

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0010097 (43) 공개일자 2014년01월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 38/13</i> (2006.01) <i>A61P 31/20</i> (2006.01) <i>A61P 31/14</i> (2006.01) <i>A61P 1/16</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-7025396 (22) 출원일자(국제) 2012년03월30일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2013년09월26일 (86) 국제출원번호 PCT/EP2012/055857 (87) 국제공개번호 WO 2012/131061 국제공개일자 2012년10월04일 (30) 우선권주장 61/470,666 2011년04월01일 미국(US)		(71) 출원인 노파르티스 아게 스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35 (72) 발명자 나오모브, 니콜라이 스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 노파르티스 파 르마 아게 내 (74) 대리인 위혜숙, 양영준

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 B형 간염 바이러스 단독 감염 또는 델타 간염 바이러스와의 조합 감염 및 연관된 간 질환의 치료

(57) 요약

본 발명은, 임의로 인터페론 또는 텔비부딘, 라미부딘, 엠트리시타빈, 엔테카비어, 아데포비어 또는 테노포비어와 조합되는, B형 간염 및 D형 간염 바이러스 감염의 치료에 있어서 시클로필린 억제제 (예컨대 알리스포리비어 또는 DEB025)의 용도에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

환자에서의 B형 간염 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한 알리스포리비어 (alisporivir).

청구항 2

환자에서의 D형 간염 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한 알리스포리비어.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 직접적인 항바이러스제와 조합되어 투여되는 알리스포리비어.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 직접적인 항바이러스제가 본질적으로 텔비부딘, 라미부딘, 엠트리시타빈, 엔테카비어, 아데포비어 및 테노포비어로 이루어진 군에서 선택되는 것인 알리스포리비어.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 인터페론과 조합되어 투여되는 알리스포리비어.

청구항 6

환자에서의 B형 간염 바이러스 감염 및 D형 간염 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한 알리스포리비어.

청구항 7

제6항에 있어서, 직접적인 항바이러스제 또는 인터페론과 조합되어 투여되는 알리스포리비어.

청구항 8

환자에게 유효량의 알리스포리비어를 투여하고, 임의로 인터페론 또는 직접적인 항바이러스제를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 B형 간염 바이러스 감염을 치료하는 방법.

청구항 9

환자에게 유효량의 알리스포리비어를 투여하고, 임의로 인터페론 또는 직접적인 항바이러스제를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 델타 간염 바이러스 감염을 치료하는 방법.

청구항 10

알리스포리비어를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 간 질환의 진행을 예방하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 알리스포리비어를 포함하는 제약 조성물.

명세서

배경 기술

[0001] 본 개시내용은 시클로필린 억제제인, 시클로필린에 결합하는 비-면역억제성 시클로스포린 유사체, 특히 B형 간염 바이러스 (HBV) 단독 감염 또는 델타 간염 바이러스 (HDV)와의 조합 감염 및 그러한 감염에 의해 유발된 간 질환의 치료에서 그의 제약 용도에 관한 것이다.

[0002] 시클로스포린 및 비-면역억제성 유사체는 공통적으로 약리학적 활성, 특히 면역억제 또는 소염 활성을 갖는, 일군의 구조상 구별되는 환식 폴리-N-메틸화된 운데카펩티드를 포함한다. 단리된 최초의 시클로스포린은 천연 생성 진균 대사체 시클로스포린 (Ciclosporin) 또는 시클로스포린 (Cyclosporine) (시클로스포린 A (CsA)로도 공지됨)이었다. 시클로필린에 강하게 결합하지만 면역억제성이 아닌 시클로스포린이 확인되었다. PCT/EP 2004/009804, WO 2005/021028, 또는 WO 2006/071619 (그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에서는 시클로필린에 결

합하고 또한 C형 간염 바이러스 (HCV)에 대해 억제 효과를 갖는 것으로 밝혀진 비-면역억제성 시클로스포린을 개시하고 있다. WO 2006/038088 (그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에서는 HCV의 치료에서 알리스포리비어 (alisporivir)의 사용을 위한 방법 및 조성물을 설명한다. 알리스포리비어 (DEB025 또는 데비오 (Debio)-025)는 시클로필린 (Cyp) 억제제이고, 항-HCV제로서 그의 작용 방식은 HCV 복제에 직접 관여하는 숙주 단백질, 특히 시클로필린 A의 억제를 통한 것이다.

[0003] B형 간염 바이러스 (HBV)는 가장 작은 인간 DNA 바이러스이다 (1). HBV 게놈은 HBV 단백질을 코딩하는 겹치는 해독 프레임을 갖는 부분적으로 이중-가닥의 환상 DNA이다: 외피 단백질 - i) 작은, B형 간염 표면 항원 (HBsAg); ii) 중간 - preS2 + HBsAg; iii) 큰 - preS1 + preS2 + HBsAg; 뉴클레오캡시드 단백질, B형 간염 코어 항원 (HBcAg). B형 간염 e 항원 (HBeAg)은 뉴클레오캡시드 HBcAg와 90% 아미노산을 공유하는, HBV 복제 동안 생산된 비-구조적 단백질이다. HBV의 8가지 유전자형 (A 내지 H로 지정됨)이 결정되었고, 이들은 각각 구별되는 지리적 분포를 가진다. 바이러스는 비-세포변성이고, 이때 바이러스-특이적 세포성 면역이 6개월 내에 간 질환이 소실되는 HBV-급성 감염, 또는 진행성 간 손상과 자주 연관되는 만성 HBV 감염에 대한 노출의 결과에 대한 주요 결정인자 (determinant)이다. 통상적인 진단적 면역검정에 의한 혈청 내의 HBsAg의 검출이 HBV 감염에 대한 핵심 진단 마커이고, 6개월 초과 동안 혈청 내의 HBsAg의 지속적인 검출은 확증적인 만성 HBV 감염이다 (2,3,4). 임상적으로 유의한 HBV 복제에 대한 최상의 마커는 민감한 중합효소 연쇄 반응 (PCR)-기반 검정에 의해 검출된 혈청 내의 HBV DNA의 수준이다.

[0004] 전 세계에서 3억 5천만 명이 넘는 인간이 HBV로 만성적으로 감염되어 있고, 따라서 심각한 간 질환 - 예컨대 만성 간염, 간경화, 간부전 및 간세포 암종 (HCC)의 발병 위험이 증가한다. 만성 HBV 감염의 천연 전개는 연속하는 4개의 기를 포함한다: (1) 초기 '면역관용'기 - 높은 수준의 바이러스 복제 및 최소의 간 염증; (2) 면역 반응성기 - 유의한 간 염증 및 상승된 혈청 아미노트랜스퍼라제; 일부 환자에서 다음으로 진행함: (3) '비-복제'기 - 항-HBe로의 혈청전환; 검출가능하지 않거나 낮은 수준의 바이러스혈증 (PCR-기반 검정에 의해 2000 IU/ml 미만); 간 염증의 소실; 및 (4) HBeAg-음성 만성 B형 간염 - HBeAg의 생산을 방지하지만 바이러스 복제를 방해하지 않는 특이적 바이러스 돌연변이의 출현에 의해 발생함. 상기 형태의 CHB는 혈청 HBV DNA 및 혈청 아미노트랜스퍼라제 (ALT 및 AST) 수준의 변동, 및 진행성 간 질환을 특징으로 한다. 만성 B형 간염 (CHB)은 B형 간염 e 항원 (HBeAg)-양성 또는 HBeAg-음성 CHB로서 존재할 수 있음을 아는 것은 중요하다. CHB 환자의 종단적 연구에서는 간경화의 5년 누적 발생률이 8 내지 20%임을 보여주었다. 간 대상부전 (hepatic decompensation)의 5년 누적 발생률은 대략 20%이다 (2). HCC의 세계적인 발생률은 증가하였고, 현재 5번째의 가장 흔한 암에 해당한다 (2,3,4). HBV-관련 HCC의 1년 발생률은 간경화가 확립될 때 2-5% 범위로 높다 (2).

[0005] CHB에 대한 일차 치료 목표는 HBV 복제를 영구적으로 억제하고 간 질환을 개선하는 것이다. 임상적으로 중요한 단기간 목표는 HBeAg-혈청전환, 혈청 ALT 및 AST의 정상화, 간 염증의 소실을 달성하고, 간 대상부전을 방지하는 것이다 (2). 궁극적인 치료 목표는 간경화, 간암 발생을 억제하고 생존을 연장하기 위해 오래 지속되는 반응을 달성하는 것이다. HBV 감염은 감염된 간세포의 핵 내에 특정 형태의 바이러스 공유 껍데 환상 DNA (ccc HBV DNA)의 지속성 때문에 완전히 근절될 수는 없다. 그러나, 치료-유도된 혈청 HBsAg 제거는 만성 HBV 감염 종료의 마커이고, 최상의 장기간 성과와 연관되었다 (2,3).

[0006] CHB 치료를 위해 현재 7가지 약물이 이용가능하다 - 통상적인 인터페론, peg화 인터페론, 및 직접적인 항바이러스제. 직접적인 항바이러스제 (뉴클레오시드/뉴클레오타이드 유사체)는 주로 사슬 종료자 (terminator)로서 HBV DNA 복제를 직접 저해하는 다음 3개의 클래스에 속한다: L-뉴클레오시드 (라미부딘, 텔비부딘 및 엠트리시타빈); 데옥시구아노신 유사체 (엔테카비어) 및 뉴클레오시드 포스포네이트 (아데포비어 및 테노포비어) (2,3,4). HBeAg-양성 환자에서, 1년에 바이러스학적 치료 반응물 (검출가능하지 않은 혈청 HBV DNA)은 각각의 약물 치료 시에 다음과 같다: peg-인터페론 25%; 라미부딘 36-40%; 엔테카비어 67%; 텔비부딘 60%; 테노포비어 74% (2). 1년 후에 HBsAg의 상실은 0 내지 3%로 매우 낮다. HBeAg-음성의 CHB 환자에서, 1년에 검출가능하지 않은 HBV DNA의 비율은 각각의 약물 치료시에 다음과 같다: peg-인터페론 63%; 라미부딘 72%; 엔테카비어 90%; 텔비부딘 88%; 테노포비어 91%. HBsAg의 상실은 임의의 직접적인 항바이러스제 사용시에 0%이었다. 현재 이용가능한 치료는 최적 미만이고, CHB 치료 목표를 충족시키기 위해 보다 우수한 요법이 필요하다. 인터페론 치료의 핵심적인 제한은 주요 부작용, 낮은 HBV DNA 억제 비율, 및 낮은 ALT 정상화 비율이고; 직접적인 항바이러스제의 핵심적인 제한은 내성 발생; 장기간 평생 동안의 요법을 필요로 하는, 요법 중지 후 HBV 복제의 재발, 매우 낮은 HBsAg 청소 비율, 장기간 평생 동안의 요법에 따른 유해 사례 위험의 증가이다.

[0007] 일정 비율의 만성 HBV 감염 (혈청 HBsAg-양성) 환자는 델타 간염 바이러스 (HDV)와 공동-감염될 것이다. HDV는 단일 가닥 환상 RNA 게놈을 갖는 결합 바이러스로서, B형 간염 바이러스와 연합된 경우에만 급성 또는 만성 간

질환을 일으킨다 (1). HDV RNA에 의해 발현되는 유일한 단백질은 바이러스의 뉴클레오캡시드인 델타 간염 항원이다. HDV는 그 자신의 외피 단백질 (HBsAg)을 코딩하지 않고, 이를 B형 간염 바이러스로부터 "빌려와야" 한다. 따라서, HDV 감염은 HBV의 존재 하에서만 - HBV와 동시에 (공동-감염) 또는 후속적으로 발생하고, 이때 감염 지속 기간은 HBsAg 양성의 지속 기간에 의해 결정된다. HBsAg-양성 환자에서, HDV의 활동 감염은 혈청에서 HDV RNA의 검출, 간세포에서 델타 간염 항원의 면역조직화학적 염색, 또는 혈청에서 IgM 항-HDV의 검출에 의해 확인된다 (2).

[0008] HDV는 세계적으로 분포하고, 지중해 국가, 남부 및 중앙 아프리카 일부와 남미에서 최고 풍토성을 갖는다. 모든 B형 간염 바이러스 보균자의 5%가 HDV로 감염된 것으로 추정된다 (5). HBV 유행률이 낮은 국가, 예컨대 북미 및 북유럽에서, HDV 감염은 정맥내 약물 사용자와 같이 비경구 HBV 노출의 위험이 있는 집단에 주로 제한된다. 높은 HDV 풍토성 지역으로부터의 이주가 최근에 몇몇 유럽 국가에서 유행률을 증가시켜, 만성 HBV 환자 사원에서 대략 10%에 이르렀다.

[0009] 만성 D형 간염의 유일하게 승인된 치료제는 인터페론-알파이지만, 결과가 만족스럽지 않다. 인터페론에 리바비린을 첨가하여도 반응을 개선하지 않았다. HBV 복제를 차단하는 직접적인 항바이러스제는 HDV 복제에 대해 효과가 없는 것으로 나타났다. 인터페론 + 라미부딘 또는 인터페론 + 아데포비어의 조합은 인터페론 단독에 비해 반응을 개선하지 않았다 (2,3,6). 따라서, HDV-유도된 간 손상이 간경화, 간 대상부전 및 몇몇 경우에 간부전으로 인한 사망을 일으키므로, 만성 D형 간염의 치료는 주요 미충족된 의학적 필요로 남아있다.

발명의 내용

[0010] 따라서, 본원의 목적은 B형 간염 바이러스 단독 감염 환자, 또는 B형 간염 바이러스와 델타 간염 바이러스로 감염된 환자, 및 이들 감염에 의해 유도된 간 질환 또는 장애, 예컨대 만성 간염, 간경화, 간 대상부전 및 HCC의 치료를 위한 새로운 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 놀랍게도, 본 발명자들은 시클로필린 억제제, 특히 알리스포리비어가 HBV 감염의 치료에서 효과적으로 사용될 수 있는, B형 간염 바이러스에 대한 항바이러스 특성을 갖는 것을 발견하기에 이르렀다. 특히, 본 발명자들은 알리스포리비어가 HBV 복제를 폐지하고 (또는 저해하고) 간 세포에서 HBsAg 생산을 감소시키는 것을 발견하였다. 추가로, 시클로필린 억제제, 특히 알리스포리비어는 또한 만성 D형 간염의 치료에 사용될 수 있다.

[0012] 따라서, 본 발명은 알리스포리비어를 사용하는 새로운 항-HBV 및 항-HDV 치료법을 제공한다.

[0013] 추가로, 본원은 유효량의 시클로필린 억제제, 특히 알리스포리비어를 단독으로 또는 직접적인 항바이러스제 또는 인터페론-알파와 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 HBV 및/또는 HDV 감염 및 유도된 간 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 본원은 추가로 HBV 감염 및 연관된 간 질환의 치료에 사용하기 위한, 또한 HBV 및 HDV로 감염된 환자 및 연관된 간 질환의 치료에 사용하기 위한 알리스포리비어를 제공한다.

본원의 개요

[0015] 추가로 다음을 설명한다:

[0016] 1.1 환자에게 알리스포리비어를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 B형 간염 바이러스 감염 및 HBV-유도된 질환을 치료하는 방법.

[0017] 1.2 알리스포리비어를 투여하는 것을 포함하는, HBV 복제 및 HBsAg 생산을 억제하는 방법.

[0018] 1.3. 환자에게 알리스포리비어를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 델타 간염 바이러스 감염 및 HDV-유도된 장애를 치료하는 방법.

[0019] 1.4. 알리스포리비어를 투여하는 것을 포함하는, HDV 복제 및 HBsAg 생산을 억제하는 방법.

[0020] 1.5. 알리스포리비어를 투여하는 것을 포함하는, HBV 또는 HDV-유도된 간 손상을 감소시키는 방법 및 간 세포 사멸을 감소시키는 방법.

[0021] 1.6. 알리스포리비어를 투여하는 것을 포함하는, 혈청 ALT 수준을 정상화하는 방법.

[0022] 1.7. 알리스포리비어를 투여하는 것을 포함하는, 간 염증을 감소 또는 소실시키는 방법.

[0023] 2. 상기 규정한 바와 같은 임의의 방법에 사용하기 위한 제약 조성물의 제조에 있어서 알리스포리비어의 용도.

- [0024] 3. 상기 규정한 바와 같은 임의의 방법에 사용하기 위한 의약의 제조에 있어서 알리스포리비어의 용도.
- [0025] 4. 상기 규정한 바와 같은 임의의 방법에 사용하기 위한 의약의 제조에 있어서, HBV 복제를 억제하는 직접적인 항바이러스제와 조합된 알리스포리비어의 용도.
- [0026] 5. HBV 감염 및 연관된 간 질환 환자, 및 HBV 및 HDV 감염 및 연관된 간 질환 환자의 치료를 위한, 인터페론과 조합된 알리스포리비어의 용도.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 알리스포리비어를 사용하여 세포내 HBV DNA 수준의 유의한 감소 (72시간에서 10배)가 관찰되었음을 보여준다.
- 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 알리스포리비어는 NIM811의 효과에 비해 세포 배양 상층액에서 HBV DNA 수준을 감소시키는데 더 큰 효과를 보여주었다.
- 도 3은 DEB025의 존재 하에 일시적으로 형질감염된 세포 (Huh7)로부터 또는 안정적으로 형질감염된 세포 (HepG2215)로부터 분비되는 HBV DNA의 용량-의존적 감소를 예시한다.
- 도 4는 DEB025의 존재 하에 Huh7 및 HepG2215 세포에서 세포질 HBV DNA의 용량 의존적 감소를 예시한다.
- 도 5는 DEB025 (DEB), 텔비부딘 (TELB) 및 DEB + TELB의 존재 하에 HepG2215 세포에서 분비된 HBV DNA의 감소를 예시한다.
- 도 6은 DEB025 (DEB), 텔비부딘 (TELB) 및 DEB + TELB의 존재 하에 HepG2215 세포에서 세포성 HBV DNA의 감소를 예시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본원에서 사용될 때 "B형 간염 바이러스 감염 환자"는 임의의 B형 간염 바이러스 유전자형, 예를 들어, 유전자형 A, B, C, D 등으로 감염된 환자를 의미한다. 일부 실시양태에서, 환자는 델타 간염 바이러스로 감염된다. 일부 실시양태에서, B형 간염 바이러스 감염 환자는 델타 간염 바이러스로 또한 감염될 수 있다.
- [0029] 본 발명에서, 인터페론은 peg화되거나 비-peg화될 수 있고, 인터페론, 예컨대 인트론-에이(Intron-A)® (인터페론 알파-2b: 쉐링 코퍼레이션 (Schering Corporation, 미국 뉴저지주 케닐워쓰)); 페그-인트론(PEG-Intron)® (peg인터페론 알파-2b: 쉐링 코퍼레이션, 미국 뉴저지주 케닐워쓰); 로페론(Roferon)® (재조합 인터페론 알파-2a: 호프만-라 로슈 (Hoffmann-La Roche, 미국 뉴저지주 너틀리)); 페가시스(Pegasys)® (peg인터페론 알파-2a: 호프만-라 로슈, 미국 뉴저지주 너틀리); 베레포르(Berefor)® (인터페론 알파 2: 비링거 인겔하임 파마슈티칼, 인크. (Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., 미국 코네티컷주 리지필드)); 수미페론(Sumiferoon)® (천연 알파 인터페론의 정제된 블렌드: 스미토모 (Sumitomo, 일본)); 웰페론(Wellferon)® (립프로구성 인터페론 알파 n1: 글락소스미스클라인 (GlaxoSmithKline)); 인페르겐(Infergen)® (컨센서스 알파 인터페론: 인터문 파마슈티칼스, 인크. (InterMune Pharmaceuticals, Inc., 미국 캘리포니아주 브리스베인) 및 암젠, 인크. (Amgen, Inc., 미국 캘리포니아주 뉴베리 파크)); 알페론(Alferon)® (천연 알파 인터페론의 혼합물: 인터페론 사이언시스 (Interferon Sciences), 및 퍼듀 프레데릭 컴퍼니 (Purdue Frederick Co., 미국 코네티컷주)); 비라페론(Viraferon)®; 및 이들 인터페론의 조합물을 포함할 수 있다.
- [0030] 사용할 수 있는 접합형 인터페론은 예를 들어, 인간 알부민에 접합된 알부페론(Albuferon; 휴먼 게놈 사이언스 (Human Genome Science)), 수용성 중합체 또는 폴리알킬렌 옥시드 단독중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌화 폴리올, 그의 공중합체 및 그의 블록 공중합체에 접합된 인터페론을 포함한다. 폴리알킬렌 옥시드-기반 중합체에 별법으로, 효과적으로 비-항원성인 물질, 예컨대 텍스트란, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리아크릴아미드, 폴리비닐 알콜, 탄수화물-기반 중합체 등을 사용할 수 있다. 인터페론-중합체 접합체는 US 4766106, US 4917888, EPA 0 236 987, EPA 0 510 356 및 WO 95/13090에 설명되어 있다. 중합성 변형은 항원 반응을 충분하게 감소시키므로, 외래 인터페론은 완전히 자가일 필요는 없다. 중합체 접합체를 제조하기 위해 사용된 인터페론은 포유동물 추출물, 예컨대 인간, 반추동물 또는 소 인터페론으로부터 제조할 수 있거나 재조합 방식으로 생산할 수 있다. 다른 형태의 인터페론은 인터페론 베타, 감마, 타우 및 오메가, 예컨대 레비프(Rebif) (인터페론 베타 1a: 세로노 (Serono)), 옴니페론(Omniferon) (천연 인터페론: 비라젠 (Viragen), 또는 오메가 인터페론(Omega Interferon) (비링거 인겔하임), 경구 인터페론, 예컨대 경구

인터페론 알파 (아마릴로 바이오사이언시스 (Amarillo Biosciences))를 포함한다.

- [0031] 사용할 수 있는 인터페론의 추가의 예는 peg화된 인터페론 알파, 예를 들어 peg화 인터페론 α-2a, peg화 인터페론 α-2b, peg화 컨센서스 인터페론, 또는 peg화 정제된 인터페론-α 생성물을 포함한다. peg화 인터페론 α-2a는 유럽 특허 593,868 (그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있고, 예를 들어 상표명 페가시스® (호프만-라 로슈)로 상업적으로 이용가능하다. peg화 인터페론-α-2b는 예를 들어, 유럽 특허 975,369 (그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있고, 예를 들어 상표명 페그-인트론 A® (쉐링 프라우 (Schering Plough))로 상업적으로 이용가능하다. peg화 컨센서스 인터페론은 WO 96/11953 (그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0032] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 방법에 사용되는 인터페론은 peg화 인터페론이다. 다른 실시양태에서, 인터페론은 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2b, 컨센서스 인터페론, 정제된 인터페론 알파 생성물, 또는 peg화 인터페론 알파-2a, peg화 인터페론 알파-2b, 및 peg화 컨센서스 인터페론, 천연 알파의 혼합물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0033] 바람직하게는, 인터페론 알파를 사용하는 방법은 peg화 인터페론 알파-2b를 사용하고, peg화 인터페론 알파-2b의 양은 매주, 매주 3회, 2일마다 또는 매일 기준으로 주당 0.5 내지 2.0 μg/kg이다.
- [0034] 본원에서 사용될 때, "μg/kg"은 치료할 포유동물 (인간 포함)의 체중 1 kg당 약물의 μg을 의미한다.
- [0035] 본원에서 사용될 때, 용어 "치료" 또는 "치료하다"는 질환에 걸릴 위험이 있거나 질환에 걸린 것으로 의심이 되는 환자뿐만 아니라 아프거나 질환 또는 의학적 병태로 고통받는 것으로 진단된 환자의 치료를 포함하여, 예방을 위한 또는 예방적 치료, 및 치유 또는 질환 변형 치료를 모두 나타내고, 임상적 재발 억제를 포함한다. 치료제는 장애 또는 재발 장애의 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치유하거나, 그의 발병을 지연시키거나, 그의 중증도를 감소시키거나, 개선하기 위해, 또는 그러한 치료제의 부재 하에 예상되는 것을 넘어 대상체의 생존을 연장하기 위해 의학적 장애가 있거나 결국 장애에 걸릴 수 있는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0036] "치료적 요법"은 병의 치료 패턴, 예를 들어, HBV 요법 동안 사용된 투약의 패턴을 의미한다. 치료적 요법은 유도 요법 및 유지 요법을 포함할 수 있다.
- [0037] 문구 "유도 요법" 또는 "유도 기간"은 질환의 초기 치료를 위해 사용되는 치료적 요법 (또는 치료적 요법의 일부)를 나타낸다. 유도 요법의 일반적인 목적은 치료 요법의 초기 기간 동안 높은 수준의 약물을 환자에게 제공하는 것이다. 유도 요법에서는 (부분적으로 또는 전체적으로) "부하 (loading) 요법"을 사용할 수 있고, 이것은 유지 요법 동안 의사가 사용할 수 있는 것보다 더 고용량의 약물을 투여하는 것, 또는 유지 요법 동안 의사가 약물을 투여할 것보다 더 자주 약물을 투여하는 것, 또는 둘 모두를 포함할 수 있다.
- [0038] 문구 "유지 요법" 또는 "유지 기간"은 예를 들어, 장기간의 시간 (수개월 또는 수년) 동안 관해 상태의 환자를 유지하기 위해, 병의 치료 동안 환자의 유지를 위해 사용되는 치료적 요법 (또는 치료적 요법의 일부)를 나타낸다. 유지 요법에서는 연속 요법 (예를 들어, 약물을 규칙적인 간격으로, 예를 들어, 매주, 매월, 매년 등으로 투여하는) 또는 간헐 요법 (예를 들어, 단속 (interrupted) 치료, 간헐 치료, 재발시 치료, 또는 특정 예정된 기준 [예를 들어, 통증, 질환 소견 등]의 달성 시 치료)을 사용할 수 있다.
- [0039] 본원에서 사용될 때, 용어 "약"은 문맥에서 달리 지시하지 않으면, + 또는 -10% 범위를 의미하도록 사용된다.
- [0040] 다른 실시양태에서, 인터페론 알파는 peg화 인터페론 알파-2a이고, 투여되는 peg화 인터페론 알파-2a의 양은 매주, 매주 3회, 2일마다 또는 매일 기초로 주당 20 내지 250 μg/kg이다. 바람직하게는, 인터페론 peg-IFNα2a는 매주 1회 180 μg의 양으로 투여된다.
- [0041] 구체적인 실시양태에서, 본원의 방법에서 사용된 예시적인 인터페론은 인트론-에이®; 페그-인트론®; 로페론®; 페가시스®; 베레포르®; 수미페론®; 웰페론®; 인페르젠®; 알페론®; 비라페론®; 알부페론® (휴먼 게놈 사이언스); 레비프; 옴니페론; 오메가 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 인터페론이다.
- [0042] 일부 실시양태에서, 알리스포리비어는 환자에서의 B형 간염 바이러스 감염의 치료 및/또는 환자에서의 D형 간염 바이러스 감염의 치료에 사용된다. 또 다른 측면에서, 알리스포리비어는 직접적인 항바이러스제 또는 인터페론와 조합되어 투여된다.
- [0043] 일부 다른 실시양태에서, 환자에게 유효량의 알리스포리비어를 투여하고, 임의로 인터페론 또는 직접적인 항바이러스제를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 B형 간염 바이러스 감염을 치료하는 방법을 설명한다. 또 다른

측면에서, 알리스포리비어는 간 염증 개선, 간 세포 사멸의 감소 (ALT 수준에 의해 평가할 때), 및 간 질환의 진행 예방에 사용하기 위한 것이다.

- [0044] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 방법에 따라 사용하기 위한 알리스포리비어를 포함하는 제약 조성물, 및 상기 제약 조성물과 함께 상기 조성물을 투여하기 위한 사용 지침서를 포함하는 패키지 (package)를 설명한다.
- [0045] 또 다른 실시양태에서, 알리스포리비어는 요법 치료제의 항바이러스 효능을 촉진하는 추가의 표준 치료제와 함께 투여될 수 있다.
- [0046] 직접적인 항바이러스제는 B형 간염 바이러스 (HBV) 복제 주기에서 특이적 단계를 저해하는 약제를 의미하도록 본원에서 사용된다. HBV 복제를 억제하는 직접적인 항바이러스제는 예를 들어, HBV의 치료를 위해 승인된 현재의 항-HBV제, 즉, 텔비부딘, 라미부딘, 엠트리시타빈, 엔테카비어, 아데포비어 및 테노포비어 중 임의의 것일 수 있다.
- [0047] 상기 설명된 치료에서, 표준 치료제의 유효 투여량은 조성물 내에서 투여되고, 즉, 이들은 함께 (즉, 동시에) 투여될 수 있지만, 또한 따로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 일반적으로, 조합 요법은 대개 함께 투여되고, 이때 근거는 그러한 동시 투여가 바이러스에 대해 다수의 동시 스트레스를 유도하기 때문이다. 제공되는 구체적인 투여량은 약물의 흡수, 불활성화 및 배출 속도뿐만 아니라 다른 인자에 따라 결정될 것이다. 투여량 값은 또한 완화시킬 병태의 중증도에 따라 변할 것임을 알아야 한다. 본원에서 사용될 대 용어 "동시-투여" 또는 "조합 투여" 또는 "와 조합되어 투여된" 등은 단일 환자에게 선택된 치료제들의 투여를 포함하도록 의미하고, 약제가 반드시 동일한 투여 경로에 의해 또는 동시에 투여되는 것이 아닌 치료 요법을 포함하도록 의도된다. 고정된 조합물이 또한 본원의 범위 내에 있다. 본원의 제약 조합물 투여는 그의 제약상 활성 성분들 중 단지 하나를 투여하는 단계요법에 비해 또는 현재의 표준 치료 요법에 비해 유익한 효과, 예를 들어 상승적 또는 상승적 치료 효과를 생성시킨다. 본원에서 설명되는 방법에 사용된 치료는 임의의 통상적인 경로로 투여될 수 있다. 하나 이상의 성분들은 비경구로, 예를 들어, 주사가 가능한 용액 또는 현탁액 형태로, 또는 주사가 가능한 비축 (deposit) 제제 형태로 투여될 수 있다. 바람직하게는, 알리스포리비어는 캡슐, 정제, 또는 음용 용액 또는 현탁액 형태로 경구로 투여될 것이다. 알리스포리비어를 포함하는 경구 투여용 제약 조성물은 대개 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 물질을 추가로 포함한다. 일반적으로, 이들 조성물은 농축되고, 투여 전에 적절한 희석제, 예를 들어, 물과 조합할 필요가 있다. 비경구 투여용 제약 조성물은 대개 하나 이상의 부형제를 또한 포함한다. 선택적인 부형제는 등장화제, 완충제 또는 다른 pH-제어제, 및 보존제를 포함한다. 이들 부형제는 조성물의 유지를 위해 및 바람직한 pH 범위 (약 6.5-7.5) 및 삼투농도 (약 300 mosm/L)를 획득하기 위해 첨가될 수 있다.
- [0048] 본원에서 설명될 때 알리스포리비어의 투여는 단일 투여 형태로 또는 하나 초과 투여 형태로 존재하고; 하나 이상의 경구 투여 형태가 매일 각각의 시간에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 알리스포리비어는 200 mg 내지 1000 mg의 용량으로 투여된다.
- [0049] 치료 요법의 효능은 표준 프로토콜을 이용하여 모니터링할 수 있다. 치료 이후 혈청에서 HBV 수준의 결정 및 혈청 ALT 수준의 측정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 환자를 그들의 혈청 내에 HBV DNA의 존재에 대해 평가할 수 있다. HBV DNA (IU/mL)는 치료 동안 규칙적인 간격으로, 예를 들어, 제1일 (투여 전 및 투여 4, 8, 및 12시간 후) 및 제2, 제3, 제8, 제15, 제29일, 및 제12주, 제24주, 제36주, 제48주, 제72주에 투여 전 (적용가능할 때), 및 추적 조사시에 측정할 수 있다.
- [0050] 치료 효능은 국제적으로 인정되는 파라미터를 이용하여 모니터링할 것이다 (2,3,4):
- [0051] 1.1. B형 간염 바이러스가 있는 환자에서 반응의 모니터링
- [0052] a) 바이러스 복제에 대한 효과를 평가하기 위해 혈청 HBV DNA 수준을 민감한 정량적 PCR-기반 검정을 이용하여 모니터링한다.
- [0053] b) HBeAg-양성 환자에서 - HBe-혈청전환이 일어나는지 여부를 결정하기 위해 HBeAg를 상응하는 항-HBe와 함께 모니터링한다.
- [0054] c) 간 염증 및 간 세포 사멸에 대한 영향을 평가하기 위해 ALT 및/또는 AST의 혈청 수준을 모니터링한다.
- [0055] d) HBsAg 청소율은 최적의 치료 성과를 나타낼 것이므로 혈청 HBsAg를 정성적으로 및 정량적으로 모니터링한다.

- [0056] e) 사용된 치료제에 대한 내성을 부여하는 HBV 게놈 내에서 돌연변이의 발생.
- [0057] 1.2 델타 간염 바이러스가 있는 환자에서 반응의 모니터링. HBV 감염에 대해 상기 나열된 마커에 추가로, 다음 HDV-특이적 시험을 사용할 것이다:
- [0058] a) 델타 간염 바이러스 복제에 대한 효과를 평가하기 위해 혈청 HDV RNA 수준을 모니터링한다.
- [0059] b) 간 조직에서 면역조직화학에 의한 델타 항원의 검출은 진행되는 HDV-복제를 지시하는 추가의 정보를 제공할 수 있다.
- [0060] 다음 실시예는 본원에 설명된 발명을 예시한다.
- [0061] **실시예**
- [0062] 실험 설계 및 인간 세포주:
- [0063] 실험에서는 바이러스 복제 및 바이러스 단백질 생산에 대한 다양한 화합물의 영향을 평가하기 위해 및 B형 간염 바이러스 또는 델타 간염 바이러스 생활 주기에 대한 시험관내 연구를 위한 모델로서 확립된 몇몇 인간 간암종-유래 세포주를 사용하였다 - HepG2 및 HuH-7 (HBV 음성), PLC/PRF/5 (HBV 양성, HBsAg만을 생산함), 및 HepG2.2.15 (HBV 양성, 완전 HBV 복제를 지원함).
- [0064] A) B형 간염 바이러스 복제 및 HBsAg 생산에 대한 시클로필린 억제제, 특히 DEB025 (알리스포리비어)의 항바이러스 활성의 조사.
- [0065] HepG2215 세포주 (HepG2 세포로부터 유래됨)를 HBV DNA로 안정적으로 형질감염시켰고, 감염성 비리온 및 HBsAg의 생산과 함께 완전 HBV 복제를 지지하였다. 이전에 설명된 바와 같이 (7,8), HepG2215 세포를 시클로필린 억제제를 첨가하기 전에 7일 동안 12-웰 플레이트에서 배양하였다.
- [0066] 세포를 0.25, 1.0 또는 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 NIM811 또는 DEB025로 처리하고; 세포 및 상청액을 각각 기준선, NIM811 또는 DEB025의 첨가 6, 24, 48 및 72시간 후에 따로 수거하였다.
- [0067] HBV 복제에서 시클로필린 A의 역할을 평가하기 위해, HepG2215 세포를 시클로필린 A에 대해 siRNA로 형질감염시키고, 배지 단독과 함께 또는 NIM811 또는 DEB025를 첨가하여 인큐베이팅하였다. 이와 유사하게, HBV 및 HDV 복제에서 시클로필린 B, C 및 D의 역할을 CypB, C 및 D에 특이적인 siRNA에 의해 평가할 것이다.
- [0068] HuH-7 세포를 pBlueScript KS(+) 벡터를 함유하는 플라스미드로 형질감염시키고, 여기서 아형 adw2의 1.5 HBV DNA 게놈을 사용하였다. 융합미만의 (Subconfluent) HuH-7 세포를 10 μL 의 수퍼펙트 (Superfect) 시약 (퀴아젠 (Qiagen, 영국 콜리))을 사용하여 직경 60 mm의 접시당 5 μg 의 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. 상청액을 형질감염 18 h 후에 10% FCS를 보충한 배지로 교체하고, 설명된 바와 같이 (7), 세포를 3일 동안 배양하였다.
- [0069] PLC/PRF/5 세포 (알렉산더 (Alexander) 세포주)는 HBV DNA의 통합된 단편을 함유하고, HBsAg 만을 생산하지만, 완전 HBV 복제를 지지하지 않는다 (9). 이것은 불활성 HBsAg 보균자 (즉, 만성 HBV 감염의 비-복제기)인 환자에서 간세포와 유사하다. 상기 세포주는 완전 비리온 생산과 분리된 HBsAg 생산에 대한 시클로필린 억제제의 영향을 특이적으로 평가하기 위해 사용되었다.
- [0070] **결과**
- [0071] 1) 도 1: 시클로필린 억제제 NIM811 및 DEB025는 모두 세포내 HBV 뉴클레오캡시드-연관 HBV DNA 수준을 감소시켰다. HBV DNA 감소는 NIM811 또는 DEB025의 부재 하에 HepG2215 세포에 비해 2 내지 10배였다. 세포내 HBV DNA 수준의 가장 현저한 감소 (72시간에 10배)는 DEB025 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 관찰되었고, 이것은 72h에 NIM811에서 관찰된 감소보다 더 컸다.
- [0072] 2) 도 2: DEB025 (5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서)는 NIM811의 효과에 비해 세포 배양 상청액 내에서 HBV DNA 수준을 감소시키는데 더 큰 효과를 보여주었다.
- [0073] B) 델타 간염 바이러스 복제에 대한 시클로필린 억제제, 특히 DEB025 (알리스포리비어)의 항바이러스 활성의 조사.
- [0074] 델타 간염 바이러스 (HDV) 감염은 항상 헬퍼 (helper) 바이러스, 즉, B형 간염 바이러스의 존재와 연관된다. 이러한 의존성에 대한 기초는 간세포 내로 HDV 도입 및 새로운 HDV 입자의 조립 (assembly) 모두를 위해 HBV 외피 단백질이 요구된다는 점이다. 일단 감수성 세포 내에 있으면, 숙주 RNA 중합효소의 재지시를 이용한 RNA-지

시된 RNA 합성에 의해 HDV의 단일 가닥 환상 RNA 게놈이 복제될 수 있다. 시험관 내에서, 헬퍼 HBV의 부재 하에 배양된 세포주 내에서 HDV 게놈 복제를 연구하는 것이 가능하다. 예를 들어, 복제는 세포가 HDV 서열의 cDNA 버전으로 형질감염될 때 개시된다 (10). 또한, HDV RNA를 δ Ag에대한 mRNA와 함께 동시형질감염시킴으로써 필요가 충족될 수 있다 (11).

[0075] C) B형 간염 바이러스 복제에 대한 직접적인 항-바이러스 표적화 HBV-DNA 중합효소 ("텔비부딘")와 조합한 시클로필린 억제제, 특히 DEB025 (알리스포리비어)의 항바이러스 활성의 조사.

[0076] 안정적으로 형질감염된 (HepG2215) 및 일시적으로 형질감염된 (HUH-7) 세포 (완전 HBV 비리온 및 HBsAg 입자를 생산함)를 일정 범위의 알리스포리비어 농도 (0.25, 1.0, 5.0 또는 20 μ g/ml) 단독, 텔비부딘 단독, 또는 알리스포리비어 및 텔비부딘의 조합물로 처리하였다. 개별 시클로필린의 관련성을 결정하기 위해, HepG2215 세포를 시클로필린 (Cyp) A, C 또는 D에 특이적인 siRNA로 형질감염시키고, 추가로 알리스포리비어로 처리하였다. 세포질 추출물 및 상청액을 기준선; 처리 24, 48 및 72시간 후에 수거하였다. 항바이러스 활성의 운동학은 세포 내 및 분비된 HBV-DNA (실시간 qPCR) 및 HBsAg 수준 (ELISA)의 정량에 의해 평가하였다.

[0077] HepG2215 및 HUH-7 세포 모두에서, 알리스포리비어 처리는 비처리 대조군에 비해 모든 시점에서 각각 70% ($p=0.004$) 및 63% ($p<0.001$)로 세포내 및 분비된 HBV-DNA의 용량-의존적 감소를 일으켰다. 알리스포리비어 및 텔비부딘의 조합물은 세포내 ($p=0.001$) 및 분비된 ($p=0.028$) HBV-DNA를 감소시키는데 더 큰 효과를 보였고, 알리스포리비어 또는 텔비부딘 단독에 비해 HBsAg의 >3배 감소를 보였다. CypA, C 또는 D 발현은 상응하는 siRNA로의 형질감염 후에 현저하게 감소하였고, 이것은 HBV-DNA 및 HBsAg 수준의 유의한 감소 ($p<0.001$)와 연관되었다. CypA, C 또는 D에 대해 침묵화시킨 세포의 알리스포리비어 처리는 HBV-DNA 및 HBsAg 수준을 추가로 감소시켰고, 여기서 CypA 침묵화시킨 세포에 비해 CypC 또는 CypD 침묵화시킨 세포에서 더 큰 항바이러스 효과를 가졌다 ($p<0.001$).

[0078] 이들 결과는 알리스포리비어가 HBV 복제의 다수 부위를 저해하고, 그의 항바이러스 활성이 직접적인 항바이러스 표적화 바이러스 DNA 중합효소, 예컨대 텔비부딘과 상승작용성을 제안한다.

[0079] 1. 세포 배양 및 형질감염

[0080] 인간 간암종 세포주 HuH7를 10% 태소 혈청, 페니실린, 및 스트렙토마이신을 보충한 돌베코 변형 이글 (Dulbecco's modified Eagle's) 배지 내에서 배양하고, 이전에 설명된 바와 같이 (12), 37°C에서 5% CO₂ 내에서 인큐베이팅하였다. 형질감염 연구를 위해, 세포 배양액을 6-웰 플레이트 또는 직경 60 mm의 페트리 접시에 밤새 접종하고, 제조사의 지시에 따라 DMRIE-C 시약 (김코 비알엘 (Gibco BRL))을 사용하여 각각 5 및 10 μ g의 HDag mRNA 및 HDV RNA의 50:50 혼합물 (게놈-길이의 1.2배)로 형질감염시켰다. 형질감염 후에, 배양액을 밤새 인큐베이팅하고, 배지를 교환하고, 추가로 2 내지 7일까지 계속 인큐베이팅하였다.

[0081] 2. 세포질 및 세포 상청액 내에서 HBV DNA 정량

[0082] 이전에 설명된 바와 같이 (8,9), HBV 복제는 세포 배양 상청액 내에서 바이러스 뉴클레오캡시드-연관 HBV DNA (세포질) 및 HBV DNA 수준의 정량에 의해 평가하였다. 뉴클레오캡시드 HBV DNA를 추출하고 택맨 (TaqMan) 실시간 PCR (ABI Prism 7700)에 의해 정량하였다. 세포내 HBV DNA를 하우스-키퍼 (house-keeping) 유전자로서 β -액틴으로 표준화하였다. 분비된 HBV DNA를 QIAmp DNA 미니키트 (키아젠, 영국 서섹스)를 사용하여 추출하고, 또한 택맨에 의해 정량하였다. HBV DNA 정량의 감도는 설명된 바와 같이 (9,10), EuroHep HBV DNA 표준물뿐만 아니라 HBV DNA 플라스미드의 연속 희석액을 사용하여 각각의 실행에서 입증하였다.

[0083] 3. HBsAg 정량

[0084] 세포 배양 상청액 (2215 내지 PLC/PRF/5 세포로부터) 내의 HBsAg 수준을 공지의 양의 HBsAg의 연속 희석액을 사용하여 Elisa (아바자임 (Abazyme, 미국 매사추세츠주 니드햄))를 이용하여 정량하였다 (9).

[0085] 4. SiRNA 형질감염

[0086] HepG2215 세포를 siRNA (다마콘 인크. (Dharmacon Inc., 미국 콜롬비아주 라파예트))로 50% 밀도로 접종하고 48 h 동안 인큐베이팅하였다. 후속적으로, 세포를 세척하고, NIM811 또는 DEB025를 첨가하였다 (BL). 세포 및 상청액 샘플을 6h, 24h (배지를 교체하였음) 및 48시간에 수집하였다. 총 DNA를 샘플로부터 추출하고, HBV DNA를 위에서와 같이 실시간 PCR에 의해 정량하였다. 총 RNA를 페놀, 클로로포름으로 추출하였다. RNA를 콰티텍트 (Quantitect) 역전사 키트 (키아젠)를 사용하여 역전사하고, cDNA를 콰티텍트 프라이머 (키아젠, 영국 서섹스

스)를 사용하는 SYBR 그린 콰티텍트 키트를 이용하여 정량하였다.

[0087] 5. HBsAg에 대한 면역블롯 분석

[0088] 48시간 후에, 세포 (PLC/PRF/5 또는 HepG2215 세포)를 트립신 처리하고, 인산염-완충 염수 내에서 2회 세척하고, 용해 완충제 내에 재현탁시켰다. PLC/PRF/5 세포 내의 인간 IgG 및 HBsAg의 존재는 설명된 바와 같이 (7), 모노클로날 항-HBs IgG의 존재 또는 부재 하에 배양된 세포 내에서 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다.

[0089] 6. 델타 간염 RNA에 대한 시험관내 전사

[0090] HDV RNA (게놈 길이의 1.2배)를 이전에 설명된 바와 같이 (13), 제한 효소 NotI를 사용한 선형화 후에 T7 메가스크립트 (MEGAscript) 키트 (앰비온 (Ambion))를 사용하여 플라스미드 pBS δ 1.2G, pBS δ 1.2AG, pBS δ 1.2G(2xS), 및 pBS δ 1.2AG(2xS)로부터 전사하였다. HDV에 대한 캡핑된 (Capped) mRNA는 T7 m-메시지 (Message) m-머신 (Machine) 키트 (앰비온)를 사용하여 HindIII을 사용한 선형화 후에 플라스미드 pX9-I/II로부터 전사하였다. 비표지된 단량체 게놈 및 항게놈성 HDV RNA를 PstI 소화에 의한 선형화 후에 T7 메가스크립트를 사용하여 pTM δ SalA 및 pTM δ SalB로부터 전사하였다.

[0091] 7. HDV RNA의 노던 (Northern) 분석

[0092] 접종물 또는 혈청으로부터의 바이러스 RNA를 제조자의 지시에 따라 QIAamp 바이러스 RNA 미니키트 (퀴아젠, 미국 캘리포니아주 발렌시아)를 사용하여 정제하였다 (14,15). 이어서, 다양한 양의 RNA를 1.9 M 글리옥살 (피셔 사이언티픽 (Fisher Scientific, 미국 뉴저지주 페어 론))-7.1 mM 인산나트륨 (pH 6.8)-4.5 mM EDTA-35% DMSO의 존재 하에 55°C에서 50 min 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 10 mM 인산나트륨 (pH 6.8)을 함유하는 1.5% 아가로스 겔 상에 로딩하고, 4 h 동안 150 mA에서 전기영동시켰다. 상청액에 대해 RNA의 절반을 사용한 한편, 세포성 RNA에 대해 5 μg을 로딩하였다. RNA를 제타-프로브 (Zeta-Probe) (바이오-라드 (Bio-Rad, 미국 캘리포니아주 리치먼드)) 막에 밤새 모세관 전달하였다. 전달 후에, 막을 소성하거나 스트라타링커 (Stratalinker) (스트라타젠 (Stratagene))를 사용하여 UV 가교연결하였다. 블롯을 상세히 설명된 바와 같이 (15) 혼성화하였다. 혼성화 후에, 블롯을 70°C에서 400 ml의 2x SSPE-0.1% SDS, 이어서 400 ml의 1x SSPE-0.1% SDS, 이어서 200 ml의 0.1x SSPE-0.1% SDS로 세척하였다. 막을 70°C에서 건조시키고 자가방사선촬영 및 포스포리미저 (phosphorimager) (몰레큘라 다이내믹스 (Molecular Dynamics)) 분석하였다.

[0093] 8. 혈청 샘플 내에서 실시간 PCR 정량 (이전에 설명된 바와 같이 (16))

[0094] HDV RNA를 QIAamp MinElute 바이러스 진공 (퀴아젠, 프랑스 코르타보프)를 사용하여 250 μl의 혈청 또는 혈장으로부터 추출하였다. 이전에 설명된 바와 같이 cDNA를 합성하고, Montage PCR 원심분리 필터 장치 (밀리포어 (Millipore, 프랑스 몰사임))로 정제하였다.

[0095] 정방향 프라이머는 게놈의 리보자임 영역을 표적화하도록 선택하고, 역방향 프라이머는 항게놈 리보자임의 영역 I을 표적화하였다. 프로브 (이는 역방향 프라이머와 동일한 영역에 혼성화함)는 역방향 프라이머와 염기 짝형성을 피하기 위해 항게놈 서열에 어닐링 (anneal)하도록 설계하였다. 프라이머 및 프로브의 명칭 및 서열은 다음과 같았다: 델타-F (정방향 프라이머), 5'-GCATGGTCCCAGCCTCC-3'; 델타-R (역방향 프라이머), 5'-TCTTCGGGTCGGCATGG-3'; 및 델타-P (프로브), 5'-FAM-ATGCCAGGTCGGAC-MGB-3'. HDV-3 게놈의 서열과 하나의 미스매치 (mismatch)의 존재 때문에, 다음 제2 직접 프라이머를 HDV-3 단리물의 증폭을 위해 특이적으로 설계하였다: T3-델타-F, 5'-GCATGGCCCAGCCTCC-3'.

[0096] 실시간 PCR은 택맨 유니버설 PCR 마스터 믹스 (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems, 프랑스 코르타보프))를 사용함으로써 수행하였다. 반응은 50°C에서 2 min의 하나의 개시 단계, 이어서 95°C에서 10 min, 이어서 95°C에서 15 s 및 60°C에서 1 min을 포함한 45 사이클의 증폭으로 이루어졌다. 반응, 데이터 획득 및 분석은 ABI PRISM 7000 서열 검출 시스템 (어플라이드 바이오시스템즈, 프랑스 코르타보프)을 사용하여 수행하였다.

[0097]

참조문헌:

1. Naoumov NV. Hepatitis Viruses (excluding hepatitis C virus). Oxford Textbook of Medicine 5th Edition, Eds. D. Warrell, T. Cox, J. Firth, Oxford University Press, 2010, Vol 1: 609-615.
2. EASL Clinical Practice Guidelines : Management of chronic hepatitis B. J Hepatol 2009; 50:227-242.
3. Lok A, McMahon B. Chronic Hepatitis B:Update 2009. AASLD Practice Guidelines. Hepatology 2009;50 (3):1-36.
4. Liaw Y-F et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. Hepatol Int 2008.
5. Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010;7(1):31-40.
6. Wedemeyer H, et al. Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta. N Engl J Med. 2011;364(4):322-31.
7. R. Schilling, et al. Endocytosis of hepatitis B immune globulin into hepatocytes inhibits the secretion of hepatitis B virus surface antigen and virions. J Virol. 2003;77:8882-92.
8. S. Phillips, et al. CD8(+) T cell control of hepatitis B virus replication: direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions. J Immunol. 2010;184:287-95.
9. A. Neumann, et al. Novel mechanism of antibodies to hepatitis B virus in blocking viral particle release from cells. Hepatology 2010;52:875-85.
10. Chao, M., S.-Y. Hsieh, and J. Taylor. 1990. Role of two forms of the hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. J. Virol. 64:5066-5069.
11. Modahl, L. E., and M. M. C. Lai. 1998. Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and regulation. J. Virol. 72:5449-5456.
12. Macnaughton TB, Lai M. Hepatitis Delta Virus RNA Transfection for the Cell Culture Model Methods in Molecular Medicine, 2004, Volume 96, II, 351-357, DOI: 10.1385/1-59259-670-3:351
13. Macnaughton, TB et al. Rolling Circle Replication of Hepatitis Delta Virus RNA Is Carried Out by Two Different Cellular RNA Polymerases J Virol. 2002; 76(8): 3920-3927.
14. Dingle, K., V. Bichko, H. Zuccola, J. Hogle, and J. Taylor. 1998. Initiation of hepatitis delta virus genome replication. J. Virol. 72:4783-4788.

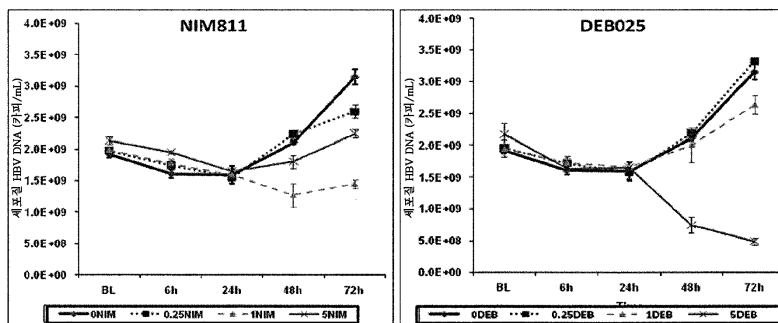
[0098]

15. Bruno B. et al. A Prenylation Inhibitor Prevents Production of Infectious Hepatitis Delta Virus Particles J Virol. 2002; 76(20): 10465-10472.
16. Le Gal, F et al. Quantification of Hepatitis Delta Virus RNA in Serum by Consensus Real-Time PCR Indicates Different Patterns of Virological Response to Interferon Therapy in Chronically Infected Patients J Clin Microbiol. 2005; 43(5): 2363-2369.

[0099]

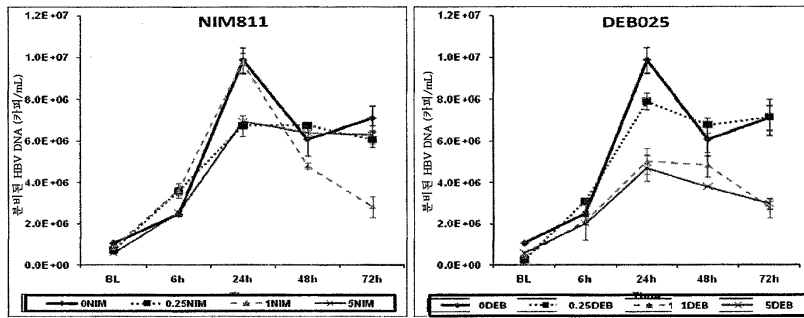
도면

도면1



HepG2215 세포에서 HBV-DNA에 대한 NIM811 및 DEB025의 효과. 세포내 HBV-DNA 수준은 NIM811 또는 DEB025를 사용한 처리 동안 감소하였다. 제시된 데이터는 2회의 독립 실험으로부터의 평균값 (±SEM)이다. 세포 배양 배지는 24hr 및 48hr에 교체하였다.

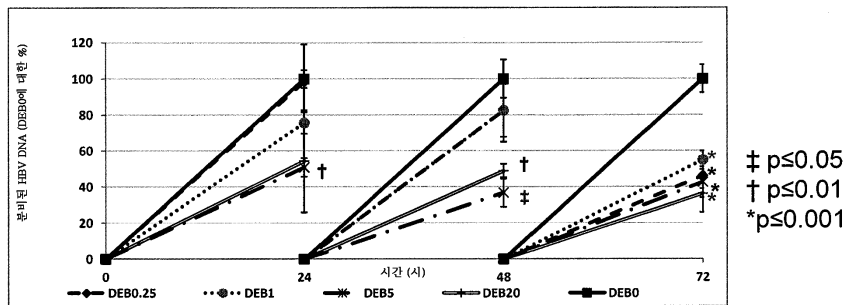
도면2



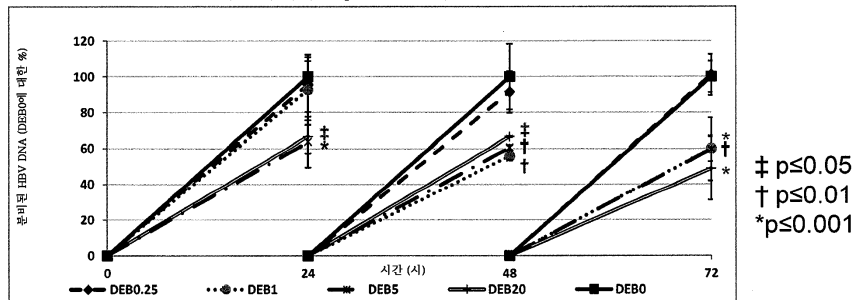
세포 배양 상청액에서 HBV DNA 수준에 대한 NIM811 및 DEB025의 효과. 분비된 HBV DNA 수준은 NIM811 또는 DEB025를 사용한 HepG2215 세포의 처리 동안 감소하였다. 제시된 데이터는 2회의 독립 실험으로부터의 평균값 ($\pm$ SEM)이다. 배양 배지는 24hr 및 48hr에 교체하였다.

도면3

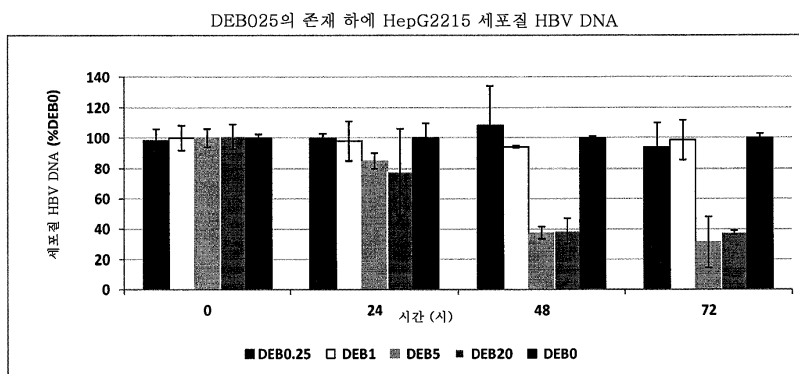
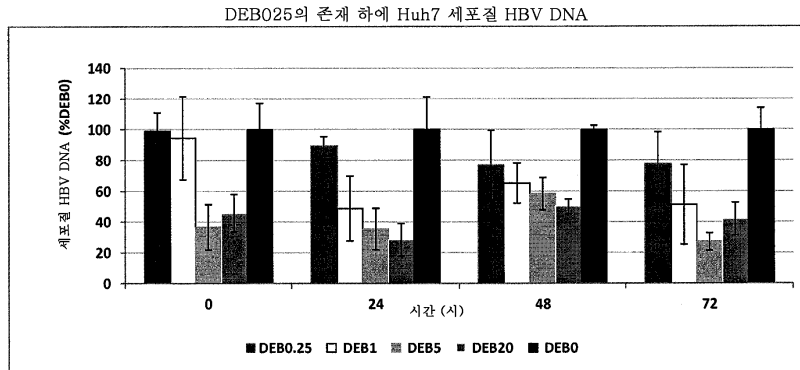
DEB025의 존재 하에 Huh7 분비된 HBV DNA



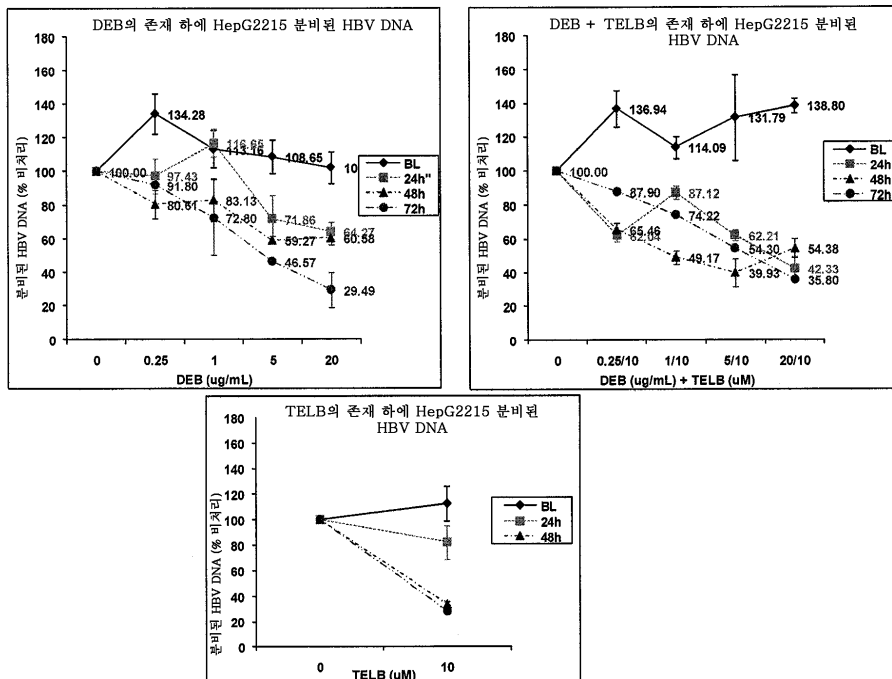
DEB025의 존재 하에 HepG2215 분비된 HBV DNA



도면4

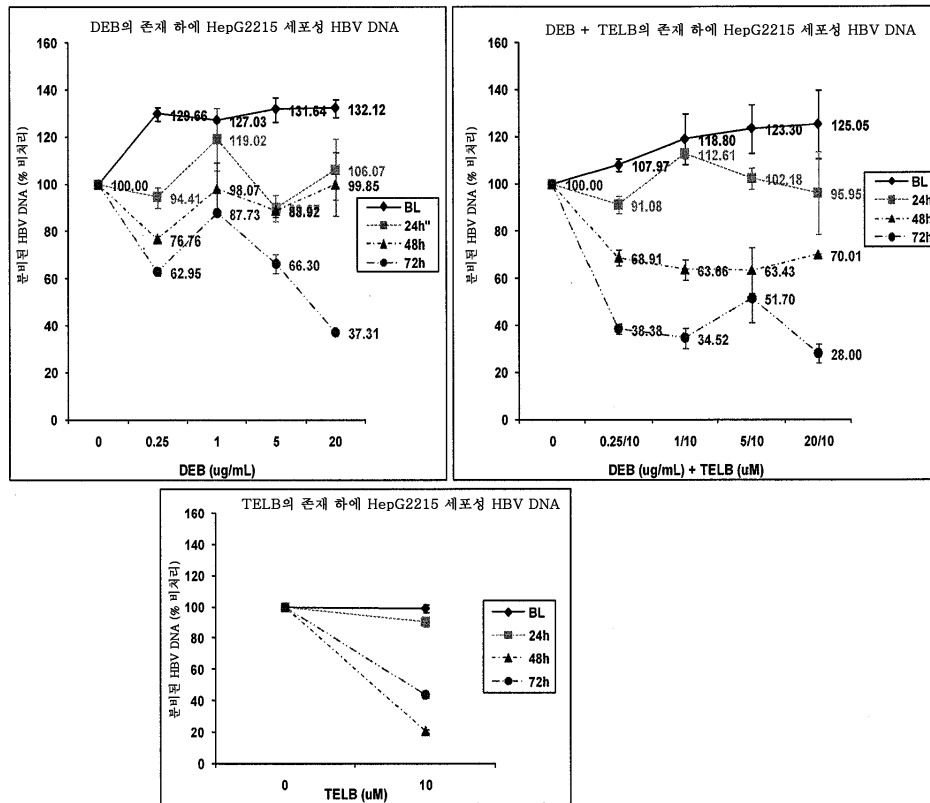


도면5



- DEB025 (DEB) 및 텔비부딘 (TELB)의 조합물은 DEB025 단독에 비해 초기 시점 (24h 및 48h)에 더 큰 효과를 가졌다.
- 분비된 HBV DNA의 감소는 DEB025 단독에 비해 TELB와 조합한 0.25, 1 및 5 $\mu\text{g/ml}$ DEB로 처리한 세포로부터 더 컸다.

도면6



DEB025 및 텔비부딘 (TELB)의 조합물은 DEB025 단독에 비해 더 큰 항바이러스 효과를 가졌다
- 48h 및 72h에 조합물은 세포내 HBV DNA의 더 큰 감소를 유도하였다.