

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 367**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2021 PCT/EP2021/050625**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2021 WO21144330**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2021 E 21700866 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025 EP 4090327**

54 Título: **Uso de agonistas de FXR para el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis D**

30 Prioridad:
15.01.2020 EP 20305024

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2025

73 Titular/es:
**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (20.00%)
101 rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON (20.00%);
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I (20.00%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (20.00%) y
ENYO PHARMA (20.00%)**

72 Inventor/es:
**DARTEIL, RAPHAËL;
LUCIFORA, JULIE;
DURANTEL, DAVID;
RAMIERE, CHRISTOPHE;
LACOMBE, BENOÎT;
LOTTEAU, VINCENT y
ANDRE, PATRICE**

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 014 367 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de agonistas de FXR para el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis D

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina, especialmente la hepatología y la virología, más particularmente el tratamiento de la infección por el virus de la Hepatitis D (VHD) en un sujeto que padece una infección crónica por VHD.

10

Antecedentes de la invención

La infección por el virus de la hepatitis D (VHD) es la forma más grave de hepatitis viral crónica debido a la rápida progresión hacia la muerte relacionada con el hígado y el carcinoma hepatocelular. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que entre 15 y 20 millones de personas están infectadas por el VHD (www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d). El metanálisis más reciente de la carga de VHD sugiere una subestimación de la prevalencia de la hepatitis D; de hecho, la seroprevalencia podría llegar al 0,98 % de la población mundial y al 10,58 % de los pacientes con hepatitis B crónica en todo el mundo (*Chen HY et al. Gut 2019;68:512–521*). En ausencia de una terapia anti-VHD específica, las pautas actuales generalmente recomiendan la inyección subcutánea de Pegilado-interferon-alfa-2a (PEG-IFN- α 2a), que es un inmunoestimulador no específico, bastante tóxico y poco respaldado por los pacientes. A menudo se usa junto con un análogo de nucleósido, que controla la viremia del VHB. La tasa general de respuesta virológica sostenida es baja. De hecho, se ha informado una tasa de respuesta al tratamiento de alrededor del 25% y un alto nivel de recaída después de la interrupción del tratamiento. En consecuencia, existe una necesidad insatisfecha de nuevos agentes terapéuticos y estrategias para el tratamiento de la infección por VHD. Sin embargo, existen varias dificultades en el desarrollo de agentes terapéuticos para estos pacientes.

El genoma del VHD es un ARN monocatenario (\approx 1700 nucleótidos) de polaridad negativa que contiene un único marco de lectura abierto que codifica dos proteínas virales: los antígenos delta pequeño y grande (HDAg-S y HDAg-L). La replicación del genoma del ARN de VHD tiene lugar en el núcleo de las células infectadas y se produce mediante un mecanismo de círculo rodante, seguido de la escisión por ribozimas endógenas y ligaduras que dan como resultado la formación de monómeros circulares antígenómicos. A partir de estos monómeros antígenómicos circulares, los mismos mecanismos generan nuevos monómeros de ARN circular genómico. Se supone que el VHD secuestra la(s) polimerasa(s) de ARN del huésped dependiente de ADN durante las etapas de replicación del genoma. VHD usa al menos la ARN polimerasa II tanto para la replicación como para la transcripción del ARNm viral, pero también se sugiere el papel de la ARN polimerasa I y III (*Mentha N et al. J Adv Res. 2019 May; 17:3–15*). Durante este proceso, también se sintetizan ARNm lineales virales que dan como resultado la síntesis de HDAg-S y HDAg-L. En comparación con HDAg-S (195 aminoácidos), HDAg-L (214 aminoácidos) contiene un dominio adicional de 19 a 20 aminoácidos en su término C resultante de la edición del ARN antígenómico de VHD mediada por ADAR-1 en un ubicación correspondiente al codón de parada del gen HDAg-S (*Wong SK, Lazinski DW. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):15118–23*).

HDAg-S participa en la acumulación de VHD durante la etapa de replicación. En particular, se cree que HDAg-S interactúa con numerosas proteínas celulares (más de 100 interactuantes identificados) y está presente en un complejo nuclear en asociación con proteínas celulares involucradas en la regulación transcripcional como Yin Yang 1 (YY1), histona acetiltransferasa (HAT) p300 Creb Binding Protein (p300/CBP) y factor de selectividad 1 (SL1), que pertenece al complejo de preiniciación de la ARN polimerasa 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*). También se ha descrito la interacción de HDAg-S con la histona celular H1.4 con consecuencias sobre la replicación viral. (*Lee CZ, Sheu J-C. Virology. 2008 May 25;375(1):197–204*). Mientras que HDAg-S participa principalmente en la etapa de replicación, HDAg-L es esencial para la gemación del virión. El dominio adicional de 19-20 aminoácidos en HDAg-L contiene un motivo de caja CXXX, un sustrato para la farnesiltransferasa celular, que agrega un grupo farnesilo a la cisteína de esta caja CXXX. Se demostró que este proceso de farnesilación es esencial para el ensamblaje del virión (*Glenn J et al. Science. 1992 May 29;256(5061):1331–3*). Durante esta etapa, el VHD secuestra los antígenos de superficie del VHB para su propio uso y la secreción de viriones del VHD infecciosos que pueden propagar o mantener la infección. Los viriones de VHB y VHD contienen las mismas proteínas de envoltura y no se pueden distinguir desde una perspectiva de respuesta humoral. En consecuencia, VHB y VHD comparten el mismo receptor de entrada, es decir, polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP), el principal transportador de ácido biliar (BA) en la membrana baso-lateral de los hepatocitos (*Yan H et al. eLife [Internet]. 2012 Nov 13 [cited 2019 Sep 3];1. Disponible en: <https://elifesciences.org/articles/00049>*). Como consecuencia de esta simbiosis viral, la transmisión del VHD generalmente ocurre a través de la coinfección o superinfección del VHB. Sin embargo, además del papel crucial de los antígenos HB (HBAg) para la entrada en los hepatocitos, las otras etapas del ciclo de vida del VHD descritos anteriormente, en particular el proceso de replicación, no dependen del VHB y contribuyen per se a la gravedad de la enfermedad y a la rápida evolución hacia cirrosis y CHC. Además, en el curso típico de la sobreinfección por VHD, los marcadores de infección por VHB generalmente se inhiben, con IgM anti-HBc y ADN de VHB que podrían dar negativo (*Romeo R, Perbellini R. World J Hepatol 2015;7:2389–95; Schaper M et al. J Hepatol. 2010;52:658–64*). Sin embargo, la replicación del VHB suele suprimirse a niveles bajos durante la fase aguda de la infección por el VHD. Esta supresión se vuelve persistente en caso de un establecimiento crónico de

65

hepatitis D.

La coinfección por VHD y VHB es una situación compleja que mezcla características propias de cada virus y otras comunes a ambos. Es importante destacar que estudios recientes informan que la adición del estándar de atención para el tratamiento del VHB, que inhibe la polimerasa específica del VHB mediante análogos de nucleótidos, al tratamiento estándar de atención del VHD con PEG-IFN-2a no mejora la tasa de respuesta del VHD al final del tratamiento (*Wedemeyer H et al. Lancet Infect. Dis. 2019;19:275–286; Mentha N et al. J. Adv. Res. 2019;17:3–17*). Estos hallazgos resaltan claramente que se necesitan opciones de tratamiento alternativas que se dirijan a las etapas de replicación del VHD para la hepatitis D. De hecho, el lonafarnib, un inhibidor de la enzima farnesil transferasa, que es una etapa obligatorio en el ensamblaje del virión, reprime la replicación del VHD independientemente del VHB (solicitud US20110129549A1; *Mentha N, Clnts.google.com/patAlfaiate D. J. Adv. Res. 2019;17:3–17*). Sin embargo, su toxicidad impide su amplio uso en la terapia anti-VHD. Varias otras moléculas antivirales dirigidas a la interacción de VHD con HBsAg de VHB están actualmente en desarrollo: Myrcludex B, que bloquea la entrada de VHD en los hepatocitos al inhibir la unión de HBsAg a NTCP, siARN que silencia el ARNm de VHB, incluido el ARNm de HBsAg, y REP 2139, que se cree que inhibe la liberación de HBsAg de los hepatocitos e interactúa con el antígeno de la hepatitis delta (*Ye X et al. ACS Infect. Dis. 2019;5:738–5:7; Mentha N et al. J. Adv. Res. 2019;17:3–17*).

Entonces, el tratamiento anti-VHD debería inhibir al menos una etapa de replicación de VHD. La etapa de replicación puede ser específico de VHD, como la prenilación de HDAG-L, o compartido con VHB mediante la inhibición de la síntesis, liberación o función de HBsAg. Idealmente, el tratamiento de la hepatitis D no solo debería reprimir la replicación de VHD sino también la replicación de VHB al inhibir etapas de replicación específicas de cada virus. Además de los compuestos dirigidos a la dependencia común de HBsAg de ambos virus, no existe tal molécula que pueda reprimir específicamente la replicación de ambos VHD Y Se ha informado la replicación del VHB. Las moléculas que inhiben los dos virus son sujeto de investigación activa, ya que es difícil predecir cómo reaccionará el segundo virus cuando un tratamiento se dirige a un solo virus. Existe el riesgo de activación o reactivación de un virus cuando el otro está inhibido. Por ejemplo, se ha observado en el desarrollo de agentes antivirales contra el VHC que, en pacientes coinfectados con el VHB, se ha producido una reactivación del VHB cuando el VHC era el blanco (*Ma et al., Gastroenterology, 2018, 154, 795–798*). Por lo tanto, los pacientes coinfectados por VHB y VHD generalmente se excluyen de los ensayos clínicos. De hecho, una revisión en 2016 informa que menos de 1000 pacientes coinfectados con VHD se incluyeron en los ensayos clínicos (*Guglielmi S et al., 2016, Revue médicale Suisse, 12, 1415-1418*).

ZHIMIN GUO ET AL ("Therapeutic Strategies and New Intervention Points in Chronic Hepatitis Delta Virus Infection", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, vol. 16, núm. 8, 18 de agosto de 2015, páginas 19537-19552) se refiere al tratamiento de coinfecciones de hepatitis D y B.

CIHAN YURDAYDIN ET AL. ("Therapy of Delta Hepatitis", COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN MEDICINE, vol. 5, no. 10, 7 de agosto de 2015 (2015-08-07), página a021543) divulga, entre otras cosas, que la hepatitis delta aguda se parece a una hepatitis autolimitada típica que es clínica e histológicamente indistinguible de la hepatitis B.

40 Sumario de la invención

Los inventores identificaron la capacidad de varios agonistas de FXR para prevenir la replicación del genoma del ARN de VHD, en modelos de monoinfección de VHD. Este resultado es particularmente sorprendente porque, si los agonistas de FXR son inhibidores conocidos de la formación y transcripción del cccADN del VHB (*Mouzannar K et al. FASEB J. 2018;33:2472–33:2*), el efecto sobre VHD es independiente de la presencia de VHB. Por lo tanto, el mecanismo de acción de los agonistas de FXR en VHD es nuevo y original, ya que actúa en etapas específicas de replicación de VHD. Además, los inventores demostraron la capacidad de varios agonistas de FXR para inhibir la producción de las dos proteínas VHD, a saber, el antígeno de hepatitis D corto (HDAG-S) y el antígeno de hepatitis D largo (HDAG-L). En modelos de coinfección por VHB y VHD, los inventores demostraron que los agonistas de FXR reprimían la replicación y la producción de ambos virus. Entonces, estos hallazgos abren una nueva vía para tratar la infección por hepatitis D, en particular la infección crónica por hepatitis D, con una nueva clase de moléculas antivirales que inhiben de manera específica e independiente la replicación del VHD y el VHB.

La presente invención se refiere a un agonista del receptor farnesoide X (FXR) para su uso en el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis D (VHD) en un sujeto que padece una infección crónica por VHD.

Opcionalmente, el agonista de FXR es un agonista de FXR selectivo.

En un aspecto particular, el agonista de FXR se selecciona del grupo que consiste en LJN452 (Tropifexor), LMB763 (Nidufexor), GS-9674 (Cilofexor), PX-102 (PX-20606), PX-104 (Phenex 104), OCA (Ocaliva), EDP-305, TERN-101 (LY2562175), MET-409, GW4064, WAY362450 (Turofexorate isopropílico), Fexamina, AGN242266 (AKN-083), BAR502 y EYP001.

En un aspecto muy particular, el agonista de FXR es EYP001.

Opcionalmente, el agonista de FXR se usa en combinación con un interferón alfa (IFN- α), un interferón lambda o una

forma pegilada del mismo, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en IFN- α 1a, IFN- α 1b, IFN- α 2a, IFN- α 2b e IFN- λ 1a o una forma pegilada del mismo, más preferiblemente PEG-IFN- α 2a (p. ej., Pegasys), PEG-IFN- α 2b (por ejemplo, ViraferonPeg o Introna) o PEG-IFN- λ 1a.

5 Opcionalmente, el agonista de FXR se usa en combinación con un agente anti-VHD, preferiblemente un análogo de nucleósido o un inhibidor de la farnesil transferasa. En un aspecto particular, dicho agente anti-VHD se selecciona del grupo formado por ribavirina, ritonavir, lonafarnib y EBP 921.

10 Opcionalmente, el agonista de FXR se usa en combinación con un agente anti-VHB, preferiblemente un análogo de nucleósido. En un aspecto particular, dicho análogo de nucleósido se selecciona del grupo formado por lamivudina, adefovir, telbivudina, entecavir, tenofovir y emtricitabina.

15 Opcionalmente, el agonista de FXR se usa en combinación con un agente anti-VHB/VHD, preferiblemente un análogo de nucleósido, un polímero de ácido nucleico o un inhibidor de NTCP. En un aspecto particular, dicho agente anti-VHB/VHD se selecciona del grupo formado por ezetimiba, myrcludex B, polímero de ácido nucleico REP 2139 y polímero de ácido nucleico REP 2165.

20 Opcionalmente, el sujeto no ha respondido a un tratamiento previo para la infección por VHD. En un primer aspecto, el tratamiento anterior es un tratamiento con PEG-IFN α . En otro aspecto particular, el tratamiento anterior es un tratamiento con un agente anti-VHD como se define en las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a agonistas del receptor farnesoide X (FXR) para su uso en el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis D (VHD) en un sujeto que padece una infección crónica por VHD.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agonista de FXR para usar en el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis D (VHD) en un sujeto que padece una infección crónica por VHD.

30 La invención se define en las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que esté fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente por referencia o comparación.

35 Cualquier referencia a un método de tratamiento del cuerpo humano o animal usando un determinado compuesto o composición debe entenderse como relativa a dicho compuesto o composición para su uso en dicho tratamiento.

Pacientes

40 Como se usa aquí, un "paciente infectado con el virus de la hepatitis D" significa un paciente infectado con cualquier genotipo del virus de la hepatitis B, por ejemplo, genotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

De acuerdo con la invención, el término "sujeto" o "paciente" y "sujeto que necesita del mismo" o "paciente que necesita del mismo", se refiere a un mamífero humano o no humano infectado o que pueda estar infectado con el virus de la hepatitis D. De acuerdo con la invención reivindicada, el sujeto sufre una infección crónica por VHD.

45 Los términos "pacientes coinfectados" se refieren a individuos que han sido infectados simultáneamente con VHB y VHD. Los términos "pacientes súper infectados" se refieren a individuos que primero se infectaron con VHB y luego se infectaron con VHD.

50 De acuerdo con un aspecto de la invención, los términos "pacientes con fracaso del tratamiento" se refieren a individuos que han fracasado en un tratamiento anterior para la infección por VHD. En consecuencia, "pacientes con fracaso del tratamiento" tal como se usa en el presente documento generalmente se refiere a pacientes infectados con VHD que no respondieron al tratamiento (denominados "no respondedores") o que inicialmente respondieron al tratamiento, pero en quienes la respuesta terapéutica no fue mantenida (referidas como "recaídas").

55 Más específicamente, aunque no existe un tratamiento eficaz contra el VHD ni ningún fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento del VHD crónico, el modulador del sistema inmunitario pegilado interferón alfa (PEG-IFN- α) se utiliza actualmente en la práctica clínica y, por lo tanto, se considera un estándar de atención para la infección por VHD. En consecuencia, "pacientes con fracaso del tratamiento" tal como se usa en este documento generalmente se refiere a pacientes infectados con VHD que no respondieron al tratamiento con PEG-IFN- α (denominados "no respondedores") o que inicialmente respondieron al tratamiento con PEG-IFN- α , pero en quienes no se mantuvo la respuesta terapéutica (denominados "recaídos").

Tratamiento

65 Tal como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere tanto al tratamiento profiláctico o preventivo como al tratamiento curativo o modificador de la enfermedad, incluido el tratamiento de pacientes con

riesgo de contraer la enfermedad o que se sospecha que la han contraído, así como pacientes que están enfermos o se les ha diagnosticado que padecen una enfermedad o afección médica, e incluye la supresión de la recaída clínica. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que tenga un trastorno médico o que en última instancia pueda adquirir el trastorno, para prevenir, curar, retrasar la aparición, reducir la gravedad o mejorar uno o más síntomas de un trastorno o trastorno recurrente o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

La eficacia del tratamiento puede controlarse utilizando protocolos estándar. De hecho, el tratamiento puede ir seguido de determinaciones de los niveles de VHD en suero (carga viral) y la medición de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) en suero. Por ejemplo, se puede evaluar a los pacientes en cuanto a la presencia de ARN de VHD en su suero. El ARN de VHD (UI/mL) se puede medir a intervalos regulares durante el tratamiento, por ejemplo, en el Día 1 (antes de la dosis y 4, 8 y 12 horas después de la dosis) y antes de la dosis en el Día 2, Día 3, Día 8, día 15, día 29 y en la semana 12, semana 24, semana 36, semana 48, semana 72 (cuando corresponda) y en el seguimiento. En consecuencia, la eficacia del tratamiento se puede monitorear utilizando parámetros aceptados internacionalmente: a) Los niveles séricos de ARN de VHD se monitorean mediante ensayos cuantitativos sensibles basados en RT-PCR para evaluar el efecto sobre la replicación viral. b) Los niveles séricos de ALT y/o aspartato aminotransferasa (AST) se controlan para evaluar el impacto en la inflamación del hígado y la muerte de las células hepáticas.

El tratamiento puede corresponder a un tratamiento de un solo agente en el que solo se administra un agonista de FXR, oa una terapia de combinación con otro agente terapéutico tal como otro agonista de FXR o agentes antivirales.

El tratamiento se puede administrar a personas a las que se les ha diagnosticado una infección por VHD. Cualquiera de los regímenes de tratamiento anteriores se puede administrar a personas que han fracasado en un tratamiento previo para la infección por VHD (pacientes con fracaso del tratamiento).

Agonista de FXR

El término "FXR" se refiere al receptor farnesoide X, que es un receptor nuclear que se activa por niveles suprafisiológicos de farnesol (Forman *et al.*, Cell, 1995,81,687-693). FXR, también se conoce como NR1H4, proteína 14 que interactúa con el receptor de retinoides X (RXR) y receptor de ácidos biliares (BAR). Con un dominio de unión a ADN (DBD) conservado y un dominio de unión a ligando (LBD) término C, FXR se une y se activa por una variedad de ácidos biliares (BA) naturales, incluido el ácido quenodesoxicólico de ácido biliar primario (CDCA) y sus conjugados de taurina y glicina. Tras la activación, el heterodímero FXR-RXR se une a la región promotora de los genes diana y regula la expresión de varios genes implicados en la homeostasis de los ácidos biliares. Los genes diana del FXR hepático se dividen en dos grupos principales. El primer grupo funciona para disminuir las concentraciones de ácidos biliares hepáticos aumentando la exportación y disminuyendo su síntesis. El segundo grupo de genes diana de FXR, como la proteína transportadora de fosfolípidos PLTP y las apolipoproteínas, modula los niveles de lipoproteínas en el suero y disminuye la concentración de triglicéridos en plasma. Para obtener una lista más detallada de genes regulados por FXR, véase, por ejemplo, el documento WO 03/016288, páginas 22-23. La patente estadounidense 6.005.086 describe la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína FXR de mamífero. Las secuencias polipeptídicas humanas para FXR están depositadas en bases de datos de nucleótidos y proteínas con los números de acceso NM_005123, Q96R11, NP_005114 AAM53551, AAM53550, AAK60271.

En esta especificación, el término "agonista de FXR" tiene su significado general en la técnica y se refiere en particular a los compuestos que funcionan dirigiéndose y uniéndose al receptor farnesoide X (FXR) y que activan FXR en al menos un 40% por encima del fondo en el ensayo descrito en Maloney *et al.* (J. Med. Chem. 2000, 43:2971-2974).

En algunas realizaciones, el agonista de FXR de la invención es un agonista de FXR selectivo. Como se usa en el presente documento, el término "agonista selectivo de FXR" se refiere a un agonista de FXR que no muestra una reactividad cruzada significativa con uno o más, idealmente sustancialmente todos, de un panel de receptores nucleares que consta de LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR γ , PPAR δ , RXR α , RAR γ , VDR, PXR, ER α , ER β , GR, AR, MR y PR. Los métodos para determinar la reactividad cruzada significativa se describen en J. Med. Chem. 2009, 52, 904-907

Los agonistas de FXR son bien conocidos por los expertos en la materia.

Por ejemplo, el experto en la materia puede identificar fácilmente el agonista de FXR a partir de las siguientes publicaciones:

- 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 11 Aug 11.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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..
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 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
- 60 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.
- 65 Típicamente, los agonistas de FXR incluyen la clase de agonistas de FXR esteroides y agonistas de FXR no esteroides.

En ciertas realizaciones de la invención, el agonista de FXR se selecciona de compuestos de molécula pequeña que actúan como moduladores de FXR que se han divulgado en las siguientes publicaciones: EP1392714; EP1568706; JP2005281155; US20030203939; US2005080064; US2006128764; US20070015796; US20080038435; 5 US20100184809; US20110105475; US6,984,560; 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; 10 WO2008073825; WO2008157270; WO2009005998; WO2009012125; WO2009027264; WO2009080555; WO2009127321; WO2009149795; WO2010028981; WO2010034649; WO2010034657; WO2017218330; WO2017218379; WO2017201155; WO2017201152; WO2017201150; WO2017189652; WO2017189651; WO2017189663; WO2017147137; WO2017147159; WO2017147174; WO2017145031; WO2017145040; WO2017133521; WO2017129125; WO2017128896; WO2017118294; WO2017049172; 15 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; 20 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; 25 WO2019089665; WO2019089664; WO2019089670.

En un aspecto, el agonista de FXR puede ser cualquier agonista de FXR divulgado en las siguientes solicitudes de patente: WO2017/049172, WO2017/049176, WO2017/049173, WO2017/049177, WO2018/170165, WO2018/170166, WO2018/170173, WO2018/170182 y WO2018/170167.

30 Los ejemplos específicos de agonistas de FXR incluyen, entre otros, EYP001, GW4064 (como divulgado en la publicación PCT n.º WO 00/37077 o en el documento US2007/0015796), ácidos 6-etil-quenodesoxicólico, especialmente 3 α , 7 α -dihidroxi 7 α -dihidroxi-ácido 6 α -etil-5 β -colan-24-oico, también denominado INT-747; INT-777; ácidos 6-etil-ursodesoxicólicos, INT-1103, UPF-987, WAY-362450, MFA-1, GW9662, T0901317, fexamina, ácido 3 β -azido-6 α -etil-7 α -hidroxi-5 β -colan-24-oico, Tropifexor (LJN452), fexamina-3 (Fex-3), BAR502, BAR704, PX20606, PX20350, ácido 3 α ,7 α ,11 β -trihidroxi-6 α -etil-5 β -colan-24-oico (TC-100), ácido 6-(4-[[5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il]metoxi]piperidin-1-il)-1-metil-1H-indol-3-carboxílico, 3,6- dimetil-1-(2-metilfenil)-4-(4-fenoxifenil)-4,8-dihidro-1H-pirazol[3,4-e][1,4]tiazepin-7-ona; ácido obeticólico, ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido glicocólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, taurodihidrofusidato, ácido taurodesoxicólico, colato, glicocolato, desoxicolato, taurocolato, taurodesoxicolato, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido tauroursodesoxicólico, ácido glicoursodesoxicólico, ácido 7-B-metilcólico, ácido metilitocólico, GSK-8062 (CAS No. 943549-47-1). En algunas realizaciones, el agonista de FXR se selecciona de ácidos biliares naturales, preferiblemente ácido quenodesoxicólico [CDCA] o CDCA conjugado con taurina o glicina [tauro-CDCA o glico-CDCA] y derivados sintéticos de ácidos biliares naturales, preferiblemente 6-etil- CDCA o 6-etil-CDCA conjugado con taurina o glicina, agonistas no esteroideos naturales, preferiblemente diterpenoides tales como Cafestol y Kahweol, o 45 agonistas FXR no esteroideos sintéticos.

En algunas realizaciones, el agonista de FXR se selecciona del grupo que consiste en ácido obeticólico (Intercept Pharma), ácido cólico (CT-RS); GS-9674 (Cilofexor) (Phenex Pharmaceuticals AG), Tropifexor (LJN452) (Novartis Pharmaceuticals), EYP001, EDP-305, un agonista de FXR de ácido no carboxílico esteroideo (Enanta Pharmaceuticals), Turofexorate Isopropílico (Pfizer), INT-767 (Intercept Pharmaceuticals), LY-2562175 (Lilly), AGN-242266 (antes AKN-083, Allergan), EP-024297 (Enanta Pharmaceuticals), M-480 (Metacrine), MET-409 (Metacrine), RDX-023 (Ardelyx), GW6046, Cafestol, Fexamine y el compuesto PXL007 (también llamado EYP001 o EYP001a) identificado por el CAS No. 1192171-69-9 (descrito en WO 2009127321). En una realización particular, el agonista de FXR se selecciona del grupo que consiste en INT-747, el compuesto identificado por EDP-305, un agonista de FXR de ácido no carboxílico esteroideo (Enanta Pharmaceuticals) y el compuesto identificado por el CAS No. 1192171-69 - 9 (descrito en WO 2009127321).

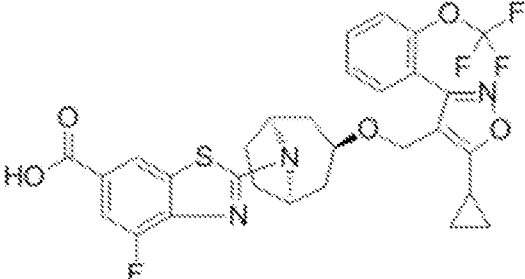
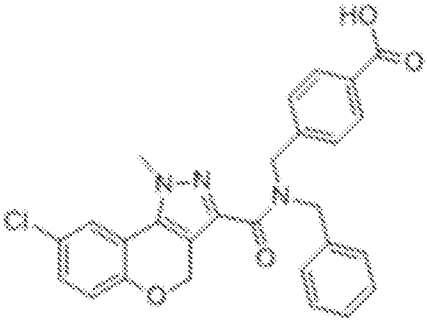
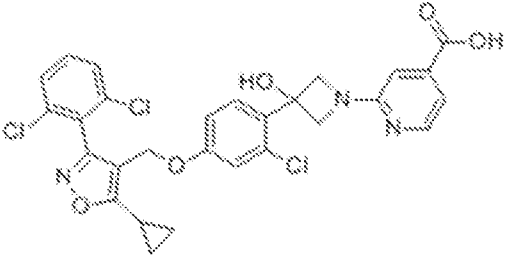
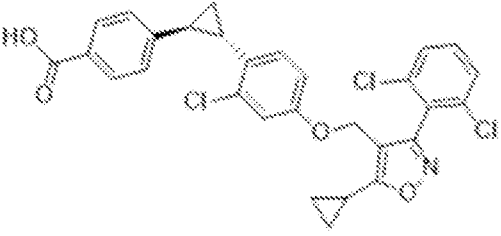
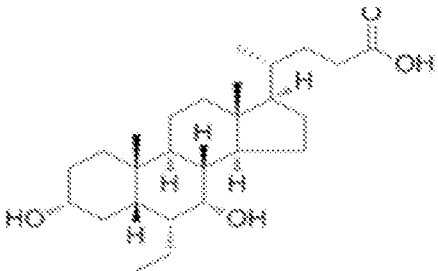
En un aspecto particular, el agonista de FXR se selecciona del grupo formado por LJN452 (Tropifexor), GS-9674 (Cilofexor), LMB763 (Nidufexor), OCA (Ocaliva), EDP-305, TERN-001 y PXL007 (también denominado EYP001).

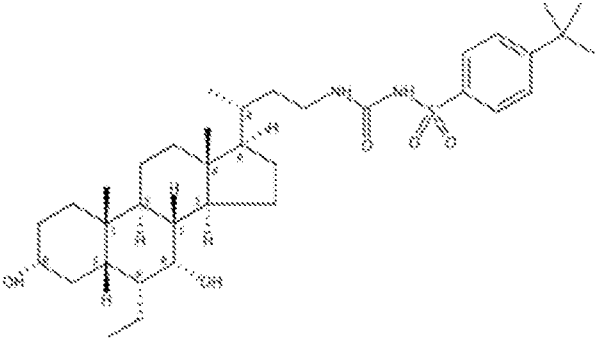
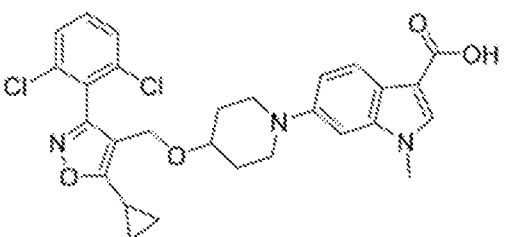
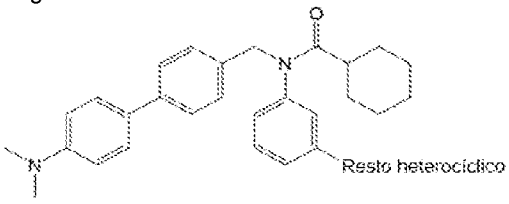
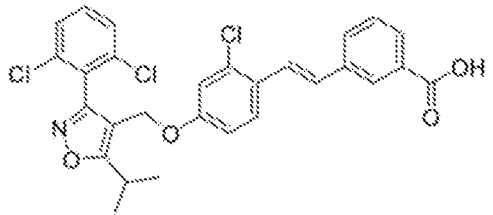
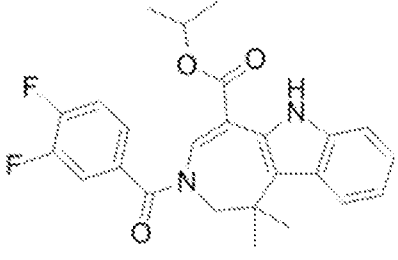
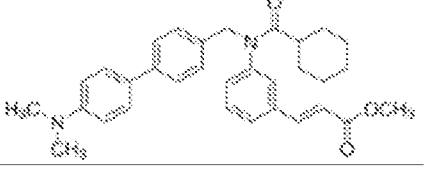
En un aspecto particular, el agonista de FXR se selecciona del grupo que consiste en el compuesto divulgado en la Tabla 1.

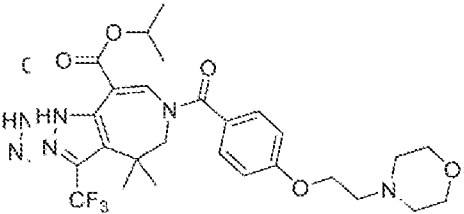
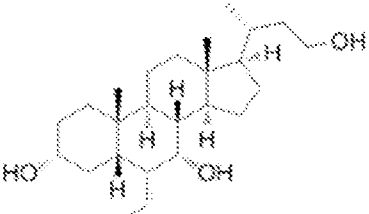
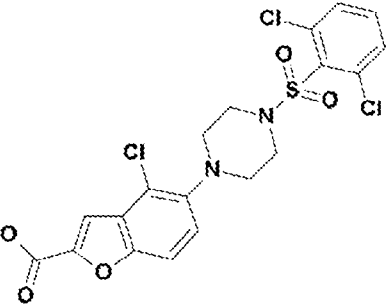
65

ES 3 014 367 T3

Tabla 1

<p>LJN452 (Tropifexor)</p> <p>Número Cas 1383816-29-2</p> <p>Ácido 2-(3-((5-ciclopropil-3-(2-(trifluorometoxi)fenil)isoxazol-4-il)metoxi)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-il)-4-fluorobenzo[d]tiazol-6-carboxílico</p>	
<p>LMB763 (Nidufixor)</p> <p>Número Cas 1773489-72-7</p> <p>Ácido 4-[(N-bencil-8-cloro-1-metil-1,4-dihidro[1]benzopirano[4,3-c]pirazol-3-carboxamido)metil]benzoico</p>	
<p>GS-9674 (Cilofexor)</p> <p>Número Cas 1418274-28-8</p> <p>Ácido 2-[3-[2-cloro-4-[[5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)-4-isoxazolil]metoxi]fenil]-3-hidroxi-1-azetidín]-4-piridincarboxílico</p>	
<p>PX-102 (PX-20606)</p> <p>Número Cas 1268244-85-4</p> <p>Ácido 4-(2-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)ciclopropil)benzoico</p>	
<p>PX-104 o Fenex 104</p>	<p>enantiómero de PX-102</p>
<p>OCA (Ocaliva o INT-747)</p> <p>Número Cas 459789-99-2</p> <p>Ácido colan-24-oico, 6-etil-3,7-dihidroxi-, (3α,5β,6α,7α)-</p>	

<p>EDP-305</p> <p>Número Cas 1933507-63-1</p> <p>Bencenosulfonamida, 4-(1,1-dimetiletil)-N-[[[(3α,5β,6α,7α)-6-etil-3,7-dihidroxi-24-norcholan-23-il]amino]carbonil]-</p>	
<p>TERN-101 (LY2562175)</p> <p>Número Cas 1103500-20-4</p> <p>Ácido 6-(4-[[5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il]metoxi]piperidin-1-il)-1-metil-1H-indol-3-carboxílico</p>	
<p>MET409</p>	<p>Desarrollado por Metacrine Divulgado en WO2017049173</p>  <p>Resto heterocíclico</p>
<p>GW4064</p> <p>Número Cas 278779-30-9</p> <p>Ácido 3-[2-[2-cloro-4-[[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metoxi]fenil]etenil]benzoico</p>	
<p>WAY362450 (turofexorato isopropílico o XL335 o FXR450)</p> <p>Número Cas 629664-81-9</p> <p>Éster 1-metiletilico del ácido 3-(3,4-difluoro-benzoil)-1,1-dimetileno-1,2,3,6-tetrahidro-azepino [4,5-b]indol-5-carboxílico, 3-(3, Éster 1-metiletilico del ácido 4-difluorobenzoi)-1,2,3,6-tetrahidro-1,1-dimetil-azepino[4,5-b]indol-5-carboxílico,</p>	
<p>Fexamina</p> <p>Número Cas 574013-66-4</p> <p>Éster metílico del ácido 3-[3-[(ciclohexilcarbonil)[4'-(dimetilamino)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]amino]fenil]-2-propenoico</p>	

AGN242266 (AKN-083)	
BAR502 Número Cas 1612191-86-2 6 α -etil-3 α ,7 α -dihidroxi-24-nor-5 β -colan-23-ol	
EYP001 Número Cas 1192171-69-9	

y cualquier sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En un aspecto preferente de la invención, el agonista de FXR es EYP001.

- 5 Los expertos en la técnica pueden identificar rutinariamente agonistas de FXR adicionales útiles en la presente invención basándose en ensayos como los descritos en el documento WO 2000/37077. Típicamente, los agonistas de FXR se identifican mediante un ensayo de péptido de receptor nuclear. Este ensayo utiliza transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y se puede usar para probar si los ligandos putativos se unen a FXR. El ensayo FRET se basa en el principio de que los ligandos inducen cambios conformacionales en los receptores nucleares que
- 10 facilitan las interacciones con las proteínas coactivadoras necesarias para la activación transcripcional. En FRET, una molécula donante fluorescente transfiere energía a través de una interacción dipolo-dipolo no radiactiva a una molécula aceptora (que suele ser una molécula fluorescente).

- Típicamente, el agonista de FXR de la invención se administra al sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 15 Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" del agonista de FXR como se ha descrito anteriormente se entiende una cantidad suficiente del agonista de FXR para tratar una infección por el virus de la hepatitis D con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente en particular
- 20 dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación con el agonista específico empleado; y como factores bien conocidos en las artes médicas. Por ejemplo, es bien conocido dentro de la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto
- 25 terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variar en un amplio rango de 0,01 a 1000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la posología al paciente a tratar. Un medicamento contiene típicamente de
- 30 alrededor de 0,01 mg a alrededor de 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a alrededor de 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz del fármaco normalmente se suministra a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

Terapia de combinación

5 De acuerdo con un aspecto de la invención, el agonista de FXR de acuerdo con la invención puede administrarse al sujeto en combinación con al menos otro agente terapéutico, preferiblemente en combinación con al menos otro agente antiviral, más preferiblemente en combinación con al menos un otro agente antiviral seleccionado del grupo que consiste en moduladores del sistema inmunitario, agentes anti-VHD, agentes anti-VHB, agentes anti-VHD/VHB y cualquier combinación de los mismos. Estos agentes se definen más particularmente a continuación.

10 En consecuencia, la presente invención se refiere a

- un agonista de FXR para el tratamiento de la infección por VHD, en particular una infección crónica por VHD, en combinación con al menos otro agente terapéutico; o
- 15 - una composición farmacéutica que comprende un agonista de FXR para el tratamiento de la infección por VHD, en particular una infección crónica por VHD, en combinación con al menos otro agente terapéutico; o
- una composición farmacéutica que comprende un agonista de FXR y al menos otro agente terapéutico para el tratamiento de la infección por VHD, en particular una infección crónica por VHD; o
- 20 - un kit que comprende un agonista de FXR y al menos otro agente terapéutico como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento de la infección por VHD, en particular una infección crónica por VHD; o
- un método de tratamiento de una infección por VHD en un sujeto, en particular una infección crónica por VHD, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de FXR y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos otro agente terapéutico; o
- 25 - un método de tratamiento de una infección por VHD en un sujeto, en particular una infección crónica por VHD, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de FXR y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos otro agente terapéutico.

30 El término "Moduladores del sistema inmunológico" se refiere a proteínas señalizadoras del tipo interferón (IFN), preferiblemente al interferón alfa (IFN- α) o interferón lambda (IFN- λ), más preferiblemente al interferón alfa pegilado (PEG-IFN- α) o interferón lambda pegilado (PEG-IFN- λ), y aún más preferiblemente a PEG-IFN- α 2a, PEG-IFN- α 2b o PEG-IFN- λ 1a.

35 En un aspecto, IFN se selecciona del grupo que consiste en consenso IFN- α (p. ej., INFERGEN®, Locteron®), IFN- α 1b (p. ej., HAPGEN®), IFN- α 2a (Roferon-A®, MOR-22, Inter 2A, Inmutag, Inferon), un IFN- α 2a pegilado (p. ej., PEGASYS®, YPEG-IFN α -2a, PEG-INTRON®, Pegaferon), IFN- α 2b (p. ej., INTRON A®, Alfarona, Bioferon, Inter 2B, citpheron, Zavinex, Ganapar, etc...), un IFN- α 2b pegilado (p. ej., Pegintron®, Albuferon, AOP2014/P1101, Algeron, Pai Ge Bin), IFN- α 2c (p. ej., Berofor Alpha) y una proteína similar a IFN (p. ej., Novaferon, proteína de fusión HSA-IFN- α 2a, proteína de fusión HSA-IFN- α 2b).

40 El IFN se puede administrar diariamente, semanalmente o 2, 3, 4, 5 o 6 veces por semana. El período de tratamiento es generalmente largo, por ejemplo, de 2 semanas a varios meses. Por ejemplo, el período es de 3-4 meses hasta 24 meses. La dosis puede variar de 1 millón de unidades a 20 millones de unidades, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 millones de unidades. El IFN se puede administrar mediante administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica o intratumoral, preferiblemente para administración subcutánea o intramuscular.

45 En un aspecto particular, el IFN se utiliza en combinación con el agonista de FXR al inicio del tratamiento. Opcionalmente, se detiene el tratamiento con el IFN mientras se mantiene el tratamiento con el agonista de FXR. Por ejemplo, el primer período de tratamiento con el agonista de FXR y el IFN puede durar varios días o semanas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 días o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 semanas) y va seguido de un período de tratamiento con el agonista de FXR en ausencia de IFN. Esta segunda etapa puede durar varios días, semanas o meses.

50 En un aspecto particular, el IFN es IFN α 2a, IFN α 2b o una forma pegilada de los mismos y se administra por vía subcutánea una vez a la semana, por ejemplo a una dosis que varía de 1 μ g a 500 μ g, preferiblemente de 10 μ g a 500 μ g, más preferiblemente de 100 μ g a 250 μ g, como 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 ó 200 μ g, y durante desde 2-4 meses hasta 24 meses. En un aspecto muy concreto, el tratamiento tiene una duración de 12 a 52 semanas, preferiblemente de 45 a 52 semanas, por ejemplo 48 semanas. En un aspecto más específico, el IFN es IFN α 2a o una forma pegilada del mismo.

60 El término "agente anti-VHD" se refiere a cualquier compuesto que trata la infección por VHD inhibiendo así la replicación de VHD, el ensamblaje de viriones VHD o inhibiendo la entrada de viriones VHD en células infectables. Algunos agentes anti-VHD son conocidos por el experto en la materia (ver Deterding *et al.* 2019, AIDS Rev., 21, 126-134; Gilman *et al.* 2019), World J Gastroenterol., 25, 4580-4597). Preferiblemente, el agente anti-VHD se selecciona del grupo que consiste en ribavirina, ritonavir, Ionafarnib y EBP 921.

65 En particular, la inhibición de la replicación de VHD corresponde a una reducción de aproximadamente 10, 20, 30, 40,

50, 60, 70, 80, 90% o 100% del número de copias de ARN de VHD replicadas en células infectadas. Las técnicas para medir el número de copias, en particular las basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), son bien conocidas por el experto en la materia. Preferiblemente, el agente anti-VHD que inhibe la replicación de VHD es un análogo de nucleósido.

5 En particular, la inhibición del ensamblaje del virión VHD corresponde a una reducción de alrededor del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % de la cantidad de virión VHD ensamblado en las células infectadas. Las técnicas para cuantificar la cantidad de virión, en particular las basadas en el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA), son bien conocidas por el experto en la materia. Preferiblemente, el agente anti-VHD que inhibe el ensamblaje del virión VHD es un inhibidor de la farnesil transferasa.

10 En particular, la inhibición de la entrada de viriones VHD en células infectables corresponde a una reducción de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % de la cantidad de entrada de viriones VHD en células infectables.

15 El término "agente anti-VHB" se refiere a compuestos que tratan la infección por VHB inhibiendo así la replicación del VHB, inhibiendo el ensamblaje del virión del VHB o inhibiendo la entrada del virión del VHB en las células infectables. Los agentes anti-VHB son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, como el interferón convencional, el interferón pegilado, los análogos de nucleósidos y nucleótidos (ver Trault *et al.* 2018). Preferiblemente, el agente anti-VHB que inhibe la replicación del VHB es un análogo de nucleósido, más preferiblemente un nucleósido inhibidor de transcriptasa inversa análogo, e incluso más preferiblemente, el agente anti-VHB se selecciona del grupo que consiste en lamivudina, adefovir, telbivudina, entecavir, tenofovir y emtricitabina.

20 En particular, la inhibición de la replicación del VHB corresponde a una reducción de alrededor del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% o 100% de la cantidad de ADN del VHB replicado en las células infectadas.

25 Un menor nivel de replicación del ADN del VHB ayuda a reducir el nivel de ensamblaje del virión del VHB, lo que a su vez induce un menor nivel de infección de otras células diana. Por tanto, se produce una menor probabilidad de aportar antígenos VHB para el montaje de visiones VHD.

30 En particular, la inhibición del ensamblaje del virión VHB corresponde a una reducción de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% de la cantidad de virión VHB ensamblado en células infectadas.

35 Un nivel más bajo de ensamblaje de viriones de VHB de viriones de VHB induce un nivel más bajo de infección de otras células diana y, por lo tanto, una menor probabilidad de proporcionar antígenos de VHB para el ensamblaje de visiones de VHD.

40 En particular, la inhibición de la entrada del virión VHB en las células infectables corresponde a una reducción de aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% de la cantidad de entrada del virión VHB en las células infectables.

45 Los términos "células infectables" se refieren a células accesibles a los viriones que expresan el receptor NTCP requerido para que el virión VHD o el virión VHB entren en la célula. Una célula, en particular una célula huésped, se considera accesible cuando no existe una barrera biológica o física que impida su contacto con el virión circulante.

Dado que los viriones VHB y VHD comparten el mismo receptor de entrada, i. mi. NTCP, el bloqueo de NTCP mediado por acoplamiento por agentes anti-VHB que inhiben eficazmente la entrada de viriones de VHB en las células, también inhibe la entrada de viriones VHD en las células.

50 El término "agente anti-VHB/VHD" se refiere a compuestos que tratan la infección por VHD y/o VHB inhibiendo así el ensamblaje de viriones de VHB y VHD, o inhibiendo la entrada de viriones de VHB y VHD en células infectables. Preferiblemente, el agente anti-VHB se selecciona del grupo que consiste en ezetimiba, myrcludex B, polímero de ácido nucleico REP 2139 y polímero de ácido nucleico REP 2165 o cualquier combinación de los mismos.

55 En particular, la inhibición del ensamblaje de los viriones VHB y VHD respectivamente corresponde a una reducción de alrededor del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % de la cantidad de viriones VHB o VHD ensamblados en células infectadas. Preferiblemente, el agente anti-VHB/VHD que inhibe el ensamblaje del virión de VHB o VHD es un polímero de ácido nucleico, más preferiblemente un polímero de ácido nucleico que bloquea la secreción de HBAG.

60 En particular, la inhibición de la entrada del virión VHB y el virión VHD en las células infectables corresponde a una reducción de alrededor del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% de la cantidad de virión VHB o entrada de virión VHD en células infectables. Preferiblemente, el agente anti-VHB/VHD que inhibe la entrada de VHB o VHD en células infectables es un inhibidor de NTCP, más preferiblemente un inhibidor de acoplamiento de NTCP.

65 De acuerdo con un aspecto preferente de la invención, el agonista de FXR de acuerdo con la invención puede administrarse al sujeto en combinación con al menos otro agente antiviral seleccionado del grupo que consiste en

5 moduladores del sistema inmunológico, agentes anti-VHD, agentes anti-VHB, agentes anti-VHD/VHB como se definen anteriormente y cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, dicho otro agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en moduladores del sistema inmunitario del tipo interferón, análogos de nucleósidos, análogos de nucleótidos, polímeros de ácidos nucleicos, inhibidores de farnesil transferasa, inhibidores de proteasa, inhibidores de NTCP y cualquier combinación de los mismos.

10 Más preferiblemente, el agonista de FXR según la invención se puede administrar al sujeto en combinación con PEG-IFN- α 2a, PEG-IFN- α 2b o PEG-IFN- λ 1a, ribavirina, ritonavir, lonafarnib y EBP 921, lamivudina, adefovir, telbivudina, entecavir, tenofovir y emtricitabina, ezetimiba, myrcludex B, polímero de ácido nucleico REP 2139 y polímero de ácido nucleico REP 2165 y cualquier combinación de los mismos.

Según un aspecto específico, el agonista de FXR según la invención puede administrarse al sujeto en combinación con PEG-IFN- α 2a.

15 Alternativamente, el agonista de FXR según la invención se puede administrar al sujeto en combinación con myrcludex B.

Alternativamente, el agonista de FXR según la invención se puede administrar al sujeto en combinación con ritonavir.

20 Alternativamente, el agonista de FXR según la invención se puede administrar al sujeto en combinación con lonafarnib.

Alternativamente, el agonista de FXR según la invención se puede administrar al sujeto en combinación con adefovir.

25 Alternativamente, el agonista de FXR según la invención se puede administrar al sujeto en combinación con PEG-IFN- α 2a y otro agente, preferiblemente con PEG-IFN- α 2a y myrcludex B.

Alternativamente, el agonista de FXR según la invención se puede administrar al sujeto en combinación con PEG-IFN- α 2a y ritonavir.

30 Alternativamente, el agonista de FXR según la invención se puede administrar al sujeto en combinación con PEG-IFN- α 2a y lonafarnib.

Alternativamente, el agonista de FXR según la invención se puede administrar al sujeto en combinación con PEG-IFN- α 2a y adefovir.

35 En un aspecto de la invención, la administración de la terapia de combinación es simultánea, de manera que el agonista de FXR y al menos otro agente se administran simultáneamente al sujeto.

40 En otro aspecto de la invención, la administración de la terapia de combinación es secuencial, de modo que el agonista de FXR y al menos otro agente se administran secuencialmente al sujeto con un retraso de tiempo determinado, preferiblemente de 1 a 10 días, más preferiblemente de 1 a 24 horas, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1 a 12 horas.

45 En un aspecto específico, el agonista de FXR no se usa en combinación con un interferón.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

FIGURAS:

50 *Figura 1. FXR α El agonista inhibe la replicación de VHD en células dHepaRG coinfectadas con VHB-VHD. Se infectaron células HepaRG diferenciadas con VHB a una MOI de 100 GE/célula y con VHD a una MOI de 10 GE/célula. Del día 3 al 13 después de la infección, las células se trataron con 10 μ M de GW4064, interferón α -2a (1000 UI/mL) o vehículo. Las células y los sobrenadantes se recogieron el día 13 para la cuantificación intracelular del ARN de VHD y VHB y de los antígenos secretados. Los resultados son la media +/-SD de dos experimentos realizados con tres réplicas biológicas.*

60 *Figura 2. El agonista FXR α inhibe la replicación de VHD en dHepaRG infectado con VHB superinfectado con VHD. Se infectaron células HepaRG diferenciadas con VHB a una MOI de 100 GE/célula y 7 días después con VHD a una MOI de 10 GE/célula. Desde el día 10 hasta el día 17 después de la infección por VHB, las células se trataron con 1, 5 o 10 μ M de GW4064, interferón α -2a (1000 UI/mL) o vehículo. Las células y los sobrenadantes se recolectaron el día 17 para la cuantificación del ARN intracelular de VHD. Los resultados son la media +/- SD de tres experimentos (en dHepaRG) realizados con tres réplicas biológicas.*

65 *Figura 3. El agonista FXR α inhibe la replicación de VHD en PHH infectado con VHB sobreinfectado con VHD. Los PHH se infectaron con VHB a una MOI de 100 GE/célula y 4 días más tarde con VHD a una MOI de 10 GE/célula.*

Desde el día 7 hasta el día 14 después de la infección por VHB, las células se trataron con 1, 5 o 10 μM de GW4064, interferón α -2a (1000 UI/mL) o vehículo. Las células y los sobrenadantes se recogieron el día 14 después de la infección por VHB para la cuantificación del ARN intracelular de VHD. Los resultados son la media \pm SD de un experimento realizado con tres réplicas biológicas.

5
 Figura 4. *El agonista FXR α inhibe la producción de proteínas VHD en dHepaRG infectado con VHB superinfectado con VHD.* Se infectaron células HepaRG diferenciadas con VHB a una MOI de 100 GE/célula y 7 días después con VHD a una MOI de 10 GE/célula. Desde el día 10 hasta el día 17 después de la infección por VHB, las células se trataron con 1, 5 o 10 μM de GW4064, interferón α -2a (1000 UI/mL) o vehículo. Las células se recogieron el día 17
 10 después de la infección por VHB y se lisaron para la extracción de proteínas y los análisis de WB. Los gráficos representan los análisis de densitometría de las transferencias respectivas y los resultados se presentan como proporciones de HDAg normalizados a los niveles de B-tubulina.

15
 Figura 5. *El agonista FXR α inhibe la producción de proteínas VHD en PHH infectado con VHB superinfectado con VHD.* Los PHH se infectaron con VHB a una MOI de 100 GE/célula y 4 días más tarde con VHD a una MOI de 10 GE/célula. Desde el día 7 hasta el día 14 después de la infección por VHB, las células se trataron con 1, 5 o 10 μM de GW4064, interferón α -2a (1000 UI/mL) o vehículo. Las células y los sobrenadantes se recogieron el día 14 después de la infección por VHB para la cuantificación del ARN de VHD intracelular y se lisaron para la extracción de proteínas y los análisis de WB. Los gráficos representan los análisis de densitometría de las transferencias respectivas y los
 20 resultados se presentan como proporciones de HDAg normalizados a los niveles de B-tubulina.

Figura 6. *Los agonistas FXR α inhiben la replicación de VHD en células dHepaRG mono infectadas.* Se infectaron células HepaRG diferenciadas con VHD a una MOI de 25 GE/célula. Desde el día 4 hasta el día 11 después de la infección, las células se trataron con 1 o 10 μM de GW4064, 10 μM de 6-ECDCA y 1 μM de tropifexor. En el día 11
 25 después de la infección por VHD, las células se recogieron y los ARN de VHD intracelulares totales se cuantificaron mediante qPCR.

Figura 7. *Los agonistas FXR α disminuyen la cantidad de ARN genómico de VHD en células dHepaRG mono infectadas.* Se infectaron células HepaRG diferenciadas con VHD a una MOI de 25 GE/célula. Desde el día 4 hasta el día 11
 30 después de la infección, las células se trataron con 1 o 10 μM de GW4064, 10 μM de 6-ECDCA y 1 μM de tropifexor. En el día 11 después de la infección por VHD, se recogieron las células y se analizó el ARN genómico de VHD mediante Northern Blot.

Figura 8. *Disminución de los niveles de ARN de VHD naciente en dHepaRG coinfectado con VHB/VHD tratado con agonistas FXR α .* dHepaRG se coinfectaron con VHB (100 vge/célula) y con VHD (10 vge/célula). Seis días después, las células se trataron con GW4064 (10 μM) o con interferón α -2a (1000 U/ml) durante 4 días. Las células se incubaron con uridina marcada o no (EU simulada) durante 2h, se lavaron y se recolectaron. Los ARN de VHD intracelulares
 35 totales, así como los ARN de VHD marcados con UE (ARN de VHD intracelulares nacientes), se aislaron y cuantificaron mediante análisis de RT-qPCR. Como control, las células se trataron con actinomicina D (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ActD) 20 min antes de la incubación con uridina marcada para bloquear la transcripción de los ARN nacientes. Los resultados son la media \pm SD de un experimento realizado con tres réplicas biológicas.

Figura 9. *GW4064 reduce la infectividad de las partículas VHD.* Las células dHepaRG se coinfectaron con VHB y VHD con 500 vge/célula para VHB y 50 vge/célula para VHD. Las células se trataron o no 3 días después con GW4064 (10
 45 μM), IFN- α (500 UI/mL) o lamivudina (LAM, 10 μM) durante 10 días. (A) Se recogieron los sobrenadantes de células dHepaRG infectadas, se concentraron mediante precipitación con PEG y se evaluaron los niveles de ARN de VHD extracelular mediante análisis de qRT-PCR. (BC) las células ingenuas HuH7.5-NTCP se infectaron con los diferentes sobrenadantes concentrados con (B) 500 vge/célula o (C) como se indica. Seis días después, se evaluaron los niveles de ARN de VHD intracelular mediante análisis de RT-qPCR. Los resultados de RT-qPCR son la media \pm SD de tres
 50 experimentos independientes, cada uno realizado con tres réplicas biológicas.

Ejemplos

RESULTADOS

55 Para determinar el impacto de los agonistas de FXR en la infección por VHD, *in vitro* las infecciones se realizaron en células HepaRG diferenciadas (dHepaRG) y hepatocitos humanos primarios (PHH).

Después de la diferenciación, las células HepaRG son susceptibles a la infección con viriones VHD producidos *in vitro*, ya sea en mono infección, o en coinfección y sobreinfección por VHB. En el caso de células coinfectadas o
 60 superinfectadas por VHB/VHD, este modelo permite el estudio de todas las etapas del ciclo de replicación del VHD, incluida la penetración en la célula, la translocación del genoma viral en el núcleo, la replicación del genoma viral y la síntesis de virus ARNm, así como etapas posteriores del ciclo viral con ensamblaje y secreción de viriones infecciosos que portan proteínas de envoltura HBs del VHB. En las células mono infectadas con VHD, se pueden explorar todas
 65 las etapas del ciclo viral, excepto el proceso de ensamblaje, ya que faltan las proteínas de la envoltura del VHB recién

sintetizadas.

Los PHH también son susceptibles a la infección con viriones VHD producidos *in vitro*, ya sea en mono infección, o en coinfección y sobreinfección por VHB.

5 El tratamiento con moduladores de FXR inhibe la replicación de VHD en células HepaRG coinfectadas con VHB/VHD.

Los inventores primero evaluaron el impacto de agonistas FXR α de la replicación del VHD en *in vitro* células dHepaRG coinfectadas. Las células se infectaron simultáneamente con VHB y VHD. Tres días después de la infección, las células se trataron durante 10 días con el agonista de FXR GW4064 a 10 μ M o 1000 UI/ml de interferón α -2a. El día 13 después de la infección, se recogieron las células y los sobrenadantes. Se cuantificaron las cantidades intracelulares de ARN de VHD y VHB, así como los antígenos HBe y HBs secretados.

15 GW4064 redujo la cantidad de ARN de VHD intracelular total en un 60% en HepaRG a 10 μ M (Fig. 1A). Esta disminución del ARN viral fue comparable a la observada con interferón α -2a. La actividad anti-VHB de GW4064, que se describió previamente, se verificó en la cantidad de ARN de VHB intracelular y antígenos HBs y HBe secretados (Fig. 1B, 1C y 1D).

20 El tratamiento con moduladores de FXR inhibe la replicación de VHD en células superinfectadas con VHB y VHD.

El impacto de agonistas de FXR α en la replicación de VHD también se evaluó en *in vitro* modelos de sobreinfección por VHD de hepatocitos infectados por VHB (tanto células dHepaRG como PHH). Las células se infectaron sucesivamente con VHB y 7 días después con VHD. Tres días después de la infección por VHD, las células se trataron durante 7 días con GW4064 a 1, 5 y 10 μ M o 1000 UI/ml de interferón α -2a. La cantidad intracelular de ARN de VHD total se cuantificó mediante RT-qPCR.

30 Tanto en las células dHepaRG como en las PHH, el tratamiento con el agonista de FXR GW4064 disminuyó la cantidad de ARN de VHD intracelular total, hasta un 60 % en las células HepaRG (Fig. 2) y 45% en PHH (Fig. 3) a 10 μ M. El efecto ya era muy pronunciado a 1 μ M. Esta disminución del ARN viral fue comparable a la observada con 1000 UI/mL de interferón α -2a.

35 Es importante destacar que el tratamiento con GW4064 también disminuyó la cantidad de antígenos VHD (HDAg) en ambas células dHepaRG superinfectadas (Fig. 4) y PHH (Fig. 5), según lo detectado por el análisis de Western Blot. Cabe destacar, el agonista FXR α disminuyó tanto HDAg-L (antígeno VHD grande) como HDAg-S (antígeno VHD pequeño) en las mismas proporciones, es decir Reducción del 75% de su importe en ambos modelos. La inhibición de HDAGs fue ligeramente mayor después del tratamiento con 10 μ M de GW4064 que la obtenida con 1000 UI/mL de interferón α -2a. En conjunto, estos resultados indican que es probable que el agonista FXR α GW4064 inhiba el VHD a nivel de ARNm, lo que conduce a una inhibición muy fuerte a nivel de proteína.

40 El tratamiento con moduladores de FXR inhibe la replicación de VHD en células mono infectadas con VHD.

Para determinar si la inhibición mediada por FXR α de VHD fue independiente de VHB, los inventores analizaron el impacto de agonistas FXR α en células dHepaRG mono infectadas con VHD. Cuatro días después de la infección con VHD solo, las células se trataron durante siete días con 3 diferentes agonistas FXR α : 6-ECDCa a 10 μ M, GW4064 a 1 y 10 μ M y tropifexor a 1 μ M. El impacto del tratamiento en la cantidad total de ARN de VHD se analizó mediante RT-qPCR. El impacto específico de los agonistas de FXR en la cantidad de ARN genómico de VHD se evaluó mediante análisis Northern Blot.

50 GW4064 a 10 μ M, 6-ECDCa y tropifexor redujeron la cantidad de ARN de VHD total en alrededor de un 60 %, según lo medido por RT-qPCR (Fig. 6) y también de ARN genómico detectado por Northern Blot (Fig. 7).

En conjunto, estos resultados indican que los agonistas FXR α inhiben la infección por VHD de una manera que es independiente de su efecto inhibitor sobre la infección por VHB. Además 3 diferentes los agonistas FXR α con estructuras distintas mostraron una eficacia comparable en la inhibición de VHD.

55 El tratamiento con moduladores de FXR inhibe la síntesis de ARNs de VHD naciente.

Para obtener información inicial sobre el modo de acción de los agonistas de FWR en VHD, los inventores realizaron un ensayo Run-ON en células dHepaRG coinfectadas con VHB/VHD para determinar si el ARN de VHD naciente también podría inhibirse como se demostró la cantidad total de ARN de VHD. Las células dHepaRG se infectaron simultáneamente con VHB y VHD. Seis días después de la infección, las células se trataron con 10 μ M de GW4064 durante 4 días antes del experimento Run-On. Los resultados mostraron que GW4064 a 10 μ M fue capaz de inhibir la síntesis de ARN de VHD dentro de las 2 horas posteriores a la tinción con uridina marcada, lo que sugiere que la iniciación del ARNm de VHD o el alargamiento podrían verse afectados (Fig. 8).

65

El tratamiento con moduladores de FXR inhibe la infectividad específica de las partículas virales VHD secretadas.

El impacto de los agonistas de FXR α en la secreción y la infectividad específica de las partículas virales de VHD se evaluó en *in vitro* células dHepaRG coinfectadas. Tres días después de la infección, las células se trataron durante 10 días con el agonista de FXR GW4064 a 10 μ M o 1000 UI/ml de interferón α -2a o lamivudina a 10 μ M. Los sobrenadantes se recolectaron y concentraron utilizando PEG 8000 al 8 %. Primero, las cantidades secretadas de ARN de VHD se cuantificaron mediante RT-qPCR. Los resultados mostraron que GW4064 disminuyó la secreción de ARN de VHD en un 65 % a 10 μ M (Fig. 9A). Esta disminución de ARN viral fue ligeramente más pronunciada que la observada con interferón α -2a (50%). Como era de esperar, el inhibidor de la polimerasa del VHB, lamivudina, utilizado como control, no modificó significativamente la secreción de ARN de VHD.

Luego, para determinar la infectividad específica de las partículas VHD secretadas, se usaron partículas virales VHD concentradas recolectadas de sobrenadantes de dHepaRG para infectar células ingenuas Huh7.5-^{NTCP} usando el mismo vge/célula para cada condición. Seis días después de la infección, se cuantificó el ARN de VHD intracelular total mediante RT-qPCR. Los resultados mostraron que, después de la infección con 500 vge/célula, la cantidad de ARN de VHD intracelular disminuyó en más del 95 % en las células infectadas con sobrenadantes obtenidos de dHepaRG tratada con el agonista de FXR GW4064 (Fig. 9B) en comparación con una disminución del 70 % en el interferón α -2a condición. La infectividad específica de las partículas de VHD no se modificó con el tratamiento con lamivudina.

Finalmente, las células ingenuas Huh7.5-^{NTCP} se infectaron con los mismos sobrenadantes concentrados pero usando dos inóculos de VHD diferentes, 100 y 500 vge/célula, para cada condición. La cuantificación de los ARN intracelulares de VHD 6 días después de la infección mostró un aumento dependiente de la dosis de los niveles de ARN de VHD en células infectadas con sobrenadantes recolectados de dHepaRG tratados con cualquier vehículo, interferón α -2a o lamivudina (Fig. 9C). Sin embargo, este no fue el caso cuando se usaron sobrenadantes recolectados de células dHepaRG tratadas con el agonista de FXR GW4064, ya que no se observaron diferencias significativas cuando no se recibieron muestras de células ingenuas Huh7.5-^{NTCP} se infectaron con 100 o 500 vge/célula. En general, estos resultados indican que el agonista de FXR GW4064 reduce gravemente las propiedades infecciosas de las partículas de VHD secretadas.

Conclusión

Los inventores encontraron que los agonistas de FXR son inhibidores de la replicación de VHD en dHepaRG y PHH, los dos modelos más relevantes para *in vitro* estudios de infección por VHD. Este efecto antiviral se demostró con tres agonistas de FXR diferentes, es decir un análogo de ácido biliar (6-ECDCA) y 2 agonistas sintéticos (GW4064 y tropifexor).

Los presentes resultados de experimentos realizados en células mono infectadas con VHD demuestran claramente que el efecto inhibitorio de los agonistas de FXR en la replicación de VHD es independiente del impacto de esta clase de moléculas en VHB, que se ha identificado previamente. Mientras que el VHD depende de las proteínas de superficie del VHB para entrar en los hepatocitos, la etapa de replicación del ciclo viral ocurre independientemente del VHB. Como los inventores observaron que la cantidad de la forma genómica del ARN de VHD así como de los ARN nacientes disminuyó después del tratamiento, los agonistas de FXR pueden dirigirse a la etapa de replicación del ciclo de vida del VHD.

Además, los inventores demostraron que los agonistas de FXR también son inhibidores de la secreción de VHD y de la infectividad específica de partículas virales secretadas en células dHepaRG. Este efecto antiviral se demostró con el agonista sintético GW4064.

En conclusión, los inventores han identificado nuevas moléculas (es decir, agonistas de FXR) que regulan (inhiben) específicamente la infección por VHD. Esto debería permitir la selección de candidatos que podrían probarse en un modelo animal o directamente en humanos con agonistas de FXR que ya se encuentran en ensayos clínicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas celulares

HepaRG

La línea celular HepaRG derivada de un hepatocarcinoma celular humano puede diferenciarse y recuperar muchos rasgos fenotípicos de los hepatocitos después de 4 semanas de cultivo en condiciones definidas¹. Las células HepaRG se cultivaron, diferenciaron e infectaron con VHB y VHD como se describió anteriormente.^{2,3}. Brevemente, para la diferenciación, las células se mantuvieron durante 2 semanas en medio estándar y luego durante al menos 2 semanas en medio estándar suplementado con DMSO al 1,8 %. La composición del medio estándar fue la siguiente: Medio William's E suplementado con suero HyCLone FetalClone II al 10 % (Thermo Fisher Scientific), penicilina/estreptomina, L-glutamina, insulina-transferrina-selenio (Gibco) y hemisuccinato de hidrocortisona 50 μ M.

Hepatocitos humanos primarios

5 Los hepatocitos humanos primarios (PHH) se prepararon recientemente a partir de una resección de hígado humano obtenida del Centro Léon Bérard (Lyon) con autorizaciones ministeriales francesas (AC 2013-1871, DC 2013 - 1870, AFNOR NF 96 900 sept 2011) como se describió anteriormente⁴.

Huh7.5^{NTCP}

10 Las células Huh7.5 fueron proporcionadas amablemente por C.M. Rice (Universidad Rockefeller, EE.UU.). Células Huh7.5^{NTCP} derivadas se generaron por transducción lentiviral como se describió previamente (Ni *et al.*, Gastroenterology, 2014; 146(4):1070-83. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.024. Epub 2013 Dec 19. PMID: 24361467).

Virus

15 Se prepararon stocks de VHD (genotipo 1, Genbank ID M21012) a partir de sobrenadantes de células Huh7 cotransfectadas como se describió anteriormente^{3,5}. Camille Sureau (Laboratoire de virologie moléculaire, Inserm UMR S_1134, Institut National de Transfusion Sanguine, Paris, Francia) proporcionó amablemente los plásmidos pSVLD3 y pT7HB2.7 utilizados para la producción de partículas infecciosas de VHD.

20 Se prepararon stocks de VHB (genotipo D, Genbank ID U95551) utilizando la línea celular HepAD38 de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente.⁷

25 Los sobrenadantes que contenían partículas de VHB o VHD se aclararon (filtro de 0,45 µm) y se concentraron con PEG 8000 al 8 % (Sigma-Aldrich).

El ARN de VHD se cuantificó mediante RT-qPCR como se describió anteriormente⁶ y el ADN de VHB se cuantificó utilizando la prueba AmpliPrep/COBAS® TaqMan® VHB (Roche).

30 Químicos

35 GW4064 [3-(2,6-diclorofenil)-4-(3-carboxi-2-cloro-estilben-4-il)-oximetil-5-isopropilisoaxazol] es un agonista de FXR (EC50 90 nM), activo tanto en vivo e in vitro⁸. Aunque muestra una biodisponibilidad limitada, GW4064 ha obtenido un uso generalizado como agonista de FXR potente y selectivo y ha alcanzado el estado de "compuesto de referencia" en este campo.

El 6-ECDCA (ácido 6-etil-queno-desoxicólico) es un derivado de sal biliar y un fuerte agonista de FXR (EC50 99 nM) y se obtuvo de Sigma-Aldrich⁹.

40 Tropifexor (2-[(1R,3r,5S)-3-({5-ciclopropil-3-[2-(trifluorometoxi)fenil]-1,2-oxazol-4-il)metoxi]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-il]-4-fluoro-1,3-benzotiazol-6-ácido carboxílico) es un agonista sintético de FXR, activo in vitro e in vivo, y se obtuvo de Cayman¹⁰.

45 GW4064, 6-ECDCA y tropifexor se disolvieron en DMSO a 10 mM para preparar soluciones madre.

El interferón alfa-2 (ROFERON-A) se adquirió de Roche.

La actinomicina D se adquirió de Sigma-Aldrich.

50 Lamivudina (LAM) se adquirió de Selleckchem.

Western Blot

55 Las células se recogieron en tampón de lisis RIPA (NaCl 150 mM, Tris HCl pH = 8,0 50 mM, SDS 0,1%, NP40 1%, Na Deoxycholate 0,5%) que contenía inhibidores de proteasa (Protein Cocktail Inhibitors de Sigma-Aldrich, NaF 10 mM, Na ortovanadato 10 mM). Los lisados clarificados se sometieron a SDS-PAGE al 10 % y transferencia Western Blot sobre membranas de PVDF o nitrocelulosa utilizando el aparato TransTurbo Blot según el fabricante (Biorad). Los anticuerpos primarios son el anticuerpo VHDag (amable regalo del Dr. Alain Kay) y el anticuerpo beta-tubulina (Abcam). Los anticuerpos HRP secundarios se adquirieron de Sigma-Aldrich. La detección de la señal de HRP se determinó electrónicamente utilizando el sistema de imágenes Ozyme - Syngene PXi y los parámetros se establecieron estrictamente por debajo del punto de saturación.

Northern Blot

65 El ARN total se extrajo de las células infectadas usando Tri Reagent® (TR118, Molecular Research Center). Para cada muestra, 2 µg del total de ARN se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,2%. Después de la

electrotransferencia a membranas de nailon cargadas (Roche), las secuencias de ARN genómico de VHD se detectaron utilizando una sonda de ARN específica de hebra sintetizada con el kit de etiquetado de ARN Dig (Sp6/T7) (Roche) y el kit de detección luminiscente DIG (Roche) según el instrucción del fabricante. La cuantificación de las señales se realizó con ImageLab.

5 Como control interno de la cantidad y la calidad del ARN extraído, la membrana se desnudó y se volvió a hibridar utilizando oligonucleótidos marcados específicos para ARNr 18S y ARNr 28S humanos.

10 Cuantificación de HBs y HBe

Los antígenos HBs y HBe secretados en el sobrenadante de las células se cuantificaron, después de las diluciones requeridas, en aparatos Mini Vidas con kits Vidas HBs y Vidas HBe/HBET (bioMérieux, Francia) o kits Autobio (AutoBio, China) según el protocolo del fabricante.

15 Cuantificación de ARN virales por qPCR

El ARN total se preparó usando NucleoSpin ARN Plus (Macherey-Nagel). Después de la digestión del ADN con TURBO DNasa (Ambion), se transcribieron de forma inversa un máximo de 1000 ng de ARN utilizando el kit de ARN a ADNc de alta capacidad (Thermo Fisher Scientific). La PCR cuantitativa se realizó con los cebadores VHD-F (5'-GCCTCTCCTTGTCGGTGAAT -3', SEQ ID NO: 1) y VHD-R (5'-CCTGGCTGGGGAACATCAAA-3', SEQ ID NO: 2) para la cuantificación de ARN total de VHD y VHB-F (5'-AGCTACTGTGGAGTTACTCTCGT-3', SEQ ID NO: 3) y VHB-R (5'-CAAAGAATTGCTTGCCTGAGTG-3', SEQ ID NO: 4) para la cuantificación de ARN de VHB pregenómico/precore. El ADNc se analizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) usando el kit de PCR QuantiFast SYBR® Green (Qiagen) en el instrumento LightCycler® 480 (Roche) usando 45 ciclos de PCR. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La cuantificación relativa se determinó mediante la normalización de la expresión de cada gen al gen de limpieza S9 usando los cebadores S9-F (5'-CCGCGTGAAGAGGAAGAATG-3', SEQ ID NO: 5) y S9-R (5'-TTGGCAGGAAAACGAGACAAT-3', SEQ ID NO: 6).

30 Ensayos continuos

Las células HepaRG infectadas con VHD se incubaron con uridina marcada o no (EU simulado) durante 2h, se lavaron y se recolectaron. Los ARN de VHD intracelulares totales, así como los ARN de VHD marcados con UE (ARN de VHD intracelular naciente) se aislaron utilizando el kit de captura de ARN naciente Click-iT™ (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como control, las células se trataron con 10 µg/ml de actinomicina D 20 min antes de la incubación con uridina marcada para bloquear la transcripción de los ARN nacientes.

Análisis de secreción de VHD e infectividad específica

40 Para el análisis de la infectividad específica del virión VHD, los sobrenadantes de dHepaRG infectados tanto con VHB como con VHD se concentraron utilizando PEG 8000 al 8%. ARN de VHD fue cuantificado por RT-qPCR en concentrados y Huh7.5^{NTCP} las células se infectaron usando los mismos equivalentes de genoma viral (vge) de virus concentrado para cada condición de tratamiento. Seis días después de la infección, se extrajo el ARN celular total y se cuantificó el ARN de VHD mediante RT-qPCR.

45 BIBLIOGRAFÍA

1. Hantz, O. *et al.* J. Gen. Virol. 90, 127–135 (2009).
2. Gripón, 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).
- 50 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).
- 55 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).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agonista del receptor farnesoide X (FXR) para usar en el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis D (VHD) en un sujeto que necesite del mismo, en donde el sujeto padece una infección crónica por VHD.
2. El agonista de FXR para uso de la reivindicación 1, en donde el agonista de FXR es un agonista de FXR selectivo.
- 10 3. El agonista de FXR para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el agonista de FXR se selecciona del grupo que consiste en LJN452 (Tropifexor), LMB763 (Nidufexor), GS-9674 (Cilofexor), PX-102 (PX-20606), PX-104 (Phenex 104), OCA (Ocaliva), EDP-305, TERN-101 (LY2562175), MET-409, GW4064, WAY362450 (turofexorato isopropílico), fexamina, AGN242266 (AKN-083), BAR502 y EYP001.
- 15 4. El agonista de FXR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el agonista de FXR es EYP001.
- 20 5. El agonista de FXR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en combinación con un interferón alfa (IFN- α), un interferón lambda o una forma pegilada del mismo, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en IFN- α 1a, IFN- α 1b, IFN- α 2a, IFN- α 2b e IFN- λ 1a o una forma pegilada de los mismos, más preferiblemente PEG-IFN- α 2a (p. ej., Pegasys), PEG-IFN- α 2b (p. ej., ViraferonPeg o Introna) o PEG-IFN- λ 1a.
- 25 6. El agonista de FXR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en combinación con un agente anti-VHD seleccionado del grupo que consiste en ribavirina, ritonavir, lonafarnib y EBP 921.
- 30 7. El agonista de FXR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en combinación con un agente anti-VHB seleccionado del grupo que consiste en lamivudina, adefovir, telbivudina, entecavir, tenofovir y emtricitabina.
- 35 8. El agonista de FXR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en combinación con un agente anti-VHB/VHD seleccionado del grupo que consiste en ezetimiba, myrcludex B, polímero de ácido nucleico REP 2139 y polímero de ácido nucleico REP 2165.
9. El agonista de FXR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el sujeto no ha respondido a un tratamiento previo para la infección por VHD.
10. El agonista de FXR para uso de la reivindicación 9, en donde el tratamiento previo es un tratamiento con PEG-IFN α .
11. El agonista de FXR para uso de la reivindicación 9, en donde el tratamiento previo es un tratamiento con un agente anti-VHD seleccionado del grupo que consiste en ribavirina, ritonavir, lonafarnib y EBP 921.

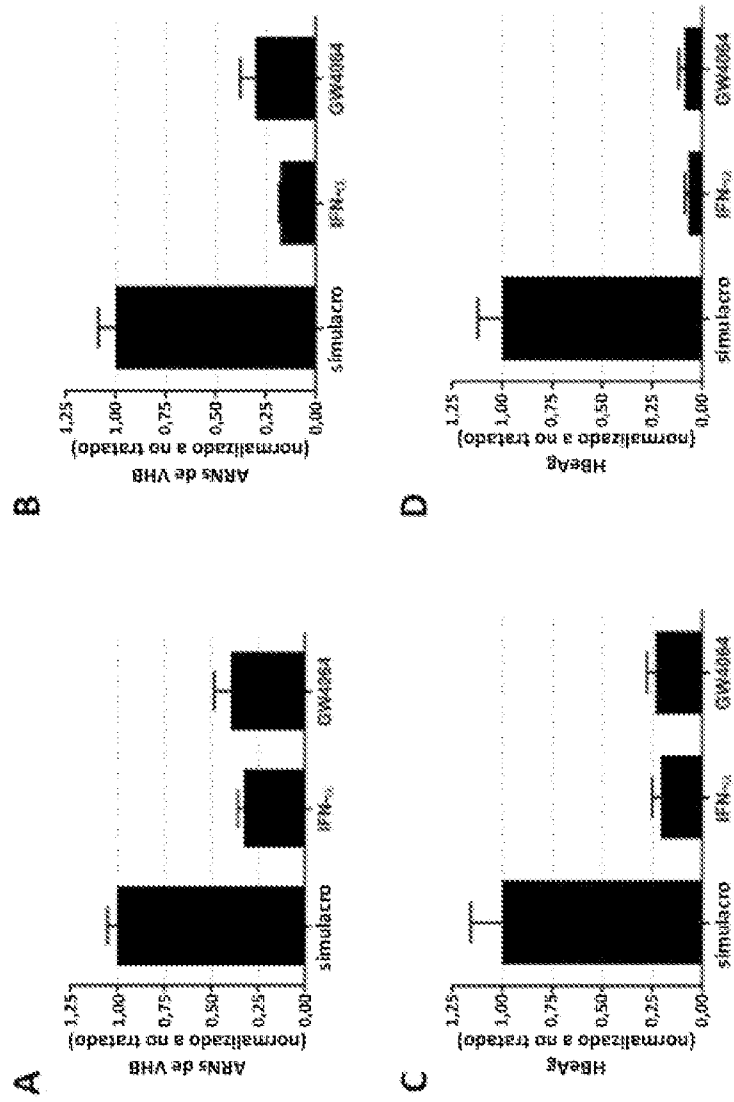


FIGURA 1

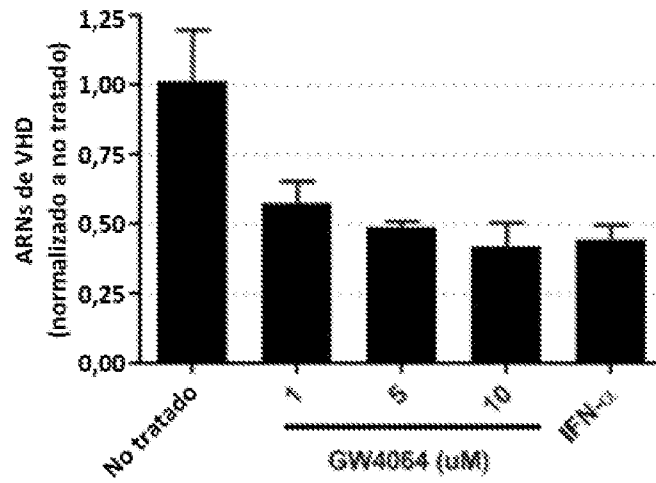


FIGURA 2

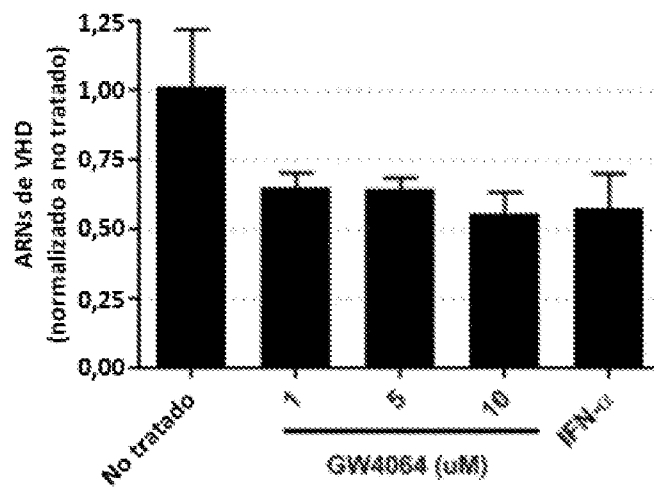


FIGURA 3

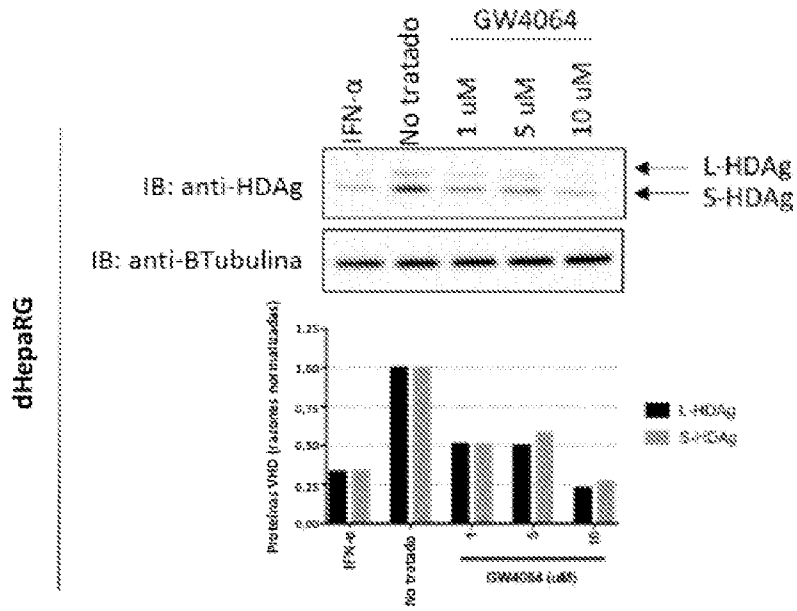


FIGURA 4

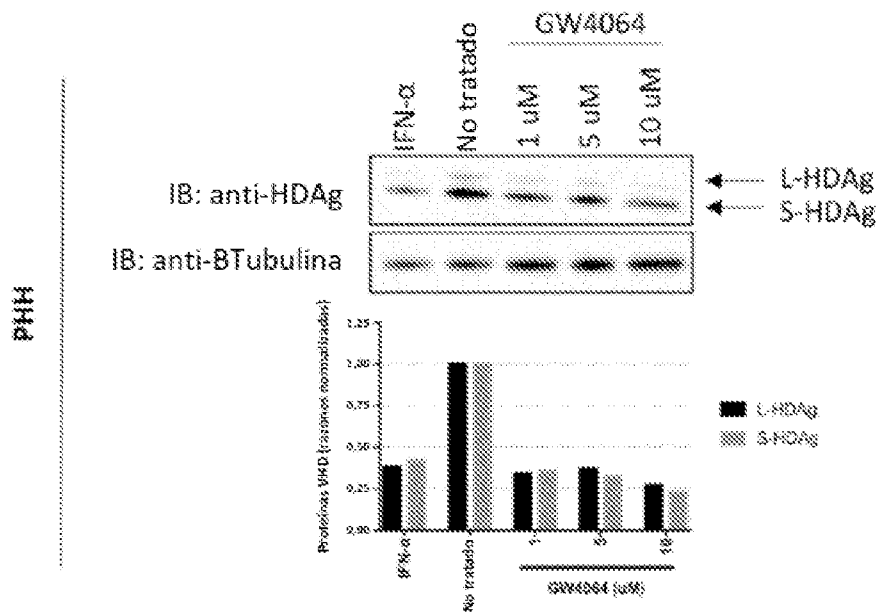


FIGURA 5

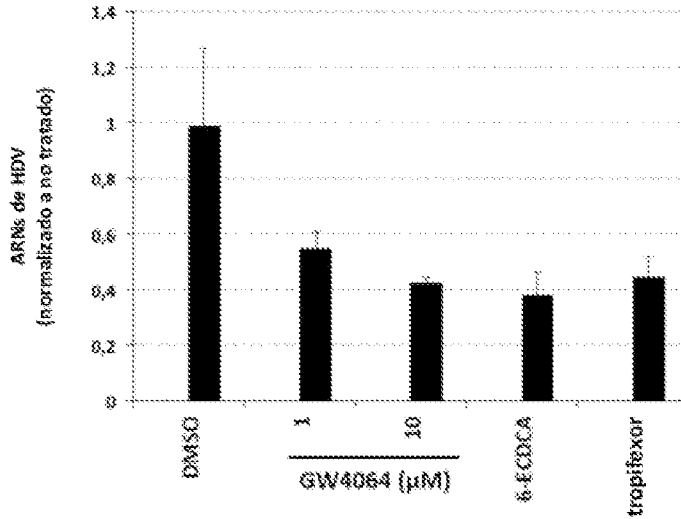


FIGURA 6

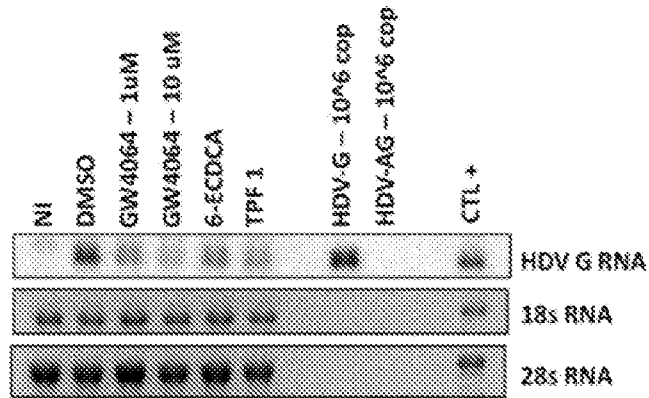


FIGURA 7

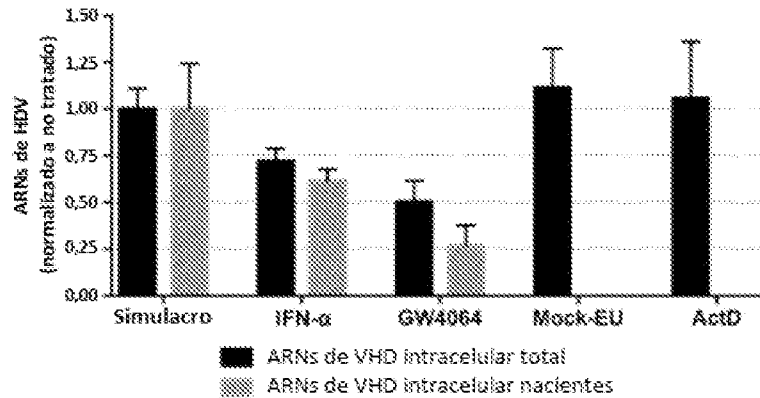


FIGURA 8

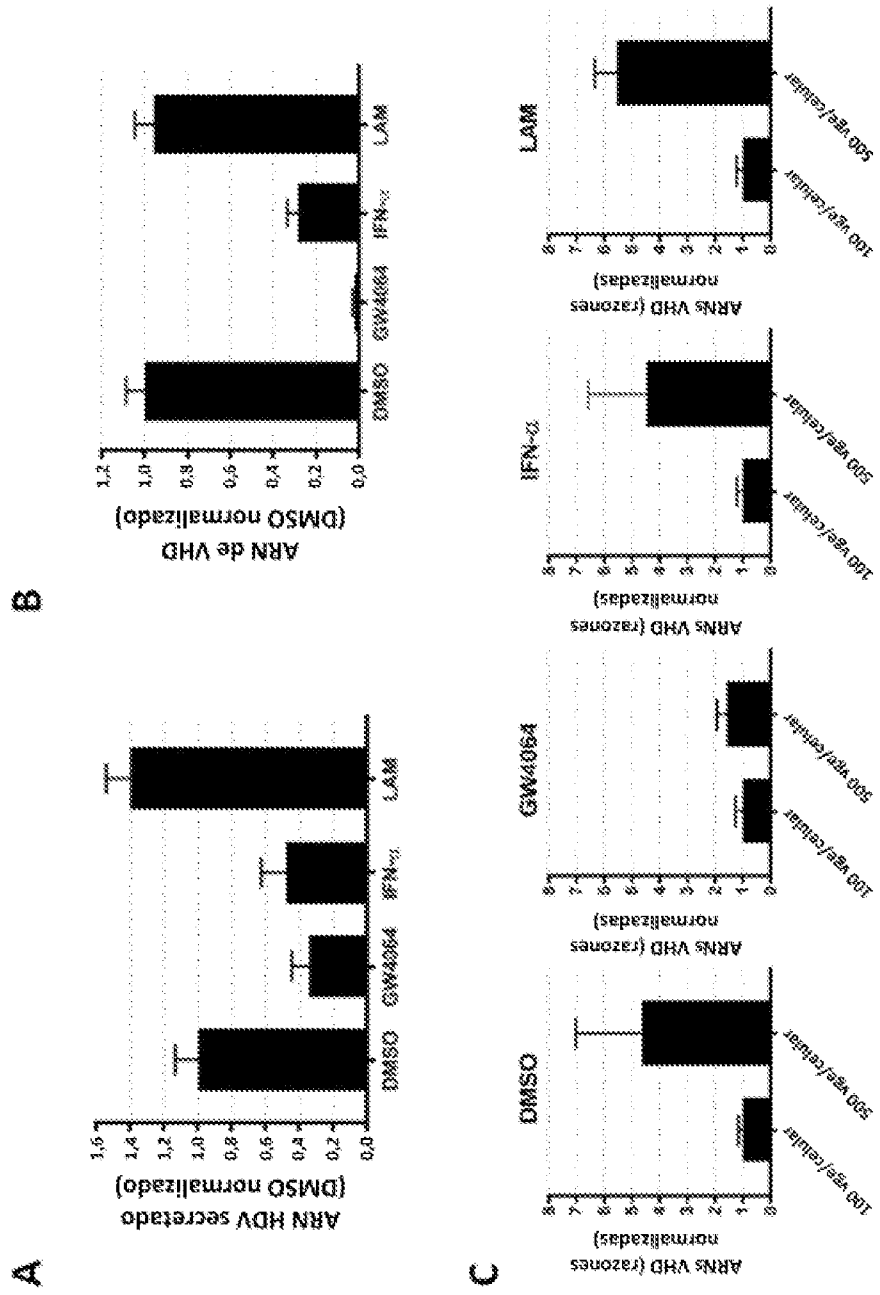


FIGURA 9