

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 266**

51 Int. Cl.:
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/7072 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03764562 .9**
96 Fecha de presentación: **11.07.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1545557**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54 Título: **Terapias de combinación de L-FMAU para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B**

30 Prioridad:
15.07.2002 US 396117 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2012

73 Titular/es:
GILEAD SCIENCES, INC.
333 LAKESIDE DRIVE FOSTER CITY
CALIFORNIA 94404, US

72 Inventor/es:
FURMAN, Phillip, A.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 381 266 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

Terapias de combinación con L-FMAU para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B

Campo de la invención

5 La presente invención describe los usos, composiciones y compuestos para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un ser humano infectado con el virus de la hepatitis B, como se expone en las reivindicaciones. Se refiere al tratamiento o la profilaxis de la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) en un ser humano, y abarca e incluye la administración de una cantidad efectiva de L-FMAU, FTC e interferón.

Antecedentes de la invención

10 A pesar de la existencia de vacunas eficaces, la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) sigue siendo un importante problema de salud pública en todo el mundo con 400 millones de portadores crónicos. Éstos pacientes infectados se exponen al riesgo de desarrollar cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (Lee, W. M. 1997, N. Engl. J. Med. 337:1733-1745). En la actualidad, se cree que hay aproximadamente 1,25 millones de portadores crónicos de la hepatitis B sólo en los Estados Unidos de América, con 200.000 nuevos infectados cada año por contacto con la sangre o los fluidos corporales.

15 El virus de la hepatitis B ("VHB") es la segunda causa de cáncer humano sólo superado por el tabaco. Se desconoce el mecanismo mediante el cual el VHB induce cáncer, aunque se postula que puede desencadenar de forma directa el desarrollo del tumor, o desencadenar el desarrollo del tumor de forma indirecta a través de inflamación crónica, cirrosis y la regeneración celular asociada con la infección.

20 El número de seres humanos infectados con el virus de la hepatitis B (VHB) ha alcanzado niveles de epidemia. Después de un periodo de incubación de dos a seis meses en el que el huésped no es consciente de la infección, la infección por el VHB puede ocasionar una hepatitis aguda y daño hepático, que resulta en dolor abdominal, ictericia, y aumento de los niveles de ciertas enzimas en sangre. El virus de la hepatitis B puede causar hepatitis fulminante, una forma de la enfermedad que progresa rápidamente y es a menudo fatal, en la que se destruyen secciones masivas del hígado. Generalmente, los pacientes se recuperan de la hepatitis vírica aguda. En algunos pacientes, sin embargo, persisten elevados niveles del antígeno vírico en la sangre durante un período de tiempo prolongado o indefinido, causando una infección crónica. Las infecciones crónicas pueden ocasionar hepatitis persistente crónica. Los pacientes infectados de forma persistente crónica con el VHB son más comunes en los países desarrollados. La hepatitis persistente crónica puede causar fatiga, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular, un cáncer primario de hígado. En los países occidentales industrializados, los grupos de alto riesgo para la infección por el VHB incluyen aquellos en contacto con portadores del virus de la hepatitis B o sus muestras de sangre. La epidemiología del VHB es en realidad muy similar a la del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, de hecho la infección por el virus de la hepatitis B es común en los pacientes con SIDA o infecciones asociadas al VIH. Sin embargo, el VHB es más contagioso que el VIH.

35 Hasta la fecha, solamente se han aprobado por la FDA tres fármacos para el tratamiento de la infección crónica por el virus del hepatitis B: interferón alfa, 3TC (Epivir, lamivudina) y adefovir dipivoxilo (Hepsera® Gilead Sciences).

Fármacos Aprobados por la FDA para el VHB:

Nombre del Fármaco	Clase de Fármaco	Compañía	Estado en la FDA
Intron A (interferón α -2b)	Interferón	Schering-Plough	Aprobado por la FDA
3TC (lamivudina; Epivir-VHB)	Análogo nucleósido	GlaxoSmithKline	Aprobado por la FDA
Adefovir dipivoxilo	Análogo nucleósido	Gilead Sciences	Aprobado por la FDA

Interferón alfa

40 Se usa una forma fabricada del interferón para tratar la hepatitis B. Este tratamiento supone la administración de interferón mediante inyección durante aproximadamente cuatro meses.

45 No todos los pacientes responden al interferón, y algunas veces es necesario repetir el tratamiento. En estudios clínicos, solamente el 45 % de los pacientes que se trataron para la hepatitis B con Intron A (interferón alfa-2b, recombinante, Schering Corporation) mediante inyección no volvieron a mostrar evidencia del virus de la hepatitis B en la sangre con el paso del tiempo. Además, la mayoría de los pacientes mostraron dificultades para tolerar el tratamiento del interferón, que causa síntomas graves similares a los de la gripe, pérdida de peso, y disminución de la energía y la resistencia.

3TC

El (-)-enantiómero del BCH-189 (2',3'-dideoxi-3'-tiacitidina), también conocido como 3TC (Eпивir, lamivudina) es un fármaco antivírico que es activo tanto frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como al de la hepatitis B (VHB). Pertenece a la clase de fármacos denominados análogos nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa (NRTT), que actúan mediante el bloqueo de la producción de la enzima transcriptasa inversa que necesitan el VIH y el VHB para replicarse. La 3TC se desarrolló originalmente para el tratamiento del VIH, sin embargo los investigadores descubrieron que la 3TC también actúa frente al virus de la hepatitis B. En diciembre de 1998, la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América (FDA) aprobó Epivir VHB para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B.

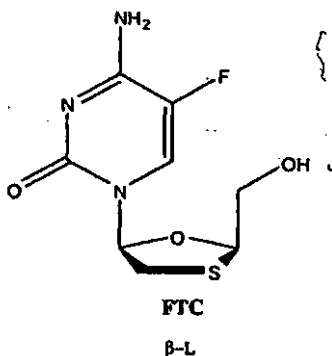
Aunque la 3TC inhibe de forma eficiente la replicación del VHB, las lentas cinéticas de eliminación vírica durante la terapia de la 3TC (Nowak, M., S. Bonhoeffer, et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:4398-4402) y la variabilidad espontánea del genoma vírico ocasionan la aparición de mutantes resistentes al fármaco que conllevan mutaciones que afectan al dominio de la transcriptasa inversa (RT) (Mason, W. S., J. Cullen, et al. 1998, Virology 245:18-32, Nafa, S., S. Ahmed, et al. 2000, Hepatology 32: 1078-1088; Melegari, M., P. P. Scaglioni, y J. R. Wands. 1998 Hepatology 27:628-633; Seignerres, B., C. Pichoud, et al. 2000, J. Infect. Dis. 181:1221-1233). Aproximadamente el 50 % de los pacientes tratados desarrollan resistencia vírica después de tres años de tratamiento con la 3TC (Leung, N. W., C. L. Lai, et al. 2001, Hepatology 33:1527-1532). La resistencia a los análogos nucleósidos se asocia con sustituciones en la secuencia de los ácidos nucleicos del gen de la polimerasa que causa cambios en la secuencia de aminoácidos de la RT del VHB, en particular en el motivo YMDD en el interior del sitio catalítico. La variante más común de la polimerasa consiste en el cambio rtL180M + M204V (de acuerdo con la nomenclatura reciente independiente del genotipo para las variantes resistentes a fármacos del VHB) (Stuyver, L. J., S. A. Locarnini, et al. 2001, Hepatology 33:751-757) que asocia una mutación en el sitio catalítico (rtM204V) con una mutación compensatoria en el dominio B de la RT (rtL180M) que proporciona una mayor capacidad de replicación al sitio catalítico de la variante (Allen, M. I., M. Deslauriers, et al. 1998, Hepatology 27:1670-1677, Chayama, K., Y. Suzuki, et al. 1998, Hepatology 27:1711-1716, Melegari, M., P. P. Scaglioni, y J. R. Wands. 1998, Hepatology 27: 628-633, Ono, S. K., N. Kato, et al. 2001, J. Clin. Investig. 107:449-455, Seignerres, B., S. Aguesse-Germon, et al. 2001, J. Hepatol. 34:114-122).

Adefovir dipivoxilo (Hepsera)

El 20 de septiembre de 2002, la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América aprobó el adefovir dipivoxilo para el tratamiento de la hepatitis B crónica. HEPSERA™ es el nombre comercial para el adefovir dipivoxilo, un profármaco diéster del adefovir. Adefovir es un análogo nucleótido acíclico de monofosfato de adenosina que inhibe la ADN polimerasa del virus de la hepatitis B (VHB) mediante la competencia con el sustrato natural trifosfato de deoxiadenosina y causando la terminación de la cadena de ADN después de su incorporación en el ADN vírico. El nombre químico del adefovir dipivoxilo es 9-[2-[bis[(pivaloiloxi)metoxi]fosfinil]metoxil-etil] adenina. Adefovir se fosforila al metabolito activo, adefovir difosfato, por acción de las quinasas celulares. Véase, por ejemplo, los documentos de Patente de los Estados Unidos de América N° 5.641.763 y 5.142.051, titulados, derivados de N-fosfonilmetoxialquilo de bases púricas y pirimidínicas y una composición terapéutica de los mismos con actividad antivírica.

(-)-FTC

La β -L-FTC ((β -2-hidroxi metil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatolano, Emtriva; emtricitabina) se aprobó para el tratamiento del VIH y en la actualidad está en fase de pruebas clínicas en seres humanos para el tratamiento de la infección por el virus de hepatitis B. El compuesto muestra una fuerte actividad contra el virus de la hepatitis B en modelos en patos (Aguesse-Germon, S., S.-H, Liu, et al. Antimicrob. Agents Chemother. 1998, 42, 369-376; Seignerres, B., C. Pichoud, et al. 2000) y en marmotas. En un modelo del VHB en marmota, se descubrió que la FTC inhibía la replicación vírica pero no inducía el aclaramiento vírico (Cullen, J. M., S. L. Smite, et al. Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41, 2076-2082; Korba, B. E., R. F. Schinazi, P., et al. Antimicrob. Agents Chemother. 2000, 44, 1757-60).



L-FMAU

La L-FMAU (clevudina) representa otro candidato prometedor para el tratamiento de una infección del virus de la hepatitis B en base a modelos *in vitro* de infección del VHB (ensayos enzimáticos y experimentos con cultivos celulares), así como en modelos animales infectados de forma experimental de la infección de hepatitis B, tales como en patos (Aguesse-Germon, S., S.-H. Liu, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 369-376; Seignerres, B., C. Pichoud, et al., 2000) y en marmotas. En el modelo en marmota, se mostró que la L-FMAU disminuye rápidamente el número de hepatocitos infectados (Zhu, Y., T. Yamamoto, et al. *J. Virol.* 2001, 75, 311-22). Anteriormente Yung Chi Cheng, Chung K. Chu y otros informaron en 1994 que la 1-(2'-deoxi-2'-fluoro-β-L-arabinofuranosil)-timina (L-FMAU) muestra una actividad superior frente al virus de la hepatitis B y al virus de Epstein Barr. Véanse los documentos de Patente de los Estados Unidos de América N° 5.587.362; 5.567.688; 5.565.438 y 5.808.040 y la Solicitud de Patente Internacional publicada como WO 95/20595. La Publicación de Patente Internacional N° WO 01/72294 desvela el uso de la 2'-deoxi-2'-fluoro-β-L-arabinofuranosil timina (L-FMAU) para el tratamiento de las infecciones de la hepatitis delta.

Interferones

El interferón es una proteína producida de forma natural por el cuerpo para modular el sistema inmune y para regular otras funciones celulares. Las clases principales de interferones son el interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega e interferón tau. Los interferones se pueden modificar para aumentar su estabilidad *in vivo*, incluyendo dichas modificaciones la pegilación, u otros medios para mejorar la estabilidad de la molécula.

Ejemplos de la clase de interferones del interferón alfa incluyen el interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2b pegilado ROFERON®-A (interferón alfa-2a, Roche), PEGASYS® (interferón alfa-2a pegilado, Roche), INTRON® A (interferón alfa-2b, Schering Corporation), PEG-INTRON® (interferón alfa-2b pegilado, Schering Corporation), interferón de consenso, INFERGEN (interferón alfacon-1) de InterMune, OMNIFERON (interferón natural) de Viragen, ALBUFERON de Human Genome Sciences, Interferón Oral Alfa de Amarillo Biosciences, y SuperFeron (IFN-alfa multisubtipo humano natural, Genetrol, Inc.).

Otros tipos de interferón incluyen: interferón beta, interferón gamma, interferón tau, interferón omega, REBIF (interferón beta-la) de Ares-Serono, Interferón Omega de BioMedicine, interferón gamma-1b de InterMune, y HuFeron (IFN-beta humano, Genetrol, Inc.).

Terapia de Combinación

Para mejorar el control de la replicación vírica y retrasar la aparición de virus mutantes resistentes, es fundamental desarrollar estrategias antivíricas en base a la terapia de combinación (Zoulim, F. 2001, *Antivir. Chem. Chemother.* 12(Suppl. 1): 131-142), que también puede prevenir la selección de mutantes de resistencia cruzada, como se mostró con el virus de la inmunodeficiencia humana (Chow, Y. K., M. S. Hirsch, et al. 1993, *Nature* 361:650-654; Snyder, S., D. Z. D'Argenio, et al. 2000, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1051-1058, Villahermosa, M. L., et al. 1997, *Biochemistry* 36:13223-13231). Algunos estudios se han centrado en examinar el efecto antivírico de la combinación de inhibidores de la polimerasa para la terapia de la infección crónica por hepadnavirus, usando varios modelos experimentales (Korba, et al. 2000, *Antivir. Res.* 45:19-32; Colledge, D., S. Locamini, y T. Shaw. 1997, *Hepatology* 26:216-225; Colledge, et al. 2000, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 551-560). El desarrollo de una terapia de combinación para la infección por hepatitis B es una estrategia necesaria que está actualmente en marcha para reducir adicionalmente la morbilidad y la mortalidad de la infección crónica por hepatitis B.

Se evaluaron los efectos de determinadas combinaciones de nucleósidos de pirimidina y purina en modelos de infección de la hepatitis B en patos por Seignerres et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(6):1842-1852 (2003) y *Artiviral Research*, 53(3), página A72. Las combinaciones de amdoxovir (DAPD), emtricitabina ((-)-FTC) y clevudina (L-FMAU) tienen un efecto antivírico potenciado.

Pichoud et al, *Antiviral Research*, 53 (3), página A72, desvela que la terapia única con IFN-γ tiene solamente un efecto transitorio en la replicación del virus de la hepatitis de la marmota (WHV). Delaney et al., *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 11(2), pp 169-187, revisan algunas terapias potenciales para el WHV.

Los tratamientos para la infección de la hepatitis B también se describen en Lok y McMahon, *AASLD Practice Guidelines*, pp. 1225-1241 (2001), incluyendo el tratamiento con interferones. Las marmotas de pascua infectadas de forma crónica con el virus de la hepatitis de la marmota (WHV) se usaron como un modelo para la infección por el VHB para estudiar el efecto antivírico del 1-(2'-fluoro-5-metil-β-L-arabinofuranosil)-uracilo (L-FMAU) y para la vacuna del antígeno de superficie del WHV. La inmunidad humoral y celular asociada a la combinación de la L-FMAU y la vacuna es semejante a la observada en la infección del WHV autolimitada (Menne et al., *J. Virology*, 76(11):5305-5314 (2002)).

Jacquard et al. publicaron un estudio para el tratamiento con múltiples fármacos de la hepatitis B crónica usando L-FMAU y FTC, junto con el suministro de adenovirus de interferón gama recombinante (Jacquard et al., "Evaluation and Combination of Clevudine and Emtricitabine with Adenovirus Mediated Delivery of Interferón Gamma in the Woodchuck Model of GBV Infection", póster presentado en el Congreso AASLD de Boston, Nov. 2-5, 2002. Véase

también el Congreso de Asilomar "The Molecular Biology of Hepatitis B Virus" Sept 29 - Oct 3, 2002.). Este estudio sugiere que el interferón no potencia el efecto de la L-FMAU y la FTC, sin embargo, el estudio se limitó al virus de la hepatitis de la marmota en marmotas, y no al del virus de la hepatitis B humana en seres humanos.

5 La Patente de los Estados Unidos de América Nº 5.808.040 de la Fundación de Investigación de la Universidad de Georgia y de la Universidad de Yale desvela que la L-FMAU se puede administrar junto con FTC, 3TC, carbovir, aciclovir, interferón, AZT, DDI (2',3'-dideoxiinosina), DDC (2',3'-dideoxicitidina), L-DDC, L-F-DDC, y D4T.

10 La Solicitud de Patente Internacional Nº PCT/US99/25673, publicada como el documento WO 00/25797 desvela combinaciones y procedimientos que usan tales combinaciones para el tratamiento de la infección del VHB y las afecciones relacionadas en los seres humanos. En particular, las composiciones comprenden una cantidad efectiva de forma sinérgica de β -2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano (FTC) y una de penciclovir (2-amino-1,9-dihidro-9-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)butil]-6H-purin-6-ona, también denominado "PCV"), famciclovir, o 9-[2-(fosfometoxi)etil]adenina (PMEA, también denominado en adelante Bis-POM-PMEA o BP-PMEA). De forma alternativa, las composiciones comprenden una cantidad efectiva de forma sinérgica de 2'-fluoro-5-metil- β -L-arabinofulaniluridina (L-FMAU) y una de Penciclovir, 9-[2-(fosfometoxi)etil]adenina (PMEA) o un nucleósido de β -D-1,3-dioxolano, tal como DAPD. De forma alternativa, las composiciones comprenden una cantidad efectiva de forma sinérgica de un nucleósido de β -D-1,3-dioxolano, tal como DAPD y PMEAs.

La Publicación del PCT Nº WO 98/23285 desvela un procedimiento para el tratamiento o profilaxis de las infecciones por el virus de la hepatitis B en un paciente humano o animal que comprende administrar al paciente cantidades efectivas o profilácticas de penciclovir (o un bioprecursor del mismo tal como famciclovir) y alfa interferón.

20 La Patente de los Estados Unidos de América Nº 5.990.093 y las Publicaciones de Patente Internacional Nº WO 95/07086 y Nº WO 96/40164, asignada a la Universidad de Emory, desvelan procedimientos para el tratamiento del VHB que comprenden administrar β -L-2',3'-dideoxiadenosina en combinación o alternancia con 2-hidroxi-metil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano; 2-hidroximetil-5-(citocin-1-il)-1,3-oxatiolano; 2'-fluoro-5-yodo-arabinosiluracilo (FIAU); 2'-fluoro-5-etil-arabinosiluracilo (FEAU), carbovir, o interferón.

25 Las Patentes de los Estados Unidos de América de Nº 5.703.058, 5.905.070 y 6.232.300 y la Publicación de Patente de Internacional Nº WO 96/22778 desvela nucleósidos de (5-carboximido o 5-fluoro)-(2',3'-insaturado o 3'-modificado) pirimidina para el tratamiento de los virus HTV o VHB. En particular, las patentes y la publicación de patente internacional desvelan terapias de combinación para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana o del virus de la hepatitis B que comprenden un nucleósido de (5-carboximido o 5-fluoro)-(2',3'-insaturado o 3'-modificado) pirimidina junto con uno o más de 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano, 2-hidroximetil-5-(citocin-1-il)-1,3-oxatiolano; 9->4-(hidroximetil)-2-ciclopenten-1-il-guanina (carbovir), 9-(2-hidroxi-etoxi)metil-guanina (aciclovir), interferón, 3'-deoxi-3'-azidotimidina (AZT), 2',3'-dideoxiinosina (DDI), 2',3'-dideoxicitidina (DDC), (-)-2'-fluoro-5-metil-beta-L-ARAuridine (L(-)-FMAU) y 2',3'-didehidro-2',3'-dideoxitimidina (D4T).

30 Aunque se han realizado avances en el tratamiento de la hepatitis B y en las terapias de combinación, todavía no se conoce qué combinaciones son efectivas de forma óptima para reducir o eliminar de forma considerable la carga vírica de la hepatitis B humana en el huésped. Se ha observado que mientras determinados agentes y combinaciones para la hepatitis B se pueden potenciar con terapias adicionales, en otros casos las terapias adicionales no proporcionan ningún beneficio añadido y de hecho pueden ser perjudiciales para el bienestar de los pacientes. Por lo tanto, el proveedor de asistencia sanitaria necesita información acerca de de las combinaciones beneficiosas y ventajosas de las terapias de la hepatitis B para que puedan desarrollar un tratamiento óptimo para el paciente.

35 Teniendo en cuenta que el virus de la hepatitis B ha alcanzado niveles de epidemia en todo el mundo, y que tiene efectos graves y a menudo trágicos en el paciente infectado, sigue existiendo una fuerte necesidad de proporcionar nuevos procedimientos, usos y combinaciones farmacéuticos efectivos para tratar a los seres humanos infectados con el virus que tiene baja toxicidad para el huésped.

Además, el tratamiento de la hepatitis B crónica requiere la administración a largo plazo de análogos de nucleósidos para purificar los hepatocitos infectados, lo que estimula el desarrollo de cepas víricas resistentes al fármaco. Debido a la selección de los mutantes resistentes al fármaco, se necesitan nuevas estrategias de tratamiento para la hepatitis B crónica.

50 Por consiguiente, es otro objeto de la presente invención proporcionar composiciones y procedimientos para el tratamiento de pacientes humanos u otros huéspedes infectados con el virus de la hepatitis B.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar procedimientos y composiciones para tratar infecciones de cepas del virus de la hepatitis B resistentes a fármacos.

Sumario de la invención

55 La L-FMAU administrada en combinación y/o alternancia con la FTC y en combinación y/o alternancia con un interferón, tal como interferón alfa o interferón gamma proporciona una terapia superior contra el virus de la hepatitis

de en seres humanos. En una realización, el interferón se administra en forma de una proteína, generalmente de forma directa en la vena o arteria. En una realización alternativa de la invención, el interferón se administra en forma de un ácido nucleico, gen, o fragmento de gen del mismo que se expresa por el huésped. El ácido nucleico del interferón se puede suministrar al huésped "desnudo", es decir, sin un vector o, de forma alternativa, se puede suministrar a través de un vector, que incluye pero sin limitación un vector vírico que incluye un vector de adenovirus.

En una realización preferente, la β -L-FTC y la L-FMAU están libres en al menos un 90 % de sus enantiómeros β -D opuestos. En una realización más preferente, la β -L-FTC y la L-FMAU están libres de forma independiente en al menos un 95 %, 98 % o 99 % de sus enantiómeros β -D opuestos.

En una realización, el interferón es interferón alfa, opcionalmente, interferón alfa pegilado. En otra realización, el interferón alfa se selecciona entre el grupo que incluye, pero no se limita a: interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2b pegilado ROFERON®-A (interferón alfa-2a, Roche), PEGASYS® (interferón alfa-2a pegilado, Roche), INTRON® A (Interferón alfa-2b, Schering Corporation), PEG-INTRON® (Interferón alfa-2b pegilado, Schering Corporation), interferón de consenso, INFERGEN (interferón alfacon-1) de InterMune, OMNIFERON (interferón natural) de Viragen, ALBUFERON de Human Genome Sciences, Interferón Oral Alfa de Amarillo Biosciences, y SuperFeron (IFN-alfa multisubtipo humano natural, Genetrol, Inc.). En una realización alternativa, el interferón es interferón gamma. En aún otra realización, el interferón es interferón beta, interferón omega o interferón tau. En otra realización, el interferón se selecciona entre el grupo que incluye, pero no se limita a: REBIF (interferón beta-1a) de Ares-Serono, Interferón Omega de BioMedicine, interferón gamma-1b de InterMune, y HuFeron (IFN-beta humano, Genetrol, Inc.).

En una realización de la presente invención, el interferón se suministra en forma de una proteína. En una realización alternativa, el interferón se suministra en forma de un ácido nucleico, gen o fragmento de gen que expresa la proteína de inmunomodulador. En una realización particular de la presente invención, el interferón se suministra en forma de un ácido nucleico, gen o fragmento de gen del mismo bien "desnudo" o bien a través de un vector.

En general, durante la terapia de alternancia, se administra una dosificación eficaz de cada agente de forma seriada, mientras que en la terapia de combinación, se administran las dosificaciones eficaces de dos o más agentes en conjunto. Las dosificaciones dependerán de factores tales como la absorción, biodistribución, metabolismo y velocidad de excreción para cada fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la materia. Hay que señalar que los valores de la dosificación también podrán variar con la gravedad de la afección que se ha de aliviar. Adicionalmente, hay que comprender que para cualquier sujeto particular, los regímenes y programas de dosificación específicos se ajustarán a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y con el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Ejemplos de rangos de dosificación adecuados se pueden encontrar en la literatura científica y en los vademécum. Muchos ejemplos de rangos de dosificación adecuados para otros compuestos descritos en el presente documento también se encuentran en la literatura pública o se pueden identificar usando procedimientos conocidos. Estos rangos de dosificación se pueden modificar según se desee para lograr un resultado deseado.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una ilustración de un ejemplo no limitante de un vector adenovírico que comprende un interferón gamma de marmota adecuado para suministro. Se representan y definen las regiones de codificación.

La Figura 2 es una ilustración de un esquema no limitante de regímenes de tratamiento de 1-(2-fluoro-5-metil- β -L-arabinosil)uracilo (L-FMAU), y β -2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano (FTC), con y sin inyecciones de un vector de adenovirus para la expresión de interferón gamma de marmota (Ad IFN) o un vector de adenovirus para la expresión de Proteína Fluorescente Verde (Ad GFP), administrados a marmotas representativas.

La Figura 3 muestra cuatro gráficos que representan la cantidad de ADN vírico (copias/ml) del virus de la hepatitis B de marmota (WHV) frente al tiempo (días) antes y después de inyectar a las marmotas dosis diferentes (ufp) de un vector de adenovirus para la expresión de interferón gamma de marmota (Ad IFN). Las flechas indican el tiempo de la inoculación y el tiempo de la biopsia. En el eje Y izquierdo se muestra la cantidad de ADN vírico de cadena positiva, medido mediante el ensayo de la polimerasa endógena (EPA, dpm/ml) como se describe en el Ejemplo 3, representado frente al tiempo.

La Figura 4 muestra cinco gráficos que representan la cantidad de ADN vírico (copias/ml) del virus de la hepatitis B de marmota (WHV) frente al tiempo (días) antes y después de inyectar a las marmotas con 3×10^9 ufp del vector de adenovirus completo para la expresión de interferón gamma de marmota (Ad IFN GFP). Las flechas indican el tiempo de la inoculación y el tiempo de la biopsia. En el eje Y izquierdo se muestra la cantidad de ADN vírico de cadena positiva, medido mediante el ensayo de la polimerasa endógena (EPA, dpm/ml) como se describe en el Ejemplo 3, representado frente al tiempo. Los datos se describen con mayor detalle en el Ejemplo 5.

La Figura 5 consta de tres gráficos que representan la cantidad de ADN vírico (copias/ml) del virus de la hepatitis B de marmota (WHV) frente al tiempo (días) antes y después de inyectar a las marmotas con 3×10^9 ufp del vector de adenovirus para la expresión de Proteína Fluorescente Verde (Ad GFP) (los dos gráficos superiores) o control sin tratar (gráfico del fondo). Las flechas indican el tiempo de la inoculación y el tiempo de la biopsia. En el eje Y izquierdo se muestra la cantidad de ADN vírico de cadena positiva, medido mediante el ensayo de la polimerasa endógena (EPA, dpm/ml) como se describe en el Ejemplo 3, representado frente al tiempo. Los datos se describen con mayor detalle en el Ejemplo 5.

La Figura 6 es una copia de las transferencias de southern que analizan el ADN vírico encontrado en las biopsias hepáticas de marmotas infectadas con el virus de la hepatitis B de marmota (WHV), tomadas un mes antes del tratamiento (M-1) y 5 días después de la inyección (D5), de marmotas inyectadas con un vector de adenovirus completo para la expresión de interferón gamma de marmota (Ad IFN GFP), un vector de adenovirus para la expresión de Proteína Fluorescente Verde (Ad GFP), o no tratadas. Las transferencias del fondo son del ADN correspondiente al ADN de la forma vírica circular cerrado de forma covalente (CCC). Los números debajo de los gráficos expresan la relación de ADN en DS/M-1 en porcentaje.

La Figura 7 muestra los gráficos de concentración vírica (copias/ml) del virus de hepatitis B de marmota frente al tiempo (días) durante y después del tratamiento de los animales con 1-(2-fluoro-5-metil-β-L-arabinosil) uracilo (L-FMAU), y β-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano, Emtriva; emtricitabina (FTC), con y sin inyecciones de un vector de adenovirus para la expresión de interferón gamma de marmota (Ad IFN) como se describe en el Ejemplo 6. Los resultados se obtuvieron usando los ensayos de transferencia puntual descritos en el Ejemplo 3.

La Figura 8 muestra los gráficos de concentración vírica (copias/ml) del virus de hepatitis B de marmota frente al tiempo (días) durante y después del tratamiento de los animales con inyecciones de un vector de adenovirus para la expresión de interferón gamma de marmota (Ad IFN) o de un vector de adenovirus para la expresión de Proteína Fluorescente Verde (Ad GFP) como se describe en el Ejemplo 3. Las marmotas de control tratadas sólo con Ad IFN no mostraron ninguna variación significativa en la viremia.

La Figura 9 es un gráfico de concentración vírica (copias/ml) del virus de hepatitis B de marmota frente al tiempo (días) en un animal no tratado como se describe en el Ejemplo 6. Los resultados se obtuvieron usando los ensayos de transferencia puntual descritos en el Ejemplo 3.

La Figura 10 consta de tres gráficos de carga vírica (copias/ml) del virus de hepatitis B de marmota frente al tiempo (días) durante y después del tratamiento de los animales con 1-(2-fluoro-5-metil-β-L-arabinosil) uracilo (L-FMAU), y β-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano, Emtriva; emtricitabina (FTC), con o sin inyecciones de un vector de adenovirus para la expresión de interferón gamma de marmota (IFN) medido usando PCR en tiempo real como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 11 es una copia de las transferencias de southern que analizan el ADN vírico encontrado en las biopsias hepáticas de marmotas infectadas con el virus de la hepatitis B de marmota (WHV), tomadas justo antes de la terapia (TO), con un mes de tratamiento (M1) y con dos meses de tratamiento (M2), de marmotas tratadas con 1-(2-fluoro-5-metil-β-L-arabinosil) uracilo (L-FMAU), y β-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano, Emtriva; emtricitabina (FTC), un vector de adenovirus para la expresión de interferón gamma de marmota (Ad IFN), un vector de adenovirus para la expresión de Proteína Fluorescente Verde (Ad GFP), o sin ningún tratamiento. Las transferencias del fondo son del ADN correspondiente al ADN de la forma vírica circular cerrado de forma covalente (CCC). Los números debajo de los gráficos expresan la relación de ADN en D5/M-1 en porcentaje.

La Figura 12 son los gráficos que representan el porcentaje del ADN vírico del virus de la hepatitis B de marmota (WHV) y el ADN correspondiente al ADN de la forma vírica circular cerrado de forma covalente (CCC) en animales tratados con 1-(2-fluoro-5-metil-β-L-arabinosil) uracilo (L-FMAU), y β-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano, Emtriva; emtricitabina (FTC), o un vector de adenovirus para la expresión de interferón gamma de marmota (IFN), indicando la reducción del virus. M0 indica las muestras tomadas justo antes de la terapia, M1 indica las muestras tomadas con un mes de tratamiento, y M2 indica las muestras tomadas con dos meses de tratamiento.

La Figura 13 son los gráficos que representan el porcentaje del ADN vírico del virus de la hepatitis B de marmota (WHV) y el ADN correspondiente al ADN de la forma vírica circular cerrado de forma covalente (CCC) en animales tratados con 1-(2-fluoro-5-metil-β-L-arabinosil) uracilo (L-FMAU), y β-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano, Emtriva; emtricitabina (FTC), indicando la reducción del virus. T0 indica las muestras tomadas justo antes de la terapia, M1 indica las muestras tomadas con un mes de tratamiento, y M2 indica las muestras tomadas con dos meses de tratamiento.

La Figura 14 son los gráficos que representan el porcentaje del ADN vírico del virus de la hepatitis B de marmota (WHV) y el ADN correspondiente al ADN de la forma vírica circular cerrado de forma covalente

(CCC) en animales tratados con inyecciones de un vector de adenovirus completo para la expresión de interferón gamma de marmota (Ad IFN), un vector de adenovirus para la expresión de Proteína Fluorescente Verde (Ad GFP), o sin tratar. T0 indica las muestras tomadas justo antes de la terapia, M1 indica las muestras tomadas con un mes de tratamiento, y M2 indica las muestras tomadas con dos meses de tratamiento.

La Figura 15 son los gráficos que representan la cantidad de actividad inflamatoria (puntuación de Metavir) como se describe en el Ejemplo 2, después del tratamiento con 1-(2-fluoro-5-metil-β-L-arabinosil) uracilo (L-FMAU), y β-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano, Emtriva; emtricitabina (FTC), inyecciones de un vector de adenovirus para la expresión de interferón gamma de marmota (Ad IFN), un vector de adenovirus para la expresión de Proteína Fluorescente Verde (Ad GFP), o controles sin tratar.

Descripción detallada de la invención

La presente invención es como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

La L-FMAU administrada en combinación y/o alternancia con la FTC y en combinación y/o alternancia con un interferón, tal como interferón alfa o interferón gamma proporciona una terapia superior en seres humanos contra el virus de la hepatitis B. En una realización, el interferón se administra en forma de una proteína, generalmente de forma directa en la vena o la arteria. En una realización alternativa de la presente invención, el interferón se administra en forma de un ácido nucleico, gen o fragmento de gen del mismo que se expresa por el huésped. El ácido nucleico del interferón se puede suministrar "desnudo" o por medio de un vector, usando técnicas conocidas por aquellos habitualmente expertos en la materia.

En una realización preferente, la β-L-FTC y la L-FMAU están libres al menos en un 90 % de sus enantiómeros β-D opuestos. En una realización más preferente, la β-L-FTC y la L-FMAU están libres de forma independiente al menos en un 95 %, 98 % o 99 % de sus enantiómeros β-D opuestos.

En una realización preferente, el inmunomodulador es un interferón. En una realización, el interferón es interferón alfa, opcionalmente, interferón alfa pegilado. En otra realización, el interferón alfa se selecciona entre el grupo que incluye, pero no se limita a: interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2b pegilado, ROFERON®-A (interferón alfa-2a, Roche), PEGASUS® (interferón alfa-2a pegilado, Roche), INTRON® A (Interferón alfa-2b, Schering Corporation), PEG-INTRON® (Interferón alfa-2b pegilado, Schering Corporation), interferón de consenso, INFERGEN (interferón alfacon-1) de InterMune, OMNIFERON (interferón natural) de Viragen, ALBUFERON de Human Genome Sciences, Interferón Alfa Oral de Amarillo Biosciences, y SuperFeron (IFN-alfa multisubtipo humano natural, Genetrol, Inc.). En una realización alternativa, el interferón es interferón gamma. En aún otra realización, el interferón es interferón beta, interferón omega o interferón tau. En otra realización, el interferón alfa se selecciona entre el grupo que incluye, pero no se limita a: REBIF (interferón beta-1a) de Ares-Serono, Interferón Omega de BioMedicine, interferón gamma-1b de InterMune, y HuFeron (IFN-beta humano, Genetrol, Inc.).

En una realización de la presente invención, el interferón se suministra en forma de una proteína. En una realización alternativa, el interferón se suministra en forma de un ácido nucleico, gen o fragmento de gen que expresa la proteína. En una realización particular de la presente invención, el interferón se suministra en forma de un ácido nucleico, gen o fragmento de gen del mismo, y el suministro se consigue con un vector vírico o mediante suministro "desnudo".

En general, durante la terapia de alternancia, se suministra de forma seriada una dosificación eficaz de cada agente, mientras que en la terapia de combinación, se administran en conjunto las dosificaciones eficaces de dos o más agentes. Las dosificaciones dependerán de factores tales como la absorción, biodistribución, metabolismo y velocidad de excreción para cada fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la materia. Hay que señalar que los valores de la dosificación también podrán variar con la gravedad de la afección que se ha de aliviar. Adicionalmente, hay que comprender que para cualquier sujeto particular, los regímenes y programas de dosificación específicos se ajustarán a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y con el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Ejemplos de rangos de dosificación adecuados se pueden encontrar en la literatura científica y en los vademécum. Muchos ejemplos de rangos de dosificación adecuados para otros compuestos descritos en el presente documento también se encuentran en la literatura pública o se pueden identificar usando procedimientos conocidos. Estos rangos de dosificación se pueden modificar según se desee para lograr un resultado deseado.

I. Definiciones

El término "alquilo", como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, se refiere a un hidrocarburo primario, secundario o terciario saturado de cadena lineal, ramificado o cíclico generalmente de C₁ a C₁₀, e incluye de forma específica metilo, trifluorometilo, CCl₃, CFCl₂, CF₂Cl, etilo, CH₂CF₃, CF₂CF₃, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, y 2,3-dimetilbutilo. El término incluye los grupos alquilo tanto sustituidos como no sustituidos. Los radicales con los que se puede sustituir el grupo alquilo se seleccionan

entre el grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, bien no protegidos, o bien protegidos si fuera necesario, según se conoce por los expertos en la materia, por ejemplo, según se enseña en Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley y Sons, Second Edition, 1991, incorporado como referencia en el presente documento.

El término "alquilo inferior", como se usa en el presente documento, y a menos que se indique otra cosa, se refiere a un grupo alquilo C₁ a C₄ saturado de cadena lineal, ramificado o, si fuera apropiado, cíclico (por ejemplo, ciclopropilo), que incluye tanto las formas sustituidas como las no sustituidas. A menos que se indique de forma específica en el presente documento, cuando el alquilo es un radical adecuado, el alquilo inferior es preferente. De forma análoga, cuando el alquilo o el alquilo inferior es un radical adecuado, el alquilo o el alquilo inferior no sustituido es preferente.

El término "arilo", como se usa en el presente documento, y a menos que se indique otra cosa, se refiere a fenilo, bifenilo, o naftilo, y preferentemente a fenilo. El término incluye tanto los radicales sustituidos como los no sustituidos. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más radicales seleccionados entre el grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, bien no protegidos, o bien protegidos si fuera necesario, según se conoce por los expertos en la materia, por ejemplo, según se enseña en Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley y Sons, Second Edition, 1991.

El término "acilo" se refiere a un éster de ácido carboxílico en el que el radical no carbonílico del grupo éster se selecciona entre alquilo o alquilo inferior de cadena lineal, ramificado, o cíclico, alcoxilalquilo que incluye metoximetilo, aralquilo que incluye bencilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo, arilo que incluye fenilo opcionalmente sustituido con halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I), alquilo C₁ a C₄ o alcoxi C₁ a C₄, ésteres de sulfonato tales como alquil o aralquil sulfonilo que incluyen metanosulfonilo, los ésteres de mono, di o trifosfato, trilito o, monometoxitritilo, bencilo sustituido, trialquilsililo (por ejemplo, dimetil-t-butilsililo) o difenil-metilsililo. Los grupos arilo de los ésteres comprenden de forma óptima un grupo fenilo. El término "acilo inferior" se refiere a un grupo acilo en el que el radical no carbonílico es alquilo inferior.

El término "forma básicamente pura" se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva para describir un compuesto que incluye aproximadamente más de un 90 %, de forma alternativa al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o más de un único enantiómero de dicho compuesto. Cuando la presente memoria descriptiva se remite a un nucleósido de una configuración particular (D o L), se supone que el nucleósido se administra en una forma básicamente pura.

El término "inmunomodulador", como se usa en el presente documento, se refiere a una quimioquina o citoquina que regula de forma directa o indirecta una respuesta inmune. Los ejemplos no limitantes de inmunomoduladores incluyen citoquinas TH1, y en particular, interferón, interferón- α , interferón- α purificado, interferón- α 2a, interferón- α 2b, interferón- β , interferón- γ , interferón de consenso, interferón pegilado, interferón- α pegilado, factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos, interleuquina, interleuquina-2, e interleuquina-12. En una realización preferente, el inmunomodulador es interferón, e incluso más preferentemente interferones- γ .

El término "huésped", como se usa en el presente documento, se refiere a un organismo unicelular o multicelular en el que se puede replicar el virus, que incluye líneas celulares y animales, y preferentemente un ser humano. Como se expone en las reivindicaciones, la presente invención se preocupa del tratamiento o profilaxis del virus de la hepatitis B en seres humanos. De forma alternativa, el huésped puede ser portador de una parte del genoma vírico, cuya replicación o función se pueda alterar con los compuestos de la presente invención. El término huésped se refiere de forma específica a células infectadas, células transfectadas con todo o parte del genoma vírico y animales, en particular, primates (incluyendo chimpancés) y seres humanos. En la mayoría de las aplicaciones animales de la presente invención, el huésped es un paciente humano. Sin embargo, mediante la presente invención se constituye de forma clara una anterioridad con respecto a las aplicaciones veterinarias en determinadas indicaciones.

II. Sales y Profármacos Farmacéuticamente Aceptables

En aquellos casos en los que cualquiera de los compuestos, según se desvelan en el presente documento, son lo suficientemente básicos o ácidos para formar sales estables no tóxicas de ácidos o bases, puede ser apropiada la administración del compuesto en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, que incluyen, sales de sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden obtener usando procedimientos convencionales bien conocidos de la técnica, por ejemplo mediante la reacción de un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden hacer sales de ácidos carboxílicos de metales alcalinos (por ejemplo sodio, potasio o líquido) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo

calcio).

El término "profármacos farmacéuticamente aceptables" se refiere a un compuesto que se metaboliza, por ejemplo se hidroliza o se oxida, en el huésped para formar el compuesto de la presente invención. Ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que poseen grupos protectores biológicamente lábiles o un resto funcional del compuesto activo. La presente invención se refiere a profármacos específicos según se expone en las reivindicaciones. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las obtenidas a partir de ácidos y bases orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales adecuadas incluyen las que derivan de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre otros muchos ácidos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Los compuestos de la presente invención bien poseen actividad antivírica, o bien se metabolizan en un compuesto que exhibe dicha actividad.

Cualquiera de los nucleósidos descritos en el presente documento se pueden administrar en forma de un profármaco de nucleótido para aumentar la actividad, biodisponibilidad, estabilidad o alterar de cualquier manera las propiedades del nucleósido. Se conocen un determinado número de ligandos de profármacos de nucleótido. En general, la alquilación, la acilación u otra modificación lipofílica del grupo hidroxilo del compuesto o del mono, di o trifosfato del nucleósido aumentará la estabilidad del nucleótido. Ejemplos de grupos sustituyentes que pueden sustituir uno o más hidrógenos en el resto fosfato son alquilo, arilo, esteroides, carbohidratos, que incluyen azúcares, 1,2-diacilglicerol y alcoholes. La mayoría se describen en R. Jones y N. Bischofberger, *Antiviral Research*, 27 (1995) 1-17. Cualquiera de estos se puede usar junto con los nucleósidos desvelados para conseguir un efecto deseado.

Cualquiera de los compuestos que se describen en el presente documento para su uso en terapia de combinación y/o alternancia se pueden administrar en forma de un profármaco acilado, en el que el término acilo se refiere a un éster de un ácido carboxílico en el que el radical no carbonílico del grupo éster se selecciona entre un alquilo o alquilo inferior de cadena lineal, ramificado, o cíclico que incluye metoximetilo, aralquilo que incluye bencilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo, arilo que incluye fenilo opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C₁ a C₄ o alcoxi C₁ a C₄, ésteres de sulfonato tales como alquil o aralquil sulfonilo que incluyen metanosulfonilo, los ésteres de mono, di o trifosfato, trilito o monometoxitritilo, bencilo sustituido, trialquilsililo (por ejemplo, dimetil-t-butilsililo).

El nucleósido activo u otro compuesto que contenga hidroxilo se puede proporcionar en forma de un éter lipídico (y de forma particular un 5'-éter lipídico o un 5'-fosfoéter lipídico de un nucleósido), como se desvela en las siguientes referencias, que se incorporan como referencia en el presente documento: Kucera, L.S., N. Iyer, et al. *AIDS Res. Hum. Retro Viruses*. 6:491-501; Piantadosi, C., J. Marasco C.J., et al. *J. Med. Chem.* 34:1408.1414; Hosteller, K.Y., D.D. Richman, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2025.2029; Hostetler, K.Y., L.M. Stuhmiller, et al. *J. Biol. Chem.* 265:61127.

Los ejemplos no limitantes de patentes de los Estados Unidos de América que desvelan sustituyentes lipofílicos que se pueden incorporar de forma covalente en el nucleósido u otro compuesto que contenga hidroxilo o amina, preferentemente en la posición 5'-OH del nucleósido o las preparaciones lipofílicas, incluyen las Patentes de los Estados Unidos de América N° 5.149.794 (22 de septiembre de 1992, Yatvin et al.); 5.194.654 (16 de marzo de 1993, Hostetler et al.), 5.223.263 (29 de junio de 1993, Hostetler et al.); 5.256.641 (26 de octubre de 1993, Yatvin et al.); 5.411.947 (2 de mayo de 1995, Hostetler et al.); 5.463.092 (31 de octubre de 1995, Hostetler et al.); 5.543.389 (6 de agosto de 1996, Yatvin et al.); 5.543.390 (6 de agosto de 1996, Yatvin et al.); 5.543.391 (6 de agosto de 1996, Yatvin et al.); y 5.554.728 (10 de septiembre de 1996, Basava et al.), todas las cuales se incorporan como referencia en el presente documento. Las solicitudes de patentes extranjeras que desvelan sustituyentes lipofílicos que se pueden unir a los nucleósidos de la presente invención, o a las preparaciones lipofílicas, incluyen los documentos WO 89/02733, WO 90/00555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, EP 0 350 287, EP 93917054,4, y WO 91/19721.

Ejemplos no limitantes de profármacos nucleótidos se describen en las siguientes referencias: Ho, D.H.W. (1973) *Cancer Res.* 33, 2816-2820; Holy, A. (1993) *Isopolar phosphorous-modified nucleotide analogues*, En: De Clercq (Ed.), *Advances in Antiviral Drug Design*, Vol. I, JAI Press, pp. 179-231; Hong, C.I., Nechaev, A., y West, C.R. (1979a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 1223-1229; Hong, C.I., Nechaev, A., et al. (1980) *J. Med. Chem.* 28, 171-177; Hosteller, K.Y., Stuhmiller, L.M. et al. *J. Biol. Chem.* 265, 6112-6117; Hosteller, K.Y., Carson, D.A. y Richman, D.D. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 11714-11717; Hosteller, K.Y., Korba, B. et al. (1994a) *Antiviral Res.* 24, 59-67; Hosteller, K.Y., Richman, D.D., et al. (1994b) *Antimicrobial Agents Chemother.* 38, 2792-2797; Hunston, R.N., Jones, A.A. et al. (1984) *J. Med. Chem.* 27, 440-444; Ji, Y.H., et al. (1990); *J. Med. Chem.* 33 2264-2270; Jones, A.S., McGuigan, C., et al. (1984) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1471-1474; Juodka, B.A. y Smrt, J. (1974) *Coll. Czech. Chem. Commun.* 39, 363-968; Kataoka, S., Imai, J., et al. (1989) *Nucleic Acids Res. Sym. Ser.* 21, 1-2; Kataoka, S., Uchida, Heterocycles 32, 1351-1356; Kinchington, D., Harvey, J.J., et al. (1992) *Antiviral Chem. Chemother.* 3, 107-112; Kodama, K., Morozumi, M., et al. (1989) *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 679-685; Korty, M. y Engels, J. (1979) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310, 103-111; Kumar, A., Goe, P.L., et al. (1990) *J. Med. Chem.* 33, 2368-2375; LeBec, C., y Huynh-Dinh, T. (1991) *Tetrahedron Lett.* 32, 6553-6556; Lichtenstein, J., Barner, H.D. y Cohen, S.S. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 457-465; Luchty, J., Von Daeniken, A., et al. (1981) *Mitt. Geg. Lebensmittelunters. Hyg.* 72, 131-133 (*Chem. Abstr.* 95, 127093); McGigan, C. Tollerfield, S.M. y Riley, P.A. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 6065-6075; McGuigan, C., Devine, K.G., et al. (1990a) *Antiviral Chem. Chemother.* 1107-1113; McGuigan, C., O'Connor, et al. (1990b) *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 355-360; McGuigan, C., Nicholls, S.R., et al. (1990c) *Antiviral*

Chem. Chemother. 1, 25-33; McGuigan, C., Devin, K.G., et al. (1991) "Antiviral Res. 15, 255-263; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Balzarini, J. y DeClercq, E. (1993b) J. Med. Chem. 36, 1048-1052, Antiviral Chem. Chemother. 5, 271-277; Meyer, R. B., Jr., Shuman, D.A. y Robins, R.K. (1973) Tetrahedron Lett. 269-272; Nagyvary, J. Gohilo, R.N., Kirchner, C.R. y Stevens, J.D. (1973) BioChem. Biophys. Res. Commun. 55, 1072-1077; Namane, A. Gouyette, C., et al. (1992) J. Med Chem. 35, 3039-3044; Nargeot, J. Nerbonne, et al. (1983) Natl. Acad Sci. U.S.A. 80, 2395-2399; Nelson, K.A., Benrude, W.G. et al. (1987) J. Am. Chem. Soc. 109, 4058-4064; Nerbonne, J.M., Richard, S., Nargeot, J. y Lester, H.A. (1984) Nature 301, 74-76; Neumann, J.M., Herv, M., et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111, 4270-4277; Ohno, R., Tatsumi, N., et al. (1991) Oncology 48, 451-455. Palomino, E., Kessle, D. y Horwitz, J.P. (1989) J. Med. Chem. 32, 22-625; Perkins, R.M., Barney, S. et al. (1993) Antiviral Res. 20 (Suppl. I). 84; Piantadosi, C., Marasco, C.J., Jr., et al. (1991) J. Med. Chem. 34, 1408-1414; Pompon, A., Lefebvre, I., Imbach, J.L., Kahn, S. y Farquhar, D. (1994). Antiviral Chem Chemother. 5, 91-98; Postemark, T. (1974) Annu. Rev. Pharmacol. 14, 23-33; Prisbe, E.J., Martin, J.C.M., et al. (1986) J. Med. Chem. 29, 671-675; Pucch, F., Gosselin, G., et al. (1993) Antiviral Res. 22, 155-174; Pugaeva, V.P., Klochkeva, S.I., Mashbits, F.D. y Eizengart, R.S. (1969) Gig. Trf. Prof. Zabol. 14, 47-48 (Chem. 72, 212); Robins, R.K. (1984) Pharm. Res. 11-18; Rosowsky, A., Kim, S.H., Ross y J. Wick, M.M. (1982) J. Med. Chem. 25, 171-178; Ross, W. (1961) BioChem. Pharm. 8, 235-240; Ryu, E.K., Ross, R.J. Matsushita, T., et al. (1982). J. Med. Chem. 25, 1322-1329; Saffhill, R. y Hume, W.J. (1986) Chem. Biol. Interact. 57, 347-355; Saneyoshi, M., Morozumi, M., et al. (1980) Chem Pharm. Bull. 28, 2915-2923; Sastry, J.K., Nehete, P.N., et al. (1992) Mol. Pharmacol. 41, 441-445; Shaw, J.P., Jones, R.J. et al. (1994) "Oral bioavailability of PMEAs from PMEAs prodrugs in male Sprague-Dawley rats." 9th Annual AAPS Meeting. San Diego, CA (Abstract). Shuto, S., Ueda, S., Imamura, S., Fukukawa, K. Matsuda, A. y Ueda, T. (1987) Tetrahedron Lett. 28, 199-202; Shuto, S. Itoh, H., et al. (1988) Pharm. Bull. 36, 209-217. Un ejemplo de un grupo fosfato de profármaco útil es el grupo S-acil-2-tioetilo, también denominado "SATE".

III. Composiciones Farmacéuticas

Los seres humanos que sufren los efectos causados por el VHB o que se han expuesto al virus de la hepatitis B, se pueden tratar mediante la administración al paciente de una cantidad eficaz de L-FMAU y β -L-FTC, en combinación y/o alternancia con un interferón según se expone en las reivindicaciones. Los materiales activos se pueden administrar mediante una vía adecuada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, enteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea, tópica, nasal, rectal, en forma líquida o en forma sólida.

Los compuestos activos se incluyen en el vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para suministrar paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto para inhibir la replicación vírica *in vivo*, especialmente la replicación del VHB, sin causar efectos tóxicos graves en el paciente tratado. Por "cantidad inhibitoria" se quiere decir una cantidad de un ingrediente activo suficiente para ejercer un efecto inhibitorio que se mide mediante, por ejemplo, un ensayo tal como los que se describen en el presente documento.

Una dosis preferente del compuesto para todas las afecciones mencionadas anteriormente estará en el rango de aproximadamente 1 a 50 mg/kg, preferentemente de 1 a 20 mg/kg, de peso corporal por día, más generalmente de 0,1 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día. El rango de dosificación eficaz de los derivados farmacéuticamente aceptables se puede calcular en base al peso del nucleósido de partida que se va a suministrar. Si el derivado exhibe actividad por sí mismo, la dosificación eficaz se puede estimar como se indicó anteriormente usando el peso del derivado, o mediante otro medio conocido por los expertos en la materia.

Los compuestos se administran de forma conveniente en cualquier forma de dosificación unitaria adecuada, que incluyen pero no se limitan a una que contiene de 7 a 3000 mg, preferentemente de 70 a 1400 mg del compuesto activo por forma de dosificación unitaria. Una dosificación oral de 50 a 1000 mg es habitualmente conveniente.

De manera ideal, al menos uno de los ingredientes activos, aunque preferentemente la combinación de los ingredientes activos, se debería administrar para conseguir una concentración máxima en plasma del compuesto activo de aproximadamente 0,2 a 70 mM, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 10 mM. Esto se puede conseguir, por ejemplo, a través de una inyección intravenosa de una solución del 0,1 al 10 % del ingrediente activo, opcionalmente en solución salina, o administrado en forma de un bolo del ingrediente activo.

La concentración del compuesto activo en la composición del fármaco dependerá de la absorción, distribución, metabolismo y velocidades de excreción del fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la materia. Hay que señalar que los valores de la dosificación también podrán variar con la gravedad de la afección que se ha de aliviar. Adicionalmente, hay que comprender que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se ajustarán a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y con el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de concentración expuestos en el presente documento son solamente a modo de ejemplo y no se pretende que limiten el ámbito o la práctica de la composición reivindicada. El ingrediente activo se puede administrar de una sola vez, o se puede dividir en un determinado número de dosis más pequeñas que se administren en intervalos variables de tiempo.

Una forma preferente de administración de la FTC y la L-FMAU es oral. Las composiciones orales incluirán generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden introducir en cápsulas de gelatina o comprimir

en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporar excipientes y se puede usar en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Se pueden incluir agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición.

5 Los comprimidos, las píldoras, las cápsulas, los trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; una sustancia de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, o aroma de naranja. Cuando la forma de dosificación unitaria es
10 una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso. Además, las formas de dosificación unitarias pueden contener otros materiales diversos que modifiquen la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca, u otros agentes entéricos.

15 Los compuestos se pueden administrar como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, goma de mascar o similares. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa o un agente edulcorante y determinados conservantes, tintes y colorantes y aromas.

20 Los compuestos o sus derivados farmacéuticamente aceptables o las sales de los mismos se pueden mezclar con otros materiales activos que no perjudiquen la acción deseada o con materiales que suplementen la acción deseada, tales como antibióticos, antifúngicos, antiinflamatorios, inhibidores de proteasa, u otros agentes antivíricos nucleósidos o no nucleósidos, como se ha discutido con mayor detalle anteriormente. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijadores, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como el alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la presión
25 osmótica tales como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral se puede introducir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Si se administra en forma intravenosa, los vehículos preferentes son suero salino fisiológico o tampón fosfato salino (PBS).

30 Si se administran a través de un aerosol nasal o por inhalación, las presentes composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar en forma de soluciones en suero salino, empleando alcohol bencílico u otro conservante adecuado, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

35 Si se administran por vía rectal en forma de supositorios, las presentes composiciones se pueden preparar mediante la mezcla del fármaco con un excipiente no iniciante adecuado, tal como mantequilla de coco, ésteres de glicerina sintéticos o polietilenglicoles, que son sólidos a temperaturas ordinarias, pero que se licuan y/o disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.

40 En una realización, uno o más de los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del organismo, tales como una formulación de liberación controlada, que incluye los implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de vinilo y etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation.

45 También son preferentes como vehículos farmacéuticamente aceptables las suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos a las células infectadas con anticuerpos monoclonales de antígenos víricos). Estas se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos de América N° 4.522.811. Por ejemplo, se pueden preparar las formulaciones de liposomas mediante la disolución del lípido o lípidos adecuados (tales como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, araquidoil fosfatidil colina, y colesterol) en un disolvente inorgánico que se evapora a continuación,
50 dejando tras de sí una fina película de lípido seco en la superficie del recipiente. Se introduce a continuación en el recipiente una solución acuosa del compuesto activo o de sus derivados de monofosfato, difosfato, y/o trifosfato. A continuación se agita a mano el recipiente para liberar el material lipídico de las paredes del envase y para dispersar los agregados lipídicos, formando de esta manera la suspensión liposomal.

55 Las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden administrar en combinación y/o alternancia con uno u otros más antivíricos, anti-VIH, anti-VHB, anti-VHC o agentes anti-herpéticos o interferón, o agentes anticáncer, antiproliferativos o antibacterianos, incluyendo otros compuestos de la presente invención. Ciertos compuestos de acuerdo con la presente invención pueden resultar efectivos para potenciar la actividad biológica de

ciertos agentes de acuerdo con la presente invención mediante la reducción del metabolismo, catabolismo o desactivación de otros compuestos y como tales, se administran de forma conjunta para este efecto deseado.

En general, durante la terapia de alternancia, se administra de forma seriada una dosificación eficaz que cada agente, mientras que en la terapia de combinación se administran de forma conjunta dosificaciones eficaces de dos o más agentes. Las dosificaciones dependerán de factores tales como la absorción, biodistribución, metabolismo y velocidad de excreción para cada fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la materia. Hay que señalar que los valores de la dosificación también podrán variar con la gravedad de la afección que se ha de aliviar. Adicionalmente, hay que comprender que para cualquier sujeto particular, los regímenes y programas de dosificación específicos se ajustarán a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y con el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Ejemplos de rangos de dosificación adecuados se pueden encontrar en la literatura científica y en los vademécum. Muchos ejemplos de rangos de dosificación adecuados para otros compuestos descritos en el presente documento también se encuentran en la literatura pública o se pueden identificar usando procedimientos conocidos. Estos rangos de dosificación se pueden modificar según se desee para lograr un resultado deseado.

IV. Terapia Génica

Otro aspecto de la presente invención es el uso de procedimientos de terapia génica *in vivo* para suministrar interferón en combinación y/o alternancia con los dos o más agentes anti-VHB, para tratar el VHB. Los procedimientos de la terapia génica se refieren a la introducción de secuencias de ácidos nucleicos (ADN, ARN, y ADN o ARN antisentido) en un huésped, tal como un animal, y en particular un ser humano, para incrementar la expresión del inmunomodulador que se puede unir de forma operativa a un promotor y/o cualquier otro elemento genético necesario para su expresión en el tejido objetivo. Dichas terapias génicas y las técnicas y los procedimientos de suministro son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, los documentos de Patente Internacional WO 90/11092, WO 98/11779; las Patentes de los Estados Unidos de América N° 5.693.622, 5.705.151, 5.580.859; Tabata H. et al. (1997) Cardiovasc. Res. 35(3):470-479, Chao J et al. (1997) Pharmacol. Res. 35(6):517-522, Wolff J. A. (1997) Neuromuscul. Disord. 7(5):314-318, Schwartz B. et al. (1996) Gene Ther. 3(5):405-411, Tsurumi Y. et al. (1996) Circulation 94(12):3281-3290.

Los constructores polipeptídicos de vectores usados en los procedimientos de terapia génica son preferentemente constructores que no se integrarán en el genoma del huésped ni contendrán secuencias que permitan la replicación. Se puede usar cualquier promotor fuerte conocido por los expertos en la materia para conducir la expresión del ADN.

Los constructores polipeptídicos se pueden suministrar mediante cualquier procedimiento que suministre materiales inyectables a las células del animal, tal como la inyección en los espacios intersticiales de los tejidos (corazón, músculo, piel, pulmón, hígado, intestino y similares). Los constructores polipeptídicos se pueden suministrar en un líquido o un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable.

El constructor polipeptídico se pueden suministrar en el espacio intersticial de los tejidos de un animal, incluyendo el músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartilago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículo, ovario, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándulas y tejido conectivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende el fluido intracelular, la matriz de mucopolisacáridos entre las fibras reticulares de los tejidos orgánicos, las fibras elásticas en las paredes de los vasos o cámaras, las fibras de colágeno de los tejidos fibrosos, o esa misma matriz en el tejido conectivo que envuelve las células musculares o en las lagunas óseas. De forma similar es el espacio ocupado por el plasma de la circulación y el fluido linfático de los canales linfáticos. Se puede suministrar de forma conveniente mediante la inyección en los tejidos que comprenden estas células. Se suministran y se expresan preferentemente en células persistentes no divididas que están diferenciadas, aunque el suministro y la expresión se puede conseguir en células no diferenciadas o casi completamente diferenciadas, tales como, por ejemplo, las células madre sanguíneas o los fibroblastos de la piel.

En una realización adicional de la presente invención, se administran a un paciente *in vivo* las células que son manipuladas genéticamente para expresar el inmunomodulador. Dichas células se pueden obtener a partir de pacientes o de un donante con MHC compatible y pueden incluir, pero no se limitan a fibroblastos, células de la médula ósea, células sanguíneas (por ejemplo, linfocitos), adipocitos, células musculares, células endoteliales etc. Las células se manipulan genéticamente *in vitro* usando técnicas de ADN recombinante para introducir la secuencia codificante de los polipéptidos del inmunomodulador o, de forma alternativa, mediante transducción (usando vectores víricos, y preferentemente vectores que integren el transgén en el genoma de la célula) o procedimientos de transfección, que incluyen, pero no se limitan a, el uso de plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levadura (YAC), ADN desnudo, electroporación, liposomas, etc. La secuencia codificante del inmunomodulador se puede ubicar bajo el control de un promotor o un promotor/potenciador constitutivo o inducible fuerte para conseguir la expresión del inmunomodulador y preferentemente la secreción. Las células manipuladas que expresan y preferentemente secretan el inmunomodulador se pueden introducir en el paciente de forma sistémica, por ejemplo, en la circulación o de forma intraperitoneal.

De forma alternativa, las células se pueden incorporar a una matriz e implantarse en el cuerpo, por ejemplo, se pueden implantar células endoteliales manipuladas genéticamente como parte de un injerto linfático o vascular.

(Véase, por ejemplo, Anderson et al. Patentes de los Estados Unidos de América N° 5.399.349; y Mulligan & Wilson, Patentes de los Estados Unidos de América N° 5.460.959).

5 Cuando las células que se administran son células con MHC incompatible o no autólogas, se pueden administrar usando técnicas bien conocidas que previenen el desarrollo de una respuesta inmune del huésped contra las células introducidas. Por ejemplo, las células se pueden introducir en una forma encapsulada que, mientras permite un intercambio de componentes con el entorno extracelular inmediato, no permite que las células introducidas sean reconocidas por el sistema inmune del huésped.

10 Las células eucariotas que se pueden transducir con las partículas infecciosas víricas que contienen un ácido nucleico, gen, o fragmento de gen de las mismas para la expresión de un inmunomodulador incluyen, pero no se limitan a, células primarias, tales como células sanguíneas nucleadas primarias, tales como leucocitos, granulocitos, monocitos, macrófagos, linfocitos (incluyendo linfocitos T y linfocitos B), células madre totipotentes, y linfocitos infiltrados en el tumor (células TIL); células de la médula ósea; células endoteliales; células epiteliales; queratinocitos; células madre; hepatocitos, incluyendo células precursoras de hepatocitos; hepatocitos, incluyendo células precursoras de hepatocitos; fibroblastos; células mesenquimales; células mesoteliales; y células parenquimales.

En una realización, las células se pueden dirigir a un sitio específico, a través de lo cual las células funcionan de modo terapéutico en dicho sitio. De forma alternativa, las células pueden ser células que no son dirigidas a un sitio específico, y tales células funcionan de modo terapéutico sistémico.

20 Las células transducidas se pueden usar, por ejemplo, en el tratamiento del VHB, mediante la introducción en las células del huésped, tales como células sanguíneas que se han retirado del paciente y se han expandido en un cultivo, de partículas infecciosas víricas de acuerdo con la presente invención que contienen los genes que codifican un inmunomodulador. Las células se pueden aumentar en número antes o después de la transducción con las partículas infecciosas víricas que contienen los genes deseados. Por lo tanto, el procedimiento se realiza de tal manera que tras la inyección en el paciente, las células transformadas producirán un inmunomodulador en el organismo del paciente.

25 Los genes o ácidos nucleicos portados por las células transducidas comprenden de forma específica la secuencia para un interferón pero también pueden comprender cualquier secuencia que potencie directa o indirectamente los efectos terapéuticos de las células. El gen portado por las células transducidas también puede incluir secuencias que permitan a las células transducidas ejercer un efecto terapéutico que no tendrían de forma ordinaria, tal como la codificación génica de un factor de coagulación útil en el tratamiento de la hemofilia. El gen puede codificar uno o más productos que tengan efectos terapéuticos. Los genes o ácidos nucleicos adecuados codifican interferones (por ejemplo, alfa, beta y gamma interferones).

30 Es habitual, pero no necesario, suministrar el ácido nucleico a la célula usando un vehículo conocido como "vector". Los tipos más comunes de vectores usados en terapia génica son los virus. Los científicos usan los virus porque tienen la capacidad única de introducirse en el ADN de las células. Los virus usados como vectores en terapia génica están discapacitados genéticamente; no son capaces de reproducirse a sí mismos. La mayoría de los ensayos clínicos de terapia génica cuentan con un retrovirus de ratón para suministrar el gen deseado. Otros virus usados como vectores incluyen adenovirus, virus asociados a adenovirus, poxvirus y los virus del herpes.

40 Por ejemplo, las células se retiran del paciente y se hacen crecer en el laboratorio. Las células se exponen al virus que es portador del gen deseado. Los virus se introducen en las células, y el gen deseado pasa a formar parte del ADN de las células. Las células crecen en el laboratorio y a continuación se devuelven al paciente. Este tipo de terapia génica se denomina *ex vivo*, que significa "fuera del cuerpo". El gen se transfiere a las células del paciente mientras las células están fuera del cuerpo del paciente. En otros estudios, se usan vectores o liposomas (partículas grasas) para suministrar el gen deseado a las células en el cuerpo del paciente. Esta forma de terapia génica se denomina *in vivo*, porque el gen se transfiere a las células dentro del cuerpo del paciente.

45 Cuando se usan vectores víricos para portar genes dentro del cuerpo, estos se podrían alterar más que las células deseadas. Otro peligro es que el nuevo gen se podría insertar en la localización errónea del ADN, causando posiblemente cáncer u otros daños. Además, cuando se inyecta ADN de forma directa, o cuando se usa un sistema de suministro de liposomas, existe la posibilidad de que el ADN se pudiera introducir en células reproductoras, produciendo cambios heredables.

Otras preocupaciones incluyen la posibilidad de que los genes transferidos se pudieran "sobrexpresar", produciendo tanta cantidad de la proteína perdida que fuera perjudicial; que el vector vírico pudiera causar inflamación o una reacción inmune; y que el virus se pudiera transmitir del paciente a otros individuos o al entorno.

55 Existen numerosos vectores conocidos de la técnica. Cualquier vector conocido se puede usar en la presente invención. En una realización preferida de la presente invención, el vector puede dirigirse a un tipo de célula específico para un suministro de genes específico.

Vectores Adenovíricos

Se puede usar cualquiera de los vectores adenoviricos para transfectar células y/o líneas celulares para expresar y/o secretar un interferón. Los adenovirus son virus no encapsulados que contienen un genoma de ADN lineal de doble cadena. Mientras existen más de 40 serotipos de cepas de adenovirus, la mayoría de los cuales causan infecciones benignas en el tracto respiratorio en los seres humanos, se usan de forma predominante como vectores el subgrupo C serotipos 2 o 5. Normalmente el ciclo de vida no involucra la integración en el genoma del huésped, ya que se replican como elementos episomales en el núcleo de la célula huésped y consecuentemente no existe riesgo de mutagénesis por inserción. El genoma de tipo silvestre del adenovirus es de aproximadamente 35 kb de los cuales hasta 30 kb se pueden reemplazar con ADN extraño (Smith, 1995, Verma y Somia, 1997). Existen cuatro unidades transcripcionales tempranas (E1, E2, E3 y E4) que tienen funciones de regulación, y una de transcripción tardía, que codifica las proteínas estructurales. Los vectores progenitores tienen el gen E1 o el gen E3 inactivado, supliéndose el gen perdido en trans por un virus auxiliar, un plásmido o por integración en un genoma celular auxiliar (células fetales de riñón humanas, línea 293, Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. L. y Nairn, R. (1997). *General Virology* 36: 59-72.). Los vectores de segunda generación usan de forma adicional un mutante E2a sensible a la temperatura (Engelhardt, J. F., Litsky, L., y Wilson, J. M. (1994). *Human Gene Therapy* 5: 1217-1229) o una supresión en E4 (Armentano, D., Zabner, J., et al. (1997). *Journal of Virology* 71: 2408-2416.). La mayoría de los vectores recientes "sin entrañas" contienen solamente las repeticiones terminales invertidas (ITR) y una secuencia de empaquetamiento alrededor del transgén, proporcionándose todos los genes víricos necesarios en trans mediante un virus auxiliar (Chen, H., Mack, L. M., Kelly, R., et al. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94: 1645-1650.).

Los vectores adenoviricos son muy eficaces en la transducción de objetivos celulares *in vitro* e *in vivo*, se pueden producir en títulos elevados ($> 10^{11}$ /ml). Con la excepción de Geddes, B. J., Harding, T. C., Lightman, S. L. y Uney, J. B. (1997). *Nature Medicine* 3: 1402-1404.), que mostraron una expresión transgénica prolongada en cerebros de rata usando un vector de supresión E1, la expresión transgénica *in vivo* de vectores progenitores tiende a ser transitoria (Verma, I. M. y Somia, N. (1997). *Gene therapy - promises, problems and prospects. Nature* 389: 239-242.). A continuación de una inyección intravenosa, el 90 % de los vectores administrados se degrada en el hígado mediante un mecanismo mediado por un procedimiento no inmune (Worgall, S., Wolff, G., Falck-Pedersen, E. y Crystal R. G. (1997). *Human Gene Therapy* 8: 37-44.). A partir de entonces, ocurre una respuesta inmune restringida al MHC de clase I, usando linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ para eliminar las células infectadas del virus y células CD4+ para secretar interferón alfa que da como resultado un anticuerpo anti adenovirico (Yang, Y. y Wilson, J. M. (1995). *Journal of Immunology* 155: 2564-2569.). La alteración del vector adenovirico puede eliminar algunos epítomos de los linfocitos T citotóxicos, sin embargo los epítomos reconocidos difieren del haplotipo MHC del huésped (Sparer, T. E., Wynn, S. G., Clark et al. (1997). *Journal of Virology* 71: 2277-2284. Jooss, K., Ertl, H. C. J. y Wilson, J. M. (1998). *Journal of Virology* 72: 2945-2954.). Los vectores restantes, en aquellas células que no son destruidas, tienen su promotor desactivado (Armentano, D., Zabner, J., et al. (1997). *Journal of Virology* 71: 2408-2416.) y los anticuerpos persistentes previenen de administraciones posteriores del vector.

Las aproximaciones para evitar la respuesta inmune que involucran terapias inmunosupresoras transitorias han tenido éxito en la prolongación de la expresión transgénica y en la consecución de la transferencia génica secundaria (Jooss, K., Yang, Y. y Wilson, J. M. (1996). *Human Gene Therapy* 7: 1555-1566, Kay, M. A., Meuse, L., et al. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94: 4686-4691). Un procedimiento menos intervencionista ha consistido en inducir la tolerancia oral mediante la alimentación del vector desactivado UV del huésped (Kagami, H., Atkinson, J. C., et al. (1998). *Human Gene Therapy* 9: 305-313.). Sin embargo, es deseable manipular al vector antes que al huésped. Aunque sólo se usan vectores con deficiencia en la replicación, las proteínas víricas se expresan en una concentración muy baja las cuales se exponen al sistema inmune. El desarrollo de vectores que contienen un número menor de genes, que culmina en los vectores "sin entrañas" que no contienen ninguna secuencia vírica codificante, ha dado como resultado expresiones transgénicas prolongadas *in vivo* en el tejido hepático (Schiedner, G., Morral, N., et al. (1998). *Nature Genetics* 18: 180-183.). El suministro inicial de grandes cantidades de ADN empaquetado con proteínas de adenovirus, la mayoría de las cuales se degradarán y se expondrán al sistema inmune todavía puede causar problemas para los ensayos clínicos. Además la población humana es heterogénea con respecto al haplotipo MHC y una parte de la población ya se habrá expuesto a la cepa adenovirica (Gahry-Sdard, H., Molinier-Frenkel, V., et al. (1997). *Journal of Clinical Investigation* 100: 2218-2226.).

Hasta hace poco, el mecanismo mediante el cual los adenovirus se dirigían a la célula del huésped no se comprendía bien. Por consiguiente, la expresión tisular específica sólo era posible mediante el uso de promotores/potenciadores celulares como por ejemplo el promotor de cadena ligera 1 de miosina (Shi, Q., Wang, Y. y Worton, R. (1997). *Human Gene Therapy* 8: 403-410) y el promotor SM22a de células de músculo liso (Kim, S., Lin, H., et al. (1997). *Journal of Clinical Investigation* 100: 1006-1014), o mediante el suministro directo a un área local (Rome, J. J., Shayani, V., et al. (1994). *Human Gene Therapy* 5: 1249-1258). La captación de la partícula de adenovirus ha mostrado ser un procedimiento de dos etapas que involucra una interacción inicial de una proteína cubierta de fibra en el adenovirus con un receptor o receptores celulares, que incluyen la molécula MHC de clase I (Hong, S. S., Karayan, L., et al. (1997). *EMBO Journal* 16: 2294-2306.) y el receptor coxsackievirus-adenovirus (Bergelson, J. M., Cunningham J. A., et al. (1997). *Science* 275: 1320-1323.). La proteína de base pentona de la partícula de adenovirus se une a continuación a los heterodímeros de superficie celular de la familia de las integrinas (Wickham, T. J., Matias, P., et al. (1993). *Cell* 73: 309-319), lo que permite la internalización a través de la endocitosis mediada por receptor. La mayoría de las células expresan receptores primarios para la proteína de

adenovirus cubierta de fibra, sin embargo la internalización es más selectiva (Harris, J. D. y Lemoine, N. R. (1996). Trends in Genetics 12: 400-404.). Los procedimientos para incrementar la captación vírica incluyen la estimulación de las células objetivo para expresar una integrina apropiada (Davison, E., Diaz, R. M., et al. (1997). Journal of Virology 71: 6204-6207) y la conjugación del adenovirus a un anticuerpo con especificidad para el tipo de células objetivo (Wickham, T. J., Lee, G. M., et al. (1997b). Journal of Virology 71: 7663-7669, Goldman, C. K., Rogers, B. E., et al. (1997). Cancer Research 57: 1447-1451.). Sin embargo, el uso de anticuerpos aumenta las dificultades de producción del vector y el riesgo potencial de activación del sistema de complemento. Mediante la incorporación de motivos de unión del receptor en la proteína cubierta de fibra, Wickham et al. (Wickham, T. J., Tzeng, E., et al. (1997a). Journal of Virology 71: 8221-8229,) fueron capaces de redirigir el virus para unirse a las integrinas expresadas por células dañadas de músculo liso o endoteliales, o a los receptores heparin sulfato que se expresan por numerosos tipos de células.

Se pueden usar cualquiera de los vectores víricos asociados a adenovirus para transfectar células y/o líneas celulares para expresar y/o secretar un inmunomodulador. Los virus asociados a adenovirus (AAV) son parvovirus humanos no patogénicos, dependientes de un virus auxiliar, normalmente adenovirus, para proliferar. Son capaces de infectar tanto las células en división como las que no están en división, y en ausencia de un virus auxiliar se integran en un punto específico del genoma del huésped (19q 13-qter) con una alta frecuencia (Kotin, R. M., Siniscalco, M., et al. (1990). Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 87: 2211-2215.). El genoma de tipo salvaje es una molécula de ADN de cadena sencilla, que consta de dos genes; rep, codificante para proteínas que controlan la replicación vírica, la expresión génica estructural y la integración en el genoma del huésped, y cap, que codifica para las proteínas estructurales de la cápside. En la parte final de ambos genomas hay una repetición terminal (TR) de 145 bp, que contiene un promotor.

Cuando se usa como un vector, se sustituyen los genes rep y cap por el transgén y sus secuencias de regulación asociadas. La longitud total de la inserción no puede ser muy superior a 4,7 kb, la longitud del genoma de tipo salvaje (Smith, A. E. (1995). Annual Review of Microbiology 49: 807-838.). La producción del vector recombinante necesita que rep y cap se proporcionen en trans, junto con los productos génicos del virus auxiliar (E1a, E1b, E2a, E4 y VA ARN del genoma del adenovirus). El procedimiento convencional es cotransfectar dos plásmidos, uno para el vector y otro para rep y cap, en 293 células infectadas con adenovirus (Samulski, R. J., Chang, L., y Shenk, T. (1989). Journal of Virology 63: 3822-3828.). Este procedimiento, sin embargo, es incómodo, de bajo rendimiento (< 10⁴ partículas/ml) y propenso a la contaminación con adenovirus y virus asociados a adenovirus de tipo salvaje. Una de las razones para el bajo rendimiento es el efecto inhibitorio del producto génico rep en la replicación del adenovirus (Vincent, K. A., Piraino, S. T. y Wadsworth, S. C. (1997). Journal of Virology 71: 1897-1905.). Los protocolos más recientes eliminan todos los genes estructurales adenovíricos y usan plásmidos resistentes a rep (Xiao, X., Li, J. y Samulski, R. J. (1998) Journal of Virology 72: 2224-223.) o conjugan un plásmido de expresión de rep a los virus maduros antes de la infección (Fisher, K. J., Kelley, W. M, Burda, J. F. y Wilson, J. M. (1996) Human Gene Therapy 7: 2079-2087.).

En ausencia de rep, el vector del virus asociado a adenovirus sólo se integrará al azar, como un provirus único o concatámeros de cabeza a cola, una vez que las repeticiones terminales se han degradado ligeramente (Rutledge, E. A. y Russell, D. W. (1997). Journal of Virology 71: 8429-8436.). El interés en los vectores de virus asociado a adenovirus se ha debido a que su integración en el genoma del huésped permite una expresión transgénica prolongada. Se ha informado de la transferencia génica en células vasculares epiteliales (Maeda, Y., Ikeda, U., et al. (1997). Cardiovascular Research 35: 514-521.), células de músculo estriado (Fisher, K. J., Jooss, K., et al. (1997). Nature Medicine 3: 306-316, Herzog, R. W., et al. (1997). Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 94: 5804-5809.) y células hepáticas (Snyder, R. O., Miao, C. H., et al. (1997). Nature Genetics 16: 270-275.), con una expresión prolongada cuando el transgén no deriva de especies diferentes. Se puede detectar el anticuerpo de neutralización de la cápside del virus asociado a adenovirus, pero no impide la readministración del vector ni acaba con la actividad del promotor. Es posible que debido a la simplicidad de la cápside vírica se silencie de ese modo la respuesta inmune. Dado que los anticuerpos frente a los virus asociados a adenovirus estarán presentes en la población humana será necesaria investigación adicional. No ha habido ningún intento de tomar como objetivo otros tipos de células particulares que no sean por suministro de vector localizado.

En particular, se pueden usar los vectores asociados a adenovirus desvelados en la Patente de los Estados Unidos de América Nº 5.693.531, que se incorpora como referencia el presente documento, incluyendo AAVp5neo; pSV-p-Galactosidasa; TRF169; LZ11; pSP72; pSP72nLacZ; pAdRSV4; pAdRSVnLacZ; AAVnLac; SV40; pBluescriptSK; pSV40 ori AAV 1; y pKMT11.

Vectores Retrovíricos

Se pueden usar cualquiera de los vectores retrovíricos para transfectar células y/o líneas celulares para expresar y/o secretar un inmunomodulador. Los retrovirus son una clase de virus encapsulados que contienen una molécula de ARN de cadena sencilla como genoma. A continuación de la infección, el genoma vírico se transcribe de forma inversa en el ADN de doble cadena, que se integra en el genoma del huésped y se expresa como proteínas. El genoma vírico consta de aproximadamente 10 kb, conteniendo al menos tres genes: gag (codificante de las proteínas del núcleo), pol (codificante de la transcriptasa inversa) y env (codificante de la proteína de envuelta vírica). En cada final del genoma hay repeticiones terminales largas (LTR) que incluyen regiones y secuencias de

promotor/potenciador involucradas con la integración. Además hay secuencias necesarias para el empaquetamiento del ADN vírico (psi) y sitios para el empalme del ARN en el gen env. Algunos retrovirus contienen protooncogenes, que cuando mutan pueden causar cáncer, sin embargo, en la producción de los vectores éstos se retiran. Los retrovirus también pueden transformar células mediante su integración cerca de un protooncogén y conduciendo de forma inapropiada la expresión de la LTR, o mediante la interrupción de un gen supresor tumoral. Este evento, denominado mutagénesis insercional, aunque es extremadamente raro aún podría ocurrir cuando se usan los retrovirus como vectores.

Los vectores retrovéricos se basan con mayor frecuencia en el virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), que es un virus anfotrópico, capaz de infectar tanto las células de ratón, que permite el desarrollo del vector en modelos de ratón, como las células humanas, que permite el tratamiento humano. Los genes víricos (gag, pol y env) se sustituyen con transgenes de interés y se expresan en plásmidos en la línea celular empaquetada. Debido a que los genes no esenciales carecen de la secuencia de empaquetado (psi) no se incluyen en la partícula de virión. Para prevenir la recombinación que resulta de la replicación de retrovirus competentes, se deberían retirar todas las regiones homólogas con el esqueleto del vector y los genes no esenciales se deberían expresar en al menos dos unidades transcripcionales (Markowitz, D., Goff, S. y Bank, A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *Journal of Virology* 62: 1120-1124.). Aun así, la replicación de retrovirus competentes ocurre a baja frecuencia.

Las regiones esenciales incluyen las repeticiones terminales largas (LTR) 5' y 3', y la secuencia de empaquetado que descansa corriente abajo de la región terminal larga 5'. La expresión transgénica se puede conducir por la región de promotor/potenciador en la repetición terminal larga 5', o por promotores víricos alternativos (por ejemplo, citomegalovirus, virus del sarcoma de Rous) o por promotores celulares alternativos (por ejemplo, beta actina, tirosina). El análisis mutacional ha mostrado que se puede eliminar hasta la secuencia de codificación gag completa y la región inmediata corriente arriba sin surtir efecto en el empaquetado vírico o en la expresión transgénica (Kim, S. H., Yu, S. S., et al. (1998). *Journal of Virology* 72: 994-1004.). Para ayudar a la identificación de las células transformadas se pueden incluir marcadores genéticos, tales como neomicina y beta galactosidasa, y mejorar la expresión de los transgenes con la adición de sitios ribosomales internos (Saleh, M. (1997). *Human Gene Therapy* 8: 979-983.). La capacidad portadora disponible para los vectores retrovéricos es de aproximadamente 7,5 kb (Verma, I. M. y Somia, N. (1997). *Nature* 389: 239-242.), que es demasiado pequeña para algunos genes incluso si se usa el ADNc.

La envoltura retrovívica interacciona con una proteína celular específica para determinar el rango celular objetivo. La alteración del gen env o su producto ha demostrado tener éxito como medio de manipulación del rango celular. Las aproximaciones han incluido las modificaciones directas del sitio de unión entre la proteína de la envoltura y el receptor celular, aunque estas aproximaciones tienden a interferir con la internalización posterior de la partícula vírica (Harris, J. D. y Lemoine, N. R. (1996). *Trends in Genetics* 12: 400-404.). Mediante el reemplazo de una parte del gen env con 150 codones de la proteína eritropoyetina (EPO), Kasahara et al. (Kasahara, N., Dozy, A. M. y Kan, Y. W. (1994). *Science* 266: 1374-1376.) fueron capaces de seleccionar como objetivo células que contienen el receptor de eritropoyetina con una alta afinidad. El acoplamiento de un anticuerpo a la partícula vírica con afinidad por un segundo anticuerpo específico celular mediante un puente de estreptoavidina, mejora la captación vírica, pero la internalización tiende a conducir a la degradación vírica (Roux, P., Jeanteur, P., y Piechaczyk, M. (1989). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 9079-9083.). Neda et al (Neda, H., Wu, C. H., y Wu. G. Y. (1991) *The Journal of Biological Chemistry* 266: 14143-14146.) trataron partículas víricas con lactosa lo que dio como resultado la captación por las células, principalmente hepatocitos, expresando receptores de asialoglicoproteína. Posteriormente hubo una expresión transgénica vírica eficaz, posiblemente debida a la acidificación del endosoma que permite la fusión de la envoltura vírica con la membrana del endosoma.

Los virus difieren con respecto a sus tropismos, por lo tanto se puede extender el rango del huésped mediante el reemplazo del gen env con el de otros virus, en una técnica conocida como pseudotipaje. Se ha incluido la proteína G del virus de estomatitis vesicular en los vectores derivados del Mo-MLV (Burns, J. C., Matsubara, T., et al. (1994). *Developmental Biology* 165: 285-289.), que también son más estables cuando se purifican por ultracentrifugación. Recientemente, Qing (Qing, K., Bachelot, T., Mukherjee, P., et al. (1997). *Journal of Virology* 71: 5663-5667.) mejoró la transducción en numerosas líneas celulares mediante un tratamiento inicial de las células receptoras con un vector asociado a adenovirus (analizado anteriormente) expresando el receptor celular para la proteína de la envuelta retrovívica.

Un requisito para la integración retrovívica y la expresión de genes víricos es que las células objetivo se dividan. Esto limita la terapia génica a células proliferantes *in vivo* o *ex vivo*, en la que las células se retiran del cuerpo, se tratan para estimular la replicación y a continuación se transducen con el vector retrovívico, antes de ser devueltas al paciente. Se pueden translucir de forma más eficaz las células *ex vivo*, debido a la exposición a títulos de virus y factores de crecimiento más elevados (Glimm, H., Kiem, H. P., et al. (1997). *Human Gene Therapy* 8: 2079-2086.). Además las células tumorales tratadas *ex vivo* se asociarán con la masa tumoral y pueden tener efectos tumorocidas directos (Oldfield, E. H. y Ram, Z. (1995). *Human Gene Therapy* 6: 55-85.; Abdel- Wahab, Z., Weltz, C., et al. (1997). *Cancer* 80: 401-412.).

Los lentivirus son una subclase de retrovirus que son capaces de infectar tanto células proliferantes como no

proliferantes. Son considerablemente más complicados que los retrovirus simples, conteniendo seis proteínas adicionales, tat, rev, vpr, vpu, nef y vif. Las líneas celulares de empaquetamiento actuales tienen plásmidos separados para un pseudotipo del gen env, un constructor transgénico y un constructor de empaquetamiento que suministra los genes estructurales y regulatorios en trans (Naldini, L., Blmer, U., et al. (1996). *Science* 272: 263-267.). Los estudios recientes que usan genes marcadores han sido prometedores, mostrando una expresión prolongada *in vivo* en tejido muscular, hepático y neuronal (Blmer, U., Naldini, L., et al. (1997). *Journal of Virology* 71: 6641-6649.; Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, F. H. y Verma, I. M. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94: 10319-10323.; Kafri, T., Blmer, U., et al. (1997). *Nature Genetics* 17: 314-317). De forma interesante, los transgenes se conducen mediante un promotor de citomegalovirus modificado internamente, que a diferencia de los vectores MoMLV, no está inactivado. Esto se puede deber a que la respuesta inflamatoria limitada de la inyección del vector, tuvo la misma magnitud que la de control salino (Blmer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M. y Gage, F. H. (1997). *Journal of Virology* 71: 6641-6649).

Los vectores lentivíricos usados derivan del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y se está evaluando su seguridad, con vista a eliminar algunos de los genes regulatorios no esenciales. Los mutantes de vpr y vif son capaces de infectar neuronas con una eficacia reducida, pero no las células musculares o hepáticas (Blmer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M. y Gage, F. H. (1997). *Journal of Virology* 71: 6641-6649; Kafri, T., Blmer, U., et al. (1997). *Nature Genetics* 17: 314-317.).

En una realización particular, se usan los vectores retrovíricos pLXIN, pSIR, pLXSH, pLNCX, pLAPSN, pFB y pFB-Neo.

20 *Vectores Víricos del Herpes Simple*

Se pueden usar cualquiera de los vectores víricos del herpes simple para transfectar células y/o líneas celulares para expresar y/o secretar un inmunomodulador. El virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) es un virus humano neurotrópico, y en consecuencia ha existido un gran interés en el uso del HSV-1 como vector para la transferencia genética al sistema nervioso. El HSV-1 de tipo salvaje es capaz de infectar neuronas y avanzar con un ciclo de vida lítico o persistir en forma de un episoma intranuclear en estado latente. Las neuronas infectadas de forma latente funcionan normalmente y no son rechazadas por el sistema inmune. Aunque el virus latente es casi silente en cuanto a su transcripción, posee promotores neuronales específicos que son capaces de funcionar durante la latencia. Los anticuerpos frente al HSV-1 son comunes entre la población humana, sin embargo las complicaciones debidas a la infección por herpes, tales como encefalitis, son muy raras.

El genoma vírico es una molécula de ADN de doble cadena lineal de 152 kb. Existen dos regiones únicas, la larga y la corta (denominadas UL y US) que se unen en cualquier orientación mediante secuencias de repetición internas (IRL y IRS). En los extremos no enlazantes de las regiones únicas hay repeticiones terminales (TRL y TRS). Existen hasta 81 genes (Marconi, P., Krisky, D., et al. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11319-11320.), de los cuales aproximadamente la mitad no son esenciales para el crecimiento en cultivo celular. Una vez eliminados estos genes no esenciales, se pueden alojar 40-50 kb de ADN extraño en el virus (Glorioso, J. C., DeLuca, N. A. y Fink, D. J (1995). *Annual Review of Microbiology* 49: 675-710.). Se han identificado tres clases principales de genes del virus del herpes simple tipo 1, concretamente los genes inmediatamente tempranos (IE o alfa), los genes tempranos (E o beta) y los genes tardíos (L o gamma).

A continuación de la infección en las células susceptibles, la replicación lítica se regula mediante una secuencia temporalmente coordinada de transcripción génica. La Vmw65 (una proteína estructural tegumentaria) activa los genes inmediatamente tempranos (IP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP477) que son factores de transactivación que permiten la producción de genes tempranos. Los genes tempranos codifican genes para el metabolismo de nucleótidos y la replicación del ADN. Los genes tardíos se activan mediante los genes tempranos y codifican para proteínas estructurales. El ciclo completo dura menos de 10 horas y tiene como resultado de forma invariable la muerte celular.

Los eventos moleculares que conducen al restablecimiento de la latencia no se han determinado completamente. La expresión génica durante la latencia se conduce mediante los transcriptores asociados a la latencia (LAT) localizados en la región IRL del genoma. Se transcriben dos transcriptores asociados a la latencia (LAT) (2,0 y 1,5 kb) en la dirección opuesta al gen inmediatamente temprano ICP0. Los transcriptores asociados a la latencia (LAT) participan en la reactivación de la latencia del HSV-1 (Steiner, I., Spivack, J. G., et al. (1989). *EMBO Journal* 8: 505-511.) y en el establecimiento de la latencia (Sawtell, N. M. y Thompson, R. L. (1992). *Journal of Virology* 66: 2157-2169.). Se han identificado dos promotores activos de la latencia que conducen la expresión de los transcriptores asociados a latencia (LAT) (Marconi, P., Krisky, D., et al.. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11319-11320.) y pueden demostrar su utilidad para la expresión transgénica del vector.

Se han usado dos aproximaciones básicas para la producción de vectores del HSV-1, concretamente amplicones y virus recombinantes del herpes simple tipo 1. Los amplicones son plásmidos producidos por bacterias que contienen col E1 ori (un origen de replicación de la *Escherichia coli*), OriS (el origen de replicación del HSV-1), la secuencia de empaquetamiento del HSV-1, el transgén bajo control de un promotor inmediatamente temprano y un marcador genético (Federoff, H. J., Geschwind, M. D., Geller, A. I. y Kessler, J. A. (1992). *Proceedings of the National*

Academy of Sciences USA 89: 1636-1640.). El amplicón se transfecta en una línea celular que contiene un virus auxiliar (un mutante sensible a la temperatura) que proporciona todos los genes estructurales y regulatorios que faltan en trans. Se suministran al receptor tanto las partículas víricas auxiliares como las que contienen el amplicón. Los amplicones más recientes incluyen una secuencia derivada del virus de Epstein-Barr para el mantenimiento episomal del plásmido (Wang, S. y Vos, J. (1996). *Journal of Virology* 70: 8422-8430.).

Los virus recombinantes se hacen para que su replicación sea deficiente mediante la eliminación de uno de los genes inmediatamente tempranos como por ejemplo el ICP4, que se proporciona en trans. Aunque son menos patogénicos y pueden dirigir la expresión transgénica en tejido cerebral, son tóxicos para las neuronas en cultivo celular (Marconi, P., Krisky, D., et al. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11319-11320.). La supresión de un determinado número de genes inmediatamente tempranos reduce de forma considerable la citotoxicidad y también permite la expresión de los promotores que sería silenciada en los virus latentes de tipo salvaje. Estos promotores pueden ser útiles en la dirección de la expresión génica a largo plazo.

Los mutantes de replicación condicional sólo son capaces de replicarse en determinadas líneas celulares. Las líneas celulares que lo permiten son todas proliferantes y proporcionan un enzima celular para complementar la deficiencia vírica. Los mutantes incluyen timidina quinasa (Daring, M. J., Naegle, J. R., O'Malley, K. L. y Geller, A. I. (1994). *Science* 266: 1399-1403.), ribonucleasa reductasa (Kramm, C. M., Chase, M., et al. (1997). *Human Gene Therapy* 8: 2057-2068.), UTPasa, o el factor de neurovirulencia g34,5 (Kesari, S., Randazzo, B. P., et al. (1995). *Laboratory Investigation* 73: 636-648.).

Vectores No Víricos

Todos los vectores víricos inducen una respuesta inmunológica en algún grado y pueden tener riesgos de seguridad (tales como mutagénesis insercional o problemas de toxicidad). Además, su capacidad es limitada y puede ser difícil conseguir una producción a gran escala. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, se usan procedimientos no víricos de transferencia génica, que pueden necesitar solamente un pequeño número de proteínas, tienen una capacidad virtualmente infinita, no tienen ningún potencial infeccioso ni mutagénico y es posible la producción a gran escala usando técnicas farmacéuticas. Existen tres procedimientos de transferencia de ADN no vírico, a saber: ADN desnudo, liposomas y conjugados moleculares.

Ácidos Nucleicos Desnudos

El ADN o los ácidos nucleicos desnudos se pueden usar para suministrar el interferón al huésped. Se pueden suministrar por ejemplo en forma de un plásmido que se puede inyectar directamente en las células musculares (Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. y Felgner P. L. (1990). *Science* 247: 1465-1468.) o unido a partículas de oro que se bombardean en el tejido (Cheng, L., Ziegelhoffer, P. R. e Yang, N. S. (1993). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 90: 4455-4459.). Los términos ácido nucleico, ADN o ARN "desnudos" se refieren a secuencias que carecen de cualquier vehículo de suministro que actúe para asistir, promocionar o facilitar su entrada en la célula, incluyendo secuencias víricas, partículas víricas, formulaciones de liposomas, lipofectina o agentes precipitantes y similares. Aunque no muy eficaz, esto puede dar como resultado una expresión de bajo nivel prolongada *in vivo*. A diferencia de otras técnicas de terapia génica, una ventaja importante de introducir secuencias de ácido nucleico desnudo en las células diana es la naturaleza transitoria de la síntesis del inmunomodulador en las células. Los estudios han mostrado que se pueden introducir en las células secuencias de ADN no replicantes para proporcionar la producción del inmunomodulador deseado durante periodos de hasta seis meses. La simplicidad de este procedimiento, y la expresión sostenida ha conducido al desarrollo de las vacunas de ADN. Comparando con las vacunas atenuadas convencionales y las basadas en proteínas, no tiene ningún efecto la inmunidad preexistente como por ejemplo la debida a anticuerpos maternos, son relativamente baratas, y puede suministrar un determinado número de agentes patogénicos en un plásmido único (Manickan, E., Karem, K. L., y Rouse, B. T. (1997). *Critical Reviews en Immunology* 17: 139-154.). Se están desarrollando vacunas de ADN para aquellos patógenos para los que no existe vacuna como por ejemplo el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Lekutis, C., Shiver, J. W., Liu, M. A., y Letvin, L. N. (1997). *The Journal of Immunology* 158: 4471-4477.) o para los que la vacuna actual no es completamente efectiva como por ejemplo la gripe (Macklin, M. D., McCabe, D., et al. (1998). *Journal of Virology* 72: 1491-1496.). Mediante el uso de genes muy bien conservados, Ulmer et al. (Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., et al. (1993). *Science* 254: 1745-1749.) fueron capaces de inmunizar ratones frente a dos cepas serológicamente distintas del virus de la gripe. Sin embargo, en la mayoría de los casos las vacunas de ADN no han mostrado ser mejores que las vacunas existentes (Macklin, M. D., McCabe, D., et al. (1998). *Journal of Virology* 72: 1491-1496.). El tipo de respuesta inmune real se puede controlar mediante la cotransformación de un gen que codifica la citoquina apropiada (Xiang, Z. y Ertl, H. C. (1995). *Immunity* 2: 129-135.) y este procedimiento puede demostrar su utilidad a la hora de redireccionar respuestas inmunes inapropiadas (Manickan, E., Karem, K. L., y Rouse, B. T. (1997). *Critical Reviews en Immunology* 17: 139-154.). Otros usos para el ADN desnudo incluyen la inmunopotenciación del cáncer (analizado posteriormente, Corr. M., Tighe, H., Lee, D., Dudler, J., et al. (1997). *The Journal of Laboratory Investigation* 159: 4999-5004.), la restitución de la función de la insulina pancreática (Goldfine, I. D., German, M. S., Tseng, H., et al. (1997). *Nature Biotechnology* 15: 1378-1382.), y la estimulación del desarrollo de los vasos sanguíneos colaterales (Takeshita, S., Tsurumi, Y., et al. (1996). *Laboratory Investigation* 75: 487-501.). Se puede mejorar la expresión del producto genético en tejido muscular mediante la administración conjunta de colagenasa, papaverina y condiciones isquémicas (Budker, V., Zhang, G.,

Danko, I., Williams, P. y Wolff, J. (1998). *Gene Therapy* 5: 272-276.). El uso de un promotor muscular específico (Skarli, M., Kiri, A., et al. (1998). *Gene Therapy* 5: 514-520.) y otras secuencias regulatorias intragénicas, tales como la poli A y la secuencia de terminación de la transcripción (Hartikka, J., Sawdey, M., et al. (1996). *Human Gene Therapy* 7: 1205-1217.) también mejorarán la expresión transgénica.

- 5 Para la inyección del polipéptido desnudo, una cantidad de dosificación eficaz de ADN o ARN estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 g/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Preferentemente la dosificación será de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg y más preferentemente de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. Por supuesto, como podrá apreciar el experto en la materia, esta dosificación podrá variar de acuerdo con el lugar del tejido en que se efectúe la inyección. La dosificación efectiva y apropiada de secuencia de ácido nucleico se puede determinar fácilmente por aquellos habitualmente expertos en la materia y puede depender de la afección que se está tratando y la vía de administración. La vía de administración es por vía parenteral de inyección en el espacio intersticial de los tejidos, o se pueden indicar también otras vías parenterales, tales como la inhalación de una formulación de aerosol particularmente para el suministro a los pulmones o el tejido bronquial, garganta o membranas mucosas de la nariz. Además, los constructores polipeptídicos desnudos se pueden suministrar a las arterias durante una angioplastia a través del catéter usado en el procedimiento.

El interferón también se puede suministrar en formulaciones de liposomas (tales como aquellas que se muestran en Felgner P. L. et al. (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 772:126-139 y Abdallah B. et al. (1995) *Biol. Cell* 85(1):1-7) que se pueden preparar por procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Los liposomas son bicapas de lípidos que atrapan una fracción de fluido acuoso. El ADN se asociará de forma espontánea a la superficie externa de los liposomas catiónicos (en virtud de su carga) y estos liposomas interaccionarán con la membrana celular (Felgner, J. H., Kumar, R., et al. (1994). *Journal of Biological Chemistry* 269: 2550-2561.). Se pueden transfectar *in vitro* hasta un 90 % de determinadas líneas celulares. Mediante la inclusión de una pequeña cantidad de un lípido aniónico a un liposoma de otra manera catiónico, se puede incorporar el ADN en la superficie interna del liposoma, protegiéndolo de esta manera de la degradación enzimática (Crespo et al, 1996, citado en Alio, S. F. (1997). *Biochemical Pharmacology* 54: 9-13.). Para facilitar la captación en la célula como endosomas, se han incluido proteínas diana en los liposomas, por ejemplo anticuerpos anti-MHC (Wang, C., y Huang, L. (1987). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 7851-7855.) transferrina (Stavridis, J. C., Deliconstantinos, G., et al. (1986). *Experimental Cell Research* 164: 568-572.), y los virus Sendai o su proteína F (Dzau, J. V., Mann, M. J., Morishita, R. y Kaneda, Y. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11421-11425.). Los virus Sendai permiten de forma adicional que el plásmido de ADN escape del endosoma en el citoplasma, evitando de esta manera su degradación. La inclusión de una proteína de unión al ADN (proteína de grupo 1 de alta movilidad de 28 kDa) mejora la transcripción mediante la introducción del plásmido en el núcleo (Dzau et al, 1997 *Am J Cardiol.* 1997 Nov 6; 80 (9A):331-391).

35 La conjugación molecular consiste en proteínas o ligandos sintéticos a los que se ha unido un agente aglutinante del ADN. Se puede mejorar el suministro a la célula mediante el uso de técnicas similares a las de los liposomas. Las proteínas objetivo incluyen asialoglicoproteína (Wagner, E., Cotten, M., Foisner, R. y Birnstiel, M. L. (1991). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 4255-4259.), transferrina (Wu, C. H., Wilson, J. M. y Wu., G. Y. (1989). *Journal of Biological Chemistry.* 264: 16985-16987.), IgA polimérica (Ferkol, T., Kaetzel, C. S. y Davis, P. B. (1993). *Journal of Clinical Investigation* 92: 2394-2400.) y adenovirus (Madon, J. y Blum, H. E. (1996). *Hepatology* 24: 474-481.). La expresión transgénica tiende a ser transitoria y se limita por la degradación endosomal/lisosomal.

A continuación se proporcionan ejemplos ilustrativos de la presente invención.

Ejemplos

45 Las abreviaturas como se usan en el presente documento se refieren a las siguientes:

Ad IFN Vector de adenovirus que expresa el interferón gamma de marmota

Ad RFP Vector de adenovirus sin gen de interferón gamma de marmota

ADN CCC Forma de ADN vírico circular cerrada de forma covalente

ADN Acido desoxirribonucleico

50 FTC 5-fluoro-1-(2R,5S)-1,3-oxatiolan-5-il]citosina

GFP Proteína fluorescente verde

VHB Virus de la hepatitis B

IFN Interferón

L-FMAU 1-(2-fluoro-5-metil-β,L-arabinofuranosil)timina

M1, M2	Mes 1 ó 2, respectivamente, después del inicio del tratamiento
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ufp	Unidad formadora de placas
5	RFP Proteína fluorescente roja
	RI Productos intermedios de replicación
	RT Transcripción inversa
	TUNEL Ensayo de marcado del extremo libre de dUTP mediado por deoxinucleotidiltransferasa (TdT) terminal
	WHV Virus de la Hepatitis B de Marmota

10 **Ejemplo 1**

Administración de L-FMAU y β -L-FTC

En general, se administró β -L-FTC siguiendo un protocolo descrito previamente por Cullen et al. (Cullen et al. Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41, 2076-2082). De forma específica, se inyectó β -L-FTC por vía intraperitoneal 30 mg/kg.

- 15 En experimentos que usan L-FMAU, el compuesto se administró por vía intraperitoneal con una concentración descrita por Peek et al. (Peek et al. Hepatology 2001, 33, 254-66) y Zhu et al. (Zhu et al. J. Virol. 2001, 75, 311-22) (10 mg/kg).

Animales

- 20 El modelo de infección del virus de la hepatitis B de marmota representa un modelo útil para la evaluación de antiviricos debido a que mimetiza la historia de la infección vírica observada en seres humanos con hepatitis B crónica. Varios estudios han mostrado que este modelo animal es fiable para su uso en el estudio de nuevos análogos de nucleósido, de forma particular en términos de eficacia antivírica y toxicidad.

- 25 Se usaron para los experimentos *in vivo* doce marmotas canadienses (*Marmotta monax*) nacidas en cautividad de aproximadamente un año de edad infectadas con el WHV de forma crónica. Se realizaron los protocolos de tratamiento desde julio hasta diciembre de 2000.

Cuando se inyectaron los adenovirus, se tomaron muestras de sangre diariamente durante los 10 días posteriores a la inyección del adenovirus y dos veces a la semana a partir de entonces. Estas muestras se evaluaron adicionalmente para marcadores víricos como se describe posteriormente.

Sistema de suministro del gen de interferón (Dr. Nassal, Friburgo, Alemania)

- 30 El vector de adenovirus se obtuvo de acuerdo con los procedimientos descritos por He et al. (He, T. C., et al. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1998, 95, 2509-14). Los vectores de adenovirus poseían una replicación defectuosa debido a supresiones en las regiones E1 y E3. Se insertó en la región E1 original (454-3500) un casete recombinante con un casete codificante para el gen pre-IFN gamma (aa 1-143) bajo el control de un promotor de CMV asociado con el gen indicador eCFP bajo el control del promotor SV40 (**Figura 1**). Se evaluó la eficacia de la producción de IFN gamma activa en la marmota mediante la protección de la línea celular de marmota WCH17 de la infección por el VSV.

Se usó como control el mismo adenovector que contenía solamente el casete pSV40-eCFP. Los vectores adenovíricos se administran mediante inyección intravenosa para seleccionar como objetivo el hígado. Los vectores se administraron en concentraciones de 3×10^7 a 3×10^{11} ufp/animal, diluidos en tampón fosfato salino (PBS).

40 **Ejemplo 2**

Evaluación de L-FMAU + β -L-FTC + Ad IFN

Se compraron dieciocho marmotas canadienses (*Marmota monax*), infectadas de forma experimental con WHV a Northeastern Wildlife (South Plymouth, N.Y.). Las marmotas se infectaron de forma crónica y se usaron para experimentos *in vivo*.

- 45 Se administró en forma intraperitoneal tanto la β -L-FTC (30 mg/kg) como la L-FMAU (10 mg/kg). Se administraron inyecciones diarias durante la primera semana, seguido de inyecciones en días alternos durante las siguientes siete semanas.

Se insertó en la región E1 original del vector adenovírico (Ad IFN) un nuevo casete recombinante del gen del interferón gamma (IFN) de marmota bajo el control de un promotor de CMV, que se asoció con un gen indicador eRFPnuc bajo el control de un promotor SV40. Se usó como control (AdGFP) el mismo vector de adenovirus que contenía sólo eGFPnuc controlado por pSV40 (suministrado por Dr. Michael Nassal, University of Freiburg, Alemania).

Para estos experimentos, las inyecciones intravenosas del vector adenovírico recombinante que expresa el interferón gamma de marmota se administraron dos veces (en la semana 4 y en la semana 8) con 3×10^{10} ufp por animal. La inoculación vírica se validó en un estudio previo presentado en el Congreso de VHB celebrado en Amherst, MA, USA, agosto de 2001 (véase la **Figura 2**).

Durante la terapia, se tomaron muestras de sangre cada dos días, y a diario durante los cinco días posteriores a cada inyección del Ad IFN. Después de retirar el fármaco, se tomaron las muestras de sangre cada dos días hasta que la carga vírica comenzó a aumentar, después una vez a la semana y a continuación dos veces al mes.

Ejemplo 3

Biopsia hepática

Las biopsias hepáticas quirúrgicas se realizaron después de una laparotomía con anestesia general anterior a la terapia (TO), dos veces durante el tratamiento (M1, M2) y cuatro meses después de la retirada del fármaco (M3). Las biopsias bajo tratamiento se realizaron cuatro días después de cada inyección de adenovirus. Una parte de cada muestra se almacenó a -80 °C para el análisis de ADN vírico. Otra parte se fijó en formalina y se embebió en parafina para la histología e inmunotinción hepáticas. La última parte se fijó en tetraóxido de osmio al 1 % para su estudio por microscopía electrónica (TO y M2). También se realizó un examen macroscópico del hígado durante la cirugía.

Análisis de la síntesis intrahepática de ADN vírico

Se extrajo el ADN vírico intrahepático de las marmotas infectadas al mismo tiempo que la biopsia hepática. Después de la homogeneización en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 10 mM, las muestras de hígado se dividieron en dos partes, una para el aislamiento del ADN vírico total (después de la digestión con proteinasa K, la extracción con fenol-cloroformo seguido de la precipitación en etanol) y la otra para el aislamiento de el ADN vírico circular cerrado de forma covalente (CCC) de unión no proteica (después de la precipitación con SDS-KCl del ADN unido a proteína, la extracción con fenol-cloroformo seguido de la precipitación en etanol). Para normalizar la cantidad de ADN en cada muestra usada para el análisis de transferencia de Southern, se determinó la concentración de ADN mediante un análisis densitométrico UV y se comparó con el ADN cuantificado de forma previa después de electroforesis en gel de agarosa. A continuación se sometieron 5 µg de los ácidos nucleicos correspondientes a las preparaciones de ADN total o ADN CCC a electroforesis en geles de agarosa al 1,2 %, transferencia alcalina mediante transferencia en una membrana de nailon, y se detectó el ADN vírico mediante una hibridación específica como se ha descrito anteriormente.

Análisis de la histología hepática

Se tiñeron las secciones de tejido de biopsia hepática fijadas en formalina con tinte hematoxilina-eosina-safran (HES) y se examinaron con un microscopio óptico. Se evaluó de forma semicuantitativa el grado de necrosis de los hepatocitos (cuerpos acidófilos), el nivel de inflamación del tracto portal y el espacio intralobular, y el estadio de la fibrosis mediante el uso de la puntuación de Metavir (Hepatology. 1994;20(1 Pt 1):15-20). También se evaluaron las secciones de biopsia hepática para esteatosis, proliferación ductal, displasia de hepatocitos y carcinoma hepatocelular.

El examen de la histología hepática reveló signos de exacerbación aguda de hepatitis que eran comparables en los dos grupos de animales que recibieron el vector Ad IFN o Ad GFP mientras que se observó una actividad inflamatoria leve en los animales no tratados.

Los estudios de inmunotinción realizados en las secciones de biopsia hepática obtenidos antes de la inyección y en el D5 posterior a la inyección con un anticuerpo policlonal anti WHV, mostraron un descenso significativo del número de hepatocitos infectados en las marmotas A37 y A36.

Ejemplo 4

Análisis de la viremia

Ensayo de Transferencia Puntual

Se evaluó la viremia mediante la detección cuantitativa del ADN del virus de la hepatitis B de marmota (WHV). El ADN de WHV se extrajo del suero usando un kit de extracción de ADN de matriz de PCR HighPure (Roche diagnostics), y se colocaron en membranas (Biodyne B, 0,45 µM, Merck Eurolab) 50 µl de suero de las muestras correspondientes con diluciones seriadas de un estándar de ADN de WHV. Después del procedimiento de fijación,

los filtros se hibridaron con una sonda de ADN de WHV marcada completamente con ^{32}P . Se realizó un análisis comparativo de las exploraciones de fosfoimager (Amersham Pharmacia Biotech) con el software ImageQuant. El límite de detección del ensayo fue de 6×10^7 copias/ml (200 pg/ml).

Ensayo de la Polimerasa Endógena (EPA)

- 5 El efecto del Ad IFN en la síntesis del ADN vírico de cadena positiva se determinó usando partículas de WHV en un ensayo de polimerasa endógena (EPA). A efectos de comparación, se usó como control ácido fosfonofórmico (PFA), un inhibidor de la ADN polimerasa dependiente de ADN. La actividad de la polimerasa endógena corresponde a la finalización de ADN vírico de cadena positiva en partículas maduras que contienen ADN circular relajado. Se ensayó la actividad de la ADN polimerasa asociada al WHV mediante la mezcla de 50 μl de partículas víricas parcialmente purificadas con 25 μl de tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, MgCl_2 40 mM, NH_4Cl 60 mM, NP40 al 0,5 %, p-mercaptoetanol 10 mM) conteniendo: (i) dATP, dCTP, dGTP (100 μl de cada uno) y ^3H -dTTP (0,17 μM). Los ensayos enzimáticos se realizaron según se describe por Hantz et al. (Hantz O, et al. 1992 Virology. Sep;190(1):193-200). En resumen, se incubaron las reacciones enzimáticas a 37 °C durante tres horas y se colocaron en filtros de fibra de vidrio GF/C (Whatman), y se lavaron de forma extensiva con ácido tricloroacético al 5 %. Se midió la incorporación de ^3H -dTTP en un contador de centelleo Beckman LS 6000SC. El límite de detección de este ensayo fue de 1000 cpm/ml.

Ensayo de PCR en tiempo real (Light Cycler)

- 20 En los casos en los que los títulos víricos fueron demasiado bajos para ser detectados fácilmente mediante la hibridación de Transferencia Puntual, se usaron las técnicas de PCR en tiempo real (véase por ejemplo Dandri et al. Hepatology 2000, 32, 139-46). Se ha conocido que la PCR en tiempo real detecta como mínimo 10 copias de ADN de VHB humano. Por consiguiente, para completar el análisis de la viremia, se usó la PCR en tiempo real para detectar ADN de WHV con una concentración inferior a 6×10^7 copias/ml (200 pg/ml). Se usó el mismo estándar de ADN de WHV tanto para el ensayo de transferencia puntual como para el ensayo de PCR en tiempo real. Los ensayos de PCR en muestras positivas de transferencia puntual proporcionaron resultados cuantitativos similares. El límite inferior de detección de este procedimiento fue de 25 copias/ μL de WHV.

Los resultados preliminares de las cinéticas de aclaramiento y rebote vírico en tres marmotas, analizados mediante PCR en tiempo real, se presentan en la **Figura 10**. Se muestra el título vírico para alcanzar un valor inferior de 0,320 pg/ml, que representa una media de 9×10^4 copias/ml. Esta técnica también se pudo aplicar en muestras animales adicionales para determinar la eficacia de la β -L-FTC sola o junto con inmunomoduladores, tales como Ad IFN.

30 **Ejemplo 5**

Determinación del título de inóculo

Para determinar la eficacia y tolerancia antivírica del inóculo del vector adenovírico, se administró a cuatro animales una inyección intravenosa de Ad-IFN en concentraciones de 3×10^7 (A33), 3×10^9 (A30) y 3×10^{11} ufp (A32 y A34).

- 35 El título de inóculo más elevado (3×10^{11} ufp) induce un marcado descenso de la carga vírica, sin embargo los dos animales murieron en los días 2 y 5 posteriores a la inyección (el ADN de WHV disminuyó entre el D0 y el día de la muerte desde 147 ng/ml hasta 70 ng/ml y desde 1067 ng/ml hasta 265 ng/ml respectivamente). El inóculo de 3×10^9 ufp indujo una disminución transitoria desde 70 ng/ml hasta aproximadamente 30 ng/ml durante seis días. El inóculo más bajo no indujo ninguna disminución significativa de la viremia (**Figura 3**).

Ejemplo 6

40 *Estudio de eficacia: evaluación del efecto antivírico del vector de Ad IFN*

Cinco marmotas (A35, A36, A37, A38, A42) recibieron 3×10^9 ufp del vector de Ad IFN completo. Un grupo de control consistente en dos marmotas (A39, A40) recibió 3×10^9 ufp del vector Ad GFP, y una marmota (A41) no se trató (**Figuras 4 y 5**).

- 45 En el grupo tratado con Ad IFN, se observa una disminución transitoria del ADN de WHV en tres de los cinco animales tratados (A35 desde 46 ng/ml hasta 20 ng/ml; A37 desde 76 hasta 20 ng/ml y A42 desde 20 hasta 5 ng/ml) después de la inoculación del adenovirus. Se evaluaron también los resultados de ADN de WHV mediante EPA (**Figuras 4 y 5**). La hibridación por transferencia de Southern de ADN de WHV intrahepático mostró una disminución marcada del ADN vírico (desde un 16 hasta un 76 %, excepto en A42) así como de los niveles de ADN CCC (desde un 2 hasta un 76 %) (**Figura 6**).

50 **Ejemplo 7**

Evaluación de L-FMAU y β -L-FTC.

Los resultados mostraron una inhibición significativa de la viremia que se redujo aproximadamente entre 4 y 5 unidades logarítmicas, por debajo del límite de detección del ensayo de transferencia puntual (6×10^7 copias/ml) en

todos los animales tratados con β -L-FTC, L-FMAU, y Ad IFN (**Figura 7**). Sin embargo, los controles (sin tratar, Ad GFP) o las marmotas tratadas solamente con Ad IFN no mostraron ninguna variación significativa en la viremia (**Figuras 8 y 9**).

5 La reducción de la carga vírica inducida por el tratamiento fue extraordinariamente rápida. La viremia disminuyó hasta niveles indetectables ($< 6.10^7$ /ml) en menos de una o dos semanas después del comienzo de la terapia.

10 La viremia en animales tratados con β -L-FTC, L-FMAU, y Ad IFN permaneció contenida durante diversos períodos de tiempo después de la retirada del tratamiento. Además, la carga vírica en los animales tratados no volvió a los niveles anteriores al tratamiento. El nivel de viremia de dos marmotas (A52 y A49) tratadas con L-FMAU, β -L-FTC, y Ad IFN todavía se mantuvo por debajo del nivel de detección en la semana 28 (seis meses después de la retirada del fármaco).

15 Los resultados de la terapia de combinación con un inmunomodulador mostraron un descenso rápido y significativo del nivel de la viremia (disminución media de 5 \log_{10} en dos semanas). Esta disminución es significativa comparada con los resultados obtenidos con β -L-FTC y L-FMAU solos. En estudios anteriores, los títulos víricos en suero disminuyeron aproximadamente entre 56 y 1000 veces respectivamente en el mismo marco de tiempo. Esta observación indica que la actividad antivírica de β -L-FTC y L-FMAU mejoró cuando se combinaron con un inmunomodulador. Además, el efecto antivírico se prolongó en el tiempo con un rebote vírico retrasado. La viremia se mantuvo indetectable en el ensayo de transferencia puntual ($< 6.10^7$ copias/ml) en muestras de suero de dos animales (A49 y A52) de seis a siete meses después de la retirada del fármaco. Este efecto prolongado es consistente con la disminución en los niveles de ADN CCC (-69 % y -75 % respectivamente). El retraso en el rebote de la replicación vírica tras el cese de la terapia puede reflejar el tiempo necesario para restablecer las agrupaciones de ADN CCC a través de la reinfección de nuevos hepatocitos y/o reamplificación de las agrupaciones intracelulares existentes de ADN CCC en células infectadas.

ADN CCC intrahepático

25 Los análisis por transferencia de Southern del ADN vírico intrahepático (**Figura 11**) demostraron cambios en los niveles de los productos intermedios de replicación del WHV intrahepático que fueron generalmente consistentes con los patrones de viremia. Se observó un descenso marcado en el nivel de la síntesis de ADN vírico en ambos grupos tratados con β -L-FTC y L-FMAU, con una disminución del 82 al 93 % en el nivel de los productos intermedios de ADN vírico intrahepático comparados con los niveles anteriores al tratamiento (**Figuras 12 y 13**). Mientras que el ADN CCC persistió en el hígado en los M1 y M2, otros productos intermedios de la replicación del ADN de WHV disminuyeron de forma dramática.

30 Además, el ADN CCC también se redujo entre el 24 y el 47 % durante la terapia doble con L-FMAU/ β -L-FTC. Sin embargo, la inhibición de la replicación del WHV mediante la administración de L-FMAU/ β -L-FTC no continuó con el aclaramiento del ADN CCC vírico intrahepático, como se demuestra mediante los análisis de transferencia de southern.

35 Sin embargo, en la marmota no tratada, el ADN total o el CCC aumentaron en el tiempo en + 64 % y + 77 % respectivamente (**Figura 14**).

40 Comparado con los resultados de Cullen et al. (Cullen et al. Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41, 2076-2082), Zhu et al. (Zhu et al. J. Virol. 2001, 75, 311-22) y Peek et al. (Peek et al. Hepatology 2001, 33, 254-66), la β -L-FTC combinada con IFN y L-FMAU tiene un efecto antivírico significativo. Los productos intermedios de replicación disminuyeron hasta niveles indetectables en el hígado un mes después del comienzo del tratamiento. Por el contrario, los niveles de ADN CCC intrahepático disminuyeron a una velocidad mucho menor que la replicación del ADN. La combinación de β -L-FTC y L-FMAU hizo disminuir el ADN CCC vírico en un 40 % (frente a una disminución del 98 % de los productos intermedios de replicación del ADN). Este efecto se pudo deber al efecto antivírico de la L-FMAU sola como se demostró por Peek, et al. (Peek et al. Hepatology 2001, 33, 254-66), que mostraron una disminución media de un factor de 10 en el ADN CCC). Sin embargo, después de ocho o nueve meses de tratamiento con un fármaco único, aparecieron cepas de WHV resistentes al fármaco (Zhou, T., et al. J. Viron. 2000, 74, 11754-63). La L-FMAU en combinación con β -L-FTC puede evitar que aparezcan cepas resistentes al fármaco y permitir un tratamiento a largo plazo que podría reducir la agrupación residual de ADN CCC.

Ejemplo 8

50 *Síntesis de ADN de WHV intrahepático*

A diferencia de los resultados de la terapia de combinación, el Ad IFN sólo no afectó a los niveles de ADN CCC y ADN vírico total en el hígado (+ 44 % y - 6 % respectivamente comparados con + 43 % para el ADN total del grupo del Ad GFP) (**Figura 15**).

Ejemplo 9

55 *Evaluación de la transducción de hepatocitos mediante el vector de adenovirus recombinante*

Para determinar el número de hepatocitos infectados por el adenovirus, se realizó la inmunotinción con un anticuerpo comercial dirigido contra la Proteína Fluorescente Verde (GFP). Sin embargo, la fluorescencia observada no era específica cuando se comparó con los controles, y se puede haber debido a fluorescencia natural de los hepatocitos o quizá a los pigmentos biliares.

5 Ejemplo 10

Examen histológico

El examen de las secciones de biopsia hepática de los animales tratados con una terapia de combinación de β -L-FTC revelaron inflamación en el hígado con lesiones lobulares. Todas las marmotas del grupo tratado con Ad IFN mostraron un aumento de la actividad inflamatoria (**Figura 15**). Se observó la actividad inflamatoria máxima en la puntuación de Metavir en seis biopsias de este grupo. En comparación, el grupo tratado con L-FMAU y β -L-FTC no mostró perfiles similares. Sólo tres de las seis marmotas en este grupo mostraron un incremento de la actividad inflamatoria. En los grupos de control, la puntuación de Metavir fue estable durante el tiempo, incluso en el grupo tratado sólo con Ad IFN.

Ejemplo 11

15 *Análisis de la viremia*

La viremia se pudo analizar usando el ensayo de transferencia puntual para el ADN del WHV y cuantificar con un fosfoimager hasta que la viremia vuelva a los valores anteriores al tratamiento.

Si se confirma la eliminación del virus, el ADN extraído del suero en condiciones de PCR sería indetectable mediante el ensayo de transferencia puntual (viremia inferior a 6.10^7 copias/ml). Además, el ADN se debe analizar mediante un ensayo de PCR en tiempo real (Light Cycler). En estos ejemplos, se adoptó el procedimiento de PCR en tiempo real para la detección del ADN de WHV usando cebadores específicos.

Ejemplo 12

Análisis de la síntesis de ADN vírico intrahepático

Se analizaron las secciones de una biopsia hepática tomada cinco meses después del tratamiento mediante hibridación por transferencia de southern para analizar la síntesis de ADN vírico intrahepático.

Ejemplo 13

Secuenciación del gen de polimerasa de WHV

La secuencia genética de los viriones circulantes se pudo analizar después de la amplificación por PCR de las regiones PreS y RT, para determinar si se han seleccionado o no mutantes de escape o uno de los protocolos antivíricos.

Se amplificó el ADN de WHV mediante PCR a partir de suero recogido al final del período de tratamiento o en el mejor punto anterior a la muerte del animal. Se amplificó el ADN a partir de suero durante 35 ciclos (94 °C durante 1 min, 50 °C durante 1 min, y 72 °C durante 1 min) con Taq polimerasa y un par cebador específico (5'-AGATTGGTTGGTGCACTTCT-3' (nucleótidos 385 a 403) y 5'-ATTGTCAGTGCCCAACA-3' (nucleótidos 1468 a 1461), que corresponden a los dominios B y C del gen de la transcriptasa inversa, con referencia a secuencias publicadas anteriormente. Para confirmar que no había ADN vírico presente, se usó otro par cebador para PCR anidada en las muestras que resultaron ser negativas en la primera ronda de amplificación, en concreto 5'-GGATGTATCTGCGGCGTTT-3' (nucleótidos 510 a 528) y 5'-CCCAAATCAAGAAAAACAGAACA-3' (nucleótidos 953 a 931).

40 Ejemplo 14

Examen de las mitocondrias hepáticas mediante microscopía electrónica

Las secciones de la biopsia hepática se fijaron en tetraóxido de osmio al 1 % en cacodilato sódico HCl 150 mM (pH 7,4), se deshidrataron en etanol graduado y se embebieron con acetato de uranilo metanólico y citrato de plomo, y se podrán analizar con un microscopio electrónico de transmisión 1200EX para descartar la toxicidad mitocondrial de la terapia de combinación de β -L-FTC.

Ejemplo 15

Visualización de la GFP o RFP

El número de células infectadas por el vector de adenovirus se pudo monitorizar mediante la observación directa de secciones de tejido hepático sin parafina de cinco micrómetros de espesor mediante un microscopio confocal usando los filtros apropiados.

Ejemplo 16

Evaluación del número de hepatocitos infectados por WHV

5 El número de células infectadas por WHV se pudo monitorizar mediante la inmunotinción de las proteínas de superficie y cápside. Para hacer esto, se incubaron secciones de tejido hepático sin parafina de 5 micrómetros de espesor durante una noche con suero de conejo que contenía un anticuerpo policlonal dirigido contra las proteínas pre-S o del núcleo del WHV. A partir de entonces se incubaron las secciones con una inmunoglobulina G de cabra anti-conejo biotinilada. El complejo antígeno anticuerpo se reveló usando estreptoavidina peroxidasa de rábano. La cuantificación del número de hepatocitos infectados que expresan proteínas víricas se realizó en áreas representativas de las secciones de hígado.

10 **Ejemplo 17**

Análisis de la renovación de los hepatocitos

15 Se pudo determinar el número de hepatocitos que experimentan apoptosis usando el procedimiento TUNEL (marcado del extremo libre de dUTP mediado por deoxinucleotidil transferasa terminal) (Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. y Currie, A.R. 1972 Br. J. Cancer 26:239-257). El número de hepatocitos que progresa en el ciclo celular de mitosis se pudo determinar mediante inmunotinción para el PCNA.

REIVINDICACIONES

1. El uso de:

5 β -L-FTC, un éter lipídico profármaco del mismo, o un nucleótido profármaco del mismo opcionalmente con una alquilación, acilación u otra modificación lipofílica del grupo hidroxilo o del mono, di o trifosfato;
 L-FMAU, un éter lipídico profármaco del mismo, o un nucleótido profármaco del mismo opcionalmente con una alquilación, acilación u otra modificación lipofílica del grupo hidroxilo o del mono, di o trifosfato; e
 10 interferón;
 o sus sales farmacéuticamente aceptables, independiente y opcionalmente en vehículos farmacéuticamente aceptables; en la fabricación de un medicamento para administración combinada o alternada, para el tratamiento o la profilaxis de un ser humano infectado con el virus de la hepatitis B.

2. El uso de la reivindicación 1, en la que el interferón se selecciona entre el grupo que consiste en interferón alfa, interferón alfa pegilado, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta, interferón gamma e interferón de consenso.

3. El uso de la reivindicación 2, en la que el interferón es interferón alfa.

15 4. El uso de la reivindicación 2, en la que el interferón es interferón gamma.

5. El uso de la reivindicación 2, en la que el interferón es interferón beta.

6. Una composición farmacéutica que comprende:

20 β -L-FTC o un profármaco como se define en la reivindicación 1;
 L-FMAU o un profármaco como se define en la reivindicación 1; e
 interferón;
 o sus sales farmacéuticamente aceptables, independiente y opcionalmente en vehículos farmacéuticamente aceptables, para su uso combinado o alternado, en el tratamiento o la profilaxis de un ser humano infectado con el virus de la hepatitis B.

25 7. El uso de β -L-FTC en la fabricación de un medicamento, cuando se usa en combinación o alternancia con L-FMAU e interferón, para el tratamiento o la profilaxis de un ser humano infectado con el virus de la hepatitis B.

8. El uso de L-FMAU en la fabricación de un medicamento, cuando se usa en combinación o alternancia con β -L-FTC e interferón, para el tratamiento o la profilaxis de un ser humano infectado con el virus de la hepatitis B.

9. El uso de interferón en la fabricación de un medicamento, cuando se usa en combinación o alternancia con β -L-FTC y L-FMAU, para el tratamiento o la profilaxis de un ser humano infectado con el virus de la hepatitis B.

30 10. β -L-FTC para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un ser humano infectado con el virus de la hepatitis B, en el que la β -L-FTC se usa en combinación o alternancia con L-FMAU e interferón.

11. L-FMAU para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un ser humano infectado con el virus de la hepatitis B, en el que la L-FMAU se usa en combinación o alternancia con β -L-FTC e interferón.

35 12. Interferón para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un ser humano infectado con el virus de la hepatitis B, en el que el interferón se usa en combinación o alternancia con β -L-FTC y L-FMAU.

13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 7 a 9, en las que el interferón se suministra en forma de un gen o fragmento de gen que expresa la proteína interferón.

40 14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, la β -L-FTC para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, la L-FMAU para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o el interferón para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el interferón está en forma de un gen o fragmento de gen que expresa la proteína interferón.

FIGURA 1

VECTOR DE ADENOVIRUS PARA
EL SUMINISTRO DE INTERFERÓN
GAMMA DE MARMOTA

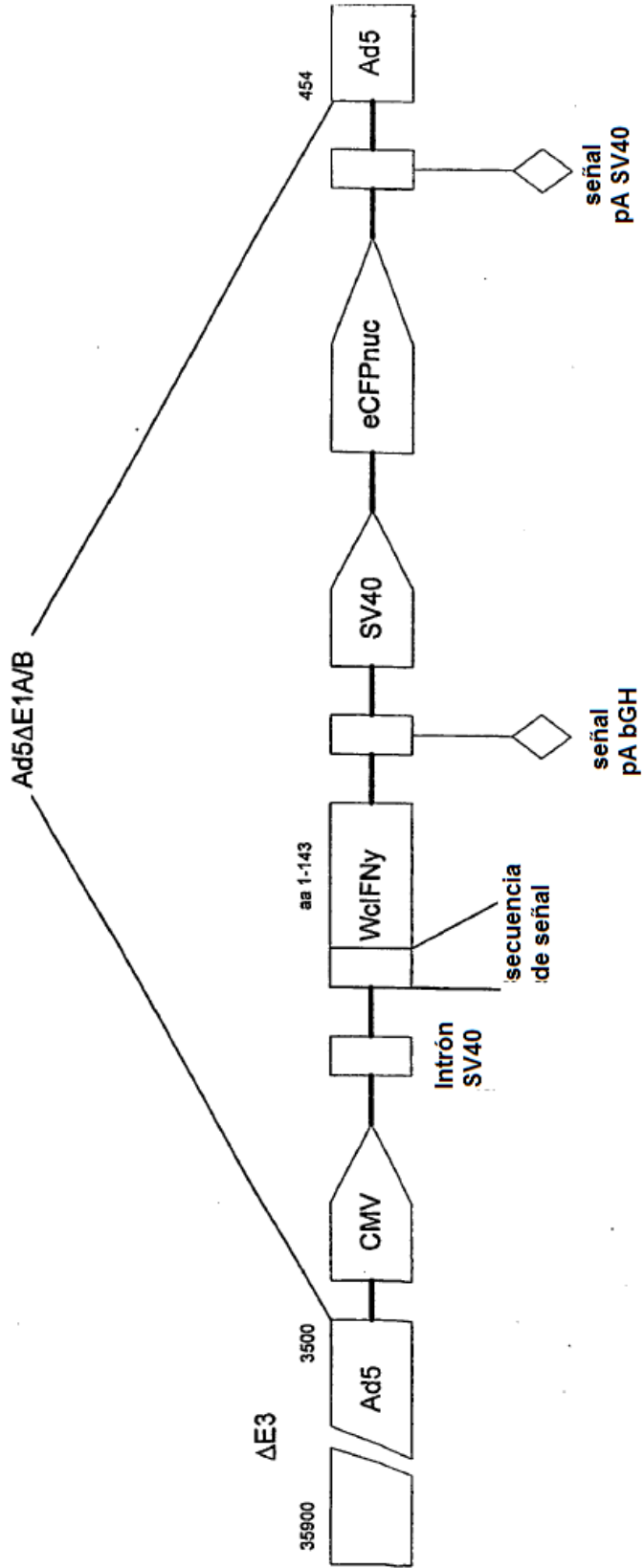


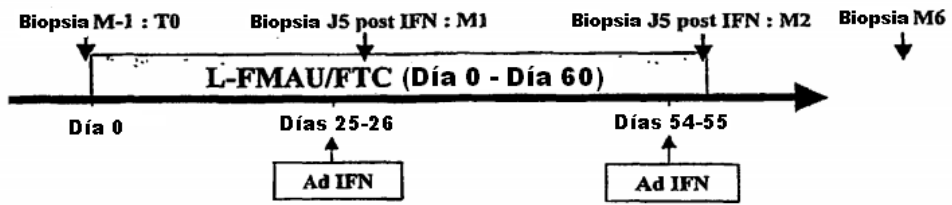
FIGURA 2

TRATAMIENTO DE LAS MARMOTAS

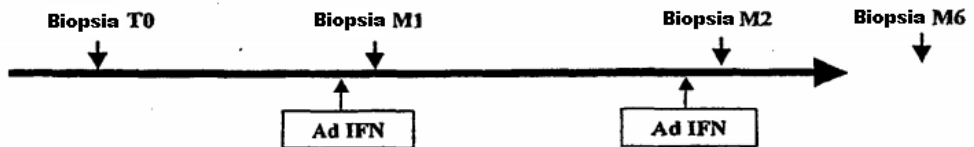
Tratamiento con L-FMAU 10 mg/kg FTC 30 mg/kg +/- inyección de Ad IFN

➤ **8 marmotas tratadas con Ad IFN**

- **6 marmotas tratadas con L-FMAU + FTC con inyección de Ad IFN:**
(W 643 644 645 646 647 648)

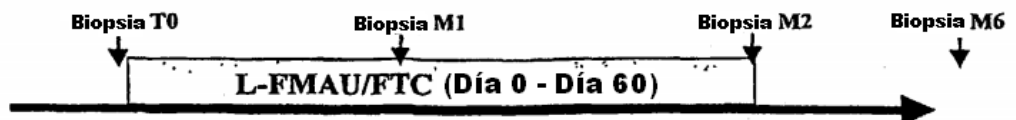


- **2 marmotas tratadas sin L-FMAU + FTC con inyección de Ad IFN:**
(W638 W641)



➤ **10 marmotas de control**

- **6 marmotas tratadas con L-FMAU FTC sin inyección de Ad IFN:**
(W649 650 651 652 653 654)



- **2 marmotas sin tratamiento antivirico (L-FMAU FTC) pero con inyección de Ad GFP:** (W657 658)
- **1 sin ningún tratamiento** (W 642)

FIGURA 3

ESTUDIO DE DETERMINACIÓN DE DOSIS: SEGUIMIENTO DE LA VIREMIA

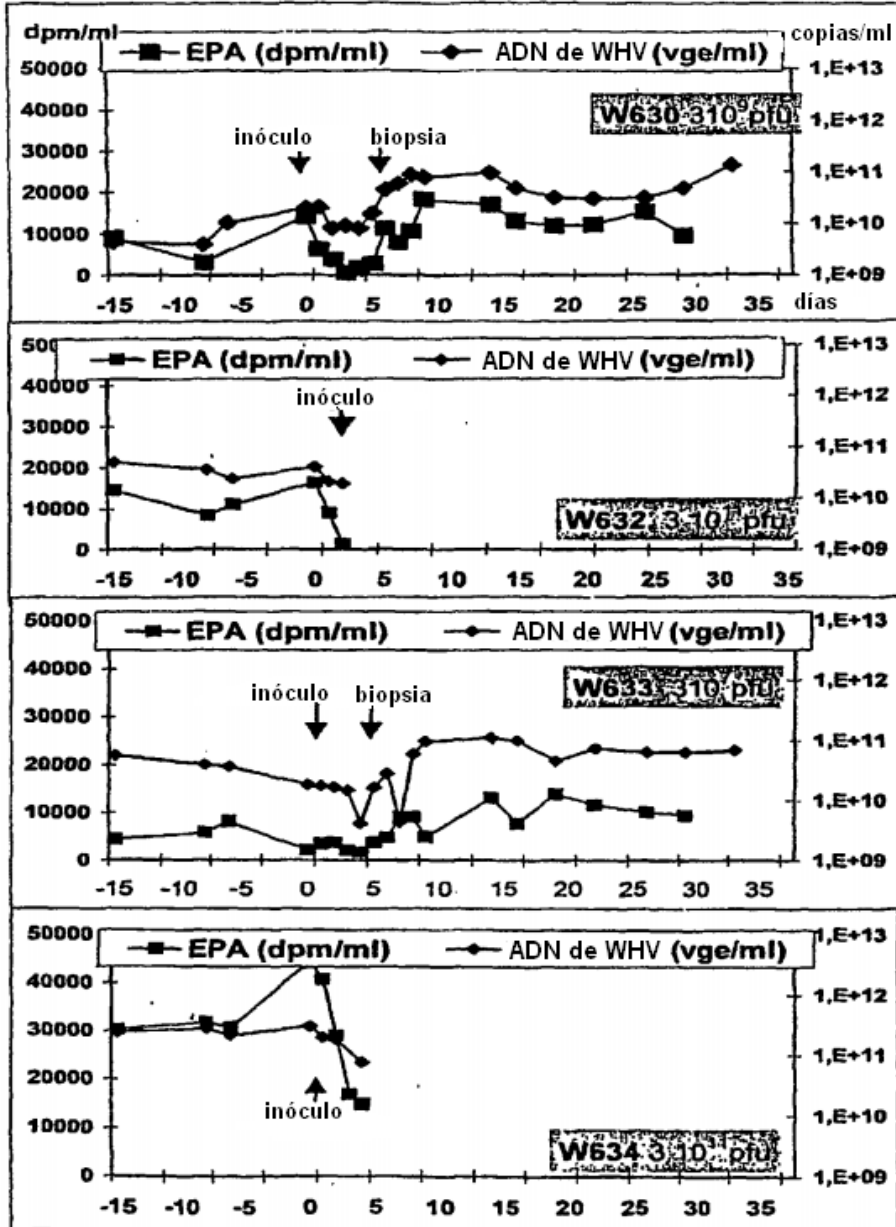


FIGURA 4

Estudio de eficacia
SEGUIMIENTO DE LA VIREMIA DEL GRUPO Ad-IFN-GFP

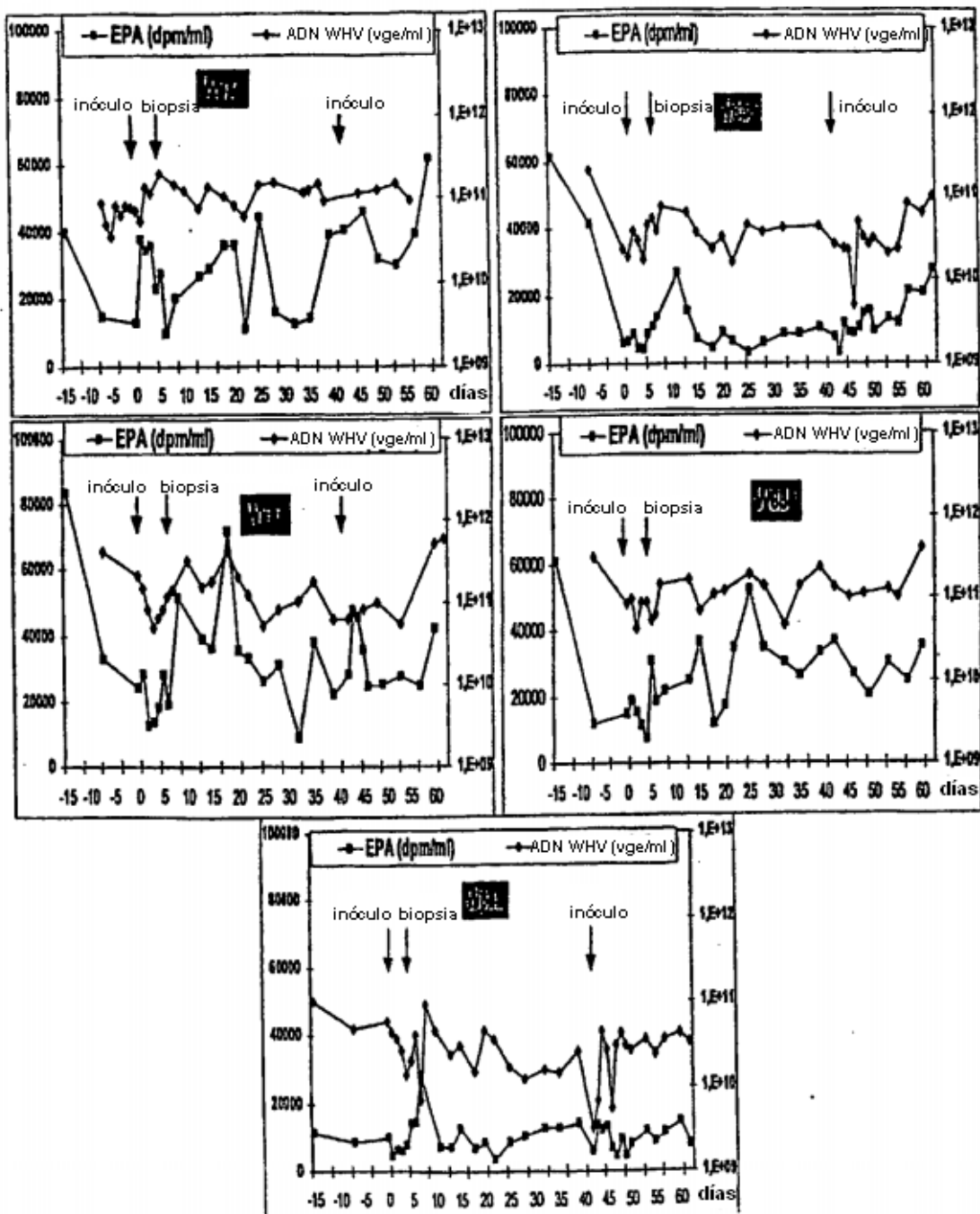
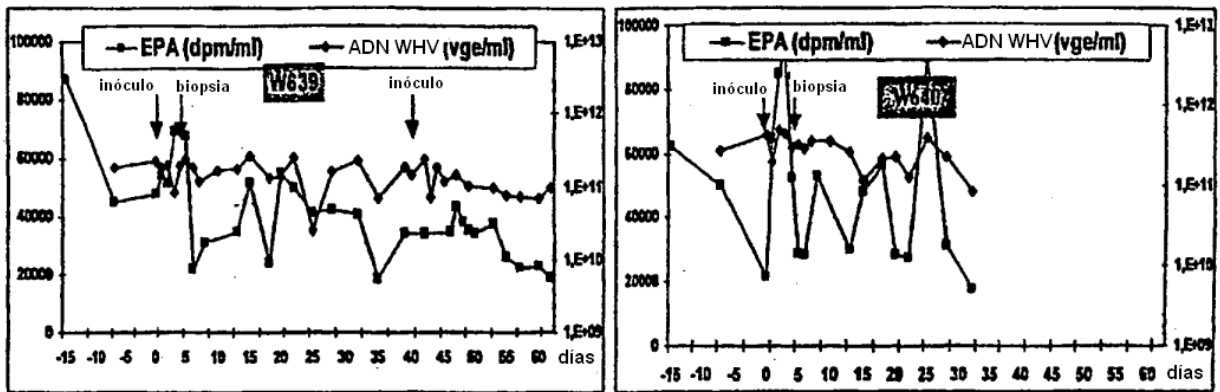


FIGURA 5

Estudio de eficacia

SEGUIMIENTO DE LA VIREMIA EN LOS GRUPOS DE CONTROL

SEGUIMIENTO DE LA VIREMIA EN EL GRUPO DE CONTROL AD-GFP



SEGUIMIENTO DE LA VIREMIA EN LAS MARMOTAS SIN TRATAR

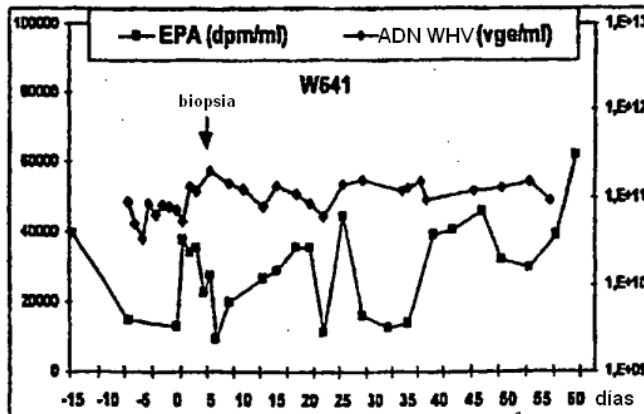


FIGURA 6

Estudio de eficacia
resultados de SBH de las biopsias hepáticas

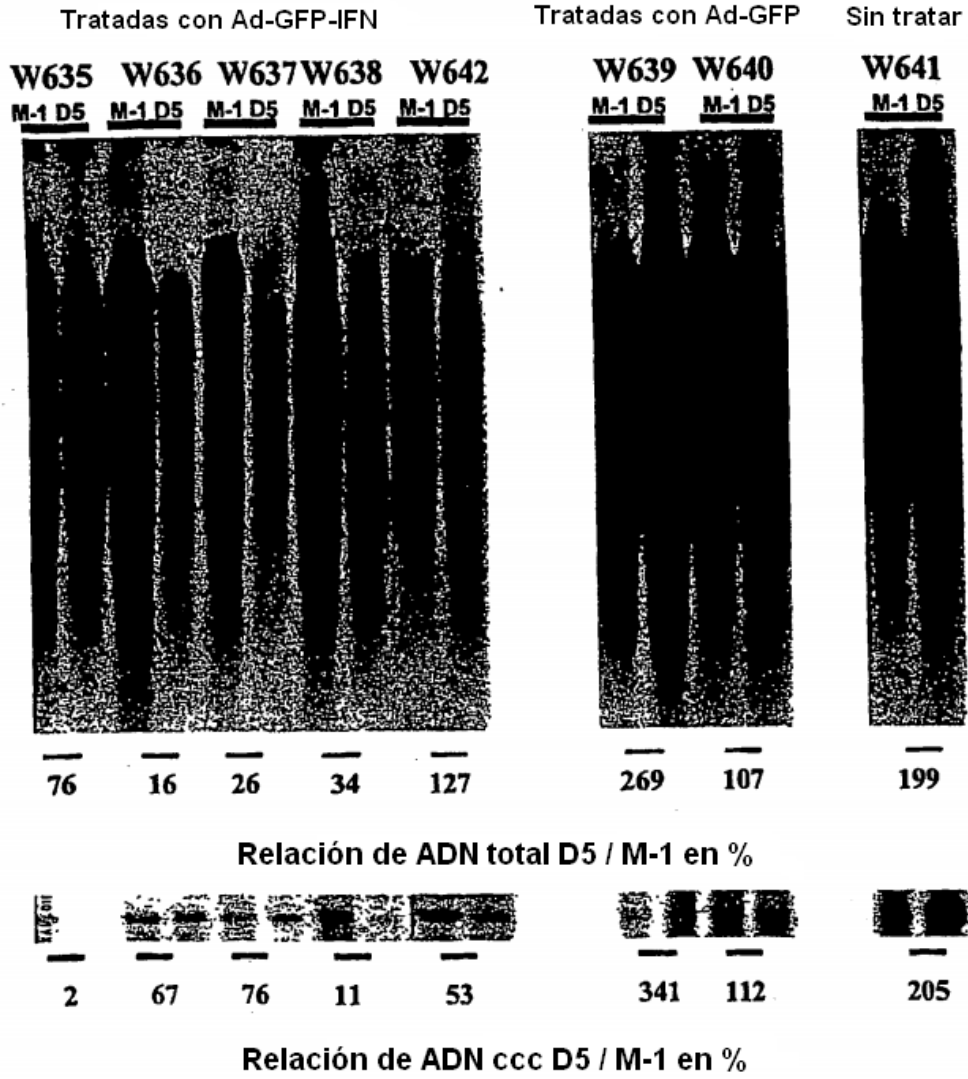


FIGURA 7

Análisis de la viremia mediante ensayo de transferencia puntual

Tratamiento L-FMAU + FTC

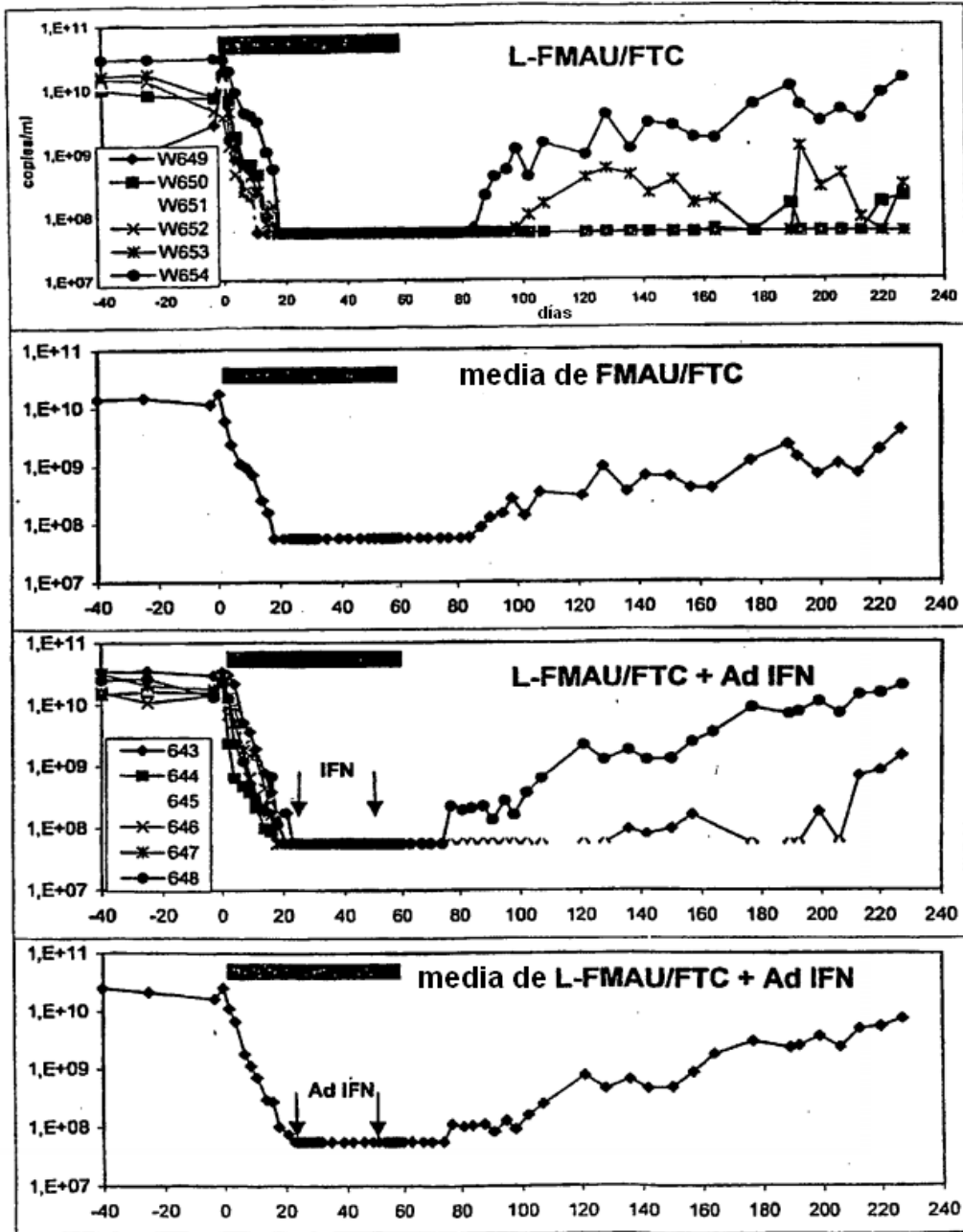


FIGURA 8

Análisis de la viremia mediante ensayo de transferencia puntual

Controles

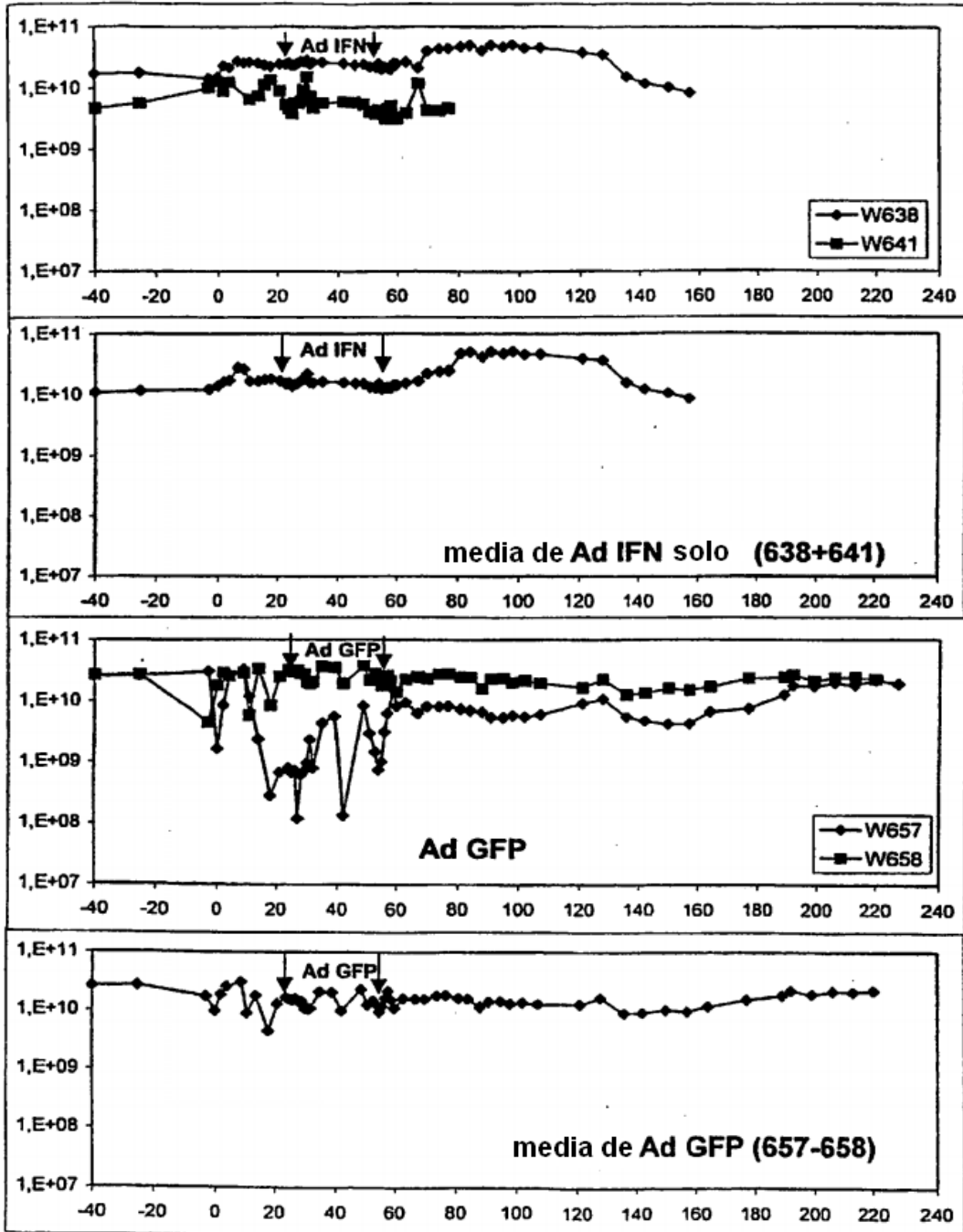


FIGURA 9

Análisis de la viremia mediante ensayo de transferencia puntual

Controles sin tratar

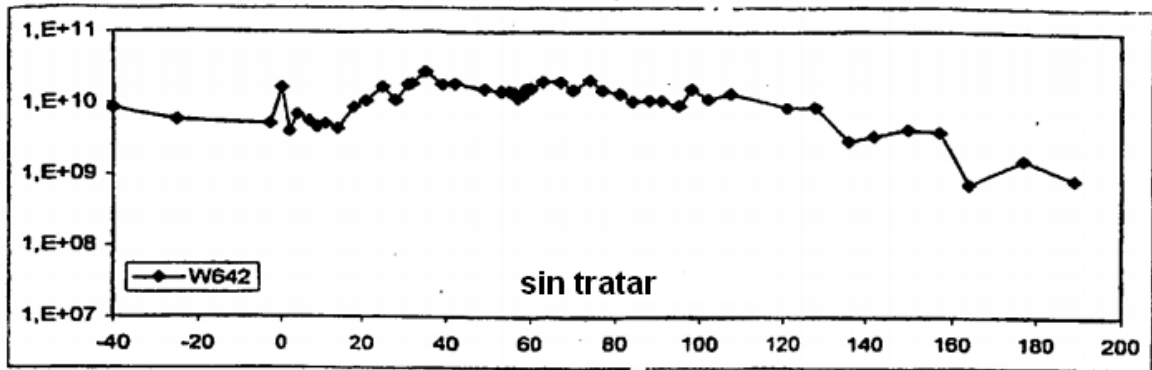


FIGURA 10

Análisis de la viremia mediante PCR en tiempo real

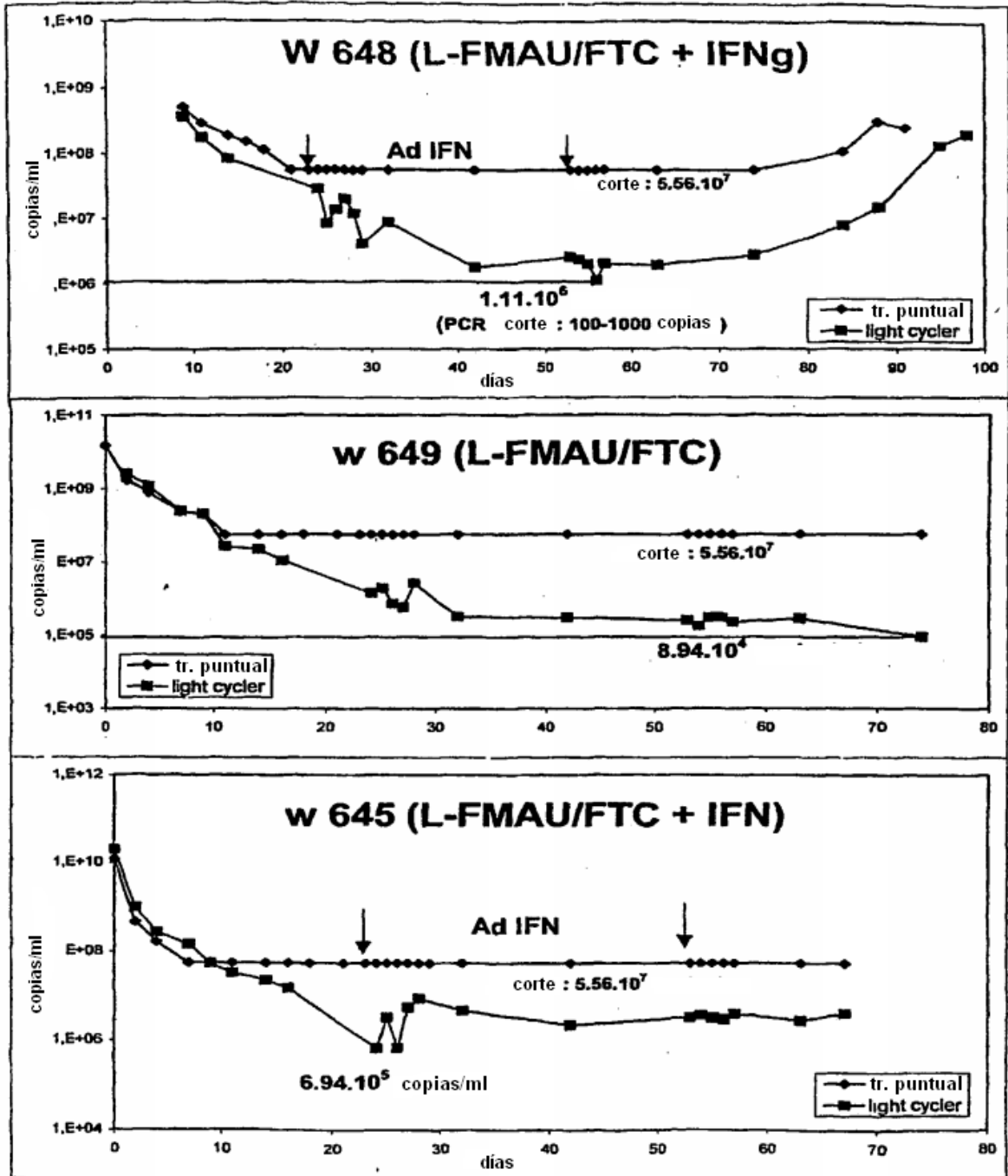


FIGURA 11

Resultados de SBH de las biopsias hepáticas

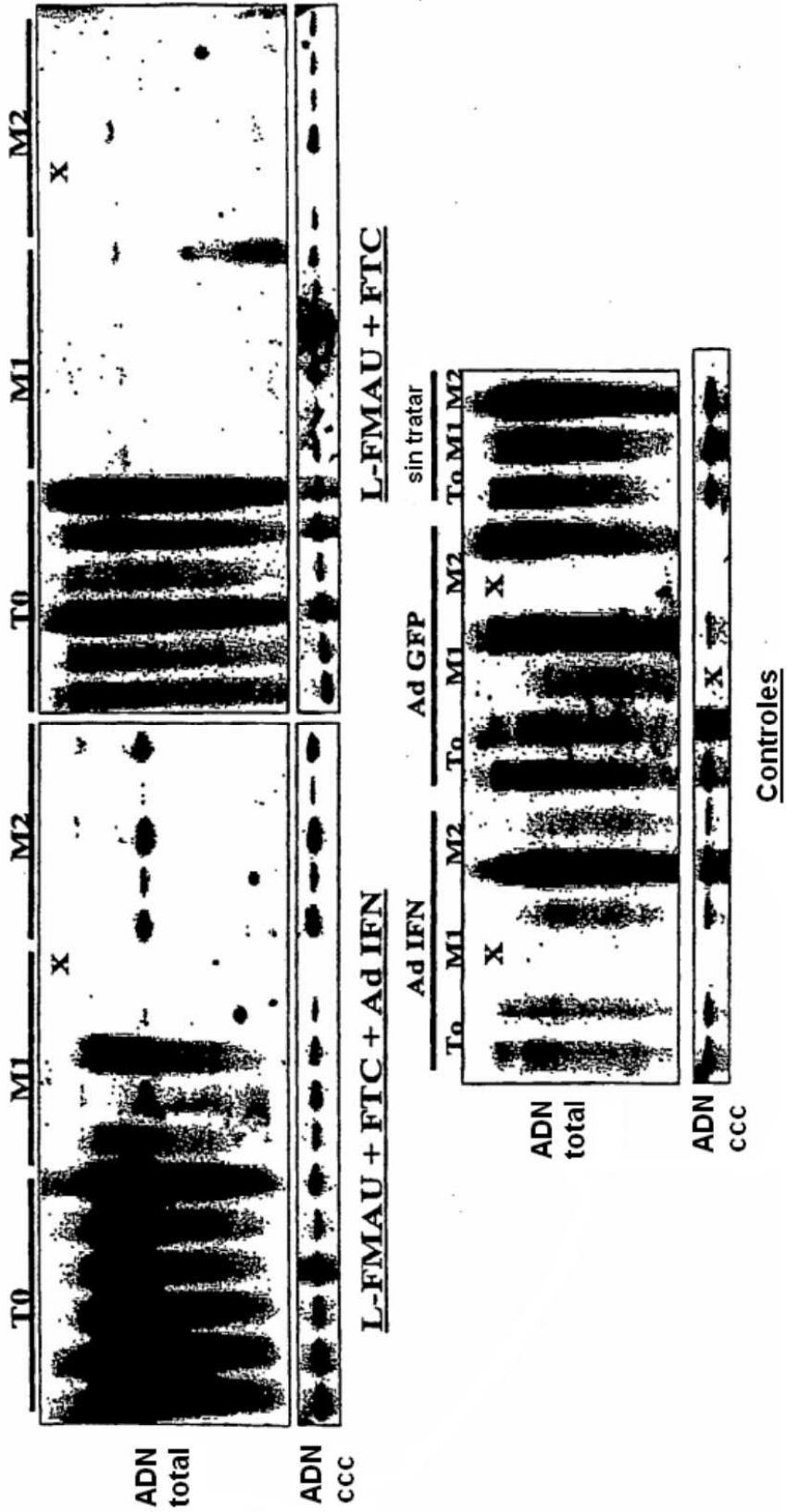


FIGURA 12

Intrahepático: ADN total y ADN ccc (% de T0)

L-FMAU + FTC + IFN

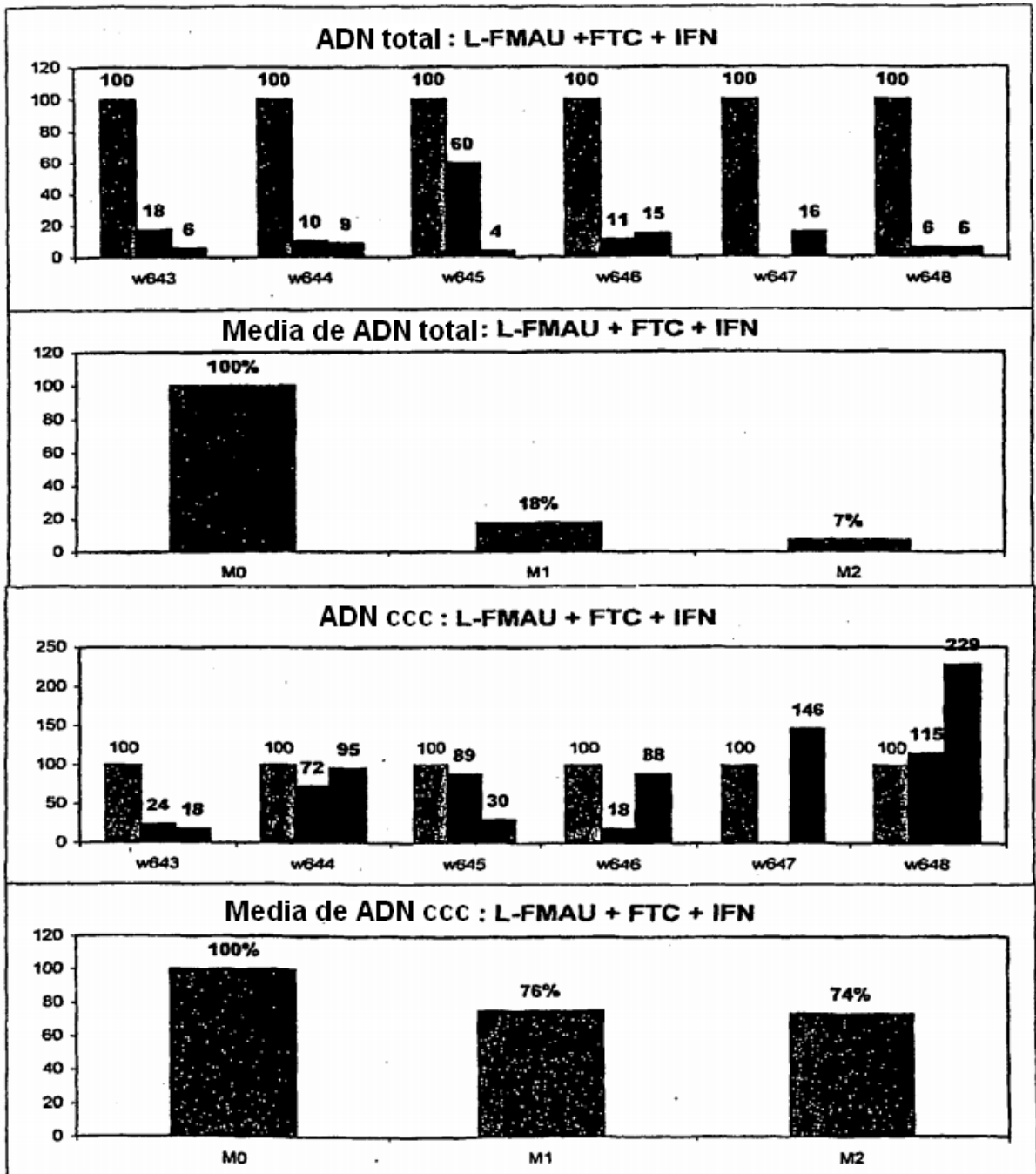


FIGURA 13

Intrahepático: ADN total y ADN ccc (% de T0)

L-FMAU + FTC

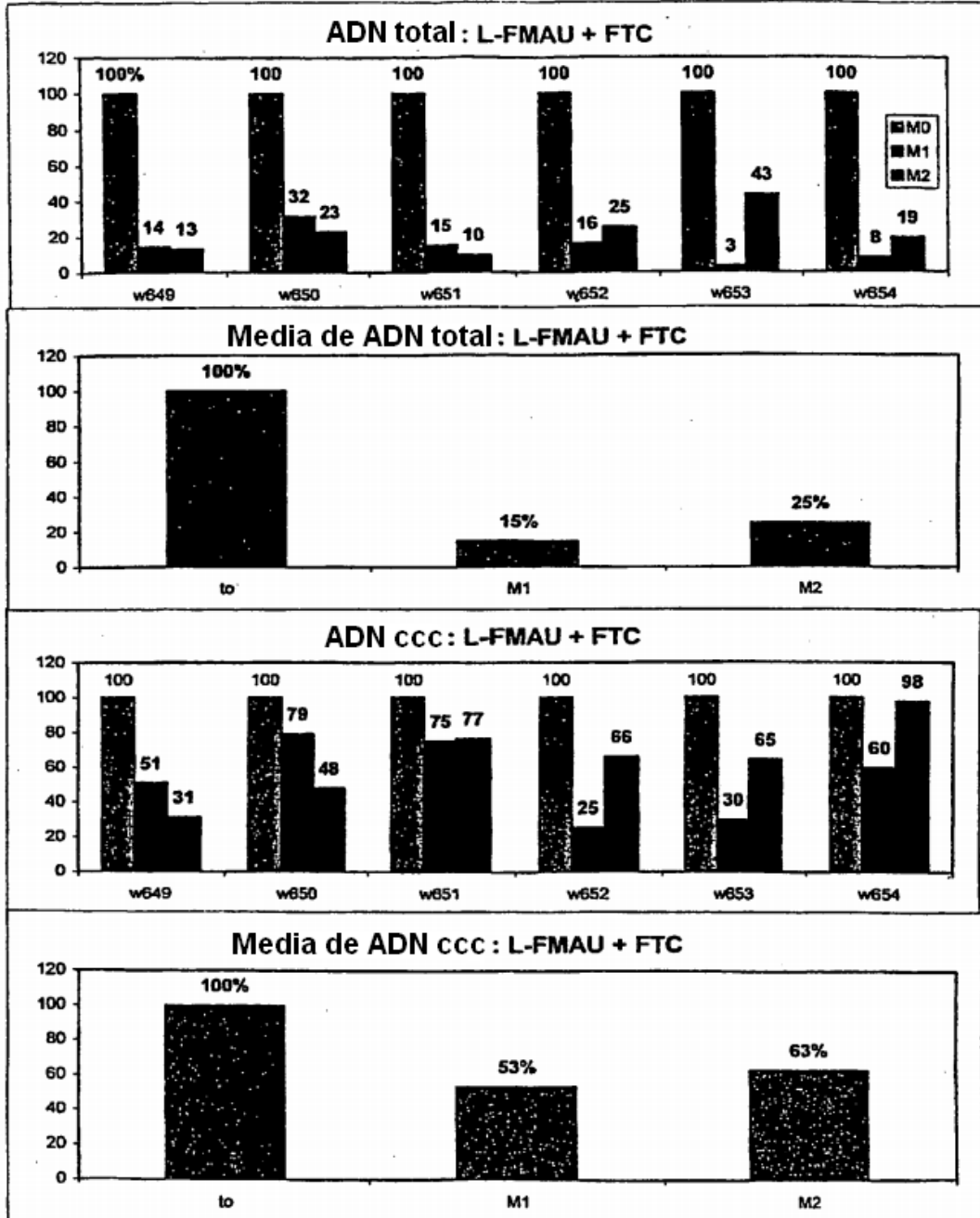


FIGURA 14

Intrahepático: ADN total y ADN ccc (% de T0)

Controles

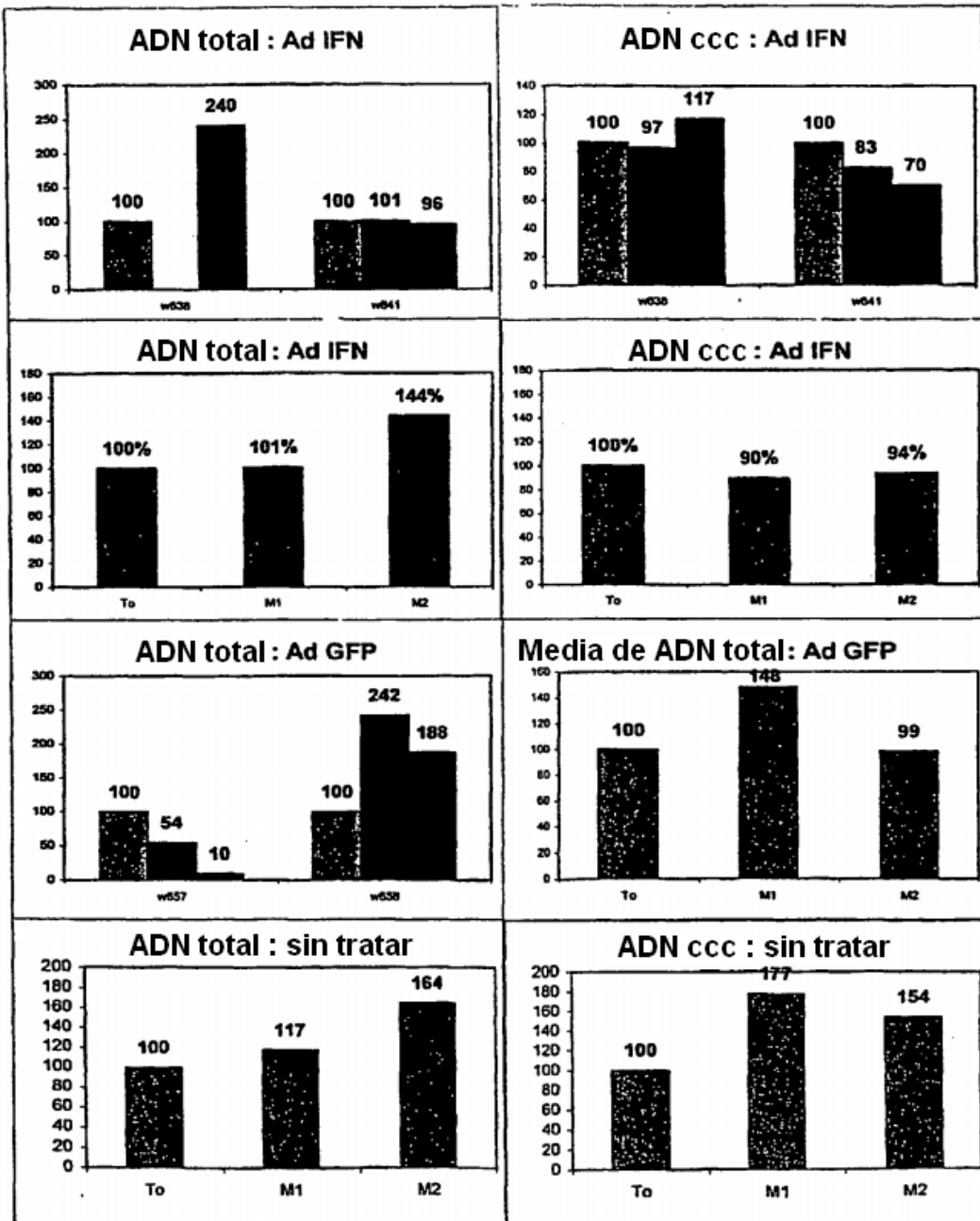


FIGURA 15

Actividad inflamatoria
Valores medios

