

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291676 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.04(22) Дата подачи заявки
2021.01.14

(51) Int.Cl. A61K 31/167 (2006.01) A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/397 (2006.01) A61K 31/55 (2006.01)
A61K 31/4045 (2006.01) A61K 31/575 (2006.01)
A61K 31/4162 (2006.01) A61K 31/675 (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01) A61K 31/7056 (2006.01)
A61K 31/423 (2006.01) A61K 31/7072 (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01) A61K 31/708 (2006.01)
A61K 31/439 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01) A61K 38/21 (2006.01)
A61K 31/4545 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)

(54) ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АГОНИСТА FXR ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА D

(31) 20305024.0

(32) 2020.01.15

(33) EP

(86) PCT/EP2021/050625

(87) WO 2021/144330 2021.07.22

(71) Заявитель:
ЭНСЭРМ (ЭНСТИТИУ НАСЪОНАЛЬ
ДЕ ЛЯ САНТЕ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ); ЭКОЛЬ НОРМАЛЬ
СЮПЕРЬЕР ДЕ ЛИОН;
ЮНИВЕРСИТЕ КЛОД БЕРНАР
ЛИОН 1; САНТР НАСЪОНАЛЬ ДЕ
ЛЯ РЕШЕРШ СЪЯНТИФИК; ЭНИО
ФАРМА (FR)

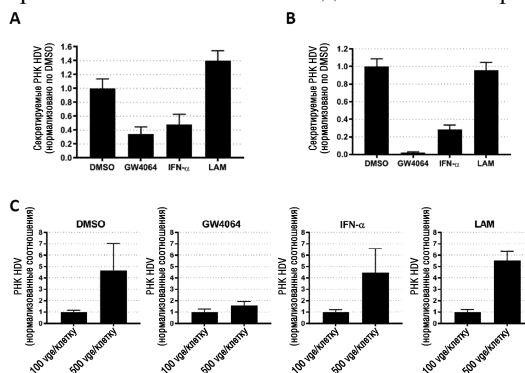
(72) Изобретатель:

Дартей Рафаэль, Люсифора Жюли,
Дюрантель Давид, Рамьер Кристоф
(FR), Лакомб Бенуа (CH), Лотто
Венсан, Андре Патрис (FR)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к применению агониста FXR для лечения инфекции гепатита D.



202291676
A1

202291676

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574459EA/019

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АГОНИСТА FXR ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА D

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области медицины, в большей степени к гепатологии и вирусологии, а более конкретно к лечению инфекции, вызванной вирусом гепатита D (HDV).

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Инфекция, вызванная вирусом гепатита D (HDV), является наиболее тяжелой формой хронического вирусного гепатита из-за быстрого прогрессирования заболевания, связанного с поражением печени и гепатоцеллюлярной карциномой. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 15-20 миллионов человек инфицированы HDV (www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d). Самый последний метаанализ бремени HDV свидетельствует о недооценке распространенности гепатита D; действительно, серопревалентность такового может достигать 0,98% в мировой популяции и 10,58% у пациентов с хроническим гепатитом B (Chen H-Y et al. Gut 2019; 68: 512-521). При отсутствии специфической анти-HDV-терапии современные руководства обычно рекомендуют подкожное введение пегилированного интерферона-альфа-2а (PEG-IFN- α 2a), который является неспецифическим иммуностимулятором, довольно токсичным и плохо переносимым пациентами. Он часто используется в дополнение к аналогам нуклеозидов, контролирующим виремию HBV. Общая частота устойчивого вирусологического ответа низка. Действительно, имеются сообщения, что частота ответа на лечение составляет около 25%, а уровень рецидивов после прекращения лечения довольно высок. Соответственно, существует неудовлетворенная потребность в новых терапевтических средствах и стратегиях лечения инфекций, вызванных HDV. В то же время, существует ряд трудностей в разработке терапевтических средств для таких пациентов.

Геном HDV представляет собой одноцепочечную РНК ($\approx$ 1700 нуклеотидов) отрицательной полярности, содержащую одну открытую рамку считывания, кодирующую два вирусных белка: малый и большой дельта-антигены (HDAg-S и HDAg-L). Репликация генома РНК HDV происходит в ядрах инфицированных клеток по механизму катящегося кольца с последующим расщеплением эндогенными рибозимами и лигированием, что приводит к образованию антигеномных кольцевых мономеров. Из этих кольцевых антигеномных мономеров те же самые механизмы генерируют новые мономеры геномной кольцевой РНК. Предполагается, что HDV использует ДНК-зависимую РНК-полимеразу хозяина на этапах репликации генома. HDV использует по меньшей мере РНК-полимеразу II как для репликации, так и для транскрипции вирусной мРНК, но, по предположению, могут быть задействованы также РНК-полимеразы I и III (Mentha N et al. J Adv Res. 2019 May; 17:3-15). Во время этого процесса также синтезируются вирусные линейные мРНК,

что приводит к синтезу HDAg-S и HDAg-L. По сравнению с HDAg-S (195 аминокислот), HDAg-L (214 аминокислот) содержит дополнительный домен из 19-20 аминокислот на своем С-конце, возникший в результате ADAR-1 опосредованного РНК-редактирования антигеномной РНК HDV в положении, соответствующим стоп-кодону гена HDAg-S (Wong SK, Lazinski DW. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 12;99(23):15118-23). HDAg-S участвует в накоплении HDV на этапе репликации. В частности, считается, что HDAg-S взаимодействует с многочисленными клеточными белками (более 100 идентифицированных взаимодействующих агентов) и присутствует в ядерном комплексе в ассоциации с клеточными белками, участвующими в регуляции транскрипции, такими как Yin Yang 1 (YY1), гистон-ацетилтрансфераза (HAT), p300 Creb Binding Protein (p300/CBP) и фактор селективности 1 (SL1), принадлежащий прединициационному комплексу РНК-полимеразы I (Huang WH et al. *J Virol*. 2008 Aug;82(15):7313-24; Li Y-J et al. *J Virol*. 2006 Jul;80(13):6478-86). Взаимодействие HDAg-S с клеточным гистоном H1.4 также было описано в связи с вирусной репликацией (Lee CZ, Sheu JC. *Virology*. 2008 May 25;375(1):197-204). В то время как HDAg-S в основном участвует на этапе репликации, HDAg-L необходим для почкования вириона. Дополнительный домен из 19-20 аминокислот в HDAg-L содержит CXXX-box мотив, который является субстратом для клеточной фарнезилтрансферазы, добавляющей фарнезильную группу к цистеину данного CXXX-box мотива. Было показано, что данный процесс фарнезилирования необходим для сборки вириона (Glenn J et al. *Science*. 1992 May 29;256(5061):1331-3). На данном этапе HDV захватывает поверхностные антигены HBV для собственного использования и секреции инфекционных вирионов HDV, способных распространять или поддерживать инфекцию. Вирионы HBV и HDV содержат одни и те же белки оболочки и неразличимы с точки зрения гуморального ответа. Следовательно, HBV и HDV имеют один и тот же входной рецептор, то есть полипептид, котранспортирующий таурохолат натрия (NTCP), основной переносчик желчных кислот (bile acid, (BA)) на базолатеральной мембране гепатоцитов (Yan H et al. *eLife [Интернет]*. 2012 Nov. 13 [цитировано 3 сентября 2019 г.]; 1. Доступно по адресу: <https://elifesciences.org/articles/00049>). В следствие такого вирусного симбиоза, передача HDV обычно происходит путем коинфекции или суперинфекции HBV. Однако, несмотря на решающую роль HB-антигенов (HBAg) в проникновении в гепатоциты, другие описанные выше этапы жизненного цикла HDV, в частности процесс репликации, не зависят от HBV и сами по себе определяют тяжесть заболевания, способствуя быстрому развитию цирроза печени и HCC. Кроме того, при типичном течении суперинфекции HDV маркеры инфекции HBV обычно ингибируются, при этом IgM анти-HBc и ДНК HBV могут быть отрицательными (Romeo R, Perbellini R. *World J Hepatol* 2015;7:2389-95), Schaper M et al. *J Hepatol*. 2010;52:658-64). Однако, репликация HBV обычно подавляется до низких уровней во время острой фазы инфекции HDV. Это подавление становится постоянным при установлении диагноза хронического гепатита D.

Коинфекция HDV и HBV представляет собой сложную ситуацию, в которой

сочетаются черты, как характерные для каждого вируса, так и некоторые общие для обоих вирусов. Важно отметить, что в недавних исследованиях сообщалось, что добавление стандартного лечения HBV, направленного на ингибирование специфической полимеразы HBV с помощью аналогов нуклеотидов, к стандартному лечению HDV с помощью PEG-IFN-2a не улучшает частоту HDV-ответа в конце лечения (Wedemeyer H et al. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 19:275-286; Mentha N et al. *J. Adv. Res.* 2019; 17:3-17). Эти результаты ясно подчеркивают, что для гепатита D необходимы альтернативные варианты лечения, направленные на этапы репликации HDV. Действительно, лонафарниб, ингибитор фермента фарнезилтрансферазы, обеспечивающего обязательный этап сборки вириона, подавляет репликацию HDV независимо от HBV (заявка US20110129549A1; Mentha N, Clns.google.com/patAlfaiate D. *J. Adv. Res.* 2019; 17:3-17). Однако токсичность такового препятствует его широкому использованию в анти-HDV терапии. В настоящее время разрабатываются несколько других противовирусных молекул, направленных на взаимодействие HDV с HBsAg HBV: Myrcludex B, блокирующий проникновение HDV в гепатоциты путем ингибирования связывания HBsAg с NTCP, siRNA, подавляющая мРНК HBV, включая мРНК HBsAg, и REP 2139, который, как считается, ингибируют высвобождение HBsAg из гепатоцитов и взаимодействуют с дельта-антигеном гепатита (Ye X et al. *ACS Infect. Dis.* 2019; 5:738-5:7; Mentha N et al. *J. Adv. Res.* 2019; 17:3-17).

Кроме этого, лечение анти-HDV должно ингибировать по меньшей мере один этап репликации HDV. Этап репликации может быть специфичным для HDV, как, например, пренилирование HDAg-L, или же общим с HBV, этап репликации может быть ингибирован путем ингибирования синтеза, высвобождения или функции HBsAg. В идеале лечение гепатита D должно подавлять не только репликацию HDV, но и репликацию HBV путем ингибирования определенных этапов репликации каждого вируса. В сообщениях о соединениях, нацеленных на общую HBsAg-зависимость обоих вирусов, не сообщалось о такой молекуле, которая могла бы специфически подавлять как репликацию HDV, так и репликацию HBV. Молекулы, ингибирующие оба вируса, являются предметом активных исследований, поскольку трудно предсказать, как отреагирует другой вирус, если лечение нацелено только на один вирус. Существует риск активации или реактивации одного вируса при ингибировании другого. Например, при разработке противовирусных средств против HCV было замечено, что у пациентов, коинфицированных HBV, реактивация HBV происходила при нацеливании на HCV (Ma et al., *Gastroenterology*, 2018, 154, 795-798). Таким образом, пациенты с коинфекцией HBV и HDV, как правило, исключаются из клинических испытаний. Действительно, обзор 2016 года сообщает, что менее 1000 пациентов с коинфекцией HDV были включены в клинические испытания (Guglielmi S et al, 2016, *Revue médicale Suisse*, 12, 1415-1418).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения выявили способность нескольких агонистов FXR предотвращать репликацию РНК-генома HDV в моделях моноинфекции HDV. Этот результат особенно удивителен, поскольку, если агонисты FXR являются известными

ингибиторами образования cccDNA и транскрипции HBV (Mouzannar K et al. FASEB J. 2018; 33:2472-33:2), их влияние на HDV не зависит от присутствия HBV. Таким образом, механизм действия агонистов FXR на HDV является новым и оригинальным, так как действует на специфические этапы репликации HDV. Кроме того, изобретатели продемонстрировали способность нескольких агонистов FXR ингибировать продукцию двух белков HDV, а именно малого антигена гепатита D (HDAg-S) и большого антигена гепатита D (HDAg-L). На моделях коинфекции HBV и HDV изобретатели показали, что агонисты FXR подавляют как репликацию, так и продукцию вирусов. Таким образом, данные результаты открывают новый способ лечения инфекции гепатита D, в частности хронической инфекции гепатита D, с помощью нового противовирусного класса молекул, которые специфически и независимо ингибируют репликацию HDV и HBV.

Настоящее изобретение относится к агонисту фарнезоидного X-рецептора (FXR) для применения для лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита D (HDV), у субъекта, нуждающегося в этом.

Необязательно, субъект страдает от хронической инфекции HDV.

Необязательно, агонист FXR представляет собой селективный агонист FXR.

В конкретном аспекте агонист FXR выбран из группы, состоящей из LJN452 (Тропифексор), LMB763 (Нидуфексор), GS-9674 (Цилофексор), PX-102 (PX-20606), PX-104 (Фенекс 104, Phenex 104), OCA (Окалива, Ocaliva), EDP-305, TERN-101 (LY2562175), MET-409, GW4064, WAY362450 (турофексорат изопропил), фексарамин, AGN242266 (AKN-083), BAR502 и EYP001. В особом аспекте агонистом FXR является EYP001.

Необязательно, агонист FXR предназначен для применения в комбинации с интерфероном альфа (IFN- α), интерфероном лямбда или пегилированной формой такового, и предпочтительно выбран из группы, состоящей из IFN- α 1a, IFN- α 1b, IFN- α 2a, IFN- α 2b и IFN- λ 1a или пегилированных форм таковых, более предпочтительно PEG-IFN- α 2a (например, Пегасис (Pegasys)), PEG-IFN- α 2b (например, вираферон-пег (ViraferonPeg) или Интрона (Introna)) или PEG-IFN- λ 1a.

Необязательно, агонист FXR предназначен для применения в комбинации с анти-HDV агентом, предпочтительно аналогом нуклеозида или ингибитором фарнезилтрансферазы. В конкретном аспекте указанное анти-HDV агент выбран из группы, состоящей из рибавирина, ритонавира, лонафарниба и EBP 921.

Необязательно, агонист FXR предназначен для применения в комбинации с анти-HBV агентом, предпочтительно аналогом нуклеозида. В конкретном аспекте указанный аналог нуклеозида выбран из группы, состоящей из ламивудина, адефовира, телбивудина, энтекавира, тенофовира и эмтрицитабина.

Необязательно, агонист FXR предназначен для применения в комбинации с агентом против HBV/HDV, предпочтительно аналогом нуклеозида, полимером нуклеиновой кислоты или ингибитором NTCP. В конкретном аспекте указанный агент против HBV/HDV выбран из группы, состоящей из эзетимиба, миркладекса B, полимера нуклеиновой кислоты REP 2139 и полимера нуклеиновой кислоты REP 2165.

Необязательно, субъект не ответил на предыдущее лечение инфекции HDV. В первом аспекте предшествующее лечение представляет собой лечение PEG-IFN α . В другом конкретном аспекте предшествующее лечение представляет собой лечение анти-HDV агентом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к агонистам фарнезоидного X-рецептора (FXR) для применения при лечении инфекции, вызванной вирусом гепатита D (HDV), у субъекта, нуждающегося в этом.

Настоящее изобретение относится к способу лечения инфекции вируса гепатита D (HDV) у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества агониста фарнезоидного X-рецептора (FXR).

Настоящее изобретение относится к применению агониста FXR для изготовления лекарственного средства для лечения инфекции вируса гепатита D (HDV).

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей агонист FXR, для применения при лечении инфекции, вызванной вирусом гепатита D (HDV), у субъекта, нуждающегося в этом.

Пациенты

Используемый здесь термин «пациент, инфицированный вирусом гепатита D» означает пациента, инфицированного любым генотипом вируса гепатита B, например, генотипом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

Согласно изобретению, термины «субъект» или «пациент» и «субъект, нуждающийся в этом» или «пациент, нуждающийся в этом» используются для человека или млекопитающего, не являющегося человеком, инфицированного или потенциально инфицированного вирусом гепатита D. В некоторых аспектах изобретения субъект страдает хронической инфекцией HDV.

Термин «коинфицированные пациенты» относится к лицам, одновременно инфицированным HBV и HDV. Термин «суперинфицированные пациенты» относится к лицам, которые сначала были инфицированы HBV, а затем инфицированы HDV.

В соответствии с аспектом изобретения термины «пациенты с неэффективным лечением» относятся к лицам, у которых предыдущее лечение инфекции HDV было неэффективным. Следовательно, термин «пациенты с неэффективным лечением», как используется в данном документе, обычно относится к пациентам, инфицированным HDV, но не ответившим на лечение (называемые «не ответившими на лечение») или к тем, которые первоначально ответили на лечение, но у которых терапевтический ответ не сохранялся (так называемые «relapsers»).

В частности, хотя не существует эффективного лечения HDV или какого-либо одобренного FDA препарата для лечения хронического HDV, пегилированный модулятор иммунной системы интерферон альфа (PEG-IFN- α) в настоящее время используется в клинической практике и, таким образом, считается стандартом медицинской помощи при инфекции HDV. Следовательно, «пациенты с неэффективным лечением», как

используется в настоящем документе, обычно относится к пациентам, инфицированным HDV, не ответившим на лечение PEG-IFN- α (называемые «не ответившие на лечение») или которые первоначально ответили на лечение PEG-IFN- α , но у которых терапевтический ответ не сохранялся (так называемые «relapsers»).

Лечение

Используемые здесь термины «лечение» или «лечить» относятся как к профилактическому или превентивному лечению, так и к излечивающему или модифицирующему заболевание лечению, и включают лечение пациентов с риском заражения заболеванием или подозрением на заболевание, а также пациентов, которые больны или у которых было диагностировано заболевание или расстройство, а также включает подавление клинического рецидива. Лечение может быть назначено субъекту, страдающему соматическим расстройством или у которого в конечном итоге может развиться это расстройство, для предотвращения, лечения, отсрочки начала, снижения тяжести или улучшения одного или нескольких симптомов нарушения или рецидивирующего расстройства, или для продления выживания субъекта сверх ожидаемого в отсутствие такого лечения.

Эффективность лечения можно контролировать с помощью стандартных протоколов. Действительно, лечение можно сочетать с определением уровня HDV в сыворотке (вирусная нагрузка) или с измерением уровня аланинаминотрансферазы (ALT) в сыворотке. Например, пациентов можно обследовать на наличие РНК HDV в сыворотке. РНК HDV (МЕ/мл) могут быть измерены через регулярные промежутки времени во время лечения, например, в 1-й день (до введения дозы и через 4, 8 и 12 часов после введения дозы) и перед введением дозы на 2-й день, 3-й день, день 8, 15-й, 29-й день, а также на 12-й, 24-й, 36-й, 48-й, 72-й неделе (если применимо) и при последующем наблюдении. Соответственно, эффективность лечения можно контролировать с использованием международно-признанных параметров, например: а) уровни РНК HDV в сыворотке контролируются с помощью чувствительных количественных анализов на основе RT-PCR для оценки влияния на репликацию вируса; б) сывороточные уровни ALT и/или аспаратаминотрансферазы (AST) контролируются для оценки влияния на воспаление печени и гибель клеток печени.

«Лечение» может относиться к лечению одним средством, если вводится только один агонист FXR, или к комбинированной терапии с другим терапевтическим агентом, таким как другой агонист FXR или противовирусный агент.

Лечение может быть назначено лицам, у которых была диагностирована инфекция HDV. Любая из вышеперечисленных схем лечения может быть назначена лицам, у которых предыдущее лечение инфекции HDV оказалось неэффективным (пациенты с неэффективным лечением).

Агонист FXR

Термин «FXR» относится к фарнезоидному X-рецептору, который представляет собой ядерный рецептор, активирующийся супрафизиологическими уровнями фарнезола

(Forman et al., Cell, 1995, 81, 687-693). FXR также известен как NR1H4, белок 14, взаимодействующий с рецептором ретиноида X (RXR), и рецептор желчных кислот (BAR). Содержащий консервативный ДНК-связывающий домен (DBD) и С-концевой лиганд-связывающий домен (LBD), FXR связывается и активируется различными естественными желчными кислотами (BAs), включая первичную хенодезоксихолевую кислоту желчных кислот (CDCA) и конъюгаты таковой с таурином и глицином. При активации гетеродимер FXR-RXR связывается с промоторной областью генов-мишеней и регулирует экспрессию нескольких генов, участвующих в гомеостазе желчных кислот. Гены-мишени FXR печени делятся на две основные группы. Первая группа снижает концентрацию печеночных желчных кислот за счет увеличения экспорта и снижения их синтеза. Вторая группа генов-мишеней FXR, таких как транспортный белок фосфолипидов PLTP и аполипопротеины, модулирует уровни липопротеинов в сыворотке и снижает концентрацию триглицеридов в плазме. Более подробный список генов, регулируемых FXR, см., например, в WO 03/016288, стр. 22-23. Патент США 6005086 раскрывает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок FXR млекопитающих. Полипептидные последовательности человека для FXR депонированы в базах данных нуклеотидов и белков под номерами доступа NM_005123, Q96RI1, NP_005114 AAM53551, AAM53550, AAK60271.

В данном описании термин «агонист FXR» имеет общепринятое значение в данной области техники и относится, в частности, к соединениям, которые функционируют путем нацеливания и связывания фарнезоидного X-рецептора (FXR) и которые активируют FXR по меньшей мере на 40% выше фона в анализе, описанного в Maloney et al. (J. Med. Chem. 2000, 43:2971-2974).

В некоторых вариантах осуществления агонист FXR по изобретению представляет собой селективный агонист FXR. Используемый здесь термин «селективный агонист FXR» относится к агонисту FXR, который не проявляет значительной перекрестной реактивности к одному или нескольким, а в идеале практически ко всем компонентам панели ядерных рецепторов, состоящей из LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR γ , PPAR δ , RXR α , RXR γ , VDR, PXR, ER α , ER β , GR, AR, MR и PR. Способы определения выраженной перекрестной реактивности описаны в J. Med. Chem. 2009, 52, 904-907.

Агонисты FXR хорошо известны специалистам в данной области техники.

Например, специалист в данной области может легко идентифицировать агонист FXR из следующих публикаций (раскрытие которых включено в настоящий документ в качестве ссылки):

Abenavoli L, et al. Pharmaceuticals (Basel). 2018 Oct 11;11(4). pii: E104. doi: 10.3390/ph11040104. Review.

Adorini L, et al. Drug Discov Today. 2012 Sep;17(17-18):988-97. doi: 10.1016/j.drudis.2012.05.012. Epub 2012 May 29. Review.

Akwabi-Ameyaw A, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2009 Aug 15;19(16):4733-9. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.06.062. Epub 2009 Jun 21.

- Akwabi-Ameyaw A, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Aug 1;18(15):4339-43. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.06.073. Epub 2008 Jun 28.
- Akwabi-Ameyaw A, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 Oct 15;21(20):6154-60. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.08.034. Epub 2011 Aug 11.
- Baghdasaryan A, et al. *Hepatology*. 2011 Oct;54(4):1303-12. doi: 10.1002/hep.24537.
- Bass JY, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Jun 1;19(11):2969-73. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.04.047. Epub 2009 Apr 18.
- Bass JY, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 Feb 15;21(4):1206-13. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.12.089. Epub 2010 Dec 23.
- Buijsman et al., *Curr. Med. Chem*. 2005, 12, 1017
- Carino et al, *Sci Rep*. 2017 Feb 16;7:42801. doi: 10.1038/srep42801.
- Chiang PC, et al. *J Pharm Sci*. 2011 Nov;100(11):4722-33. doi: 10.1002/jps.22664. Epub 2011 Jun 9.
- Crawley, *Expert Opin. Ther. Pat*. 2010, 20, 1047
- Feng S, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 May 1;19(9):2595-8. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.03.008. Epub 2009 Mar 9.
- Festa et al, *Front Pharmacol*. 2017 Mar 30;8:162. doi: 10.3389/fphar.2017.00162. eCollection 2017.
- Finamore et al, *Sci Rep*. 2016 Jul 6;6:29320. doi: 10.1038/srep29320.
- Flatt B, et al. *J Med Chem*. 2009 Feb 26;52(4):904-7. doi: 10.1021/jm8014124.
- Gege et al, *Curr Top Med Chem*. 2014;14(19):2143-58.
- Gege et al, *Handbook of Experimental Pharmacology*, doi: 10.1007/164_2019_232..
- Genin et al, *J Med Chem*. 2015 Dec 24;58(24):9768-72. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01161. Epub 2015 Dec 2.
- Ghebremariam YT, et al. *PLoS One*. 2013 Apr 4;8(4):e60653. doi: 10.1371/journal.pone.0060653. Print 2013.
- Gioiello A, et al. *Bioorg Med Chem*. 2011 Apr 15;19(8):2650-8. doi: 10.1016/j.bmc.2011.03.004. Epub 2011 Mar 10.
- Hoekstra M, et al. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Oct 15;362(1-2):69-75. doi: 10.1016/j.mce.2012.05.010. Epub 2012 May 27.
- Iguchi Y, et al. *Steroids*. 2010 Jan;75(1):95-100. doi: 10.1016/j.steroids.2009.11.002. Epub 2009 Nov 12.
- Kinzel et al, *Bioorg Med Chem Lett*. 2016 Aug 1;26(15):3746-53. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.05.070. Epub 2016 May 24.
- Lin HR. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 Jul 15;22(14):4787-92. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.05.057. Epub 2012 May 23.
- Lundquist JT, et al. *J Med Chem*. 2010 Feb 25;53(4):1774-87. doi: 10.1021/jm901650u.
- Ma Y, et al. *Pharm Res*. 2013 May;30(5):1447-57. doi: 10.1007/s11095-013-0986-7. Epub 2013 Feb 1.
- Marinozzi M, et al. *Bioorg Med Chem*. 2013 Jul 1;21(13):3780-9. doi:

10.1016/j.bmc.2013.04.038. Epub 2013 Apr 23.

Massafra et al. Pharmacol Ther. 2018 Nov;191:162-177. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.009. Epub 2018 Jun 20.

Misawa T, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2012 Jun 15;22(12):3962-6. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.04.099. Epub 2012 Apr 30.

Pellicciari et al, J Med Chem. 2016 Oct 4.

Richter HG, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2011 Feb 15;21(4):1134-40. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.12.123. Epub 2010 Dec 31.

Rizzo G, et al. Mol Pharmacol. 2010 Oct;78(4):617-30. doi: 10.1124/mol.110.064501. Epub 2010 Jul 14.

Roda et al, J Pharmacol Exp Ther. 2014 Jul;350(1):56-68. doi: 10.1124/jpet.114.214650. Epub 2014 May 1.

Schuster D, et al. Bioorg Med Chem. 2011 Dec 1;19(23):7168-80. doi: 10.1016/j.bmc.2011.09.056. Epub 2011 Oct 4.

Schwabl et al, J Hepatol. 2017 Apr;66(4):724-733. doi: 10.1016/j.jhep.2016.12.005. Epub 2016 Dec 18.

Samlley et al, Bioorg Med Chem Lett. 2015 Jan 15;25(2):280-4. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.11.050. Epub 2014 Nov 26.

Sepe et al. Expert Opin Ther Pat. 2018 May;28(5):351-364. doi: 10.1080/13543776.2018.1459569. Epub 2018 Apr 13. Review.

Sepe et al. Expert Opin Ther Pat. 2015;25(8):885-96. doi: 10.1517/13543776.2015.1045413. Review.

Soisson SM, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr 8;105(14):5337-42. doi: 10.1073/pnas.0710981105. Epub 2008 Apr 7.

Townsend SA, Newsome PN. Aliment Pharmacol Ther. 2017 Sep;46(5):494-507. doi: 10.1111/apt.14210. Epub 2017 Jul 4.

Tully et al, J Med Chem. 2017 Dec 28;60(24):9960-9973. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00907. Epub 2017 Dec 8.

Wang et al, J Am Soc Nephrol. 2018 Jan;29(1):118-137. doi: 10.1681/ASN.2017020222. Epub 2017 Oct 31.

Wang et al, Bioorg Med Chem Lett. 2017 Aug 1;27(15):3386-3390. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.06.003. Epub 2017 Jun 3.

Wang H, et al. Expert Opin Ther Pat. 2018 Nov;28(11):765-782. doi: 10.1080/13543776.2018.1527906. Epub 2018 Oct 8. Review

Watanabe M, et al. J Biol Chem. 2011 Jul 29;286(30):26913-20. doi: 10.1074/jbc.M111.248203. Epub 2011 Jun 1.

Yu D, et al. Steroids. 2012 Nov;77(13):1335-8. doi: 10.1016/j.steroids.2012.09.002. Epub 2012 Sep 21.

Zhang S, et al. J Hepatol. 2009 Aug;51(2):380-8. doi: 10.1016/j.jhep.2009.03.025. Epub 2009 May 18.

Как правило, агонисты FXR включают класс стероидных агонистов FXR и нестероидных агонистов FXR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агонист FXR выбирают из низкомолекулярных соединений, действующих как модуляторы FXR, которые были раскрыты в следующих публикациях: EP1392714; EP1568706; JP2005281155; US20030203939; US2005080064; US2006128764; US20070015796; US20080038435; US20100184809; US20110105475; US6984560; WO2000037077; WO200040965; WO200076523; WO2003015771; WO2003015777; WO2003016280; WO2003016288; WO2003030612; WO2003016288; WO2003080803; WO2003090745; WO2004007521; WO2004048349; WO2004046162; WO2004048349; WO2005082925; WO2005092328; WO2005097097; WO2007076260; WO2007092751; WO2007140174; WO2007140183; WO2008002573; WO2008025539; WO2008025540; WO200802573; WO2008051942; WO2008073825; WO2008157270; WO2009005998; WO2009012125; WO2009027264; WO2009080555; WO2009127321; WO2009149795; WO2010028981; WO2010034649; WO2010034657; WO2017218330; WO2017218379; WO2017201155; WO2017201152; WO2017201150; WO2017189652; WO2017189651; WO2017189663; WO2017147137; WO2017147159; WO2017147174; WO2017145031; WO2017145040; WO2017145041; WO2017133521; WO2017129125; WO2017128896; WO2017118294; WO2017049172; WO2017049176; WO2017049173; WO2017049177; WO2016173397; WO2016173493; WO2016168553; WO2016161003; WO2016149111; WO2016131414; WO2016130809; WO2016097933; WO2016096115; WO2016096116; WO2016086115; WO2016073767; WO2015138986; WO2018152171; WO2018170165; WO2018170166; WO2018170173; WO2018170182; WO2018170167; WO2017078928; WO2014184271; WO2013007387; WO2012087519; WO2011020615; WO2010069604; WO2013037482; US2017275256; WO2005080064; WO2018190643; WO2018215070; WO2018215610; WO2018214959; WO2018081285; WO2018067704; WO2019007418; WO2018059314; WO2017218337; WO2020231917; WO2020211872; WO2020168143; WO2020168148; WO2020156241; WO2020150136; WO2020114307; WO2020061118; WO2020061114; WO2020061112; WO2020061113; WO2020061116; WO2020061117; WO2020011146; WO2020001304; WO2019160813; WO2019120088; WO2019118571; WO2019089667; WO2019089672; WO2019089665; WO2019089664; WO2019089670; раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В одном аспекте агонистом FXR могут быть любые агонисты FXR, раскрытые в следующих патентных заявках: WO2017/049172, WO2017/049176, WO2017/049173, WO2017/049177, WO2018/170165, WO2018/170166, WO2018/170173, WO2018/170182 и WO2018/170167.

Конкретные примеры агонистов FXR включают, без ограничения таковыми, EYP001, GW4064 (как описано в публикации РСТ № WO 00/37077 или в US 2007/0015796), 6-этилхенодезоксихолевые кислоты, особенно такие как 3 α ,7 α -дигидрокси-7 α -дигидрокси-6 α -этил-5 β -холан-24-овая кислота, также обозначаемая как INT-747; INT-

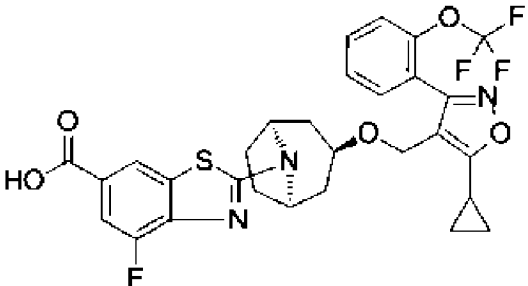
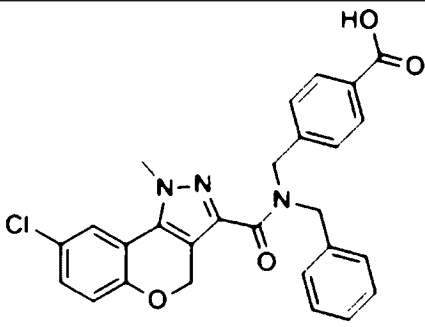
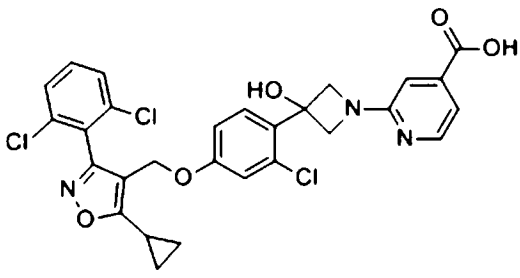
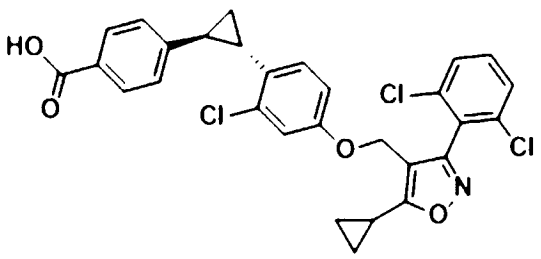
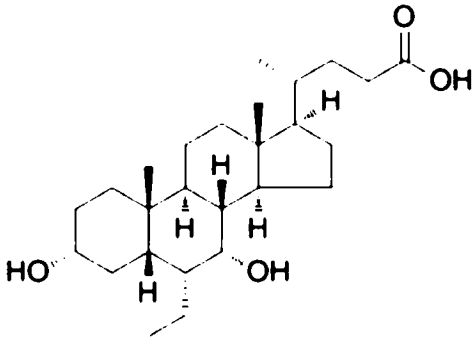
777; 6-этил-урсодеоксихолевая кислота, INT-1103, UPF-987, WAY-362450, MFA-1, GW9662, T0901317, фексарамин, 3 β -азидо-6 α -этил-7 α -гидрокси-5 β -холан-24-овая кислота, Тропифексор (LJN452), фексарамин-3 (Fex-3), BAR502, BAR704, PX20606, PX20350, 3 α ,7 α ,11 β -тригидрокси-6 α -этил-5 β -холан-24-овая кислота (TC-100), 6-(4-{[5-Циклопропил-3-(2,6-дихлорфенил)изоксазол-4-ил]метокси}пиперидин-1-ил)-1-метил-1H-индол-3-карбоновая кислота, 3,6-диметил-1-(2-метилфенил)-4-(4-феноксифенил)-4,8-дигидро-1H-пиразоло[3,4-e][1,4]тиазепин-7-он; обетихолевая кислота, холевая кислота, дезоксихолевая кислота, гликохолевая кислота, гликодезоксихолевая кислота, таурохолевая кислота, тауродигидрофузидат, тауродезоксихолевая кислота, холат, гликохолат, дезоксигхолат, таурохолат, тауродезоксигхолат, хенодезоксихолевая кислота, урсодеоксихолевая кислота, тауроурсодезоксихолевая кислота, гликоурсодезоксихолевая кислота, 7-В-метилхолевая кислота, метил литохолевая кислота, GSK-8062 (CAS № 943549-47-1). В некоторых вариантах осуществления агонист FXR выбран из природных желчных кислот, предпочтительно хенодезоксихолевой кислоты [CDCA] или CDCA, конъюгированных с таурином или глицином [тауро-CDCA или глико-CDCA], и синтетических производных природных желчных кислот, таких как предпочтительно 6-этил-CDCA или конъюгированная с таурином или глицином 6-этил-CDCA, природных нестероидных агонистов, предпочтительно дитерпеноидов, таких как кафестол (Cafestol) и кахвеол (Kahweol), или синтетических нестероидных агонистов FXR.

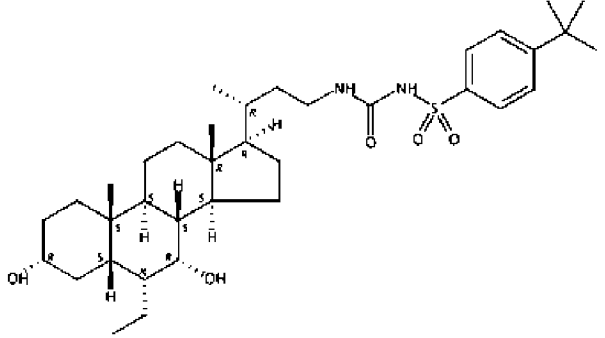
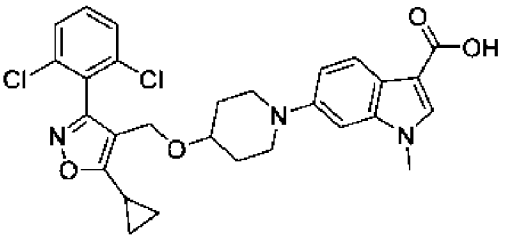
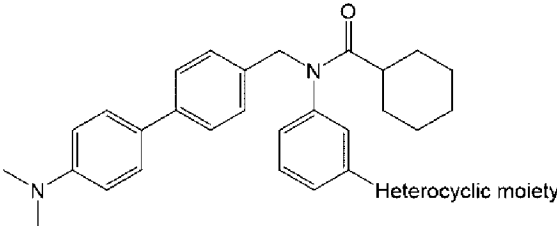
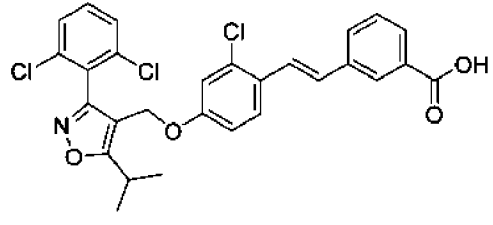
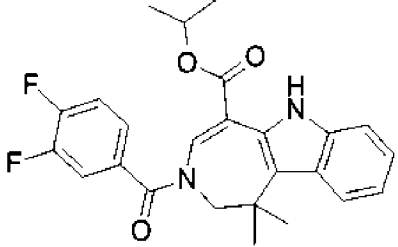
В некоторых вариантах осуществления агонист FXR выбран из группы, состоящей из обетихолевой кислоты (Intercept Pharma), холевой кислоты (CT-RS); GS-9674 (цилофексор Cilofexor) (Phenex Pharmaceuticals AG), тропифексора (Tropifexor (LJN452) (Novartis Pharmaceuticals)), EYP001, EDP-305, стероидного агониста FXR, не являющегося карбоновой кислотой (Enanta Pharmaceuticals), турофексорат изопропила (Pfizer), INT-767 (Intercept Pharmaceuticals), LY-2562175 (Lilly), AGN-242266 (ранее AKN-083, аллерган (Allergan)), EP-024297 (Enanta Pharmaceuticals), M-480 (метакрин (Metacrine)), MET-409 (метакрин (Metacrine)), RDX-023 (арделикс (Ardelyx)), GW6046, кафестола (Cafestol), фексарамина (Fexaramine) и соединения PXL007 (также называемого EYP001 или EYP001a), идентифицированного как CAS № 1192171-69-9 (описано в WO 2009127321). В конкретном варианте осуществления агонист FXR выбран из группы, состоящей из INT-747, соединения, идентифицированного как EDP-305 (стероидный некарбоновый агонист FXR (Enanta Pharmaceuticals)) и соединения, идентифицированного CAS № 1192171-69-9 (описано в WO 2009127321).

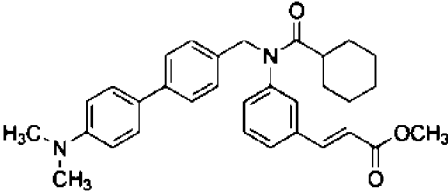
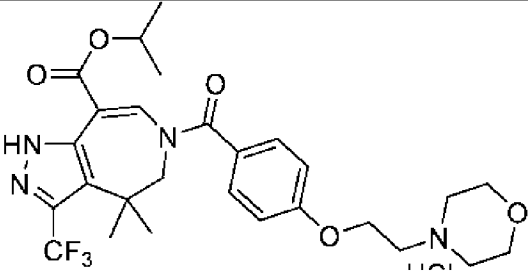
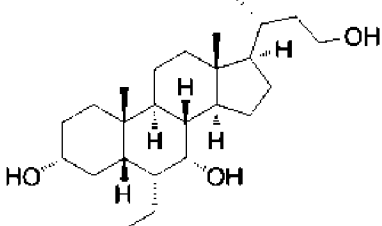
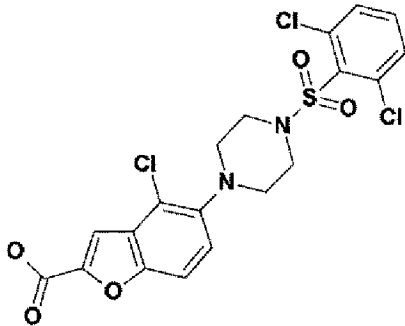
В конкретном аспекте агонист FXR выбран из группы, состоящей из LJN452 (Тропифексор (Tropifexor)), GS-9674 (Цилофексор (Cilofexor)), LMB763 (Нидуфексор (Nidufexor)), OCA (Окалива (Ocaliva)), EDP-305, TERN-001 и PXL007 (также называемый EYP001).

В конкретном аспекте агонист FXR выбран из группы, состоящей из соединений, раскрытых в Таблице 1.

Таблица 1

LJN452 (Тропифексор (Tropifexor)) Cas № 1383816-29-2 2-(3-((5-циклопропил-3-(2-(трифторметокси)фенил)изоксазол-4-ил)метокси)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)-4-фторбензо[d]тиазол-6-карбоновая кислота	
LMB763 (Нидуфексор (Nidufexor)) Cas № 1773489-72-7 4-[(N-бензил-8-хлор-1-метил-1,4-дигидро[1]бензопирано[4,3-с]пиразол-3-карбоксамидо)метил]бензойная кислота	
GS-9674 (Цилофексор (Cilofexor)) Cas Number 1418274-28-8 2-[3-[2-Хлор-4-[[5-циклопропил-3-(2,6-дихлорфенил)-4-изоксазолил]метокси]фенил]-3-гидрокси-1-азетидинил]-4-пиридинкарбоновая кислота	
PX-102 (PX-20606) Cas № 1268244-85-4 4-(2-(2-Хлор-4-((5-циклопропил-3-(2,6-дихлорфенил)изоксазол-4-ил)метокси)фенил)циклопропил)бензойная кислота	
PX-104 или Фенекс (Phenex) 104	энантиомер PX-102
ОСА (Окалива (Ocaliva) или INT-747) Cas № 459789-99-2 Холан-24-овая кислота, 6-этил-3,7-дигидрокси-, (3α,5β,6α,7α)-	

EDP-305 Cas № 1933507-63-1 Бензолсульфонамид, 4-(1,1-диметилэтил)-N-[[[(3α,5β,6α,7α)-6-этил-3,7-дигидрокси-24-норхолан-23-ил]амино]карбонил]-	
TERN-101 (LY2562175) Cas № 1103500-20-4 6-(4-{[5-Циклопропил-3-(2,6-дихлорфенил)изоксазол-4-ил]метокси}пиперидин-1-ил)-1-метил-1H-индол-3-карбоновая кислота	
MET409 Heterocyclic moiety- гетероциклический фрагмент	Разработан Метакрином (by Metacrine) Описан в WO2017049173 
GW4064 Cas № 278779-30-9 3-[2-[2-Хлор-4-[[3-(2,6-дихлорфенил)-5-(1-метилэтил)-4-изоксазолил]метокси]фенил]этилен]бензойная кислота	
WAY362450 (Турофексорат изопропил (Tufofexorate isopropyl) или XL335 или FXR450) Cas № 629664-81-9 Изопропиловый эфир 3-(3,4-дифторбензоил)-1,1-диметилен-1,2,3,6-тетрагидроазепино[4,5-b]индол-5-карбоновой кислоты, 3-(3,1-метилэтиловый эфир 4-дифторбензоил)-	

1,2,3,6-тетрагидро-1,1-диметилазепино[4,5-b]индол-5-карбоновой кислоты,	
Фексарамин (Fexaramine) Cas № 574013-66-4 Метилловый эфир 3-[3-[(циклогексилкарбонил)[[4'-(диметиламино)[1,1'-бифенил]-4-ил]метил]амино]фенил]-2-пропеновой кислоты	
AGN242266 (AKN-083)	
BAR502 Cas № 1612191-86-2 6α-этил-3α, 7α-дигидрокси-24-нор-5β-холан-23-ол	
EYP001 Cas № 1192171-69-9	

и любую фармацевтически приемлемую соль таковых.

В предпочтительном аспекте изобретения агонистом FXR является EYP001.

Дополнительные агонисты FXR, применимые в настоящем изобретении, могут быть идентифицированы обычным способом специалистами в данной области техники на основе анализов, таких как описанные в WO 2000/37077, положения которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Как правило, агонистов FXR идентифицируют с помощью метода «ядерный рецептор-пептид анализ». В этом анализе используется резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), этот метод можно использовать для проверки того, связываются ли предполагаемые лиганды с FXR. Анализ

FRET основан на том принципе, что лиганды индуцируют конформационные изменения в ядерных рецепторах, облегчающие взаимодействие с белками-коактиваторами, необходимыми для активации транскрипции. При FRET молекула флуоресцентного донора передает энергию через нерадиоактивное диполь-дипольное взаимодействие молекуле-акцептору (обычно это флуоресцентная молекула).

Как правило, агонист FXR по изобретению вводится субъекту в терапевтически эффективном количестве. Под "терапевтически эффективным количеством" агониста FXR, как описано выше, подразумевается количество агониста FXR, достаточное для лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита D, при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому медицинскому лечению. Однако следует понимать, что общее ежедневное использование соединений и композиций по настоящему изобретению должно определяться лечащим врачом в рамках здравого медицинского суждения. Конкретный терапевтически эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включающих подлежащее лечению расстройство и тяжесть расстройства; активность конкретного используемого соединения; конкретный используемый состав; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время введения, способ введения и скорость выведения используемого конкретного соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в сочетании с применяемым специфическим агонистом; а также подобные факторы, хорошо известные в медицине. Например, специалистам в данной области техники хорошо известно, что начальные дозы соединения должны быть ниже уровней, необходимых для достижения желаемого терапевтического эффекта, при этом необходимо постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. Однако суточная доза продуктов может варьироваться в широком диапазоне от 0,01 до 1000 мг на взрослого человека в сутки. Предпочтительно композиции содержат 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 или 500 мг активного ингредиента для симптоматической коррекции дозировки для пациента, подлежащего лечению. Лекарственное средство обычно содержит от около 0,01 мг до около 500 мг активного ингредиента, предпочтительно от 1 до около 100 мг активного ингредиента. Эффективное количество лекарственного средства обычно вводят в дозировке от 0,0002 мг/кг до примерно 20 мг/кг массы тела в сутки, особенно от примерно 0,001 мг/кг до 7 мг/кг массы тела в сутки.

Комбинированная терапия

В соответствии с аспектом изобретения агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации по меньшей мере с одним другим терапевтическим агентом, предпочтительно в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным агентом, более предпочтительно в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным агентом, выбранным из группы, состоящей из модуляторов иммунной системы, агентов против HDV, агентов против HBV, агентов против HDV/HBV и любой комбинации таковых. Эти агенты более подробно определены

ниже.

Соответственно, настоящее изобретение предоставляет:

- агонист FXR для лечения инфекции HDV, в частности хронической инфекции HDV, в комбинации по меньшей мере с одним другим терапевтическим агентом; или
- фармацевтическую композицию, содержащую агонист FXR, для лечения инфекции HDV, в частности хронической инфекции HDV, в комбинации по меньшей мере с одним другим терапевтическим агентом; или
- фармацевтическую композицию, содержащую агонист FXR и по меньшей мере один другой терапевтический агент для лечения инфекции HDV, в частности хронической инфекции HDV; или
- набор, содержащий агонист FXR и по меньшей мере один другой терапевтический агент в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения инфекции HDV, в частности хронической инфекции HDV; или
- способ лечения инфекции HDV у субъекта, в частности хронической инфекции HDV, включающий введение терапевтически эффективного количества агониста FXR и терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного другого терапевтического агента; или
- способ лечения инфекции HDV у субъекта, в частности хронической инфекции HDV, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество агониста FXR и терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного другого терапевтического агента.

Термин «модуляторы иммунной системы» относится к сигнальным белкам интерферонового типа (IFN), предпочтительно к интерферону альфа (IFN- α) или интерферону лямбда (IFN- λ), более предпочтительно к пегилированному интерферону альфа (PEG-IFN- α) или пегилированному интерферону лямбда (PEG-IFN- λ), и еще более предпочтительно к PEG-IFN- α 2a, PEG-IFN- α 2b или PEG-IFN- λ 1a.

В одном аспекте IFN выбран из группы, состоящей из консенсусного IFN- α (например, INFERGEN®, Locteron®), IFN- α 1b (например, HAPGEN®), IFN- α 2a (Roferon-A®, MOR-22, Inter 2A, Inmutag, Inferon), пегилированного IFN- α 2a (например, PEGASYS®, YPEG-IFN α -2a, PEG-INTRON®, Pegaferon), IFN- α 2b (например, INTRONA®, Alfaron, Bioferon, Inter 2B, цитферон, Zavineх, Ganapar и т. д.), пегилированного IFN- α 2b (например, Pegintron®, Albuferon, AOP2014/P1101, Algeron, Pai Ge Bin), IFN- α 2c (например, Berofor Alpha) и IFN-подобного белка (такой как, например, Новаферон (Novaferon), слитый белок HSA-IFN- α 2a, слитый белок HSA-IFN- α 2b).

IFN можно вводить ежедневно, еженедельно или 2, 3, 4, 5 или 6 раз в неделю. Период лечения обычно является длительным, например от 2 недель до нескольких месяцев, как, например, период от 3-4 месяцев до 24 месяцев. Дозировка может варьироваться от 1 миллиона единиц до 20 миллионов единиц, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 миллионов единиц. IFN можно вводить путем

подкожного, внутримышечного, внутривенного, трансдермального или внутрипухолового введения, предпочтительно подкожным или внутримышечным введением.

В конкретном аспекте IFN применяют в комбинации с агонистом FXR в начале лечения. Необязательно лечение IFN прекращают, тогда как лечение агонистом FXR продолжают. Например, первый период лечения агонистом FXR и IFN может длиться несколько дней или недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 дней или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 недель), а затем следует период лечения агонистом FXR в отсутствие IFN. Этот второй этап может длиться несколько дней, недель или месяцев.

В конкретном аспекте IFN представляет собой IFN α 2a, IFN α 2b или пегилированную форму таковых и вводится подкожно один раз в неделю, например, в дозе от 1 мкг до 500 мкг, предпочтительно от 10 мкг до 500 мкг, более предпочтительно от 100 мкг до 250 мкг, например 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 мкг, и в течение от 2-4 месяцев до 24 месяцев. В очень конкретном аспекте лечение длится от 12 до 52 недель, предпочтительно от 45 до 52 недель, например 48 недель. В более конкретном аспекте IFN представляет собой IFN α 2a или его пегилированную форму.

Термин «агент против HDV» относится к любому соединению, которое лечит инфекцию HDV, тем самым ингибируя репликацию HDV, сборку вириона HDV или ингибируя проникновение вириона HDV в инфицируемые клетки. Некоторые агенты против HDV известны специалистам в данной области техники (см. Deterding et al. 2019, *AIDS Rev.*, 21, 126-134; Gilman et al. 2019), *World J Gastroenterol.*, 25, 4580-4597). Предпочтительно средство против HDV выбирают из группы, состоящей из рибавирина, ритонавира, лонафарниба и EBP 921.

В частности, ингибирование репликации HDV соответствует уменьшению примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или 100% числа копий РНК HDV, реплицируемых в инфицированных клетках. Методы измерения количества копий, в частности основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), хорошо известны специалистам в данной области техники. Предпочтительно агент против HDV, ингибирующий репликацию HDV, представляет собой аналог нуклеозида.

В частности, ингибирование сборки вириона HDV соответствует уменьшению примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% количества вириона HDV, прошедшего сборку в инфицированных клетках. Методы количественного определения количества вириона, в частности основанные на твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA), хорошо известны специалистам в данной области техники. Предпочтительно анти-HDV агент, ингибирующий сборку вириона HDV, представляет собой ингибитор фарнезилтрансферазы.

В частности, ингибирование проникновения вириона HDV в инфицированные клетки соответствует уменьшению примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% количества вириона HDV, проникшего в инфицированные клетки.

Термин «агент против HBV, анти-HBV агент» относится к соединениям, которые

лечат инфекцию HBV, тем самым ингибируя репликацию HBV, ингибируя сборку вириона HBV или ингибируя проникновение вириона HBV в инфицируемые клетки. Анти-HBV агенты, например, такие как обычный интерферон, пегилированный интерферон, аналоги нуклеозидов и нуклеотидов, известны специалистам в данной области техники (см. Terrault et al. 2018). Предпочтительно агент против HBV, ингибирующий репликацию HBV, представляет собой аналог нуклеозида, более предпочтительно аналог нуклеотида, являющийся ингибитором обратной транскриптазы, и еще более предпочтительно агент против HBV выбирают из группы, состоящей из ламивудина, адефовира, телбивудина, энтекавира, тенофовира и эмтрицитабина.

В частности, ингибирование репликации HBV соответствует уменьшению примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или 100% количества ДНК HBV, реплицируемой в инфицированных клетках.

Более низкий уровень репликации ДНК HBV помогает снизить уровень сборки вириона HBV, что, в свою очередь, вызывает более низкий уровень инфицирования других клеток-мишеней. Следовательно, снижается вероятность предоставления антигенов HBV для сборки образцов HDV.

В частности, ингибирование сборки вириона HBV соответствует уменьшению примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% количества вириона HBV, прошедшего сборку в инфицированных клетках.

Более низкий уровень сборки вирионов HBV из вирионов HBV приводит к более низкому уровню инфицирования других клеток-мишеней и, следовательно, более низкой вероятности предоставления HBV антигенов для сборки HDV вирионов.

В частности, ингибирование проникновения вириона HBV в заражаемые клетки соответствует уменьшению примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% количества проникновения вириона HBV в заражаемые клетки.

Термины «инфицируемые клетки» относятся к клеткам, доступным для вирионов, которые экспрессируют рецептор NTCP, необходимый для проникновения вириона HDV или вириона HBV в клетку. Клетка, особенно клетка-хозяин, считается доступной, если нет биологического или физического барьера, предотвращающего контакт таковой с циркулирующим вирионом.

Поскольку вирионы HBV и HDV имеют один и тот же входной рецептор, т.е. е. NTCP, блокада стыковочной площадки NTCP анти-HBV агентами, эффективно ингибирующая проникновение в клетки вирионов HBV, также ингибирует проникновение в клетки вирионов HDV.

Термин «средство против HBV/HDV» относится к соединениям, которые лечат инфекцию HDV и/или HBV, тем самым ингибируя сборку вирионов HBV и HDV или ингибируя проникновение вирионов HBV и HDV в инфицируемые клетки. Предпочтительно анти-HBV агент выбирают из группы, состоящей из эзетимиба, миркладекса В, полимера нуклеиновой кислоты REP 2139 и полимера нуклеиновой кислоты REP 2165 или любой комбинации таковых.

В частности, ингибирование сборки вирионов HBV и HDV, соответственно, соответствует уменьшению примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% количества вирионов HBV или HDV, прошедших сборку в инфицированных клетках. Предпочтительно анти-HBV/HDV агент, ингибирующий сборку вирионов HBV или HDV, представляет собой полимер нуклеиновой кислоты, более предпочтительно полимер нуклеиновой кислоты, блокирующий секрецию HBsAg.

В частности, ингибирование проникновения вириона HBV и вириона HDV в инфицированные клетки соответствует уменьшению примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% количества вириона HBV или вириона HDV, проникающих в инфицированные клетки. Предпочтительно агент против HBV/HDV, который ингибирует проникновение HBV или HDV в инфицированные клетки, представляет собой ингибитор NTCP, более предпочтительно ингибитор стыковочной площадки NTCP.

В соответствии с предпочтительным аспектом изобретения агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации по меньшей мере с одним другим противовирусным средством, выбранным из группы, состоящей из модуляторов иммунной системы, анти-HDV агентов, анти-HBV агентов, анти-HDV/HBV агентов, как определено выше, и любых комбинаций таковых. Предпочтительно указанный другой противовирусный агент выбран из группы, состоящей из модуляторов иммунной системы типа интерферона, аналогов нуклеозидов, аналогов нуклеотидов, полимеров нуклеиновых кислот, ингибиторов фарнезилтрансферазы, ингибиторов протеазы, ингибитора NTCP и любой комбинации таковых.

Более предпочтительно, агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации с PEG-IFN- α 2a, PEG-IFN- α 2b или PEG-IFN- λ 1a, рибавирином, ритонавиром, лонафарнибом и EBP 921, ламивудином, адефовиром, телбивудином, энтекавиром, тенофовиром и эмтрицитабином, эзетимибом, миркладексом B, полимером нуклеиновой кислоты REP 2139 и полимером нуклеиновой кислоты REP 2165, а также с любой комбинацией таковых.

Согласно конкретному аспекту агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации с PEG-IFN- α 2a.

Альтернативно, агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации с миркладексом B.

Альтернативно, агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации с ритонавиром.

Альтернативно, агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации с лонафарнибом.

Альтернативно, агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации с адефовиром.

Альтернативно, агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации с PEG-IFN- α 2a и другим агентом, предпочтительно с PEG-IFN- α 2a и миркладексом B.

Альтернативно, агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации с PEG-IFN- α 2a и ритонавиром.

Альтернативно, агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации с PEG-IFN- α 2a и лонафарнибом.

Альтернативно, агонист FXR по изобретению можно вводить субъекту в комбинации с PEG-IFN- α 2a и адефовиром.

В одном аспекте изобретения введение при комбинированной терапии является одновременным, так что субъекту одновременно вводят агонист FXR и по меньшей мере один другой агент.

В другом аспекте изобретения введение при комбинированной терапии является последовательным, так что агонист FXR и по меньшей мере один другой агент последовательно вводятся субъекту с определенной временной задержкой, предпочтительно примерно от 1 до 10 дней, более предпочтительно примерно от 1 до 24 часов, еще более предпочтительно примерно от 1 до 12 часов.

В конкретном аспекте агонист FXR не используют в комбинации с интерфероном.

Изобретение будет дополнительно проиллюстрировано следующими фигурами и примерами. Однако эти примеры и фигуры никоим образом не следует интерпретировать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

ЧЕРТЕЖИ:

Фигура 1. *Агонист FXR α ингибирует репликацию HDV в коинфицированных HBV-HDV клетках dHepaRG.* Дифференцированные клетки HepaRG инфицировали HBV при MOI 100 GE/клетку и HDV при MOI 10 GE/клетку. С 3-го по 13-й день после заражения клетки обрабатывали 10 мкМ GW4064, интерфероном α -2a (1000 МЕ/мл) или носителем. Клетки и супернатанты собирали на 13-й день для анализа внутриклеточной РНК HBV и HDV и количественного определения секретируемых антигенов. Результаты представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение двух экспериментов, проведенных с тремя биологическими повторами.

Фигура 2. *Агонист FXR α ингибирует репликацию HDV в HBV-инфицированных dHepaRG, суперинфицированных HDV.* Дифференцированные клетки HepaRG инфицировали HBV при MOI 100 GE/клетку и через 7 дней HDV при MOI 10 GE/клетку. С 10-го по 17-й день после инфекции HBV клетки обрабатывали 1, 5 или 10 мкМ GW4064, интерфероном α -2a (1000 МЕ/мл) или носителем. Клетки и супернатанты собирали на 17-й день для количественного определения внутриклеточной РНК HDV. Результаты представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение трех экспериментов (в dHepaRG), проведенных с тремя биологическими повторами.

Фигура 3. *Агонист FXR α ингибирует репликацию HDV в HBV-инфицированных PHH, суперинфицированных HDV.* PHH инфицировали HBV при MOI 100 GE/клетку и через 4 дня HDV при MOI 10 GE/клетку. С 7-го по 14-й день после инфекции HBV клетки обрабатывали 1, 5 или 10 мкМ GW4064, интерфероном α -2a (1000 МЕ/мл) или носителем. Клетки и супернатанты собирали на 14-й день после заражения HBV для количественного

определения внутриклеточной РНК HDV. Результаты представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение одного эксперимента, проведенного с тремя биологическими повторами.

Фигура 4. *Агонист FXR α ингибирует продукцию белков HDV в HBV-инфицированной dHepaRG, суперинфицированной HDV.* Дифференцированные клетки HepaRG инфицировали HBV при MOI 100 GE/клетку и через 7 дней HDV при MOI 10 GE/клетку. С 10-го по 17-й день после инфекции HBV клетки обрабатывали 1, 5 или 10 мкМ GW4064, интерфероном α -2a (1000 МЕ/мл) или носителем. Клетки собирали на 17-й день после инфицирования HBV и лизировали для выделения белка и анализа WB. Графики представляют денситометрические анализы соответствующих блотов, а результаты представлены в виде соотношений HDAg, нормализованных к уровням В-тубулина.

Фигура 5. *Агонист FXR α ингибирует продукцию белков HDV в HBV-инфицированных PHH, суперинфицированных HDV.* PHH инфицировали HBV при MOI 100 GE/клетку и через 4 дня HDV при MOI 10 GE/клетку. С 7-го по 14-й день после инфекции HBV клетки обрабатывали 1, 5 или 10 мкМ GW4064, интерфероном α -2a (1000 МЕ/мл) или носителем. Клетки и супернатанты собирали на 14-й день после инфекции HBV для количественного определения внутриклеточной РНК HDV и лизировали для выделения белка и анализа WB. Графики представляют денситометрические анализы соответствующих блотов, а результаты представлены в виде соотношений HDAg, нормализованных к уровням В-тубулина.

Фигура 6. *Агонисты FXR α ингибируют репликацию HDV в моноинфицированных клетках dHepaRG.* Дифференцированные клетки HepaRG инфицировали HDV при MOI 25 GE/клетку. С 4-го по 11-й день после инфицирования клетки обрабатывали 1 или 10 мкМ GW4064, 10 мкМ 6-ECDSA и 1 мкМ тропифектора. На 11-й день после инфицирования HDV собирали клетки и количественно определяли общую внутриклеточную РНК HDV с помощью количественной ПЦР.

Фигура 7. *Агонисты FXR α снижают количество геномной РНК HDV в моноинфицированных клетках dHepaRG.* Дифференцированные клетки HepaRG инфицировали HDV при MOI 25 GE/клетку. С 4-го по 11-й день после инфицирования клетки обрабатывали 1 или 10 мкМ GW4064, 10 мкМ 6-ECDSA и 1 мкМ тропифектора. На 11-й день после инфицирования HDV клетки собирали и геномную РНК HDV анализировали с помощью нозерн-блоттинга.

Фигура 8. *Снижение уровней зарождающихся РНК HDV в dHepaRG с коинфекцией HBV/HDV, получавших агонисты FXR α .* dHepaRG были коинфицированы HBV (100 вирусных геномов (vge) на клетку) и HDV (10 вирусных геномов (vge) на клетку). Через шесть дней клетки обрабатывали GW4064 (10 мкМ) или интерфероном α -2a (1000 ЕД/мл) в течение 4 дней. Клетки инкубировали с меченым уридином или без него (ложный EU) в течение 2 ч, промывали и собирали. Суммарные внутриклеточные РНК HDV, а также EU-меченые РНК HDV (зарождающиеся внутриклеточные РНК HDV)

выделяли и определяли количественно с помощью анализа RT-qPCR. В качестве контроля клетки обрабатывали актиномицином D (10 мкг/мл, ActD) за 20 мин до инкубации с меченым уридином для блокирования транскрипции образующихся РНК. Результаты представляют собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение для одного эксперимента, проведенного с тремя биологическими повторами.

Фигура 9. *GW4064 снижает инфекционность частиц HDV.* Клетки dHepaRG коинфицировали HBV и HDV с 500 вирусных геномов (vge) на клетку для HBV и 50 вирусных геномов (vge) на клетку для HDV. Через 3 дня клетки обрабатывали или не обрабатывали GW4064 (10 мкМ), IFN- α (500 МЕ/мл) или ламивудином (LAM, 10 мкМ) в течение 10 дней. (А) Супернатанты инфицированных клеток dHepaRG собирали, концентрировали с помощью преципитации ПЭГ, а уровни внеклеточной РНК HDV оценивали с помощью анализа qRT-PCR. (В-С) Наивные клетки HuH7.5-NTCP были инфицированы различными концентрированными супернатантами с (В) 500 вирусных геномов (vge) на клетку или (С), как указано. Шесть дней спустя уровни внутриклеточной РНК HDV оценивали с помощью анализа RT-qPCR. Результаты RT-qPCR представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение трех независимых экспериментов, каждый из которых выполнен с тремя биологическими повторами.

ПРИМЕРЫ

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Чтобы определить влияние агонистов FXR на инфекцию HDV, инфекцию *in vitro* проводили в дифференцированных клетках HepaRG (dHepaRG) и первичных гепатоцитах человека (PHH).

После дифференцировки клетки HepaRG восприимчивы к инфицированию вирионами HDV, продуцируемыми *in vitro*, либо при моноинфекции, либо при коинфекции и суперинфекции HBV. В случае коинфицированных или суперинфицированных клеток HBV/HDV эта модель позволяет изучать все этапы цикла репликации HDV, включая проникновение в клетку, транслокацию вирусного генома в ядро, репликацию вирусного генома и синтез вирусной мРНК, а также на более поздних стадиях вирусного цикла - сборку и секрецию инфекционных вирионов, несущих HBs-белки оболочки HBV. В клетках, моноинфицированных HDV, можно исследовать все этапы вирусного цикла, кроме процесса сборки, поскольку вновь синтезированные белки оболочки HBV отсутствуют.

PHH также восприимчивы к инфекции вирионами HDV, продуцируемыми *in vitro*, как при моноинфекции, так и при коинфекции и суперинфекции HBV.

Лечение модуляторами FXR ингибирует репликацию HDV в коинфицированных HBV/HDV клетках HepaRG.

Авторы изобретения сначала оценивали влияние агонистов FXR α на репликацию HDV в коинфицированных *in vitro* клетках dHepaRG. Клетки одновременно инфицировали HBV и HDV. Через три дня после инфицирования клетки обрабатывали в течение 10 дней агонистом FXR GW4064 в концентрации 10 мкМ или 1000 МЕ/мл

интерферона $\alpha 2a$. На 13-й день после инфицирования собирали клетки и супернатанты. Количественно определяли внутриклеточные количества РНК HDV и HBV, а также секретируемые антигены HBe и HBs.

Количество общей внутриклеточной РНК HDV снижалось при обработке GW4064 на 60% в HепaRG при концентрации такового 10 мкМ (**Фиг. 1А**). Это снижение вирусной РНК было сравнимо с таковым, наблюдаемым при применении интерферона $\alpha 2a$. Анти-HBV-активность GW4064, описанная ранее, была проверена по количеству внутриклеточных РНК HBV и секретируемых антигенов HBs и HBe (**Фиг. 1В, 1С и 1D**).

Лечение модуляторами FXR ингибирует репликацию HDV в суперинфицированных клетках HBV и HDV.

Влияние агонистов FXR α на репликацию HDV также оценивали в моделях *in vitro* при суперинфекции HDV инфицированных HBV гепатоцитов (как клеток dHепaRG, так и РНН). Клетки последовательно инфицировали: сначала HBV и через 7 дней HDV. Через три дня после инфекции HDV клетки обрабатывали в течение 7 дней GW4064 в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ или 1000 МЕ/мл интерферона $\alpha 2a$. Внутриклеточное количество общей РНК HDV определяли количественно с помощью RT-qPCR.

Как в клетках dHепaRG, так и в РНН, обработка агонистом FXR GW4064 снижала количество общей внутриклеточной РНК HDV до 60% в клетках HепaRG (**Фиг. 2**) и до 45% в клетках РНН (**Фиг. 3**) при концентрации 10 мкМ. Эффект был уже очень заметен при концентрации 1 мкМ. Это снижение вирусной РНК было сравнимо с наблюдаемым при обработке 1000 МЕ/мл интерферона $\alpha 2a$.

Важно отметить, что обработка GW4064 также снижала количество антигенов HDV (HDAg) как в суперинфицированных клетках dHепaRG (**Фиг. 4**), так и в клетках РНН (**Фиг. 5**), что было обнаружено с помощью вестерн-блоттинга. Следует отметить, что агонист FXR α снижал как HDAg-L (большой антиген HDV), так и HDAg-S (малый антиген HDV) в одинаковых пропорциях, т.е. наблюдалось снижение активности таковых на 75% в обеих моделях. Ингибирование HDAg было немного выше после обработки 10 мкМ GW4064, чем при 1000 МЕ/мл интерферона $\alpha 2a$. В совокупности эти результаты показывают, что FXR α агонист GW4064, вероятно, ингибирует HDV на уровне мРНК, что приводит к очень сильному ингибированию на уровне белка.

Лечение модуляторами FXR ингибирует репликацию HDV в моноинфицированных HDV клетках.

Чтобы определить, является ли опосредованное FXR α ингибирование HDV независимым от HBV, авторы изобретения проанализировали влияние агонистов FXR α на клетки dHепaRG, моноинфицированные HDV. Через четыре дня после инфицирования HDV клетки обрабатывали в течение семи дней тремя различными агонистами FXR α : 6-ЕСДСА в концентрации 10 мкМ, GW4064 в концентрации 1 и 10 мкМ и тропифексором в концентрации 1 мкМ. Влияние лечения на количество общей РНК HDV анализировали с помощью RT-qPCR. Специфическое влияние агонистов FXR на количество геномной РНК HDV оценивали с помощью нозерн-блоттинга.

GW4064 в концентрации 10 мкМ, 6-ECDSA и тропифексор уменьшали количество общей РНК HDV примерно на 60%, что было измерено с помощью RT-qPCR (Фиг. 6), а также уменьшали количество геномной РНК, обнаруживаемой с помощью нозерн-блоттинга (Фиг. 7).

В целом эти результаты показывают, что агонисты FXR α ингибируют инфекцию HDV способом, который не зависит от их ингибирующего действия на инфекцию HBV. Кроме того, 3 различных агониста FXR α с различными структурами продемонстрировали сопоставимую эффективность ингибирования HDV.

Лечение модуляторами FXR ингибирует синтез зарождающихся РНК HDV.

Чтобы получить первоначальное представление о способе действия агонистов FWR на HDV, авторы изобретения провели Run-ON анализ в клетках dHepaRG, коинфицированных HBV/HDV, чтобы определить, может ли зарождающаяся РНК HDV также быть ингибирована, как было показано на примере общего количества РНК HDV. Клетки dHepaRG одновременно инфицировали HBV и HDV. Через шесть дней после заражения клетки обрабатывали 10 мкМ GW4064 в течение 4 дней перед экспериментом Run-On. Результаты показали, что GW4064 в концентрации 10 мкМ действительно был способен ингибировать синтез РНК HDV в течение 2 часов после окрашивания меченым уридином, что позволяет предположить, что GW4064 может влиять на инициацию мРНК HDV и/или удлинение таковой (Фиг. 8).

Лечение модуляторами FXR ингибирует специфическую инфективность секретируемых вирусных частиц HDV.

Влияние агонистов FXR α на секрецию и специфическую инфективность вирусных частиц HDV оценивали в коинфицированных *in vitro* клетках dHepaRG. Через три дня после заражения клетки обрабатывали в течение 10 дней агонистом FXR GW4064 в концентрации 10 мкМ или 1000 МЕ/мл интерферона α -2а или ламивудином в концентрации 10 мкМ. Супернатанты собирали и концентрировали с использованием 8% ПЭГ 8000. Сначала определяли количество секретируемой РНК HDV с помощью RT-qPCR. Результаты показали, что секреция РНК HDV снижалась под действием GW4064 на 65% при 10 мкМ (Фиг. 9А). Это снижение вирусной РНК было несколько более выраженным, чем при использовании интерферона α -2а (50%). Как и ожидалось, ингибитор HBV-полимеразы ламивудин, использованный в качестве контроля, не оказывал существенного влияния на секрецию РНК HDV.

Затем, чтобы определить специфическую инфективность секретируемых частиц HDV, концентрированные вирусные частицы HDV, собранные из супернатантов dHepaRG, использовали для заражения наивных клеток Huh7.5-NTCP с использованием одного и того же vge/клетку для каждого условия. Через шесть дней после заражения общую внутриклеточную РНК HDV определяли количественно с помощью RT-qPCR. Результаты показали, что после инфицирования при 500 вирусных геномов (vge) на клетку количество внутриклеточной РНК HDV снижалось более чем на 95% в клетках, инфицированных супернатантами, полученными из dHepaRG, обработанного агонистом

FXR GW4064 (**Фиг. 9В**), по сравнению с 70% снижением в клетках, инфицированных супернатантами, обработанными интерфероном α -2а. Специфическая инфективность частиц HDV не изменялась при обработке ламивудином.

Наконец, наивные клетки Huh7.5-NTCP инфицировали теми же концентрированными супернатантами, но с использованием двух разных инокулятов HDV, 100 и 500 vge /клетку для каждого условия. Количественное определение внутриклеточных РНК HDV через 6 дней после инфицирования показало дозозависимое увеличение уровней РНК HDV в клетках, инфицированных супернатантами, собранными из dHepaRG, обработанных либо любым носителем, интерфероном α -2а, либо ламивудином (**Фиг. 9С**). Однако этого не наблюдалось при использовании супернатантов, собранных из клеток dHepaRG, обработанных агонистом FXR GW4064, поскольку при этих условиях не наблюдалось существенной разницы, когда наивные клетки Huh7.5-NTCP были инфицированы либо 100, либо 500 vge/клетку. В целом, эти результаты показывают, что агонист FXR GW4064 значительно снижает инфекционные свойства секретируемых частиц HDV.

Выводы

Авторы изобретения обнаружили, что агонисты FXR являются ингибиторами репликации HDV в dHepaRG и РНН, двух наиболее подходящих моделях для исследований инфекции HDV *in vitro*. Этот противовирусный эффект был продемонстрирован с тремя различными агонистами FXR, т.е. одним аналогом желчных кислот (6-ECDCA) и двумя синтетическими агонистами (GW4064 и тропифексор).

Настоящие результаты экспериментов, проведенных на клетках, моноинфицированных HDV, ясно демонстрируют, что ингибирующее действие агонистов FXR на репликацию HDV не зависит от воздействия этого класса молекул на HBV, которое было выявлено ранее. В то время как HDV зависит от поверхностных белков HBV для проникновения в гепатоциты, этап репликации вирусного цикла происходит независимо от HBV. Поскольку авторы изобретения заметили, что количество геномной формы РНК HDV, а также зарождающихся РНК уменьшалось после лечения, агонисты FXR могут быть нацелены на стадию репликации жизненного цикла HDV.

Более того, авторы изобретения показали, что агонисты FXR также являются ингибиторами секреции HDV и специфической инфективности секретируемых вирусных частиц в клетках dHepaRG. Этот противовирусный эффект был продемонстрирован синтетическим агонистом GW4064.

В заключение, авторы изобретения идентифицировали новые молекулы (т.е. агонисты FXR), специфически регулирующие (ингибирующие) инфекцию HDV. Это должно позволить отобрать молекулы-кандидаты, которые можно было бы протестировать на животных моделях или непосредственно на людях с агонистами FXR, уже используемыми в клинических испытаниях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии клеток

НераRG

Линия клеток НераRG, полученная из клеточной гепатокарциномы человека, способна дифференцироваться и восстанавливать многие фенотипические признаки гепатоцитов после 4 недель культивирования в определенных условиях¹. Клетки НераRG культивировали, дифференцировали и инфицировали HBV и HDV, как описано ранее^{2,3}. Вкратце, для дифференцировки клетки выдерживали в течение 2 недель в стандартной среде, затем не менее 2 недель в стандартной среде с добавлением 1,8% DMSO. Состав стандартной среды был следующим: среда William's E с добавлением 10% сыворотки HyCLone FetalClone II (Thermo Fisher Scientific), пенициллина/стрептомицина, L-глутамина, инсулин-трансферрин-селена (Gibco) и 50мкМ гемисукцинат гидрокортизона.

Первичные гепатоциты человека

Первичные гепатоциты человека (PHH) были свежеприготовлены из резекции печени человека, полученной из Центра Леона Берапа (Лион) (Centre Léon Bérard (Lyon)) с разрешения министерства Франции (AC 2013-1871, DC 2013-1870, AFNOR NF 96 900 sept 2011), как описано ранее⁴.

Huh7.5^{NTCP}

Клетки Huh7.5 были любезно предоставлены С.М. Райс (Рокфеллеровский университет, США (С.М. Rice (Rockefeller University, USA))). Клетки, производные от Huh7.5NTCP, были получены с помощью лентивирусной трансдукции, как описано ранее (Ni et al., Gastroenterology, 2014; 146(4):1070-83. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.024. Epub 2013 Dec 19. PMID: 24361467).

Вирусы

Количества HDV (генотип 1, Genbank ID M21012) приготавливали из супернатантов котрансфицированных клеток Huh7, как описано ранее^{3,5}. Плазмиды pSVLD3 и pT7HB2.7, используемые для получения инфекционных частиц HDV, были любезно предоставлены Camille Sureau (Laboratoire de virologie moléculaire, Inserm UMR S_1134, Institut National de Sanguine Institut, Paris, France).

Количества HBV (генотип D, Genbank ID U95551) готовили с использованием клеточной линии НерAD38 в соответствии с ранее описанными протоколами⁷.

Супернатанты, содержащие частицы HBV или HDV, очищали (фильтр 0,45 мкм) и концентрировали с помощью 8% PEG 8000 (Sigma-Aldrich).

РНК HDV определяли количественно с помощью RT-qPCR, как описано ранее⁶, а ДНК HBV определяли количественно с использованием теста AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test (Roche).

Химикаты

GW4064 [3-(2,6-дихлорфенил)-4-(3-карбокси-2-хлорстильбен-4-ил)-оксиметил-5-изопропилизоксазол] представляет собой агонист FXR (EC₅₀ 90 нМ), активный как *in vivo*, так и *in vitro*⁸. Несмотря на ограниченную биодоступность, GW4064 получил широкое распространение в качестве мощного селективного агониста FXR и достиг статуса «эталонного соединения» в этой области.

6-ECDCA (6-этил-хенодезоксихолевая кислота) представляет собой производное соли желчных кислот и сильный агонист FXR (EC₅₀ 99 нМ), был получен от Sigma-Aldrich⁹.

Тропифексор (2-[(1R,3r,5S)-3-({5-циклопропил-3-[2-(трифторметокси)фенил]-1,2-оксазол-4-ил}метокси)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил]-4-фтор-1,3-бензотиазол-6-карбоновая кислота) представляет собой синтетический агонист FXR, активный *in vitro* и *in vivo*, был получен от Cayman¹⁰.

GW4064, 6-ECDCA и тропифексор растворяли в DMSO в концентрации 10 мМ для приготовления маточных растворов.

Интерферон альфа-2 (ROFERON-A) был приобретен у компании Roche.

Актиномицин D был приобретен у Sigma-Aldrich.

Ламивудин (LAM) был приобретен у Selleckchem.

Вестерн-блот

Клетки собирали в буфере для лизиса RIPA (NaCl 150 мМ, Tris HCl pH = 8,0 50 мМ, SDS 0,1%, NP40 1%, дезоксихолат Na 0,5%), содержащем ингибиторы протеазы (Protein Cocktail Inhibitors от Sigma-Aldrich), NaF 10 мМ, Na ортованадат 10 мМ). Осветленные лизаты подвергали 10% SDS-PAGE и вестерн-блоттингу на мембраны PVDF или нитроцеллюлозы с использованием аппарата TransTurbo Blot в соответствии с инструкциями производителя (Biorad). Первичными антителами являлись антитело HDVAg (любезный подарок Dr Alain Kay) и антитело к бета-тубулину (Abcam). Вторичные антитела к HRP были приобретены у Sigma-Aldrich. Обнаружение сигнала HRP определялось электронным способом с использованием системы Ozyme - Syngene PXi Image и параметров, установленных строго ниже точки насыщения.

Нозерн-блот

Общую РНК экстрагировали из инфицированных клеток с использованием Tri Reagent® (TR118, Molecular Research Center). Для каждого образца 2 мкг общей (тотальной) РНК подвергали электрофорезу в 1,2% агарозных гелях. После электропереноса на заряженные нейлоновые мембраны (Roche) последовательности геномной РНК HDV обнаруживались с использованием специфичного для цепи РНК зонда, синтезированного с использованием набора Dig RNA Labeling kit (Sp6/T7) (Roche) и набора для люминесцентного обнаружения DIG luminescent detection kit (Roche) в соответствии с инструкцией производителя. Количественную оценку сигналов проводили с помощью ImageLab.

В качестве внутреннего контроля количества и качества выделенной РНК мембрану очищали и повторно гибридизовали с использованием меченых олигонуклеотидов, специфичных для 18S рРНК и 28S рРНК человека.

Количественное определение HB и HBe

HBs и HBe антигены, секретируемые в супернатант клеток, определяли после необходимых разведений на приборе Mini Vidas с наборами Vidas HBs и Vidas HBe/HBeT (bioMérieux, France) или наборами Autobio (AutoBio, China) в соответствии с протоколом

производителя.

Количественная оценка вирусных РНК с помощью количественной ПЦР

Общую РНК получали с использованием NucleoSpin RNA Plus (Macherey-Nagel). После расщепления ДНК ДНКазой TURBO (Ambion) максимально 1000 нг РНК подвергали обратной транскрипции с использованием набора High-Capacity RNA-to-cDNA (Thermo Fisher Scientific). Количественную ПЦР проводили с праймерами HDV-F (5'-GCCTCTCCTTGTCGGTGAAT-3', SEQ ID NO: 1) и HDV-R (5'-CCTGGCTGGGGAACATCAAA-3', SEQ ID NO: 2) для количественного определения общей РНК HDV и HBV-F (5'-AGCTACTGTGGAGTTACTCTCGT-3', SEQ ID NO:3) и HBV-R (5'-CAAAGAATTGCTTGCCTGAGTG-3', SEQ ID NO:4) для количественного определения прегеномной/предкоревой РНК HBV. кДНК анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) с использованием набора QuantiFast SYBR® Green PCR (Qiagen) на приборе LightCycler® 480 (Roche) с использованием 45 циклов ПЦР. Все анализы были выполнены в трехкратной повторности. Относительную количественную оценку определяли путем нормализации экспрессии каждого гена по отношению к гену домашнего хозяйства S9 с использованием праймеров S9-F (5'-CCGCGTGAAGAGGAAGAATG-3', SEQ ID NO:5) и S9-R (5'-TTGGCAGGAAAACGAGACAAT-3', SEQ ID NO:6).

Методы Run-On

HDV-инфицированные клетки HeparG инкубировали с меченым уридином или без него (ложный EU) в течение 2 часов, промывали и собирали. Суммарные внутриклеточные РНК HDV, а также меченные EU РНК HDV (зарождающиеся внутриклеточные РНК HDV) выделяли с использованием набора Click-iT™ Nascent RNA Capture Kit (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве контроля клетки обрабатывали 10 мкг/мл актиномицина D за 20 мин до инкубации с меченым уридином для блокирования транскрипции образующихся РНК.

Анализ секретируемой HDV и специфической инфективности

Для анализа специфической инфективности вириона HDV супернатанты от dHeparG, инфицированных как HBV, так и HDV, концентрировали с использованием 8% PEG 8000. РНК HDV определяли количественно с помощью RT-qPCR в концентратах, а клетки Huh7.5NTCP инфицировали с использованием тех же эквивалентов вирусного генома (vge) концентрированного вируса для каждого условия обработки. Через шесть дней после инфицирования выделяли общую клеточную РНК и количественно определяли РНК HDV с помощью RT-qPCR.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hantz, O. et al. J. Gen. Virol. 90, 127-135 (2009).
2. Gripon, P. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 15655-15660 (2002).
3. Alfaiate, D. et al. Antiviral Res. 136, 19-31 (2016).
4. Lecluyse, E. L. & Alexandre, E. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 640, 57-82 (2010).
5. Sureau, C. The Use of Hepatocytes to Investigate HDV Infection: The HDV/HeparG

Model. in Hepatocytes (ed. Maurel, P.) vol. 640 463-473 (Humana Press, 2010).

6. Scholtes, C. et al. J. Clin. Microbiol. 50, 2126-2128 (2012).
7. Ladner, S. K. et al. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 1715-1720 (1997).
8. Maloney, P. R. et al. J. Med. Chem. 43, 2971-2974 (2000).
9. Pellicciari, R. et al. J. Med. Chem. 45, 3569-3572 (2002).
10. Tully, D. C. et al. J. Med. Chem. 60, 9960-9973 (2017).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

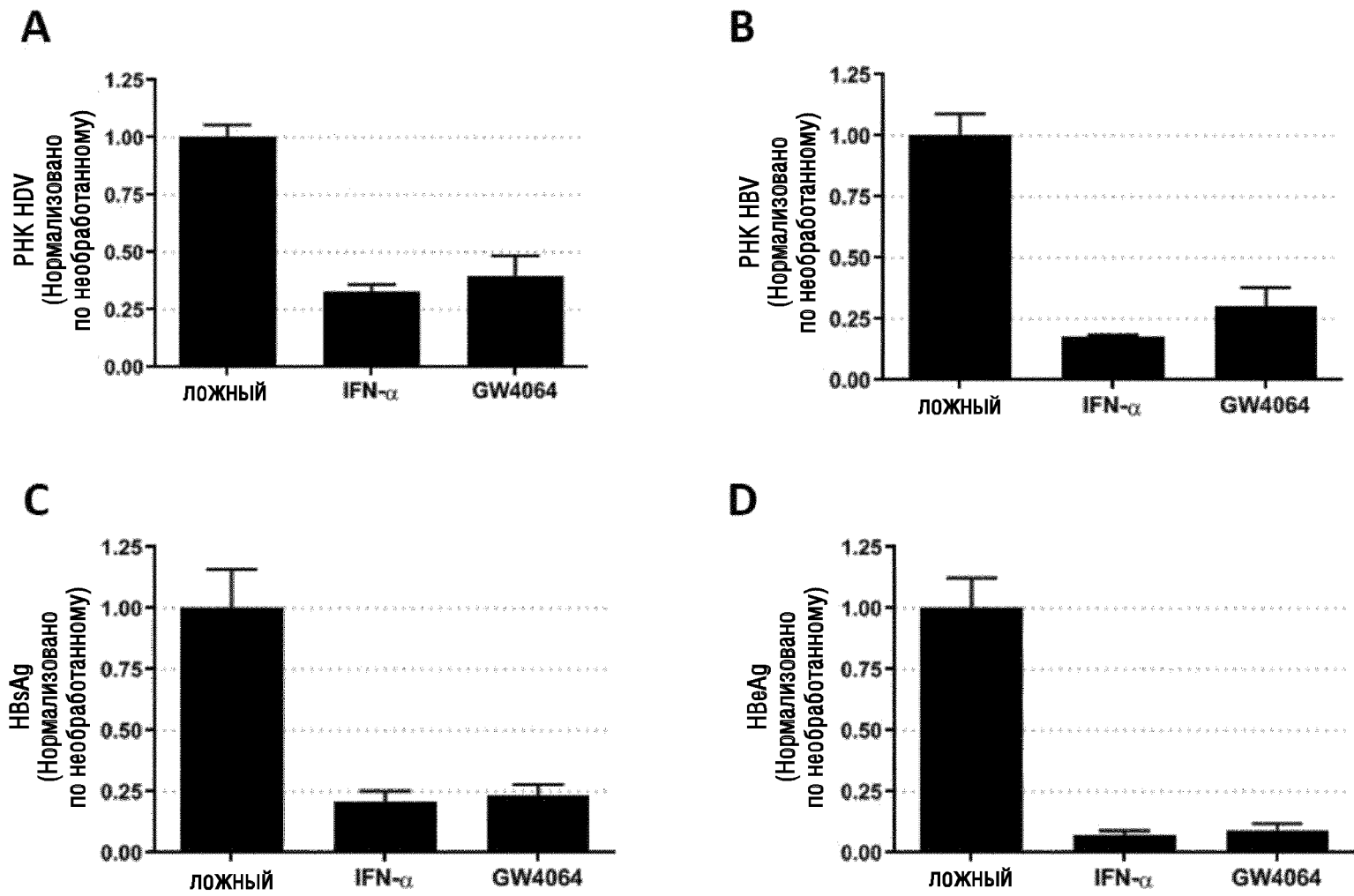
1. Агонист фарнезоидного X-рецептора (FXR) для применения при лечении инфекции, вызванной вирусом гепатита D (HDV), у субъекта, нуждающегося в этом.
2. Агонист FXR для применения по п.1, где субъект страдает хронической инфекцией HDV.
3. Агонист FXR для применения по п.1 или 2, где агонист FXR представляет собой селективный агонист FXR.
4. Агонист FXR для применения по любому из пп.1-3, где агонист FXR выбран из группы, состоящей из LJN452 (Тропифексор, Tropifexor), LMB763 (Нидуфексор, Nidufexor), GS-9674 (Цилофексор, Cilofexor), PX-102 (PX-102). 20606), PX-104 (Фенекс 104, Phenex 104), OCA (Окалива, Ocaliva), EDP-305, TERN-101 (LY2562175), MET-409, GW4064, WAY362450 (турофексорат изопропил), фексарамина (Fexaramine), AGN242266 (AKN-083), BAR502, и EYP001.
5. Агонист FXR для применения по любому из пп.1-3, где агонистом FXR является EYP001.
6. Агонист FXR для применения по любому из пп. 1-5 для применения в комбинации с интерфероном альфа (IFN- α), интерфероном лямбда или пегилированной формой таковых, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из IFN- α 1a, IFN- α 1b, IFN- α 2a, IFN- α 2b и IFN- λ 1a или пегилированных форм таковых, более предпочтительно PEG-IFN- α 2a (например, Пегасис (Pegasys)), PEG-IFN- α 2b (например, ВираферонПег (ViraferonPeg) или Интрона (Introna)) или PEG- IFN - λ 1a.
7. Агонист FXR для применения по любому из пп.1-6, для применения в комбинации с анти-HDV агентом, предпочтительно аналогом нуклеозида или ингибитором фарнезилтрансферазы.
8. Агонист FXR для применения по п.7, где указанный анти-HDV агент выбран из группы, состоящей из рибавирина, ритонавира, лонафарниба и EBP 921.
9. Агонист FXR для применения по любому из пп. 1-8, для применения в комбинации с анти-HBV агентом, предпочтительно с аналогом нуклеозида.
10. Агонист FXR для применения по п.9, где указанный аналог нуклеозида выбран из группы, состоящей из ламивудина, адефовира, телбивудина, энтекавира, тенофовира и эмтрицитабина.
11. Агонист FXR для применения по любому из пп.1-8 для применения в комбинации с анти-HBV/HDV агентом, предпочтительно аналогом нуклеозида, полимером нуклеиновой кислоты или ингибитором NTCP.
12. Агонист FXR для применения по п.11, где указанный анти-HBV/HDV агент выбран из группы, состоящей из эзетимиба, миркладекса В, полимера нуклеиновой кислоты REP 2139 и полимера нуклеиновой кислоты REP 2165.
13. Агонист FXR для применения по любому из пп.1-9, где субъект не ответил на предшествующее лечение инфекции HDV.
14. Агонист FXR для применения по п.13, где предшествующее лечение

представляет собой лечение с помощью PEG-IFN α .

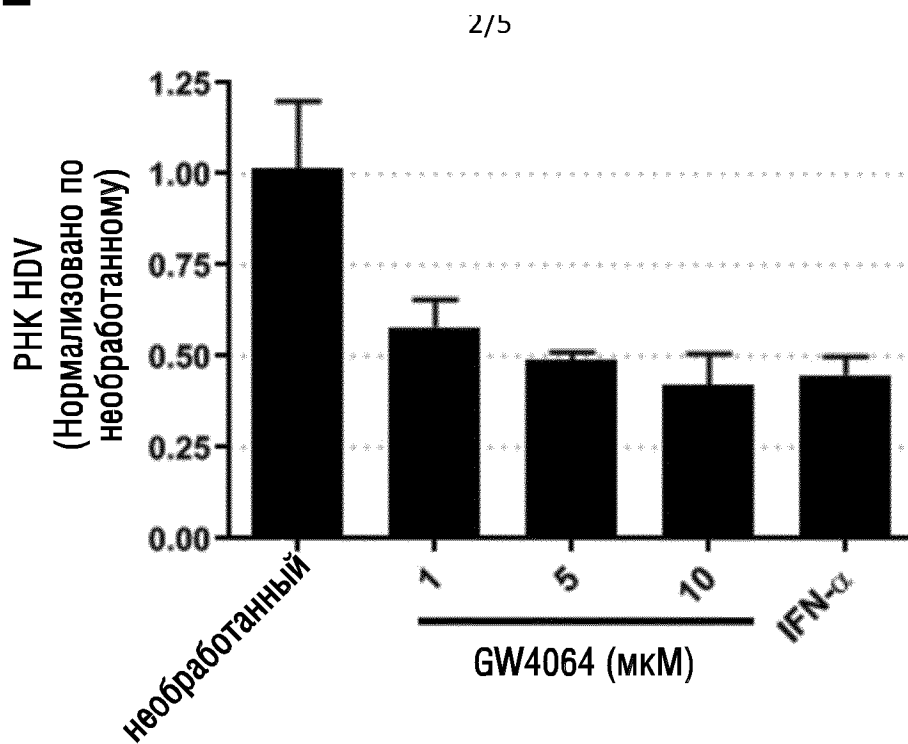
15. Агонист FXR для применения по п.13, где предшествующее лечение представляет собой лечение анти-HDV агентом.

По доверенности

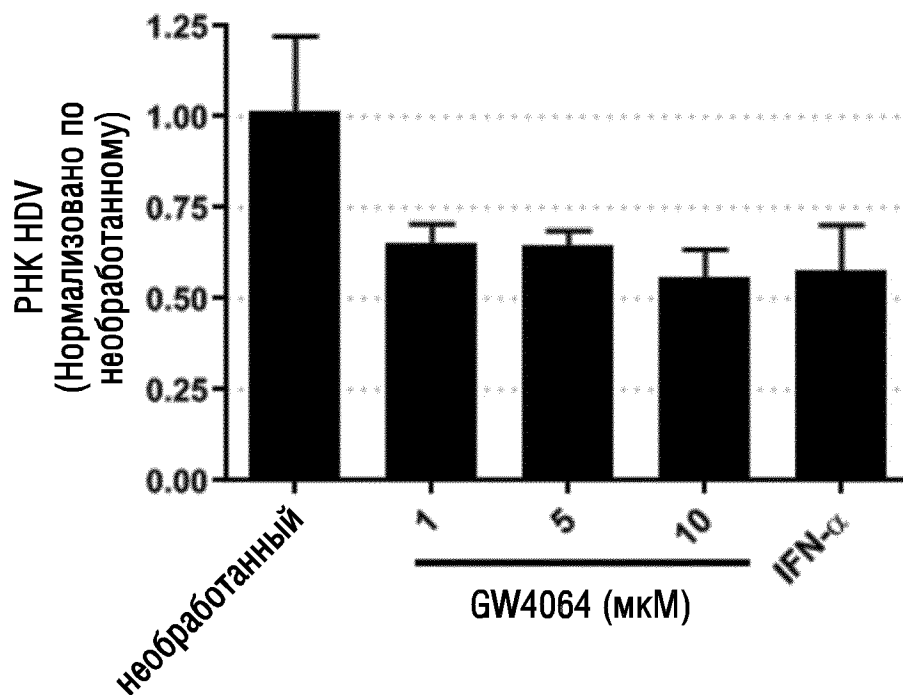
ФИГ.1



ФИГ.2

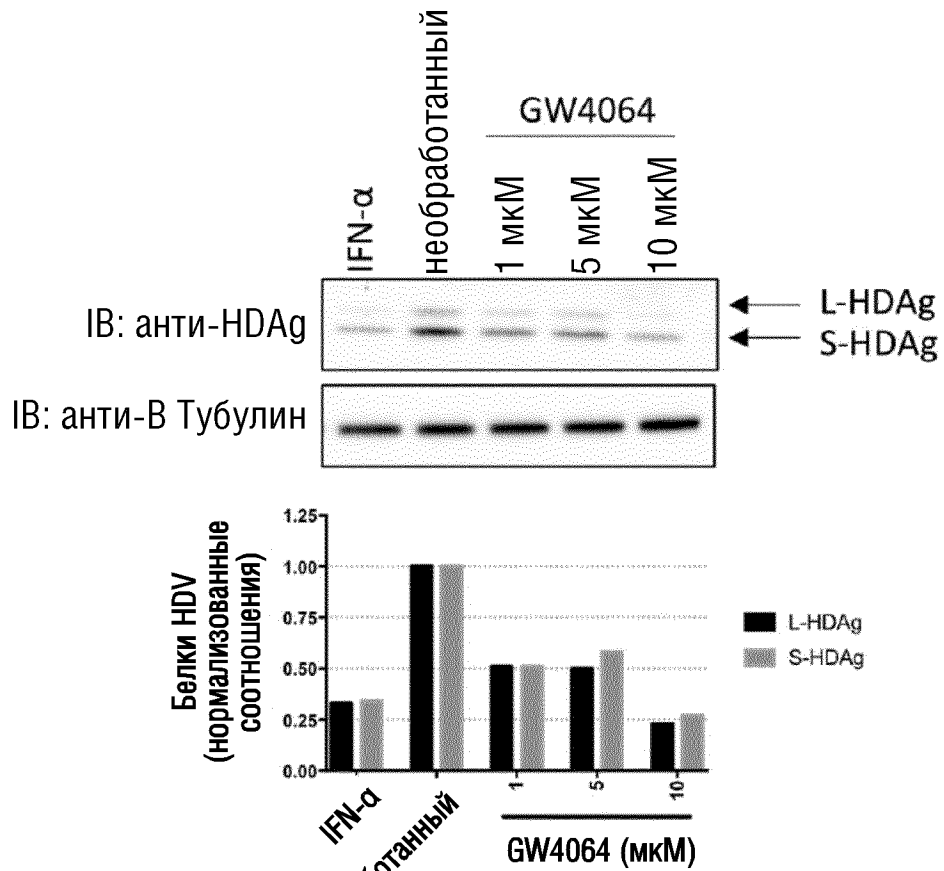


ФИГ.3



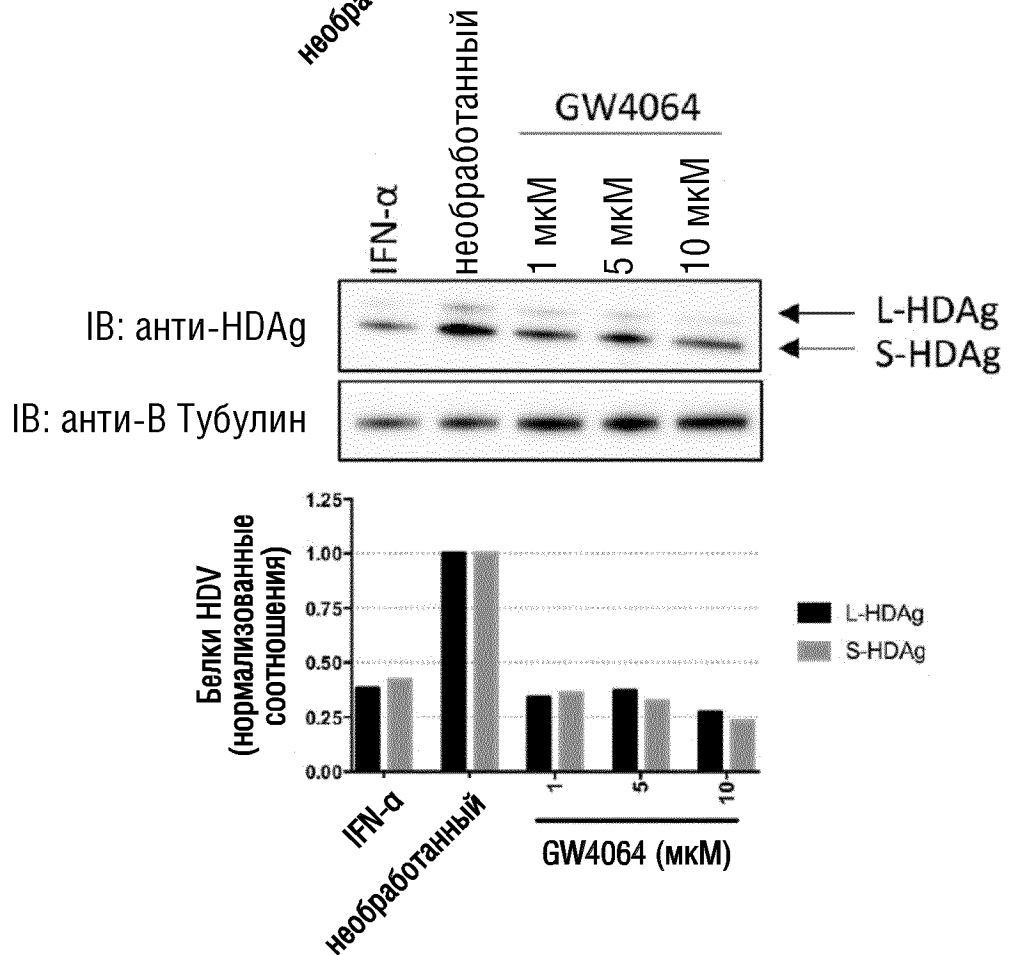
ФИГ.4

dHeraRG

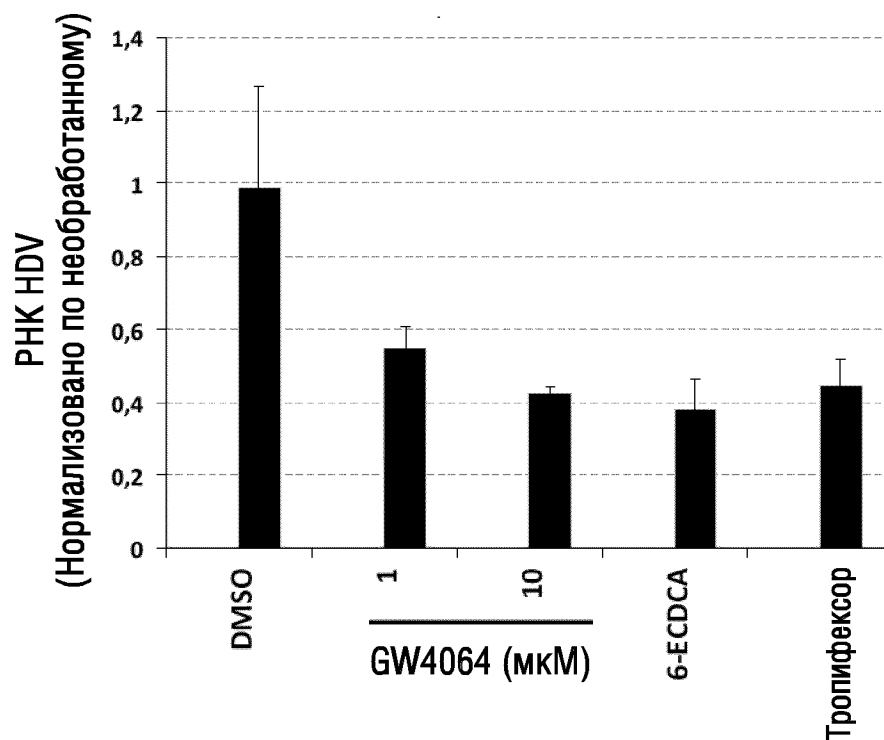


ФИГ.5

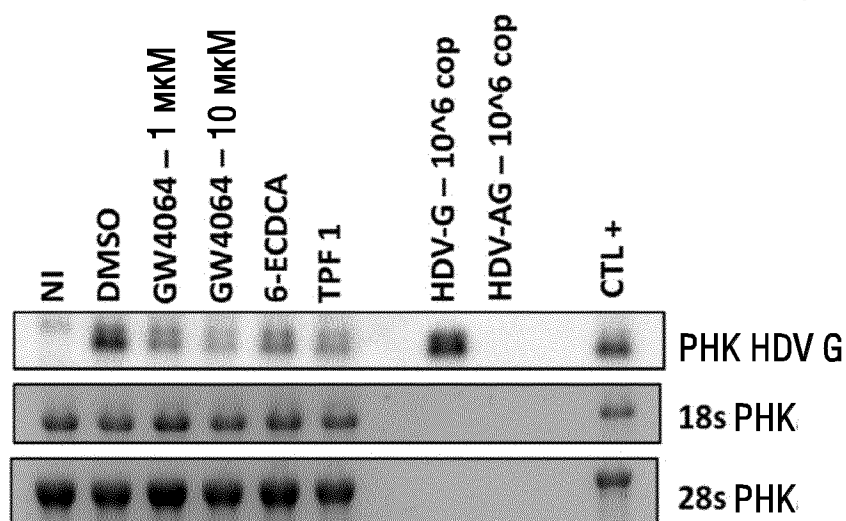
PHH



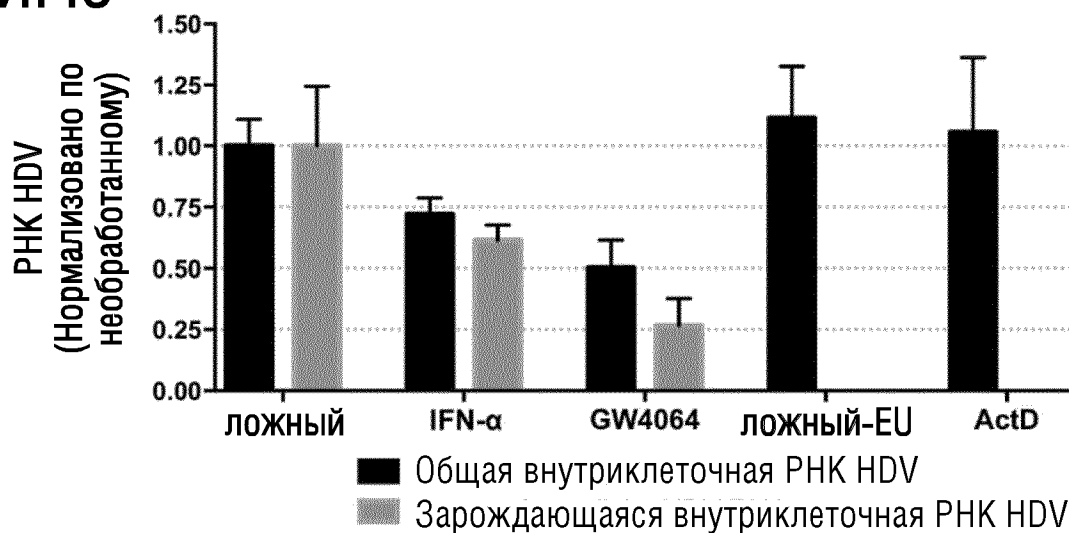
ФИГ.6



ФИГ.7

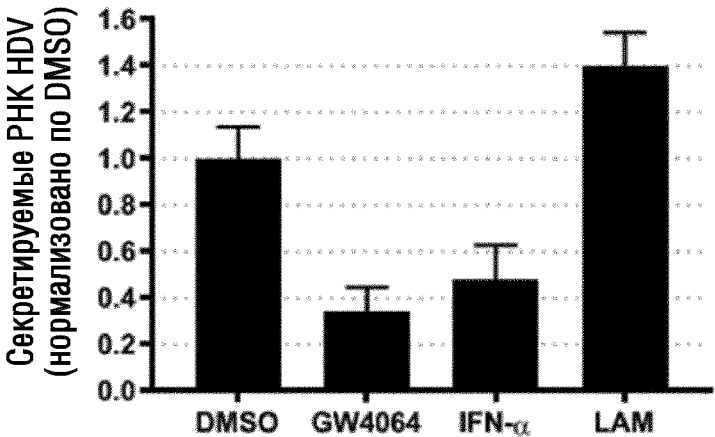


ФИГ.8

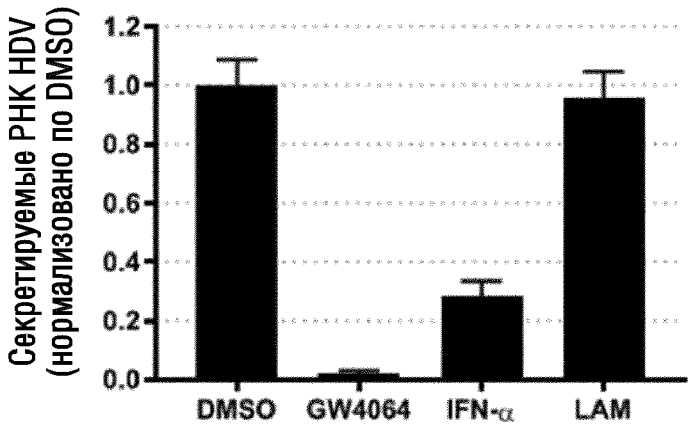


ФИГ.9

A



B



C

