке США № 2012/0046348, которые полностью включаются в данное описание путем отсылки. ON хелатные комплексы могут быть образованы с антисмысловыми ON, siRNA или NAP.

В настоящем раскрытии термин "антивирусный ON хелатный комплекс" относится к комплексу из двух или более антивирусных ON в растворе, связанных межмолекулярно катионом многовалентного металла.

Фосфоротиоатные NAP представляют собой новый класс антивирусных средств широкого спектра действия на основе ON (Bernstein et al., 2008, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 2727-2733; Cardin et al., 2009, *Virology Journal*, 6: 214; Guzman et al., 2007, *Antiviral Therapy*, 12: 1147-1156; Lee et al., 2008, *Virology*, 372: 107-117; Matsumura et al., 2009, *Gastroenterology*, 137: 673-681; Vaillant et al., 2006, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 1393-1401 и патенты США 8008269, 8008270 и 8067385), которые также блокируют образование и высвобождение SVP из инфицированных HBV гепатоцитов (см. пример I). Поскольку SVP составляют >99.9% HBsAg в крови пациентов с HBV, блокирование образования и/или высвобождения SVP из инфицированных гепатоцитов с помощью NAP является высоко эффективным способом удаления HBsAg из крови пациентов, инфицированных HBV.

Как описано в примере II, удаление HBsAg из крови инфицированных пациентов с помощью NAP

приводит к частичному восстановлению иммунного ответа, который в свою очередь устраняет HBV e-антиген (HBeAg) из крови, и существенному уменьшению уровней вируса в крови во время лечения, однако, у большинства пациентов после прекращения лечения этот эффект не сохраняется. Поскольку это частичное восстановление иммунного ответа (при отсутствии HBsAg и других вирусных антигенов) может приводить к формированию (после прекращения лечения) надежного иммунологического контроля над HBV инфекцией у небольшой части пациентов, этого недостаточно, чтобы достичь такого контроля в отсутствие лечения у большинства леченых пациентов. Таким образом, подход просто удаления HBsAg из крови с помощью любого способа или с помощью любого другого фармацевтически приемлемого средства с подобным действием будет обеспечивать только некоторый умеренный уровень иммунологического восстановления, который будет приводить к установлению надежного контроля без лечения у ограниченной части пациентов.

Другого публично разглашенного средства, кроме NAP, которое обладает способностью быстро удалять HBsAg из крови у инфицированных HBV людей-пациентов, не существует. Однако существует несколько других методов, отличных от применения NAP и хорошо известных в данной области техники, которые могут использоваться для удаления HBsAg из крови. Такие методы включают (но не ограничиваются этим) следующее.

А. Использование небольших молекул для нацеливания на участки HBsAg белка или другие вирусные факторы или факторы хозяина, участвующие в образовании SVP, с целью блокировки формирования SVP, блокировки транспорта SVP за счет использования секреторного аппарата инфицированной клетки, блокировки высвобождения SVP из инфицированных гепатоцитов в кровь или в целом блокировки высвобождения HBsAg из инфицированных клеток. Небольшие молекулы, использованные в этом подходе, могут включать производные триазолопиримидина, как описано в Yu et al. (2011, J. Med Chem. 54: 5660-5670), и могут включать конкретные производные триазолопиримидина, как описано на фиг. 1, которые, как показано, блокируют высвобождение HBsAg из HBV-продуцирующих линий клеток. Также могут использоваться другие небольшие молекулы, которые нацеливаются на белок Apo H, который может быть важным для продуцирования SVP (как описано в канадской заявке № 2746981).

В. Использование подхода, основанного на антисмысловых ON, которые включают антисмысловые олигонуклеотиды, siRNA или shRNA молекулы, для нацеливания на специфические мРНК и, таким образом, ускоряя их деградацию, ингибировать синтез HBsAg (т.е. катализировать деградацию мРНК, которая используется для продуцирования HBsAg белка), или другие вирусные факторы или факторы хозяина, вовлеченные в формирование SVP (включая Apo H, как описано в канадской заявке № 2746981), транспорт SVPs посредством секреторного аппарата инфицированной клетки или высвобождение SVP из инфицированных гепатоцитов в кровь. Такой подход на основе антисмысловых ON также может использоваться для гибридизации с вирусными мРНК или мРНК хозяина, необходимыми для синтеза белков, важных для формирования, внутриклеточного транспорта или высвобождения SVP из инфицированных гепатоцитов, и для того, чтобы вызывать деградацию этих мРНК с помощью описанных выше механизмов. В частности, некоторые подходы к HBV на антисмысловой основе могут быть полезны в виде отдельных антисмысловых молекул, таких как siRNA, которые могут создаваться с целью вмешиваться во все HBV мРНК, продуцируемые вирусным геномом, посредством гибридизации с отдельным участком на HBV геноме, вызывая деградацию всех мРНК, продуцируемых HBV-геномом, которые одновременно влияют на синтез HBsAg, HBeAg и HBcAg, как описано в Fu et al. (2008, Acta Pharmacol. Sin. 29: 1522-1528). Две или более антисмысловых молекулы также могут использоваться одновременно или в виде отдельных молекул или в виде молекул, продуцируемых одним вектором экспрессии, введенным инфицированному хозяину, как описано Snyder et al. (2008, Antiviral Res., 80: 36-44). Примеры, известные в данной области техники для ингибирования на антисмысловой основе синтеза HBV-белков, включают:

а. Алтритол-модифицированные siRNA липоплексы (Hean et al., 2010, Artificial DNA: PNA & XNA, 1: 17-26).

б. Одну или более последовательностей siRNA (Xin et al., 2008, World J. Gastroenterol., 14: 3849-3854; Zhe et al., 2005, J. Zhejiang Univ. Sci., 6B: 236-241 and reviewed in Chen et al., 2008, Pharmaceutical Res., 25: 72-86).

с. Одну или более последовательностей siRNA и поликонъюгированную систему (ARC-520), <http://www.arrowheadresearch.com/press-releases/arrowhead-research-advances-arc-520-ind-enabling-studies-treatntent-hepatitis-b-and>; http://www.arrowheadresearch.com/sites/default/files/press_releases/pdf/whitepaper-hbv-3-7-12.pdf.

д. Модифицированные "запертой" нуклеиновой кислотой антисмысловые молекулы (Sum et al., 2011, Biochem. Biophys. Res. Comm., 409: 430-435).

е. Одну или более shRNA (Zhang et al., 2010, BMC Microbiol. 10:214; Starkey et al., 2009, J. Gen Virol. 90: 115-126 и рассмотренные в Chen et al., 2008, Pharmaceutical Res., 25: 72-86).

С. Использование аптамера на основе ON (включая классические аптамеры или шпигельмеры) для нацеливания на участки HBsAg, HBeAg или HBcAg белков или других вирусных факторов или факторов хозяина (включая Apo H), присутствующих в кровотоке, чтобы ускорить их удаление из крови. Классические аптамеры и шпигельмеры могут быть дополнительно пегилированными, как описано в

Waters et al. 2011 Blood 117: 5514-5522 and Wlotzka et al. 2002 Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 99: 8898-8902, с целью улучшения их стабильности и периода полувыведения из кровообращения.

D. Использование подхода на основе антитела, нацеленного непосредственно на HbsAg, для ускорения его удаления из крови.

Использованный в описании термин "удаление HBsAg из крови" означает какое-либо статистически значимое уменьшение концентрации HBsAg в крови относительно концентраций HbsAg в крови до лечения, что определяется с помощью количественного HbsAg-анализа Abbott Architect™. Этот анализ сывороточного HBsAg является общепринятым стандартом для измерения уровней HBsAg в крови и одобрен для использования при диагностике у людей.

Примеры ON, которые могут использоваться в текущем раскрытии, предоставляются в табл. 1.

Таблица 1. Примеры ON, которые могут использоваться в текущем раскрытии

ON класс	Тип нуклеиновой кислоты	Последовательность (5' – 3')	Модификации
NAP	ДНК	(AC) ₂₀ (SEQ ID NO: 2)	Все связи PS
NAP	ДНК	(CA) ₂₀ (SEQ ID NO: 1)	Все связи PS
NAP	ДНК	(A-5'MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 3)	Все связи PS
NAP	ДНК	(5'MeC-A) ₂₀ (SEQ ID NO: 4)	Все связи PS
NAP	РНК	(2'OMeA-2'OMeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 5)	Все связи PS
NAP	РНК	(2'OMeC-2'OMeA) ₂₀ (SEQ ID NO: 6)	Все связи PS
NAP	ДНК	(TG) ₂₀ (SEQ ID NO: 7)	Все связи PS
NAP	ДНК	(GT) ₂₀ (SEQ ID NO: 8)	Все связи PS
NAP	РНК	(2'OMe, 5'MeC-2'OMeA) ₂₀ (SEQ ID NO: 9)	Все связи PS
NAP	РНК	(2'OMeA-2'OMe, 5'MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 10)	Все связи PS
Антисмысловые	ДНК / РНК	Последовательность является на 100% комплементарной вирусной мРНК или мРНК хозяина (например, Аро Н) или HBV мРНК	Все связи PS, может содержать участок РНК с модификацией 2' рибозы или LNA
siRNA	Двух-цепочечная РНК / ДНК	Содержит последовательность на 100% комплементарную вирусной мРНК или мРНК хозяина (например, Аро Н) или HBV мРНК	Может содержать РНК с модификацией 2' рибозы, может содержать PS
shRNA	Двух-цепочечная РНК, продуцируемая экспрессирующим вектором	Содержит последовательность на 100% комплементарную вирусной мРНК или мРНК хозяина (например, Аро Н) или HBV мРНК	РНК

PS - тиофосфат, 2'OMe - 2' О метил, 5'MeC - 5'метилцитозин.

Типичными эффективными режимами дозирования различных фармацевтически приемлемых средств, описанных выше, которые могут использоваться для удаления HBsAg из крови, являются:

что касается всех NAP и фосфоротиоатных антисмысловых олигонуклеотидов, которые вызывают деградацию HBV или ароН мРНК, обычно используется установленное в данной области техники еженедельное парентеральное введение 100-500 мг соединения для достижения терапевтически активных уровней этих соединений в печени, как описано для NAP в примерах ниже, а то, что касается фосфоротиоатного антисмыслового ON, вызывающего деградацию специфических мРНК в печени (в отношении аполипопротеинов B100), описано в Akdim et al. 2010 Journal of the American College of Cardiology 55: 1611-1618).

Для достижения терапевтических уровней активности в печени siRNAs, как правило, инкапсулируют и дают дозами, с целью деградации мРНК PCSK9 в печени людей-пациентов, как описано в

http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CDgQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.alnylam.com%2Fcapella%2Fwp-content%2Fuploads%2F2012%2F01%2FALNY-PCS-Phi-PrelimResutls-Jan2012.pdf&ei=ii6UUZnBLZbe4AO8roHoBA&usg=AFQjCNGiN3K7_fVEcY-_2F91nDuepwraZA&sig2=3ZAZvGQOJXQ1xU4W--Rb5w&bvm=bv.46471029,d.dmg&cad=rja

Как описано выше, инкапсулированные siRNA могут давать терапевтический эффект в печени людей-пациентов при использовании парентеральных доз в пределах 0,015 - 0,20 мг/кг и, как считается, могут обеспечить устойчивый эффект при дозировании один раз в две недели или один раз в месяц.

shRNA пока еще не используется в отношении человека, но работает *in vivo* на грызунах, показано, что экспрессирующие векторы, созданные с целью экспрессии shRNA, при дозировании мышам в сравнимых с siRNA концентрациях, могут быть такими же эффективными как siRNA (McAnuff et al. 2007. *Journal of Pharmaceutical Science* 96: 2922-2930. Поэтому ожидается, что введение доз shRNA или с помощью систем на вирусной основе или с помощью инкапсулированных систем доставки, как описано выше, обеспечит сопоставимый эффект в печени при использовании режимов дозирования, сравнимых с режимами, используемыми в отношении siRNA.

Аптамеры, как правило, являются пегилированными, чтобы достичь лучшей стабильности, и могут быть терапевтически эффективными при использовании еженедельных парентеральных доз в пределах 100-600 мкг/кг, как описано Waters et al., 2011 *Blood* 117:5514-5522.

Шпигельмеры в большинстве случаев также являются пегилированными, чтобы достичь лучшего периода полувыведения из кровообращения и могут быть терапевтически эффективными при использовании парентеральных доз > 1,2 мг/кг через день, как описано Riecke et al., 2012 Abstract 2432 presented at the 54th Annual ASH Meeting and Exposition, Atlanta, GA, U.S.A. В отношении связывания с и ускорения удаления HBsAg или других белков HBV из крови HBV-инфицированных пациентов, могут потребоваться более высокие дозы аптамеров или шпигельмеров из-за высоких концентраций HbsAg, обычно присутствующих у пациентов с HBV-инфекцией.

Как описано выше, иммунотерапевтические подходы к лечению HBV-инфекции имеют ограниченную эффективность. Одним из ограничений монотерапии на основе интерферона является осуществление удаления HBsAg из крови у очень небольшой части пациентов (Moucari et al., 2009, *Antiviral Ther.*, 14: 1183-1188; Reijnders et al., 2011, *J. Hepatol.*, 54: 449-454). Это удаление HBsAg может лежать в основе достижения надежного контроля над HBV ДНК при лечении и без лечения у этой небольшой части леченых пациентов (Moucari et al., 2009, *Hepatology*, 49: 1151-1157). Другим важным ограничением терапии на основе интерферона является то, что она вызывает только умеренный уровень (<50 МШ/мл) выработки анти-HBs у очень небольшой части пациентов при лечении (Reijnders et al., 2011, *J. Hepatol.*, 54: 449-454; Narayiannis et al., 1990, *J. Hepatol.*, 10: 350-352) через 48 недель воздействия. Эти важные ограничения, вероятно, являются критическими факторами, лежащими в основе достижения устойчивого вирусологического ответа только у ограниченного количества пациентов после иммунотерапии.

Как описано выше, HBsAg может блокировать сигнальные пути, важные для опосредованной цитокинами стимуляции иммунной функции. В данной области техники хорошо известно, что многие различные классы иммунотерапевтических средств используют некоторые общие пути сигнальной трансдукции для эффективной активации иммунитета. Представленные здесь раскрытия дополнительно показывают, что многие (или большинство) из этих путей сигнальной трансдукции, используемых иммунотерапевтическими средствами, также могут блокироваться действием HBsAg. Новые раскрытия в данном описании указывают, что действие различных иммунотерапевтических средств специфически ингибируется присутствием HbsAg и терапевтические эффекты этих различных иммунотерапевтических средств, когда они предоставляются в режиме лечения, синергетически улучшаются при отсутствии HBsAg. Следовательно, удаление HBsAg из крови в свою очередь должно приводить к более слабому ингибированию сигнальных путей, необходимых для оптимальной активности различных иммунотерапевтических средств. Таким образом, применение иммунотерапии у пациентов, у которых ранее был удален HBsAg из их крови, или у которых активное удаление HBsAg из крови происходит при проведении иммунотерапии, вероятно должно оказывать подобное синергетическое влияние на иммуностимулирующее действие любой иммунотерапии.

В настоящем раскрытии термин иммунотерапевтическое средство относится к небольшой молекуле или полипептиду или цитокину или гормону, который за счет его специфической биохимической активности обладает способностью прямо или опосредованно усиливать иммунную функцию хозяина. Полипептид может быть природным или рекомбинантным. Полипептид может быть получен рекомбинантно из участка полипептида природного происхождения. Полипептид может быть пегилированным или нет.

Способы пегилирования полипептидов и совместимости пегилирования с биохимической активностью этих полипептидов хорошо известны в данной области техники и состоят из связывания цепей по-

лиэтиленгликоля (PEG) с рассматриваемым полипептидом на специфических аминокислотных остатках. Основным назначением пегилирования является увеличение времени жизни полипептида в кровообращении и также уменьшение его иммуногенности. Эти свойства улучшают переносимость рассматриваемого полипептида и уменьшают частоту дозирования, необходимую для получения оптимального терапевтического эффекта. Кроме того, в данной области техники известно, что прикрепление PEG остатков к полипептиду может быть достигнуто без воздействия на специфическую биохимическую активность рассматриваемого полипептида. Также известно, что пегилирование увеличивает водорастворимость рассматриваемого полипептида, что облегчает технологию приготовления лекарственного средства. В данной области техники известны многочисленные примеры пегилированных полипептидов, которые включают: Mircera™ пегилированную форму эритропоэтина; Neulasta™, пегилированную форму человеческого колониестимулирующего фактора гранулоцитов; Pegasys™ пегилированную форму человеческого интерферона α -2a; Peg-intron™, пегилированную форму человеческого интерферона α -2b; и пегилированный интерферон λ 1 (который в настоящее время проходит клинические испытания).

Кроме того, иммунотерапевтические средства, которые ранее не показали подходящей иммунотерапевтической активности в присутствии HBV-белков (например, у инфицированных пациентов, шимпанзе или на клеточных моделях), теперь в случае удаления HBsAg из крови могут иметь подходящую иммунотерапевтическую активность и использоваться при лечении HBV в комбинации с каким-либо средством, которое устраняет HBsAg из крови.

Демонстрация антивирусной активности какого-либо иммунотерапевтического средства считается общепризнанным косвенным показателем его способности стимулировать иммунную функцию, благодаря чему эта стимулированная иммунная функция оказывает противовирусное действие. Следовательно, любое иммунотерапевтическое средство с антивирусной активностью обладает способностью стимулировать иммунную функцию.

Некоторые иммунотерапевтические средства в настоящее время утверждены для лечения вирусных инфекций, включая пегилированный интерферон α -2a (Pegasys™) для лечения HBV и гепатита C (HCV), интерферон α -2b (Intron-A™) для лечения HBV и HCV и тимозин α 1 (Zadaxin™) для лечения HBV в большинстве стран Азии. Существуют также другие иммунотерапевтические средства с продемонстрированной антивирусной активностью, включая цитокины, интерферон λ 1, λ 2, λ 3 и γ и TNF α (Friborg et al., 2013, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57: 1312-1322; Lau et al., 1991, *Hepatology* 14: 975-979; McClary et al., 2000, *Journal of Virology* 74: 2255-2264; Robek et al., 2005, *Journal of Virology* 79: 3851-3854), пегилированный интерферон λ 1 (Muir et al., 2010, *Hepatology*, 52: 822-832) и низкомолекулярные агонисты Toll-подобного рецептора, подобные GS-9620 (в настоящее время разрабатывается компанией Gilead Sciences), ANA-773 (в настоящее время разрабатывается компанией Anadys) и иммуностимулирующие олигонуклеотиды IMO-2055 и IMO-2125 (в настоящее время разрабатываются компанией Idera Pharmaceuticals) (Wu et al., 2007, *Hepatology*, 46: 1769-1778; Horscroft et al., 2012, *J. Antimicrob. Chemotherapy*, 67: 789-801; Lanford et al., 2013 *Gastroenterology* Feb 12 в печати; www.natap.org/2010/AASLD/AASLD_39.htm). Кроме того, гормон дегидроэпиандростерон (5-андростен-3 β -17-он, DHEA) и многие из его метаболитов (включая андростендиол (5-андростен-3 β -17 β -диол, PAED), андростентриол (5-андростен-3 β -7 β -17 β -триол PAET) обладают явной, точно установленной иммуностимулирующей функциональной способностью улучшать формирование защитного вакцинного ответа против вирусных инфекций и обеспечивать прямую антивирусную активность против многих вирусных инфекций *in vivo* (Araeno et al., 1993, *J. Inf. Dis.*, 167: 830-840; Danenberg et al., 1995, *Vaccine*, 13: 1445-1448; Khorram et al., 1997, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 52: M1-M7; Loria and Padgett, 1998, *Rinsho Byori*, 46: 505-517; Loria, 2002, *Steroids*, 67: 953-966; Knoferl et al., 2003, *J. Appl. Physiol.*, 95: 529-535; Oberbeck et al., 2007, *Inten. Car Med.*, 33: 2207-2213; Burdnick et al., 2009, *Int. Immunopharmacol.*, 9: 1342-1346; Hazeldine et al., 2010, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 120: 127-136; Schmitz et al., 2013, *Med. Chem.*, Feb 15, Epub ahead of print).

Оценка стимулирования иммунной функции, как описано в текущем раскрытии и в случае HBV-инфекции, легко осуществляется (но не ограничивается этим) по изменению уровней свободных анти-HBsAg антител, продуцируемых у пациента, получающего иммунотерапию. Использование количественного анализа анти-HBsAg антитела Abbott Architect™ является методом, принятым во всем мире для оценки уровней свободных анти-HBsAg антител в сыворотке пациентов с хронической HBV-инфекцией, и появление или увеличение выработки анти-HBsAg антител у пациентов с HBV-инфекцией является принятой заместительной мерой иммунного ответа у этих пациентов, которые получают иммунотерапию или терапию, ингибирующую HBV полимеразу.

Существуют другие принятые критерии оценки иммунной функции, которые могут использоваться для мониторинга улучшения иммунной функции в присутствии комбинированного лечения, как описано выше. Эти критерии могут включать увеличение транскрипционной активности интерферон-респонсивных генов или увеличение уровней HBV-специфических CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток в крови или повышенные уровни различных цитокинов в крови, таких как IL2 (Liang et al., 2011, *Virology Journal* 8: 69).

Использование вакцинации против HBV (как правило, с использованием HBsAg в качестве антиге-

на) является широко известным методом эффективного предотвращения HBV инфекции и является методом, принятым во всем мире для предотвращения распространения HBV инфекции. Однако вакцинация против HBV антигенов в терапевтическом плане имеет эффект от умеренного до ничтожно малого, даже в том случае, когда вакцина объединяет два разных HBV антигена, такие как HBsAg и HBcAg (Mahtab et al., 2013. J. Hepatol. 58 (supp 1) abstract 760). В соответствии с предоставленным в данном документе раскрытием, этот слабый эффект может являться следствием циркулирующих уровней HbsAg, присутствующего в крови этих пациентов и, следовательно, способность вакцины стимулировать выработку новых антител к HBsAg (или к другим HBV-белкам) может быть значительно улучшена путем удаления HBsAg из крови.

Таким образом, существует много иммунотерапевтических средств, способных, как известно, стимулировать иммунную функцию, которые могут использоваться при введении до, во время или после устранения HBsAg из крови, эти иммунотерапевтические средства включают (без ограничения):

- тимозин $\alpha 1$;
- любой α -интерферон или его пегилированные производные;
- любой β -интерферон или его пегилированные производные;
- любой γ -интерферон или его пегилированные производные;
- любой λ -интерферон или его пегилированные производные;
- интерферон α -2a или α -2b или α -N3;
- интерферон β -1a или β -1b;
- интерферон γ -1b;
- интерферон $\lambda 1$ или $\lambda 2$ или $\lambda 3$;
- пегилированный интерферон α -2a или α -2b или $\lambda 1$ или $\lambda 2$;
- любой противовирусный цитокин или его пегилированные производные;
- тимусный белок A;
- любой противовирусный цитокин или его пегилированные производные;
- любой полипептид, обладающий противовирусной активностью или иммуностимулирующей активностью;
- иммуностимулирующий олигонуклеотид, такой как IMO-2125 и IMO-2055;
- вакцина, направленная на любой HBV антиген;
- низкомолекулярный агонист Toll-подобного рецептора, такой как GS-9620, и ANA-773; и
- любой гормон, обладающий противовирусной активностью или иммуностимулирующей активностью такой как DHEA или его метаболиты.

Примеры эффективных режимов дозирования иммунотерапевтических средств, используемых для достижения стимуляции иммунной функции, могут включать:

- еженедельные дозы 90-180 мкг в случае Pegasys™ (согласно листку-вкладышу в упаковке);
- еженедельные дозы 1.6 мг в случае Zadaxin™ (согласно листку-вкладышу в упаковке);
- еженедельные дозы 1×10^7 U в случае Intron-A™ (согласно листку-вкладышу в упаковке);
- еженедельные дозы 1.5-3.0 мкг/кг в случае пегилированного интерферона $\lambda 1$, как описано в Muir et al., 2010, Hepatology, 52: 822-832;
- аналогичные еженедельные дозы, как описано выше, для любого цитокина или иммунотерапевтического пептида, является ли он пегилированным или непегилированным;
- еженедельные дозы 0.16 - 0.48 мг/кг/неделю для не-CpG иммуностимулирующего олигонуклеотида IMO-2125, как описано в

[http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CEsQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.iderapharma.com%2Fdevelopment%2FIMO-2125-AASLD-](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CEsQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.iderapharma.com%2Fdevelopment%2FIMO-2125-AASLD-10312010.pdf&ei=WTiUUfnxHdWp4AO9vYGoBw&usg=AFQjCNENcwjLWM1B2r8Gf0JmWPRaeh-Xbw&sig2=kyENERyNTYmQoADWGoPluQ&bvm=bv.46471029,d.dmg&cad=rja)

[10312010.pdf&ei=WTiUUfnxHdWp4AO9vYGoBw&usg=AFQjCNENcwjLWM1B2r8Gf0JmW](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CEsQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.iderapharma.com%2Fdevelopment%2FIMO-2125-AASLD-10312010.pdf&ei=WTiUUfnxHdWp4AO9vYGoBw&usg=AFQjCNENcwjLWM1B2r8Gf0JmWPRaeh-Xbw&sig2=kyENERyNTYmQoADWGoPluQ&bvm=bv.46471029,d.dmg&cad=rja)

[PRaeh-Xbw&sig2=kyENERyNTYmQoADWGoPluQ&bvm=bv.46471029,d.dmg&cad=rja](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CEsQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.iderapharma.com%2Fdevelopment%2FIMO-2125-AASLD-10312010.pdf&ei=WTiUUfnxHdWp4AO9vYGoBw&usg=AFQjCNENcwjLWM1B2r8Gf0JmWPRaeh-Xbw&sig2=kyENERyNTYmQoADWGoPluQ&bvm=bv.46471029,d.dmg&cad=rja)

Обычно назначаемые дозы вакцины в соответствии с традиционной практикой в данной области техники и специально для HBV вакцин Energix-B™, Recombivax-HB™.

Таким образом, в соответствии с представленным в описании раскрытием любой из перечисленных выше способов или средств, способных достигать устранения HBsAg из крови пациентов, в сочетании со стимуляцией иммунной функции хозяина с помощью любого из иммунотерапевтических средств, перечисленных выше, как предполагается, будет оказывать синергетическое воздействие на восстановление иммунной функции у пациентов с HBV-инфекцией или HBV/HDV-коинфекцией. В дополнение к восстановлению иммунной функции, способной лучше поддерживать контроль над инфекцией без лечения, также предполагается, что такой синергизм позволит уменьшить дозу одного или более средств и даже продолжительность лечения каким-либо средством, необходимым для обеспечения терапевтически эффективного иммунного ответа у большинства пациентов. Пример III иллюстрирует синергетический эффект на восстановление иммунологической функции, когда удаление HBsAg с помощью NAP REP 2139

сопровождается дополнительной терапией с применением или тимозина $\alpha 1$ или пегилированного интерферона $\alpha 2a$.

В контексте сочетания средства, которое может удалить HBsAg из крови, с иммунотерапевтическим средством, любое количество устраненного HBsAg может обеспечить синергетическое улучшение активности иммунотерапии и дробная доза определенного иммунотерапевтического средства может привести в результате к сопоставимой или даже превосходящей иммуностимулирующей активности иммунотерапевтического средства, даже если HBsAg не удален полностью. Таким образом, сочетание какого-либо средства, приводящего к удалению HBsAg из крови, с каким-либо другим иммунотерапевтическим средством будет иметь синергетический эффект на действие обоих средств, что демонстрирует потенциальные возможности улучшения устойчивости антивирусного ответа (иммунологического контроля хозяина) без лечения, кроме того, при этом могут требоваться уменьшенные дозы обоих средств для достижения аналогичного или даже превосходящего эффекта, чем при их использовании в монотерапии.

Следовательно, в соответствии с предоставленным в данном документе раскрытием может быть полезным лечение субъекта с HBV инфекцией или HBV/HDV коинфекцией фармацевтически приемлемым средством, приводящим к уменьшению или устранению HBsAg из крови, в комбинации со вторым фармацевтически приемлемым иммунотерапевтическим средством.

Также может быть полезным введение двух фармацевтически приемлемых средств в одной и той же фармацевтической композиции или введение двух фармацевтически приемлемых средств в отдельных фармацевтических композициях одновременно или в разные моменты времени.

Также может быть полезным введение фармацевтически приемлемых средств одним и тем же или разными способами введения.

Для того чтобы обеспечить наилучший возможный антивирусный ответ у субъекта, может потребоваться добавить к комбинированному лечению, описанному выше, ингибитор HBV полимеразы, такой как (но не ограничиваясь этим): тенофовира дизопроксил фумарат, энтекавир, телбувидин, адефовира дипивоксил или ламивудин. Такие антивирусные средства могут предотвратить репликацию двухцепочечного вирусного генома в HBV и понизить концентрацию HBV вируса в крови.

Композиции, описанные здесь, могут быть введены любыми подходящими способами, например перорально, в форме таблеток, капсул, гранул или порошков; подязычно; заочно; парентерально, например путем подкожной, внутривенной, внутримышечной инъекции или инфузии (например, в виде стерильных инъеклируемых водных или неводных растворов или суспензий); с помощью ингаляции; местно, например в виде крема или мази; или ректально в форме суппозиторий или клизм; в стандартных лекарственных композициях, содержащих нетоксичные, фармацевтически приемлемые основы или разбавители. Например, настоящие композиции могут быть введены в форме, пригодной для немедленного высвобождения или замедленного высвобождения. Немедленное высвобождение или замедленное высвобождение может достигаться путем использования подходящих фармацевтических композиций или, в частности, в случае замедленного высвобождения посредством использования специальных устройств, таких как подкожные имплантаты или осмотические насосы. Таким образом, вышеуказанные композиции могут быть приспособлены для введения одним из следующих способов: перорального приема внутрь, ингаляции, подкожной инъекции, внутримышечной инъекции, внутривенной инъекции, внутривенной инъекции или вливания, или местно.

Настоящее раскрытие станет более понятным с учетом следующих примеров.

Пример I.

NAP ингибируют транспорт HBsAg из клеток.

Показано, что HBsAg блокирует многие аспекты иммунного ответа на HBV-инфекцию (Cheng et al., 2005, J. Hepatology, 43: 465-471; Moucari et al., Hepatology 49: 1151-1157; Vanlandschoot et al., 2002, J. Gen. Virol. 83: 1281-1289; Woltman et al., 2011, PloS One 6: e15324; Wu et al., 2009, Hepatology 49: 1132-1140 and Xu et al., 2009, Mol. Immunology 46: 2640-2646). Следовательно, устранение циркулирующего HBsAg может быть решающим фактором обеспечения восстановления иммунокомпетентности у пациентов с хронической инфекцией гепатитом В. Эффективным способом устранения HBsAg в кровообращении является предотвращение образования и/или высвобождения субвирусных частиц (SVP) из инфицированных клеток (SVP являются основным переносчиком HBsAg в кровь). Морфогенез и внутриклеточный транспорт SVP может быть смоделирован *in vitro* в БНК-21 клетках, экспрессирующих небольшую форму HBsAg белка (sHBsAg), который является формой, особенно повышенной в SVP. Эта модель считается суррогатной моделью морфогенеза и транспорта HBV SVP (Patient et al., 2007, J. Virology 81: 3842-3851). Вследствие решающей роли сывороточного HBsAg в обеспечении хронического состояния HBV-инфекции эффективность соединений в этой модели демонстрирует их антивирусную активность против HBV.

Различные NAP соединения были протестированы на sHBsAg-экспрессирующих БНК-21 клетках, включая полностью деградированные фосфоротиоатные NAPs REP 2006 и REP 2107, нефосфоротиоатный, полностью 2' О-метилованный деградированный NAP (REP 2086), а также NAP, состоящий из поли АС последовательности: REP 2055 (SEQ ID NO: 2) и REP 2148 (SEQ ID NO: 3). Эти

NAP были введены в ВНК-21 клетки одновременно с матричной РНК для sHBsAg экспрессии с использованием электропорации. Активность на ВНК модельной системе оценивали посредством визуализации расположения HBsAg белка внутри клеток ВНК-21 с помощью иммуофлуоресцентной микроскопии. Образование SVP в перинуклеарном пространстве визуализировали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Соединения считались активными, если HBsAg ограничивался перинуклеарным пространством и не переходил на периферию клетки (секреция), или если было предотвращено образование SVP. Активность различных NAP-соединений суммирована в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Эффект различных NAP на транспорт HBsAg в клетках ВНК-21

NAP	HBsAg удерживается в перинуклеарном пространстве	HBsAg проходит на периферию клетки	Образование SVP
контроль (NAP не присутствует)	-	++++	++++
REP 2006	++++	-	-
REP 2107	+++	+	-
REP 2086	-	++++	++++
REP 2055 (SEQ ID NO: 2)	++++	-	не исследовано
REP 2148 (SEQ ID NO: 3)	++++	-	не исследовано

"-" - эффект не наблюдался;

"+" до "++++" - наблюдаемый эффект от минимального до полного.

Результаты обработки sHBsAg-экспрессирующих ВНК-21 клеток REP 2006 и REP 2107 демонстрируют способность NAP блокировать образование SVP и транспорт sHBsAg независимым от последовательности образом. Отсутствие активности при использовании REP 2086 показывает, что активность NAPs явно зависит от наличия фосфоротионирования. Более того, эта способность сохранялась в присутствии модификации 2' рибозы (в REP 2107) и модификации основания (5'метилцитозин в случае REP 2148). Кроме того, REP 2107, REP 2055, как известно, полностью лишены какой-либо иммуностимулирующей активности, были активными по сравнению с REP 2006. В свою очередь, определенная последовательность поли AC (REP 2055 и REP 2148) была сравнительно активной относительно вырожденной последовательности (REP 2006 и REP 2107).

Эти результаты показывают, что в контексте вырожденной последовательности и последовательности, содержащей повторы чередующихся пуриновых/пиримидиновых нуклеотидов, таких как AC (и, следовательно, также CA) и также таких как TG и GT или UG и GU и необязательно содержащих модификации 2' рибозы и/или модификации основания, предполагается, что NAP будут способны блокировать образование, внутриклеточный транспорт и секрецию SVPs из инфицированных клеток при длине олигонуклеотидов 20-120 нуклеотидов в соответствии с независимыми от последовательности свойствами NAPs, как описано в патентах США № 8008269 B2, 8008270 B2 и 8067385 B2.

Пример II.

Влияние устранения HBsAg из крови HBV-инфицированных пациентов на устранение других HBV белков и восстановление иммунологического потенциала.

Пациентов с хронической инфекцией HBV лечили NAP REP 2055 (также известный под названием REP 9AC, SEQ ID NO: 2) для устранения HBsAg из крови. Влияние введения REP 2055 (как правило, еженедельное дозирование 400 мг) на уровни HBsAg в крови контролировали с помощью количественного HbsAg-теста Abbott Architect™, результат представлен в табл. 3.

Таблица 3. Действие NAP REP 2055 на уровни HBsAg в крови у пациентов с хронической HBV инфекцией

Пациент	Предварительная обработка HBsAg (IU/мл)	В конце курса лечения HBsAg (IU/мл)
1	934	0,14
Пациент	Предварительная обработка HBsAg (IU/мл)	В конце курса лечения HBsAg (IU/мл)
2	1885,4	0,38
3	384,1	0,00
4	126465,07	0,03
5	158180	0,00
6	36996	7,00
7	4672,5	43,7

Удаление HBsAg из крови вызвало иммунологическое восстановление, что подтверждено уменьшением циркулирующего HBeAg (измеренного у двух пациентов с помощью количественного HBeAg

теста Abbott Architect™ - см. табл. 4), появлением свободных анти-HBsAg антител (измеренных с помощью количественного HBeAg теста Abbott Architect™ - см. табл. 5) и уменьшением HBV вируса в крови (HBV ДНК, измеренной с помощью количественного теста Roche Cobas™ - см. табл. 6). Уменьшение в кровообращении HBV вируса наблюдалось у всех пациентов, однако, в разной степени. Более того, уровни титров свободных анти-HBsAg антител, определенные в процессе лечения у большинства из этих пациентов, были умеренными в лучшем случае и в большинстве случаев хуже, чем титры анти-HBsAg антител в крови, наблюдаемые при HBsAg вакцинации здоровых неинфицированных взрослых людей.

Таблица 4. Действие устранения HBsAg на устранение HBeAg

Пациент	Предварительная обработка HBeAg (IU / мл*)	В процессе лечения HBeAg (IU /мл*)
1	1181,29	7,63
2	78,25	8,211

*измерено с помощью количественного анализа Abbott Architect™.

Таблица 5. Действие устранения HBsAg на обнаружение свободных анти-HBsAg антител у пациентов с хронической HBV инфекцией

Пациент	Предварительная обработка анти-HBsAg* (mIU/мл)	В конце курса лечения анти-HBsAg* (mIU/мл)
1	0	13,2
2	1	22,8
3	5,68	277
4	3	5,39
5	4,99	385,7
6	1	19,7
7	2	19,2

*измерено с помощью количественного анализа Abbott Architect™.

Таблица 6. Действие устранения HBsAg на уровни в крови вируса HBV (HBV DNA)

Пациент	Предварительная обработка HBV ДНК* (копий / мл сыворотки)	В конце курса лечения HBV ДНК* (копий / мл сыворотки)
1	2×10^6	< 500
2	$1,4 \times 10^7$	$1,39 \times 10^4$
3	$4,5 \times 10^7$	< 116
4	$1,9 \times 10^{12}$	$3,1 \times 10^6$
5	$7,9 \times 10^{11}$	< 116
6	$4,8 \times 10^{11}$	372
7	$1,8 \times 10^7$	$3,5 \times 10^6$

*измерено с помощью Roche Cobas™ анализа.

Прекращение лечения этих пациентов REP 2055 приводило к последующему длительному возобновлению вирусемии у 5/7 пациентов, у которых наблюдалось устранение HBV-белков в сыворотке (повторное возникновение HBsAg в крови, уменьшение или исчезновение анти-HBsAg антител из крови и увеличение HBV ДНК до уровней до начала лечения). Таким образом, лечение NAPs или любым другим средством, которое приводит к удалению HBsAg (и других HBV антигенов) из крови, предположительно будет претерпевать аналогичное возобновление вирусной активности, в том случае, если лечение останавливается при отсутствии какой-либо сопутствующей иммунотерапии.

Пример III.

Комбинированная терапия NAP хелатным комплексом и двумя разными иммунотерапевтическими средствами при лечении пациентов-людей с хроническим гепатитом В.

REP 2139-Са представляет собой кальциевый хелатный комплекс NAP REP 2139 (SEQ ID NO: 10), приготовленный в физиологическом растворе в соотношении 30 мг CaCl₂ на каждые 100 мг присутствующего олигонуклеотида. Препарат REP 2139 в виде кальциевого хелатного комплекса используется с целью улучшения переносимости введения ON (см. международную опубликованную заявку № WO 2012/021985 и опубликованную заявку США № 2012/0046348), при этом не препятствует его специфической противовирусной активности. REP 2139-Са (обычно вводится еженедельно в дозе 500 мг) устраняет HBsAg из крови (и в дальнейшем HBeAg) и HBV вирионы (HBV ДНК) у пациентов, инфицированных HBV, аналогичным образом как REP 2055 посредством того же самого механизма действия (см. табл. 3, 4 и 6 против 7, 8 и 9, соответственно) и следовательно также демонстрирует, что NAP, содержащие обе модификации 2' рибозы и модифицированные основания (например, REP 2139) могут уменьшать HBsAg в крови, и что ON, приготовленные в виде хелатных комплексов (например, REP 2139-Са), могут использоваться для уменьшения или устранения HBsAg из крови.

Таблица 7. Действие монотерапии REP 2139-Са на сывороточный HBsAg у пациентов с хронической HBV инфекцией

Пациент	Сывороточный HBsAg (мIU/мл)*	
	Предварительная обработка	REP 2139-Са
1	70050	0,19
2	13400	0
3	3654,3	0,34
4	47689,7	180,44
5	107659	32,15
6	58937,87	9,91
7	17988	29,21
8	125000	0,01
9	1288,56	0,02

*измерено с помощью количественного HBsAg анализа Abbott Architect™.

Таблица 8. Действие REP 2139-Са, вызывающего устранение HbsAg, на уровни HBeAg в сыворотке

Пациент	Сывороточный HBeAg (индекс*)	
	Предварительная обработка	REP 2139-Са
1	1,488	0,38
2	556,27	0,34
3	662,09	1,62
4	1100,43	0,31
5	1815,75	1,11
6	561,96	0,32
7	15,27	18,27
8	1767,85	0,40
9	101,73	19,35

* < 1 - не обнаружено, ≥ 1 - высокоинфекционное состояние.

Таблица 9. Действие монотерапии REP 2139-Са на сывороточную HBV ДНК (вирионы) у пациентов с хронической HBV инфекцией

Пациент	Сывороточный HBV (копий/мл)*	
	Предварительная обработка	REP 2139-Са
1	9,89x10 ⁸ **	791
2	1,66x10 ⁸	1680
3	2,01x10 ⁸	3643
4	1,28x10 ⁸	9060
5	9,89x10 ⁸	2,52x 10 ⁶
6	8,71 x 10 ⁸	558
7	7,1x10 ⁵	1,94x10 ⁴
8	9,89x10 ⁸	552
9	9,9x10 ⁶	3250

*измерено с помощью Roche Cobas™ анализа;

**верхняя граница количественного определения.

Как описано в примере II, ограничение NAP-терапии (или любой терапии, которая может устранять HBsAg) заключается в том, что хотя существующие у пациента количества выработанных анти-HBs "освобождаются" для избавления от вируса в ходе NAP-терапии, этот уровень выработки антител (и устранение иммуно-ингибирования, вызванного HBsAg) у большинства пациентов является недостаточным для того, чтобы обеспечить полный контроль над HBV-инфекцией после завершения лечения NAP. Устранение из крови HbsAg, опосредованное REP 2139, достигало тех же самых общих уровней анти-HbsAg антител в крови, как при использовании REP 2055 в монотерапии (см. табл. 5 и 10 [завершение монотерапии]), и собственно, как можно было ожидать, приводило к тому же самому слабому сохранению иммунологического контроля, как было в случае с NAP REP 2055, когда лечение было прекращено (смотри пример II выше). Результаты использования NAPs в монотерапии указывают на то, что лежащий в основе (и ранее нераспознанный) дефект в способности иммунной системы восстанавливать полностью компетентный иммунный ответ на HBV-инфекцию даже при отсутствии этих HBV-белков, вероятно, является результатом хронического воздействия HBsAg, HBeAg и HbcAg, что вызывает долговременное иммунологическое повреждение, которое сохраняется у HBV-инфицированных субъектов даже после устранения этих антигенов из крови.

Чтобы проверить, может ли NAP-лечение (которое устраняет HBsAg из крови) усиливаться иммуно-

терапией (стимулирование иммунной функции), пациенты, у которых были устранены или уменьшены сывороточные HBV-белки, находясь на REP 2139-Са монотерапии, получали или тимозин $\alpha 1$ (ZadaxinTM - 1.6 мг в виде подкожной инъекции два раза в неделю) или пегилированный интерферон α -2a (PegasysTM - 90 - 180 мкг в виде подкожной инъекции один раз в неделю) в качестве дополнительной терапии к продолжающемуся введению REP 2139-Са. Пегилированный интерферон α -2a продается под торговым названием PegasysTM компанией Roche Inc. (Basel, Швейцария) и одобрен для лечения хронической HBV-инфекции. Тимозин $\alpha 1$ продается под торговым названием ZadaxinTM компанией SciClone Pharmaceuticals (Foster City, California, США) и также одобрен для лечения хронической HBV-инфекции.

Монотерапия на основе интерферона в большинстве случаев дает в результате только умеренный уровень (<50 мIU/мл) анти-HBsAg антител в крови у очень небольшой части пациентов (<10%) после 48 недель лечения (Reijnders et al., 2011, J. Hepatol., 54: 449-454; Harayiannis et al., 1990, J. Hepatol., 10: 350-352), и противовирусные эффекты тимозина $\alpha 1$ являются аналогичным образом ограниченными (Yang et al., 2008, Antiviral Res. 77: 136-141). Однако после добавления к лечению REP 2139-Са тимозина $\alpha 1$ или пегилированного интерферона α -2a было достигнуто удаление HBsAg из крови, при этом значительное увеличение уровней анти-HBsAg антител было достигнуто у всех пациентов, причем уровни значительно превышали уровни анти-HbsAg, наблюдаемые при использовании NAR-опосредованного устранения HBsAg в отдельности или уровни, о которых сообщалось при использовании иммунотерапии в отдельности (см. табл.10). Более того, это явное синергетическое действие на увеличение уровней анти-HBsAg антител было достигнуто всего лишь за 13 недель иммунотерапии в комбинации с REP 2139-Са (по сравнению с 48 недельным режимом, обычно назначаемым для проведения такой иммунотерапии), а также наблюдалось у двух пациентов, получавших половину дозы Pegasys (90 мкг), обычно назначаемой для лечения HBV. Кроме того, этот синергетический ответ наблюдался у 9/9 (100%) пациентов. Значительная реактивация выработки анти-HbsAg, наблюдаемая при использовании дополнительной иммунотерапии после удаления HBV-белка из крови, является единственным прямым критерием синергетически улучшенного функционирования иммунотерапии в отсутствие HBsAg. Опираясь на эти открытия, можно предсказать синергетически улучшенную активность в других областях иммуностимуляции, таких как опосредованный Т-клетками иммунитет и врожденный иммунитет, которые также могут быть необходимы для достижения полного иммунологического контроля над HBV-инфекцией.

Таблица 10. Синергетическое действие на выработку анти-HBsAg после комбинированного лечения REP 2139-Са и тимозином $\alpha 1$ или пегилированным интерфероном α -2a

Иммунотерапевтическое средство, даваемое в комбинации	Пациент	Сывороточное анти-HBsAg антитело (мIU/мл)*	
		REP 2139-Са (завершение монотерапии)	REP 2139-Са + дополнительная иммунотерапия **
Тимозин $\alpha 1$	1	19,36	987,03
	2	365	1302
	3	44,64	1108
Пегилированный интерферон α -2a	4***	5,36	381,57
	5***	2,12	288,85
	6	1,64	798,22
	7	19,69	223,29
	8	42,07	242,31
	9	42,61	499,05

*измерено с помощью Abbott ArchitectTM количественного анти-HBsAg анализа ELISA;

**13 недель непрерывной иммунотерапии (дополнительной) после того, как было достигнуто уменьшение HBsAg при использовании REP 2139-Са монотерапии;

***эти два пациента получили 90 мкг Pegasys/неделю.

Результаты, представленные в табл. 10, демонстрируют, что устранение сывороточного HBsAg оказывает значительное синергетическое действие на способность тимозина $\alpha 1$ или пегилированного интерферона α -2a стимулировать иммунную функцию, что ранее не было предположено в данной области техники. У всех пациентов были достигнуты очень высокие титры анти-HBsAg антител (и таким образом, видимо, более эффективная общая иммунная стимуляция) при использовании существенно более короткого режима иммунотерапии, чем обычно требуется для достижения даже намного более низких титров анти-HBsAg антител в крови при использовании в монотерапии, да и то только у небольшой части пациентов. В табл. 10, все пациенты с устраненным сывороточным HBsAg сильно реагировали на иммунотерапию. Во многих случаях явное увеличение выработки анти-HBsAg было обнаружено уже через 6-10 недель иммунотерапии. Эти синергетические эффекты на стимуляцию иммунитета хозяина приводили к контролю HBV-инфекции при отсутствии лечения у 8/9 пациентов и явно демонстрируют синергетическое влияние восстановления компетентного иммунного ответа у большинства пациентов с HBV-инфекцией, в том случае, когда иммунотерапия проводится в отсутствие циркулирующего HBsAg.

Эти результаты демонстрируют, что любое фармацевтически приемлемое средство, способное уменьшать или устранять HBsAg из крови, при введении в комбинации с иммунотерапевтическим средством, будет оказывать полезное и синергетическое действие на стимуляцию иммунной функции (такую как, но без ограничения, выработка анти-HBsAg антител) у пациентов с хроническим HBV. Пример III явно показывает, что удаление HBsAg из крови синергетически улучшает способность иммунотерапии вызывать сильный вторичный антивирусный иммунный ответ хозяина и дает веские основания предполагать, что постоянно циркулирующий HBsAg в крови пациентов, получающих только иммунотерапию, оказывает значительное ингибирующее действие на активность иммунотерапии и вероятно обуславливает низкую результативность принятой иммунотерапии в достижении иммунологического контроля над инфекцией, которая продолжается при отсутствии лечения. Пример III также явно показывает, что синергетическое действие на восстановление иммунной функции наблюдалось у всех пациентов, у которых уровни анти-HBsAg в крови были достигнуты намного быстрее и на более высоких уровнях, чем уровни, наблюдаемые при иммунотерапии в отдельности, во всех случаях превышая уровни анти-HBsAg антител, которые обычно наблюдаются у здоровых, неинфицированных HBsAg вакцинированных индивидуумов. Эти эффекты могут достигаться даже при использовании низких доз иммунотерапии (Pegasyс в дозе 90 мкг/неделю), которые, как известно, являются недостаточными (субоптимальными) при использовании в монотерапии. В случае удаления только HBV-белка или в случае только одной иммунотерапии эти сильные защитные уровни анти-HBsAg антител наблюдаются редко.

Удаление сывороточного HBsAg, достигнутое при использовании NAPs в текущем раскрытии, является примером самого лучшего эффекта, который может быть достигнут при использовании какого-либо другого средства, разработанного для уменьшения или устранения HBsAg (или других HBV антигенов) из крови, независимо от механизма его действия. Собственно, происходящий синергизм между удалением HBsAg из крови и стимуляцией иммунной функции, наблюдаемый при использовании NAP и иммунотерапевтических средств Pegasyс™ и Zadaxin™, явно демонстрирует специалисту в данной области техники, что теперь появление подобных синергетических эффектов в сочетании с иммунотерапией может быть надежно предсказано при использовании какого-либо средства, способного уменьшать или устранять HBsAg из крови, независимо от химической структуры или механизма действия средства. Следовательно, данное раскрытие предоставляет очевидную и новую идею о том, что при HBV-инфекции синергетическое воздействие на стимуляцию иммунитета у HBV-инфицированных пациентов при использовании NAPs в комбинации с Zadaxin™ или Pegasyс™ может быть получено с помощью комбинации какого-либо средства или способа, способного уменьшать или устранять HBsAg из крови, и какого-либо второго средства, способного стимулировать иммунную функцию. Также можно предполагать, что синергетическое действие, продемонстрированное при использовании REP 2139-Ca и тимозина $\alpha 1$ или пегилированного интерферона $\alpha 2a$, будет наблюдаться при использовании других комбинаций средств, как изложено в настоящем раскрытии, в тех случаях, когда первое средство способно уменьшать или устранять HBsAg из крови, а второе средство способно стимулировать иммунную функцию. Кроме того, можно предположить, что комбинации двух или более разных средств, способных уменьшать или устранять HBsAg из крови, с двумя или более различными иммунотерапевтическими средствами также могут оказывать сходное или превосходящее действие.

Наряду с тем, что удаление одного HBsAg из крови видимо обеспечивает большую часть синергетического воздействия на иммунотерапию, дополнительное удаление HBeAg и HBcAg также может немного способствовать синергетическому эффекту вследствие свойственных для них иммуноингибиторных свойств. Таким образом, дополнительное удаление HBeAg и HBcAg из крови (эффект также достигается при использовании NAPs) может предоставить минимальное преимущество, однако будет иметь небольшой эффект или не будет иметь эффекта без устранения HBsAg.

Поразительный эффект, что удаление или устранение HBsAg из крови оказывает воздействие на общепринятую иммунотерапию, также может существенно улучшить эффект вакцин к HBV антигенам при введении в терапевтическом плане. Исходя из предоставленного раскрытия, специалист в данной области может обоснованно исходить из того, что циркулирующий HBsAg ингибирует полностью стимулированный ответ на вакцину у HBV-инфицированных субъектов, и кроме того, что ответ на вакцину может быть значительно улучшен при введении в отсутствие или при уменьшенных уровнях HBsAg.

Пример IV.

Комбинированное лечение REP 2139-Ca/Pegasyс™ в начале терапии у пациентов с хроническим гепатитом В.

В новой группе HBV-инфицированных пациентов оба препарата, REP 2139-Ca (500 мг один раз в неделю) и Pegasyс™ (180 мг еженедельно), были назначены с начала терапии, чтобы посмотреть, будут ли достигнуты синергетические эффекты, наблюдаемые в примере III, на ранних этапах лечебного режима. У этих трех пациентов наблюдалось быстрое и резкое уменьшение сывороточного HBsAg и быстрый рост титров свободных анти-HBsAg антител (см. табл.11).

Таблица 11. Синергизм REP 2139-Ca и Pegasys™ при комбинированном применении в начале лечения

Пациент	Сывороточный HBsAg (U / мл*)		Сывороточный анти-HBsAg (мIU / мл*)	
	Предварительное лечение	Лечение неделя 9	Предварительное лечение	На фоне лечения
1	2510,66	0,17	0,48	123,75 (неделя 17)
2	4789,73	0,02	0,4	521,57 (неделя 15)
3	3338,24	0,05	0,8	646,42 (неделя 11)

*измерено с помощью Abbott Architect™.

Результаты примера IV показывают, что синергизм одновременного комбинирования удаления HBsAg из крови с иммунотерапией может наблюдаться очень рано в ходе лечения, когда NAPs и Pegasys™ оба назначаются в начале лечения. Кроме того, эти результаты и результаты, представленные в примере III, показывают, что значительное улучшение действия иммунотерапии может наблюдаться в том случае, когда иммунотерапия добавляется после достижения удаления HBsAg из крови, или когда иммунотерапия добавляется во время удаления HBsAg из крови (т.е. в начале лечения).

Несмотря на то что примеры II, III и IV касаются пациентов с HBV моноинфекцией, в виду решающей и хорошо обоснованной роли, которую HBsAg играет в образовании HDV-вируса и иммуносупрессии при HBV/HDV коинфекции, эти примеры предоставляют очевидную идею о том, что представления, изложенные в настоящем раскрытии, должны быть применимы как к HBV моноинфекции, так и HBV/HDV коинфекции.

Приведенное выше описание предназначается только для иллюстрации, и специалисту в данной области техники будет понятно, что могут быть сделаны изменения описанных вариантов осуществления в пределах объема изобретения, определенного прилагаемыми пунктами формулы изобретения. Однако другие модификации, которые попадают в рамки настоящего изобретения, определенные в прилагаемых пунктах формулы изобретения, будут очевидны для специалистов в данной области техники в свете и с учетом этого раскрытия.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения инфекции гепатитом В или коинфекции гепатитом В/гепатитом D, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту

по меньшей мере одного первого фармацевтически приемлемого средства, выбранного из олигонуклеотидного хелатного комплекса, содержащего следующие SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10; и полимера нуклеиновой кислоты, выбранного из фосфоротиоатного олигонуклеотида длиной 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности AC; фосфоротиоатного олигонуклеотида длиной 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности CA; фосфоротиоатного олигонуклеотида длиной 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности UG; фосфоротиоатного олигонуклеотида длиной 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности GU; фосфоротиоатного олигонуклеотида длиной 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности TG; или фосфоротиоатного олигонуклеотида длиной 20-120 нуклеотидов, содержащего повторы последовательности GT; и

по меньшей мере одного второго фармацевтически приемлемого иммунотерапевтического средства, выбранного из тимозина $\alpha 1$; интерферона $\alpha 2a$; интерферона $\alpha 2b$; интерферона $\alpha N3$; интерферона $\beta 1a$; интерферона $\beta 1b$; интерферона $\gamma 1b$; интерферона $\lambda 1$; интерферона $\lambda 2$; интерферона $\lambda 3$; пэгилированного интерферона $\alpha 2a$; пэгилированного интерферона $\alpha 2b$; пэгилированного интерферона $\lambda 1$; пэгилированного интерферона $\lambda 2$.

2. Способ по п.1, где полимер нуклеиновой кислоты дополнительно содержит по меньшей мере один 5' метилцитозин.

3. Способ по п.1, где все цитозины, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, присутствуют в виде 5' метилцитозина.

4. Способ по п.1, где полимер нуклеиновой кислоты дополнительно содержит по меньшей мере одну 2'-О-метил модификацию рибозы и по меньшей мере один 5' метилцитозин.

5. Способ по п.1, где все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, имеют модификацию 2'-О-метила, а все цитозины присутствуют в виде 5' метилцитозина.

6. Способ лечения инфекции гепатитом В или коинфекции гепатитом В/гепатитом D, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту

по меньшей мере одного первого фармацевтически приемлемого средства, выбранного из олигонуклеотида, выбранного из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 или 10; и полимера нуклеиновой кислоты, выбранного из фосфоротиоатного олигонуклеотида длиной 20-120 нуклеотидов, состоящего из повторов последовательности AC; и фосфоротиоатного олигонуклеотида длиной 20-120 нуклеотидов, состоящего из повторов последовательности CA; и

по меньшей мере одного второго фармацевтически приемлемого средства, выбранного из тимозина $\alpha 1$; любого пэгилированного интерферона α ; любого пэгилированного интерферона β ; любого пэгилиро-

ванного интерферона γ ; любого пэгилированного интерферона λ ,

где все цитозины, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, присутствуют в виде 5' метилцитозина.

7. Способ по п.1 или 6, где полимер нуклеиновой кислоты дополнительно содержит по меньшей мере одну 2' модификацию рибозы.

8. Способ по п.1 или 6, где все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, имеют 2' модификацию.

9. Способ по п.1 или 6, где полимер нуклеиновой кислоты дополнительно содержит по меньшей мере одну 2'-О-метил модификацию рибозы.

10. Способ по п.1 или 6, где все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, имеют модификацию 2' О-метила.

11. Способ лечения инфекции гепатитом В или коинфекции гепатитом В/гепатитом D, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту

по меньшей мере одного первого фармацевтически приемлемого средства, выбранного из олигонуклеотида, выбранного из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 или 10; и полимера нуклеиновой кислоты, выбранного из фосфоротиоатного олигонуклеотида длиной 20-120 нуклеотидов, состоящего из повторов последовательности AC; и фосфоротиоатного олигонуклеотида длиной 20-120 нуклеозидов, состоящего из повторов последовательности CA; и

по меньшей мере одного второго фармацевтически приемлемого средства, выбранного из тимозина $\alpha 1$; любого пэгилированного интерферона α ; любого пэгилированного интерферона β ; любого пэгилированного интерферона γ ; любого пэгилированного интерферона λ ;

где у указанных олигонуклеотидов все рибозы, содержащиеся в полимере нуклеиновой кислоты, имеют модификацию 2'-О-метила, а все цитозины присутствуют в виде 5' метилцитозина.

12. Способ по п.6 или 11, где указанное по меньшей мере одно второе фармацевтически приемлемое средство является пэгилированным интерфероном $\alpha 2a$, пэгилированным интерфероном $\alpha 2b$, пэгилированным интерфероном $\lambda 1$ или пэгилированным интерфероном $\lambda 2$.

13. Способ по любому из пп.1, 6 или 11, где указанные по меньшей мере одно первое фармацевтически приемлемое средство и по меньшей мере одно второе фармацевтически приемлемое средство входят в состав одной фармацевтической композиции.

14. Способ по любому из пп.1, 6 или 11, где указанные по меньшей мере одно первое фармацевтически приемлемое средство и по меньшей мере одно второе фармацевтически приемлемое средство входят в состав отдельных фармацевтических композиций.

15. Способ по любому из пп.1, 6 или 11, где указанные по меньшей мере одно первое фармацевтически приемлемое средство и по меньшей мере одно второе фармацевтически приемлемое средство вводятся одновременно.

16. Способ по любому из пп.1, 6 или 11, где указанные по меньшей мере одно первое фармацевтически приемлемое средство и по меньшей мере одно второе фармацевтически приемлемое средство вводятся различными путями.

17. Способ по любому из пп.1, 6 или 11, где указанные первое и второе средства вводятся с помощью одного или более из следующих способов: перорального приема внутрь, аэрозольной ингаляции, подкожной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутривенной инъекции и внутривенного вливания.

18. Способ по п.6 или 11, который включает дополнительное введение третьего фармацевтически приемлемого агента, содержащего одно или несколько фармацевтически приемлемых средств, выбранных из тенофовира дизопроксил фумарата, энтекавира, телбувидина, адефовира дипивоксила и ламивудина.

19. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 2 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит пэгилированный интерферон $\alpha 2a$.

20. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 3 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит пэгилированный интерферон $\alpha 2a$.

21. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 10 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит пэгилированный интерферон $\alpha 2a$.

22. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 2 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит тимозина $\alpha 1$.

23. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 3 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит тимозина $\alpha 1$.

24. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 10 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит тимозина $\alpha 1$.

25. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 2 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит интерферона $\alpha 2b$.

26. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 3 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит интерферона $\alpha 2b$.

27. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 10 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит интерферона $\alpha 2b$.

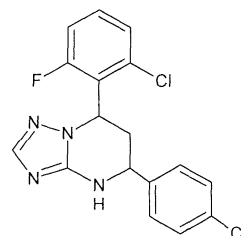
28. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 2 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит пэгилированный интерферон $\lambda 1$.

29. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 3 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит пэгилированный интерферон $\lambda 1$.

30. Способ по п.1, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту первого фармацевтически приемлемого средства, которое содержит олигонуклеотидный хелатный комплекс SEQ ID NO: 10 и второго фармацевтически приемлемого средства, которое содержит пэгилированный интерферон $\lambda 1$.

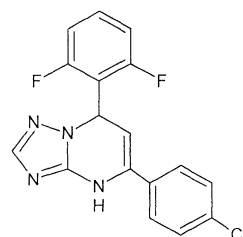
A

7-(2-хлор-6-фторфенил)-5-(4-хлорфенил)-4,5,6,7-тетрагидро[1,2,4]триазоло-[1,5- α]пиримидин



B

5-(4-хлорфенил)-7-(2,6-дифторфенил)-4,7-дигидро[1,2,4]триазоло[1,5- α]пиримидин



Фиг. 1А, В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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