

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 213**

51 Int. Cl.:

A61K 38/13 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12713680 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2694087**

54 Título: **Tratamiento para infección con el virus de hepatitis B solo o en combinación con el virus de hepatitis Delta y enfermedades hepáticas asociadas**

30 Prioridad:

01.04.2011 US 201161470666 P

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

08.04.2015

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

NAOUMOV, NIKOLAI

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 533 213 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

Tratamiento para infección con el virus de hepatitis B solo o en combinación con el virus de hepatitis Delta y enfermedades hepáticas asociadas.

Antecedentes de la divulgación

- 5 La presente descripción se refiere a análogos de ciclosporinas no inmunosupresores que se enlazan a las ciclofilinas, los cuales son inhibidores de ciclofilina, en particular a su uso farmacéutico en el tratamiento de una infección con el virus de hepatitis Delta (HDV).

10 Las ciclosporinas y los análogos no inmunosupresores comprenden una clase de undecapéptidos poli-N-metilados cíclicos estructuralmente distintos, que poseen comúnmente actividad farmacológica, en particular actividad inmunosupresora o anti-inflamatoria. La primera de las ciclosporinas que se aisló fue el metabolito fúngico de origen natural, Ciclosporina, también conocida como ciclosporina A (CsA). Se han identificado ciclosporinas que se enlazan fuertemente a la ciclofilina pero que no son inmunosupresoras. La publicación Internacional PCT/EP 2004/009804, la publicación Internacional WO 2005/021028, o la publicación Internacional WO 2006/071619 describen ciclosporinas no inmunosupresoras que se enlazan a la ciclofilina y también se ha encontrado que tienen un efecto inhibidor sobre el virus de hepatitis C (HCV). La Publicación Internacional WO 2006/038088, describe métodos y composiciones para el uso de alisporivir en el tratamiento de HCV. El alisporivir (DEB025 o Debio-025) es un inhibidor de ciclofilina (Cyp), y su modo de acción como un agente contra el HCV es por medio de la inhibición de las proteínas anfitrionas, en particular de la ciclofilina A, que se encuentran directamente involucradas en la replicación del HCV.

20 El virus de hepatitis B (HBV) es el virus de ADN humano más pequeño (1). El genoma del HBV es un ADN parcialmente circular de doble cadena con marcos de lectura traslapados que codifican las proteínas del HBV: proteínas de envoltura - i) antígeno de superficie pequeño de hepatitis B (HBsAg); ii) antígeno de superficie mediano - preS2 más HBsAg; iii) antígeno de superficie grande - preS1 más preS2 más HBsAg; proteína del nucleocápsido, antígeno nuclear de hepatitis B (HBcAg). El antígeno de hepatitis B (HBeAg) es una proteína no estructural producida durante la replicación del HBV que comparte el 90 % de aminoácidos con el nucleocápsido HBcAg. Se han determinado ocho genotipos del HBV, designados como A a H, en donde cada uno tiene una distribución geográfica distinta. El virus es no citopático, con inmunidad celular específica para el virus que es el principal determinante para el resultado de la exposición a infección aguda por HBV con resolución de las enfermedades hepáticas en 6 meses, o infección crónica por HBV que con frecuencia se asocia a lesión hepática progresiva. La detección del HBsAg en el suero mediante los inmunoensayos de diagnóstico convencionales, es el marcador de diagnóstico clave para la infección por HBV, y la detección persistente del HBsAg en suero durante más de 6 meses es la indicación de la infección crónica por HBV (2, 3, 4). El mejor marcador para la replicación clínicamente significativa del HBV es el nivel del ADN del HBV en suero, tal como el detectado mediante ensayo sensible basado en reacción en cadena de polimerasa (PCR).

35 En todo el mundo, más de 350 millones de personas están infectadas de manera crónica con el HBV y, por consiguiente, están en un mayor riesgo de desarrollar enfermedad hepática grave, tal como hepatitis crónica, cirrosis, insuficiencia hepática, y carcinoma hepatocelular (HCC). La evolución natural de la infección crónica por HBV incluye cuatro fases consecutivas: (1) fase "inmunotolerante" temprana - altos niveles de replicación del virus e inflamación mínima del hígado; (2) fase inmunoreactiva - inflamación hepática significativa y aminotransferasas elevadas en suero; en donde algunos pacientes progresan hasta (3) fase "no replicativa" - seroconversión hasta anti-H Be; nivel de viremia indetectable o de nivel bajo (por debajo de 2.000 IU/ml de acuerdo con ensayos basados en PCR); resolución de inflamación hepática; y (4) hepatitis B crónica negativa para HBeAg - debido al surgimiento de mutaciones virales específicas, las cuales impiden la producción de HBeAg pero no obstaculizan la replicación del virus. Esta forma de CHB se caracteriza por una fluctuación en los niveles del ADN del HBV en suero y de las aminotransferasas (ALT Y AST) en suero, y por enfermedad hepática progresiva. Es importante observar que la hepatitis B crónica (CHB) puede presentarse ya sea como CHB positiva para (HBeAg) o negativa para (HBeAg) el antígeno e de la hepatitis B. Los estudios longitudinales de los pacientes con CHB indican que la incidencia acumulada durante 5 años del desarrollo de cirrosis varía entre el 8 y el 20 por ciento. La incidencia acumulada durante 5 años de descompensación hepática es de aproximadamente el 20 por ciento (2). La incidencia del HCC en todo el mundo se ha incrementado, y en la actualidad constituye el quinto cáncer más común (2, 3, 4). La incidencia anual del HCC relacionado con el HBV es alta variando entre el 2 y el 5 por ciento cuando se establece la cirrosis (2).

55 El objetivo primario del tratamiento para la CHB es suprimir permanentemente la replicación del HBV y mejorar la enfermedad hepática. Los objetivos a corto plazo clínicamente importantes son lograr la seroconversión del HBeAg, la normalización de ALT y AST en suero, la resolución de la inflamación hepática, y prevenir la descompensación hepática (2). El objetivo final del tratamiento es lograr una respuesta durable para prevenir el desarrollo de cirrosis, el cáncer de hígado, y para prolongar la supervivencia. La infección por HBV no se puede erradicar completamente debido a la persistencia de una forma particular del ADN viral circular covalentemente cerrado (ADN de HBV ccc) en

los núcleos de los hepatocitos infectados. Sin embargo, la eliminación del HBsAg en suero inducida por el tratamiento es un marcador de la terminación de la infección crónica por HBV, y se ha asociado con el mejor resultado a largo plazo (2, 3).

Actualmente hay siete fármacos disponibles para el tratamiento de hepatitis B crónica (CHB) - interferón convencional, interferón pegilado, y agentes antivirales directos. Los agentes antivirales directos (núcleos/análogos tiales) pertenecen a tres clases: L-nucleósidos (lamivudina, telbivudina y emtricitabina); análogo de desoxiguanosina (entecavir), y fosfonatos de nucleósidos (adefovir y tenofovir), los cuales interfieren directamente con la replicación del ADN del HBV, primordialmente como terminadores de cadena (2, 3, 4). En los pacientes positivos para HBeAg, los índices de respuesta al tratamiento virológico (ADN del HBV indetectable en suero) en un año son aquellos que se tratan con: peg-interferón del 25 %; lamivudina, del 36 al 40%; entecavir, del 67 %; telbivudina, 60 %; tenofovir, 74 % (2). La pérdida del HBsAg después de un año es muy baja - de entre el 0 y el 3 %. En los pacientes con CHB negativos para HBeAg, los índices del ADN del HBV indetectable en un año son aquellos que se tratan con: peg-interferón 63 %; lamivudina 72 %; entecavir 90 %; telbivudina 88 %; tenofovir 91 %. La pérdida del HBsAg fue del 0 % con cualquiera de los agentes antivirales directos. Los tratamientos actualmente disponibles no son óptimos, y existe una necesidad de mejores terapias para alcanzar los objetivos del tratamiento en la CHB. Las limitaciones clave para el tratamiento con interferón son los efectos secundarios mayores, el bajo índice de supresión del ADN del HBV, y el bajo índice de normalización de ALT; las limitaciones clave del tratamiento con los antivirales directos son: desarrollo de resistencia; recuperación de la replicación del HBV después de interrumpir la terapia, requiriendo de una terapia prolongada de por vida, muy bajo índice de eliminación del HBsAg, aumento del riesgo de eventos adversos con la terapia prolongada de por vida.

Una proporción de pacientes con infección crónica con HBV (positivos para HBsAg en suero) tendrán coinfección con el virus de hepatitis Delta (HDV). El virus de hepatitis Delta (HDV) es un virus defectuoso con un genoma de ARN circular de una sola cadena, que provoca enfermedades hepáticas agudas o crónicas solamente en asociación con el virus de hepatitis B (1). La única proteína expresada por el ARN del HDV es el antígeno de hepatitis Delta, el cual es el nucleocápsido del virus. El virus de hepatitis Delta (HDV) no codifica su propia proteína de envoltura (HBsAg), y la debe "pedir prestada" del virus de hepatitis B. Por consiguiente, la infección con HDV se presenta solamente en la presencia del HBV - ya sea simultáneamente con el HBV (coinfección) o posteriormente, siendo la duración de la infección determinada por aquella de la positividad del HBsAg. En un paciente positivo para el HBsAg, la infección activa con el HDV se confirma mediante la detección del ARN del HDV en suero, mediante el tefido inmunohistoquímico para el antígeno de hepatitis Delta en hepatocitos, o mediante la detección de la IgM antiHDV en suero (2).

El virus de hepatitis Delta (HDV) tiene una distribución en todo el mundo con la más alta endemidad en los países del Mediterráneo, partes de África del Sur y Central, y en Sudamérica. Se estima que el 5 por ciento de todos los portadores del virus de hepatitis B están infectados con el HDV (5). En los países en donde la prevalencia del HBV es baja, tales como Norteamérica y el Norte de Europa, la infección con el HDV está restringida en gran parte a las poblaciones en riesgo de exposición parenteral al HBV, como los usuarios de fármacos intravenosos. La inmigración desde las regiones de alta endemidad del HDV ha aumentado la prevalencia en varios países europeos, conduciendo recientemente a aproximadamente el 10 por ciento entre los pacientes crónicos por HBV.

El único tratamiento aprobado para la hepatitis D crónica es el interferón-alfa con resultados insatisfactorios. La adición de ribavirina al interferón no mejora la respuesta. Se demostró que los antivirales directos que bloquean la replicación del HBV no tienen efecto alguno sobre la replicación del HDV. Las combinaciones de interferón más lamivudina o de interferón más adefovir no mejoraron la respuesta, comparándose con el interferón solo (2, 3, 6). Por consiguiente, el tratamiento de hepatitis D crónica sigue siendo una necesidad médica mayor insatisfecha, debido a que el daño hepático inducido por el HDV conduce a cirrosis, descompensación hepática, y en algunos casos, la muerte, debida a falla hepática.

Por consiguiente, es un objeto de la presente divulgación, proporcionar nuevos métodos para el tratamiento de los pacientes infectados con el virus de hepatitis B o el virus de hepatitis Delta, y las enfermedades o trastornos hepáticos inducidos por estas infecciones, tales como hepatitis crónica, cirrosis, descompensación hepática, y HCC.

De una manera sorprendente, hemos encontrado que los inhibidores de ciclofilina, en particular el alisporivir, tienen propiedades antivirales contra el virus de hepatitis B, que se pueden utilizar efectivamente en el tratamiento de infecciones por HBV. En particular, hemos encontrado que el alisporivir aboga (o interfiere con) la replicación del HBV, y reduce la producción del HBsAg en las células hepáticas. Adicionalmente, los inhibidores de ciclofilina, en particular el alisporivir, también se pueden utilizar en el tratamiento de hepatitis D crónica.

De conformidad con lo anterior, la presente invención proporciona nuevos tratamientos anti-HBV y anti-HDV, utilizando alisporivir.

Resumen de la divulgación

Además, se describe lo siguiente:

1.1 Un método para el tratamiento de infecciones con el virus de hepatitis B y de los trastornos inducidos por el HBV en un paciente, que comprende administrar alisporivir a dicho paciente.

1.2 Un método para inhibir la replicación del HBV y la producción del HBsAg, que comprende administrar alisporivir.

5 1.3 Un método para el tratamiento de infecciones por el virus de hepatitis Delta y de los trastornos inducidos por el HDV en un paciente, que comprende administrar alisporivir a dicho paciente.

1.4 Un método para inhibir la replicación del HDV y la producción del HBsAg, que comprende administrar alisporivir.

1.5 Un método para reducir el daño hepático inducido por HBV o HDV, y para reducir la muerte de las células hepáticas, que comprende administrar alisporivir.

10 1.6 Un método para la normalización de los niveles de ALT en el suero, que comprende administrar alisporivir.

1.7 Un método para la reducción o resolución de la inflamación del hígado, que comprende administrar alisporivir.

2. El uso de alisporivir en la preparación de una composición farmacéutica para utilizarse en cualquier método como se definió anteriormente.

15 3. El uso de alisporivir en la preparación de un medicamento para utilizarse en cualquier método como se definió anteriormente.

4. El uso de alisporivir en combinación con un agente antiviral directo que inhibe la replicación del HBV, en la preparación de un medicamento para utilizarse en cualquier método como se definió anteriormente.

5. El uso de alisporivir en combinación con un interferón para el tratamiento de pacientes con infecciones por HBV y enfermedades hepáticas asociadas, y con pacientes infectados con HBV y HDV y enfermedad hepática asociada.

20 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra que se observó una reducción significativa de los niveles intracelulares del ADN de HBV (10 veces en 72 horas) con alisporivir en una concentración de 5 microgramos/mililitro.

25 Como se puede ver en la Figura 2, el alisporivir en una concentración de 5.0 microgramos/mililitro mostró un mayor efecto en la reducción de los niveles del ADN del HBV en los sobrenadantes de cultivo celular cuando se comparó con el efecto del NIM811.

La Figura 3 ilustra la reducción dependiente de dosis del ADN del HBV secretado a partir de las células transitoriamente transfectadas (Huh7) o a partir de las células (HepG2215) establemente transfectadas en la presencia de DEB025.

30 La Figura 4 ilustra las reducciones dependientes de dosis del ADN del HBV citoplásmico en las células Huh7 y HepG2215 en la presencia de DEB025.

La Figura 5 ilustra las reducciones del ADN del HBV secretado en las células HepG2215 en la presencia de DEB025 (DEB), telbivudina (TELB) y DEB + TELB.

La Figura 6 ilustra las reducciones del ADN del HBV celular en las células HepG2215 en la presencia de DEB025 (DEB), telbivudina (TELB) y DEB + TELB.

35 Descripción de la divulgación

Como se utiliza en la presente, un "paciente infectado con el virus de hepatitis B" significa un paciente que está infectado con cualquier genotipo del virus de hepatitis B, por ejemplo, el genotipo A, B, C, D, etc. En algunas realizaciones, el paciente está infectado con el virus de hepatitis Delta. En algunas realizaciones, el paciente infectado por el virus de hepatitis B puede estar infectado también con el virus de hepatitis Delta.

40 En la presente invención, un interferón puede estar pegilado o no pegilado, y puede incluir interferones tales como: Intron-A®, interferón alfa-2b (Schering Corporation, Kenilworth, NJ); PEG-Intron®, peginterferón alfa-2b (Schering

Corporation, Kenilworth, NJ); Roferon®, interferón alfa-2a recombinante (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ); Pegasys®, peginterferón alfa-2a (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ); Bepor®, interferón alfa 2 disponible (Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, CT); Sumiferon®, una mezcla purificada de interferones alfa naturales (Sumitomo, Japón); Wellferon®, interferón linfoblastoide alfa n1 (GlaxoSmithKline); Infergen®, interferón alfa en consenso (InterMune Pharmaceuticals, Inc., Brisbane, CA, y Amgen, Inc., Newbury Park, CA); Alferon®, una mezcla de interferones alfa naturales (Interferon Sciences, y Purdue Frederick Co., CT); Viraferon®; y combinaciones de estos interferones.

Los interferones conjugados que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, Albuferon (Human Genome Science), el cual se conjuga con albúmina humana. El interferón conjugado con un polímero soluble en agua u homopolímeros de poli-óxido de alquileo, tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxi-etilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloque de los mismos. Como una alternativa a los polímeros basados en poli-óxido de alquileo, se pueden utilizar materiales efectivamente no antigénicos, tales como dextrano, polivinil pirrolidonas, poli-acrilamidas, alcoholes poli-vinílicos, polímeros basados en carbohidratos, y similares. Los conjugados de interferón-polímero se describen en las Patentes Números US 4766106, US 4917888, EPA 0 236 987, EPA 0 510 356 y WO 95/13090. Debido a que la modificación polimérica reduce suficientemente las respuestas antigénicas, el interferón extraño no necesita ser completamente autólogo. El interferón utilizado para preparar conjugados poliméricos se puede preparar a partir de un extracto de mamífero, tal como interferón humano, de rumiante, o bovino, o se puede producir de una manera recombinante. Otras formas de interferones incluyen interferón beta, gamma, tau y omega, tales como Rebif (Interferón beta 1a) de Serono, Omniferon (interferón natural) de Viragen, o Interferón Omega por Boehringer Ingelheim. Interferones orales, tales como Interferón alfa oral por Amarillo Biosciences.

Ejemplos adicionales de interferones que se pueden utilizar incluyen interferón-alfa pegilado, por ejemplo, interferón α -2a pegilado, interferón α -2b pegilado, interferón en consenso pegilado o el producto de interferón α purificado pegilado. El interferón α -2a pegilado se describe en la Patente Europea Número 593,868 y comercialmente disponible, por ejemplo, bajo el nombre comercial PEGASYS® (Hoffmann-La Roche). El interferón α -2b pegilado se describe, por ejemplo, en la Patente Europea Número 975,369 y comercialmente disponible, por ejemplo, bajo el nombre comercial PEG-INTRONA® (Schering Plough). El interferón en consenso pegilado se describe en la Publicación Internacional Número WO 96/11953.

En las realizaciones preferidas, el interferón utilizado en los métodos de la invención es el interferón pegilado. En otras realizaciones, el interferón se selecciona del grupo que consiste de interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, un interferón en consenso, un producto de interferón alfa purificado o un interferón-alfa-2a pegilado, interferón-alfa-2b pegilado, e interferón en consenso pegilado, una mezcla de alfa natural y combinaciones de los mismos.

De preferencia los métodos que utilizan interferón-alfa emplean un interferón-alfa-2b pegilado, y la cantidad de interferón-alfa-2b pegilado es de 0.5 a 2.0 microgramos/kilogramo por semana en un programa semanal, tres veces por semana, cada tercer día, o diariamente.

Como se utiliza en la presente, "microgramos/kilogramo" significa microgramos de fármaco por kilogramo de peso corporal del mamífero, incluyendo el hombre, que se vaya a tratar.

Como se utiliza en la presente, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere al tratamiento tanto profiláctico como preventivo, así como al tratamiento curativo o modificador de la enfermedad, incluyendo el tratamiento del paciente que esté en riesgo de contraer la enfermedad o del que se sospeche que ha contraído ya la enfermedad, así como de los pacientes que estén enfermos o que hayan sido diagnosticados por padecer de una enfermedad o afección médica, e incluye la supresión de la recurrencia clínica. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que tenga un trastorno médico, o que finalmente pueda adquirir el trastorno, con el objeto de prevenir, curar, retardar el establecimiento de, reducir la gravedad de, o mitigar uno o más síntomas de, un trastorno o de un trastorno recurrente, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

"Régimen terapéutico" significa el patrón de tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, el patrón de dosificación empleado durante la terapia del HBV. Un régimen terapéutico puede incluir un régimen de inducción y un régimen de mantenimiento.

La frase "régimen de inducción" o "período de inducción" se refiere a un régimen terapéutico (o a la parte de un régimen terapéutico) que se utiliza para el tratamiento inicial de una enfermedad. El objetivo general de un régimen de inducción es proporcionar un alto nivel del fármaco a un paciente durante el período inicial de un régimen de tratamiento. Un régimen de inducción puede emplear (en parte o en todo) un "régimen de carga", el cual puede incluir administrar una dosis mayor del fármaco de la que un médico emplearía durante un régimen de mantenimiento, administrar un fármaco con mayor frecuencia de aquélla con la que un médico administraría el fármaco durante un régimen de mantenimiento, o ambos.

La frase "régimen de mantenimiento" o "período de mantenimiento", se refiere a un régimen terapéutico (o a la parte de un régimen terapéutico) que se utiliza para el mantenimiento de un paciente durante el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, para mantener al paciente en remisión durante largos períodos de tiempo (meses o años). Un régimen de mantenimiento puede emplear una terapia continua (por ejemplo, administrar un fármaco a intervalos regulares, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, anualmente, etc.), o una terapia intermitente (por ejemplo, el tratamiento interrumpido, el tratamiento intermitente, el tratamiento en recurrencia, o el tratamiento después de satisfacer un criterio particular previamente determinado [por ejemplo, dolor, manifestación de la enfermedad, etc.]).

Como se utiliza en la presente, el término "aproximadamente", a menos que el contexto lo dicte de otra manera, se utiliza para significar un intervalo de + ó - 10 por ciento.

En otras realizaciones, el interferón alfa es un interferón alfa-2a pegilado, y la cantidad de interferón alfa-2a pegilado administrada es de 20 a 250 microgramos/kilogramo por semana sobre una base semanal, tres veces por semana, cada dos días, o diaria. De preferencia, el interferón peg-IFN α 2a se administra en una cantidad de 180 microgramos una vez por semana.

En las realizaciones específicas, el interferón de ejemplo utilizado en los métodos de la presente es el interferón seleccionado del grupo que consiste de Intron-A®; PEG-Intron®; Roferon®; Pegasys®; Berefor®; Sumiferon®; Wellferon®; Infergen®; Alferon®; Viraferon®; Albuferon® (Human Genome Science); Rebif®; Omiferon®; Omega, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el alisporivir se utiliza en el tratamiento de la infección con el virus de hepatitis B en un paciente y/o en el tratamiento de la infección con el virus de hepatitis D en un paciente. En todavía otro aspecto, el alisporivir se administra en combinación con un agente antiviral directo o un interferón.

En algunas otras realizaciones, se describe un método para el tratamiento de una infección con el virus de hepatitis B en un paciente, el cual comprende administrar una cantidad efectiva de alisporivir, y opcionalmente administrar al paciente, un interferón o un agente antiviral directo. En todavía otro aspecto, el alisporivir es para utilizarse para mejorar la inflamación del hígado, reducir la muerte de las células hepáticas (como se evalúa por los niveles de ALT), y prevenir el progreso de la enfermedad hepática.

En otra realización, se describe una composición farmacéutica, la cual comprende alisporivir para usarse de acuerdo con cualquiera de los métodos que se dan a conocer en la presente, y un paquete que comprende la composición farmacéutica en combinación con instrucciones para administrar esta composición.

En otra realización, se puede administrar alisporivir con agentes adicionales del estándar de atención que promuevan la eficacia antiviral de la terapia de tratamiento.

Como se utiliza aquí, agente antiviral directo significa agentes que interfieren con etapas específicas en el ciclo de la replicación del virus de hepatitis B (HBV). Un agente antiviral directo que inhibe la replicación del HBV puede ser, por ejemplo, cualquiera de los agentes contra el virus de hepatitis B (anti-HBV) actualmente aprobados para el tratamiento del virus de hepatitis B (HBV), es decir, telbivudina, lamivudina, emtricitabina, entecavir, adefovir y tenofovir.

En el tratamiento descrito anteriormente, se administran dosificaciones efectivas de los agentes del estándar de atención en las composiciones, es decir, se pueden administrar juntos (es decir, de una manera simultánea), pero también se pueden administrar por separado o en secuencia. En general, la terapia de combinación típicamente se administra en forma conjunta, siendo el razonamiento que esta administración simultánea induce múltiples tensiones simultáneas sobre el virus. Las dosificaciones específicas dadas dependerán de la velocidad de absorción, inactivación y excreción de los fármacos, así como de otros factores. Se debe observar que los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Los términos "coadministración" o "administración combinada" o "administrado en combinación con", o similares, como se utilizan en la presente, pretenden abarcar la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un solo paciente, y se pretende que incluyan los regímenes de tratamiento en donde los agentes no necesariamente se administran por la misma vía de administración o al mismo tiempo. Las combinaciones fijas están también dentro del alcance de la presente divulgación. La administración de una combinación farmacéutica de la divulgación da como resultado un efecto beneficioso, por ejemplo, un efecto terapéutico sinérgico o aditivo, comparándose con una mono-terapia que aplique solamente uno de sus ingredientes farmacéuticamente activos, o comparándose con la terapia del estándar de atención actual. El tratamiento utilizado en los métodos descritos en la presente, se puede administrar mediante cualquier vía convencional. Uno o más componentes se pueden administrar parenteralmente, por ejemplo, en la forma de soluciones o suspensiones inyectables, o en la forma de formulaciones de depósito inyectables. De preferencia, el alisporivir se administrará oralmente en la forma de cápsulas, comprimidos, o soluciones o suspensiones para beber. Las composiciones farmacéuticas para su administración oral, las cuales comprenden alisporivir, típicamente comprenden además una o más sustancias portadoras farmacéuticamente aceptables.

Típicamente, estas composiciones están concentradas y se necesitan combinar con un diluyente apropiado, por ejemplo, agua, antes de que sean administradas. Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral típicamente también incluyen uno o más excipientes. Los excipientes opcionales incluyen un agente isotónico, un regulador u otro agente de control del pH, y un conservante. Estos excipientes se pueden agregar para el mantenimiento de la composición y para obtener los intervalos preferidos de pH (de aproximadamente 6.5 a 7.5) y de osmolaridad (aproximadamente 300 mosm/L).

La administración de alisporivir, como se describe en la presente, está en la forma de una sola dosis o en más de una forma de dosificación; se pueden administrar una o más formas de dosificación oral una vez al día. En algunas realizaciones, el alisporivir se administra en dosis de 200 miligramos a 1000 miligramos.

La eficacia del régimen de terapia se puede supervisar utilizando los protocolos convencionales. El tratamiento puede estar seguido por determinaciones de los niveles en suero del HBV y la medición de los niveles de ALT en suero. Por ejemplo, los pacientes se pueden evaluar para determinar la presencia del ADN del HBV en su suero. El ADN del HBV (IU/mL) se puede medir a intervalos regulares durante el tratamiento, por ejemplo, en el día 1 (antes de la dosis y 4, 8, y 12 horas después de la dosis), y antes de la dosis en el día 2, día 3, día 8, día 15, día 29, y en la semana 12, semana 24, semana 36, semana 48, semana 72 (cuando sea aplicable), y en el seguimiento.

La eficacia de la terapia se supervisará utilizando los parámetros internacionalmente aceptados (2, 3, 4):

1.1 Supervisión de la respuesta en los pacientes con el virus de hepatitis B

a) Los niveles del ADN del HBV en suero se supervisaron utilizando ensayos sensibles cuantitativos basados en (PCR) para evaluar el efecto sobre la replicación viral.

b) En los pacientes positivos para el HBeAg – el HBeAg se supervisó junto con el anti-HBe correspondiente para determinar si se presentó la seroconversión de HBe.

c) Se supervisarán los niveles en suero de ALT y/o AST para evaluar el impacto sobre la inflamación del hígado y la muerte de las células hepáticas.

d) Se supervisa el HBsAg en suero – cualitativamente y cuantitativamente, debido a que la eliminación del HBsAg indicaría un resultado óptimo del tratamiento.

e) El desarrollo de mutaciones en el genoma del HBV que confieran resistencia al tratamiento empleado.

1.2 Supervisar la respuesta en los pacientes con el virus de hepatitis Delta. Además de los marcadores anteriormente enumerados para la infección por HBV, se utilizará la siguiente prueba específica para el HBV:

a) Se supervisaron los niveles de ARN del virus del HDV en suero, con el fin de evaluar el efecto sobre la replicación del virus de hepatitis Delta.

b) La detección del antígeno Delta mediante inmuno-histoquímica en el tejido hepático puede proporcionar información adicional que indique la replicación continua del HDV.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención descrita anteriormente en la presente.

EJEMPLOS

Diseño experimental y estirpes celulares humanas:

Los experimentos utilizaron varias estirpes celulares derivadas de hepatoma humano, que se han establecido como modelos para los estudios *in vitro* sobre el ciclo de vida del virus de hepatitis B o del virus de hepatitis Delta, y para evaluar el impacto de los diferentes compuestos sobre la replicación viral y la producción de proteína viral – HepG2 y HuH-7 (negativas para el HBV, PLC/PRF/5 (positivas para el HBV, produciendo solamente el HBsAg), y HepG2.2.15 (positivas para el HBV, que soporta la replicación completa del HBV).

A) Investigación de las actividades antivirales de los inhibidores de ciclofilina, en particular DEB025 (Alisporivir), sobre la replicación del virus de hepatitis B y la producción del HBsAg.

Estirpe celular HepG2215, derivada de las células HepG2, se transfectó establemente con el ADN del HBV y soportó la replicación completa del HBV con la producción de viriones infecciosos y el HBsAg. Las células HepG2215 se

cultivaron en placas de 12 pozos, como se describe anteriormente (7, 8), durante 7 días, antes de agregar los inhibidores de ciclofilina.

Las células se trataron con 0.25, 1.0 ó 5.0 microgramos/mL de NIM811 ó DEB025; las células y los sobrenadantes se cosecharon por separado en valores iniciales, 6, 24, 48 y 72 horas después de la adición de NIM811 ó DEB025, respectivamente.

Para evaluar la función de la ciclofilina A en la replicación del HBV, las células HepG2215 se transfectaron con el siARN, para la ciclofilina A, y se incubaron con el medio solamente o con la adición de NIM811 ó DEB025. De una manera similar, se evaluará la función de la Ciclofilina B, C, y D en la replicación del HBV y del HDV mediante el siARN específico para CypB, C y D.

Las células HuH-7 se transfectaron con un plásmido que contenía un vector pBlueScript KS(+); se utilizaron genomas de ADN del HBV 1.5 del subtipo adw2. Las células HuH-7 subconfluentes se transfectaron con 5 microgramos del ADN de plásmido por cada plato de 60 milímetros de diámetro, utilizando 10 microlitros del reactivo Superfect (Qiagen, Crawley, RU). Los sobrenadantes fueron reemplazados 18 horas después de la transfección, con medio complementado con FCS al 10 por ciento, y las células se cultivaron durante 3 días, como se describió (7).

Las células PLC/PRF/5 (estirpe celular Alexander) contienen el fragmento integrado de ADN del HBV, y producen solamente el HBsAg, pero no soportan la replicación completa del HBV (9). Esto es análogo a los hepatocitos en los pacientes que son portadores inactivos del HBsAg (es decir, la fase no replicativa de la infección crónica por HBV). Esta estirpe celular se empleó para evaluar específicamente el impacto de los inhibidores de ciclofilina sobre la producción del HBsAg separada de la producción del virión completo.

Resultados

1) Figura 1: Ambos inhibidores de ciclofilina NIM811 y DEB025 redujeron los niveles intracelulares del ADN del HBV asociado con el nucleocápsido del HBV. La reducción del ADN del HBV fue de entre 2 y 10 veces, comparándose con las células HepG2215 en ausencia de NIM811 ó DEB025. La reducción más pronunciada de los niveles intracelulares del ADN del HBV (10 veces en 72 horas) se observó con DEB025 (5 microgramos/mL), la cual fue mayor que la reducción observada con NIM811 a las 72 horas.

2) Figura 2: El DEB025 (en 5.0 microgramos/mL) mostró un mayor efecto para reducir los niveles del ADN HBV en los sobrenadantes del cultivo celular, cuando se comparó con el efecto del NIM811.

B) Investigación de las actividades antivirales de los inhibidores de ciclofilina, en particular DEB025 (Alisporivir), sobre la replicación del virus de hepatitis Delta.

La infección con el virus de hepatitis Delta (HDV) siempre está asociada con la presencia del virus auxiliar - el virus de hepatitis B (HBV). La base para esta dependencia es que se requieren las proteínas de envoltura del HBV tanto para que el HDV entre en los hepatocitos, como para el ensamble de las nuevas partículas del HDV. Una vez que está dentro de una célula susceptible, el genoma de ARN circular de una sola cadena del HDV se puede replicar mediante la síntesis del ARN dirigida al ARN, utilizando la re-dirección de una polimerasa de ARN anfitriona. *In vitro*, es posible estudiar el genoma del HDV en estirpes celulares cultivadas en ausencia del HBV auxiliar. Por ejemplo, la replicación se inicia cuando las células se transfectan con una versión de ADNc de la secuencia del HDV (10). Además, se puede satisfacer esta necesidad mediante la co-transfección del ARN del HDV junto con un ARNm para el δ Ag (11).

C) Investigación de las actividades antivirales de los inhibidores de ciclofilina, en particular DEB025 (Alisporivir) en combinación con una polimerasa de ADN del HBV de dirección anti-viral directa (telbivudina), sobre la replicación del virus de hepatitis B.

Las células establemente transfectadas (HepG2215), y las células (HUH-7) transitoriamente transfectadas, que producen los viriones completos del HBV y las partículas del HBsAg, se trataron con una gama de concentraciones de Alisporivir (0.25, 1.0, 5.0 ó 20 microgramos/ml) solo, telbivudina sola, o combinaciones de Alisporivir y telbivudina. Para determinar el involucramiento de las ciclofilinas individuales, las células HepG2215 se transfectaron con el siARN específico para la ciclofilina (Cyp) A, C ó D, y se trataron adicionalmente con Alisporivir. Los extractos citoplásmicos y los sobrenadantes se cosecharon en valores iniciales, 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. La cinética de la actividad antiviral se evaluó mediante la cuantificación del ADN del HBV intracelular y secretado (qPCR en tiempo real), y de los niveles del HBsAg (ELISA).

Tanto en las células HepG2215 como en las células HUH-7, el tratamiento con Alisporivir dio como resultado una reducción dependiente de dosis del ADN del HBV intracelular y secretado en todos los puntos del tiempo, con el 70 por ciento ($p = 0.004$) y el 63 por ciento ($p < 0.001$), respectivamente, comparándose con los controles no tratados.

La combinación de Alisporivir y telbivudina tuvo mayores efectos para reducir el ADN del HBV intracelular ($p = 0.001$) y secretado ($p = 0.028$), y >3 veces la reducción del HBsAg contra cualquiera de Alisporivir o telbivudina solos. La expresión de CypA, C o D se redujo notoriamente después de la transfección con el siARN correspondiente, la cual estuvo asociada con una disminución significativa de los niveles del ADN del HBV y del HBsAg ($p < 0.001$). El tratamiento con Alisporivir de las células inactivas para CypA, C o D redujo adicionalmente los niveles del ADN del HBV y del HBsAg, siendo mayores los efectos antivirales en las células inactivas para CypC o CypD, comparándose con las células inactivas para CypA ($p < 0.001$).

Estos resultados sugieren que el Alisporivir interfiere con múltiples sitios de la replicación del HBV, y su actividad antiviral es sinérgica con la polimerasa de ADN viral de dirección antiviral directa, tal como telbivudina.

1. Cultivo celular y transfección.

La estirpe celular de hepatoma humano HuH7 se cultivó en un medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero bovino fetal al 10 por ciento, penicilina, y estreptomycin, y se incubó a 37°C en CO₂ al 5 por ciento, como se describe anteriormente (12). Para los estudios de transfección, los cultivos celulares se sembraron durante la noche en placas de seis pozos o cajas de Petri de 60 milímetros de diámetro, y se transfecaron con 5 y 10 µg, respectivamente, de mezclas de 50:50 de ARNm de HDAg y ARN del virus del HDV (1.2 veces la longitud del genoma), utilizando el reactivo DMRIE-C (Gibco BRL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego de la transfección, los cultivos se incubaron durante la noche, se cambió el medio, y se continuó la incubación durante hasta 2 a 7 días adicionales.

2. Cuantificación del ADN del HBV en el citoplasma y en los sobrenadantes celulares

Se evaluó la replicación del virus de HBV mediante la cuantificación tanto del ADN del HBV asociado con el nucleocápsido viral (citoplásmico), como de los niveles del ADN del HBV en los sobrenadantes del cultivo celular, como se describió anteriormente (8, 9). El ADN del HBV del nucleocápsido se extrajo y se cuantificó mediante (PCR) en tiempo real TaqMan (ABI Prism 7700). El ADN del HBV intracelular se normalizó con b-actina como un gen de mantenimiento. El ADN del HBV secretado se extrajo con el mini-kit de ADN QIAmp (Qiagen, Sussex, (RU), y también se cuantificó mediante TaqMan. La sensibilidad de la cuantificación del ADN del HBV se verificó en cada prueba con diluciones en serie del plásmido de ADN del HBV, así como del estándar del ADN de HBV EuroHep, como se describe (9, 10).

3. Cuantificación del HBsAg.

Se cuantificaron los niveles del antígeno superficial pequeño del HBsAg en los sobrenadantes del cultivo celular (a partir de las células 2215 y PLC/PRF/5) con ELISA (Abazyme, Needham, MA), utilizando diluciones en serie de cantidades conocidas del HBsAg (9).

4. Transfección del siARN

Las células HepG2215 se sembraron con los siARN (Dharmacon Inc., Lafayette, CO) en una densidad del 50 por ciento, y se incubaron durante 48 horas. Posteriormente, las células se lavaron, y se agregaron NIM811 ó DEB025 (BL). Las muestras celulares y del sobrenadante se recolectaron a las 6 horas, a las 24 horas (el medio fue reemplazado), y a las 48 horas. El ADN total se extrajo de las muestras, y se cuantificó el ADN del HBV mediante PCR en tiempo real, como se hizo anteriormente. El ARN total se extrajo con fenol, cloroformo. El ARN se transcribió inversamente con el kit de transcripción inversa Quantitect (Qiagen), y el ADNc se cuantificó con el kit SYBR Green Quantitect utilizando cebadores Quantitect (Qiagen, Sussex, RU).

5. Análisis de inmunotransferencia para el HBsAg.

Después de 48 horas, las células (células PLC/PRF/5 ó HepG2215) se someten a tripsinización, y se lavaron dos veces en suero regulado con fosfato, y se volvieron a suspender en regulador de lisis. La presencia de la IgG humana y del HBsAg en las células PLC/PRF/5 se analizó mediante Western blot en las células cultivadas en presencia o en ausencia de la IgG monoclonal anti-HBs, como se describe (7).

6. Transcripción *in vitro* para el ARN de hepatitis Delta.

Los ARN del HDV de 1.2 veces la longitud del genoma, se transcriben a partir de los plásmidos pBS81.2G, pBS51.2AG, pBS51.2G(2xS), y pBS81.2AG(2xS) con los kits T7 MEGAscript (Ambion) después de la linearización con la enzima de restricción *NotI*, como se describió anteriormente (13). El ARNm tapado para el HDAg se transcribe a partir del plásmido pX9-I/II después de la linearización con *HindIII*, utilizando un kit T7 m-Message m-Machine (Ambion). Los ARN del HDV genómico y antígenómico del monómero no marcado, se transcriben a partir de pTMδSalA y pTMδSalB con el T7 MEGAscript después de la linearización mediante digestión con *PstI*.

7. Análisis Northern del ARN del HDV.

El ARN viral de los inóculos y sueros se purificó utilizando un minikit de ARN Viral QIAamp (QIAGEN, Valencia, Calif.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (14, 15). Entonces se incuban diversas cantidades de ARN a 55°C durante 50 minutos en la presencia de glioxal 1.9 M (Fisher Scientific, Fair Lawn, N.J.), fosfato de sodio 7.1 mM (pH de 6.8), EDTA 4.5 mM - DMSO al 35 por ciento. Las muestras se cargan entonces sobre un gel de agarosa al 1.5 por ciento que contiene fosfato de sodio 10 mM, pH de 6.8, y se someten a electroforesis durante 4 horas a 150 mA. Para los sobrenadantes, se utiliza la mitad del ARN, mientras que para el ARN celular, se cargan 5 microgramos. Los ARN se transfieren capilarmente durante la noche a membranas Zeta-Probe (Bio-Rad, Richmond, Calif.). Después de la transferencia, la membrana se hornea o bien se retícula con UV utilizando un Stratalinker (Stratagene). La transferencia se hibridó tal como se describió con detalle (15). Después de la hibridación, la transferencia se lava a 70°C con 400 ml de 2x SSPE-SDS al 0.1 por ciento, entonces con 400 ml de 1x SSPE-SDS al 0.1 por ciento, y entonces con 200 ml de 0.1x SSPE-SDS al 0.1 por ciento. La membrana se secó a 70°C y se sometió a autoradiografía y análisis de imágenes de fósforo (phosphorimager) (Molecular Dynamics).

8. Cuantificación del PCR en tiempo real en muestras de suero (como se describió anteriormente (16)).

Los ARN del HDV se extraen a partir de 250 µl de suero o plasma mediante el uso de una aspiradora de virus QIAamp MinElute (QIAGEN, Courtabœuf, Francia). Los ADNc se sintetizan como se describió anteriormente, y se purifican con dispositivos de filtro centrífugos de PCR Montage (Millipore, Molsheim, Francia).

El cebador primario se selecciona para dirigirse hacia la región de la ribozima del genoma, y el cebador inverso se dirige hacia la región I de la ribozima del antígeno. La sonda, la cual se hibrida en la misma región que el cebador inverso, se diseña para empalmarse a la secuencia antígenica, con el objeto de evitar el emparejamiento de bases con el cebador inverso. Los nombres y las secuencias de los cebadores y la sonda son como sigue: Delta-F (cebador primario), 5'-GCATGGTCCCAGCCTCC-3'; Delta-R (cebador inverso), 5'-TCTTCGGGTCGGCATGG-3'; y Delta-P (sonda), 5'-FAM-ATGCCAGGTCGGAC-MGB-3'. Debido a la existencia de un emparejamiento incorrecto con las secuencias de los genomas HDV-3, se diseña específicamente el siguiente segundo cebador directo para la amplificación de los aislados de HDV-3: T3-Delta-F, 5'-GCATGGCCCCAGCCTCC-3'. Se llevan a cabo PCR en tiempo real, utilizando la mezcla maestra de PCR TaqMan Universal (Applied Biosystems, Courtabœuf, Francia). La reacción consiste en una etapa de inicio de 2 minutos a 50°C, seguido por 10 minutos a 95°C, y entonces 45 ciclos de amplificación incluyendo 15 s a 95°C y 1 minuto a 60°C. Las reacciones, la adquisición de datos, y los análisis se llevan a cabo con el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Courtabœuf, Francia).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

<120> Tratamiento para Infección con el Virus de Hepatitis B solo o en Combinación con el Virus de Hepatitis Delta y Enfermedades Hepáticas Asociadas

<130> PAT054611-EP-EPT

<140> PCT/EP2012055857

<141> 2012-03-30

<150> US 61/470,666

<151> 2011-04-01

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 1

gcatgggtccc agcctcc 17

5 <210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cebador

<400> 2

tcttcgggtc ggcattg 17

<210> 3

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 3

20 atgcccag gtcggac 15

<210> 4

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Cebador

<400> 4

gcatggcccc agcctcc 17

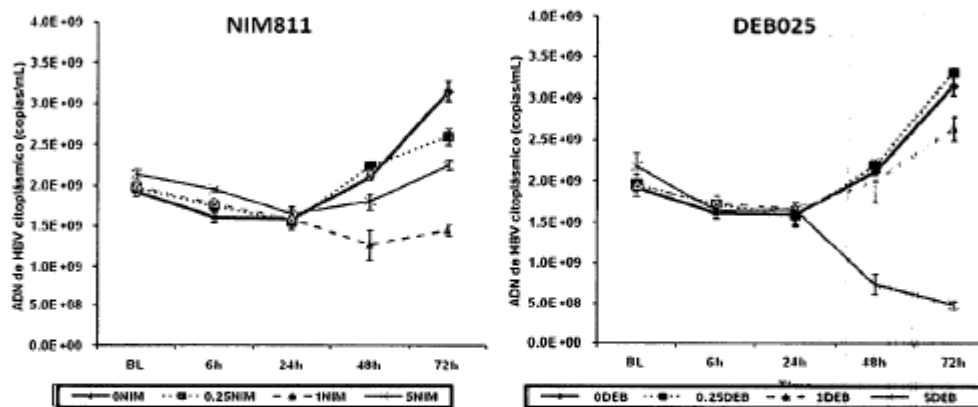
Referencias:

30 1. Naoumov NV. Hepatitis virus (excluding hepatitis C virus). Oxford Textbook of Medicine, 5a. Edición, Editores D. Warrell, T. Cox, J. Firth, Oxford University Press, 2010, Volumen 1: 609-615.

2. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50: 227-242.
3. Lok A, McMahon B., Chronic Hepatitis B: Update 2009. AASLD Practice Guidelines. *Hepatology* 2009; 50 (3): 1-36.
- 5 4. Liaw Y-F y colaboradores, Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. *Hepatol Int* 2008.
5. Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010; 7(1): 31-40.
6. Wedemeyer H et al., Peginterferon plus adefovir versus either drug for hepatitis delta. *N Engl J Med*. 2011; 364(4): 322-31.
- 10 7. R. Schilling et al. Endocytosis of hepatitis B immune globulin into hepatocytes inhibits the secretion of hepatitis B virus surface antigen and virions. *J Virol*. 2003; 77: 8882-92.
8. S. Phillips et al., CD8(+) T cell control of hepatitis B virus replication: direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions. *J Immunol*. 2010; 184: 287-95.
- 15 9. A. Neumann et al., Novel mechanism of antibodies to hepatitis B virus in blocking viral particle release from cells. *Hepatology* 2010; 52: 875-85.
10. Chao, M., S.-Y. Hsieh, y J. Taylor. 1990. Role of two forms of the hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J. Virol*. 64: 5066-5069.
11. Modahl, L. E., y M. M. C. Lai. 1998. Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and regulation. *J. Virol*. 72: 5449-5456.
- 20 12. Macnaughton TB, Lai M. Hepatitis Delta Virus RNA Transfection for the Cell Culture Model Methods in Molecular Medicine, 2004, Volumen 96, II, 351-357, DOI: 10.1385/1-59259-670-3: 351
13. Macnaughton, TB et al., Rolling Circle Replication of Hepatitis Delta Virus RNA is carried out by Two Different Cellular RNA Polymerases, *J Virol*. 2002; 76(8): 3920–3927.
- 25 14. Dingle, K., V. Bichko, H. Zuccola, J. Hogle, y J. Taylor. 1998. Initiation of hepatitis delta virus genome replication. *J. Virol*. 72: 4783-4788.
15. Bruno B. et al. A Prenylation Inhibitor Prevents Production of Infectious Hepatitis Delta Virus Particles *J Virol*. 2002; 76(20): 10465–10472.
- 30 16. Le Gal, F et al. Quantification of Hepatitis Delta Virus RNA in Serum by Consensus Real-Time PCR Indicates Different Patterns of Virological Response to Interferon Therapy in Chronically Infected Patients, *J Clin Microbiol*. 2005; 43(5): 2363–2369.

REIVINDICACIONES

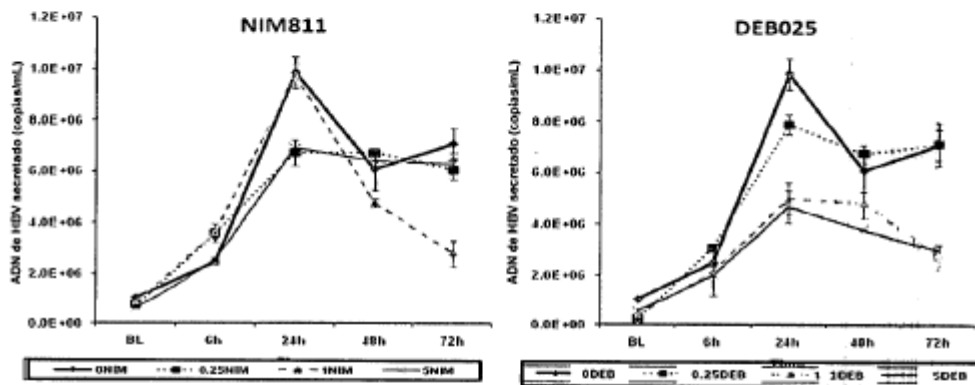
1. Alisporivir para utilizarse en el tratamiento de la infección por el virus de hepatitis D en un paciente.
2. Alisporivir para utilizarse de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el alisporivir se administra en combinación con un agente antiviral directo.
- 5 3. Alisporivir para usarse de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente antiviral directo se selecciona del grupo que consiste esencialmente de telbivudina, lamivudina, emtricitabina, entecavir, adefovir y tenofovir.
4. Alisporivir para usarse de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende administrar una cantidad efectiva de alisporivir, y opcionalmente administrar al paciente, un interferón o un agente antiviral directo.



Efecto de NIM811 y DEB025 sobre el ADN de HBV en células HepG2215.

Los niveles intracelulares del ADN de HBV disminuyeron durante el tratamiento con NIM811 o DEB025. Los datos mostrados son los valores promedio ($\pm$ SEM) de dos experimentos independientes. El medio de cultivo celular fue reemplazado a las 24 horas y a las 48 horas.

FIG. 1

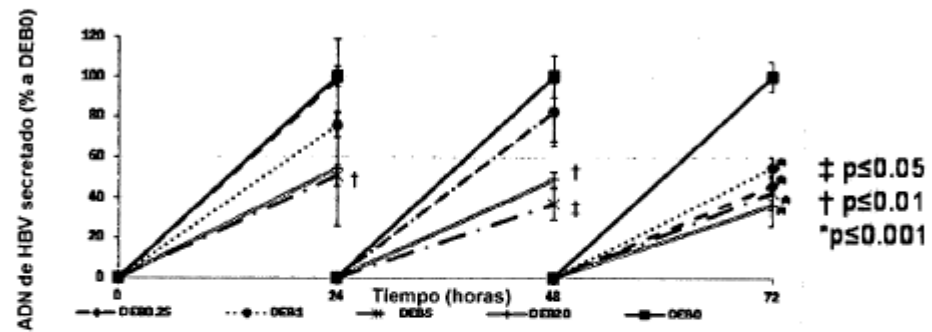


Efecto de NIM811 y DEB025 sobre los niveles del ADN de HBV en los sobrenadantes del cultivo celular.

Los niveles del ADN de HBV secretado disminuyeron durante el tratamiento de las células HepG2215 con NIM811 o DEB025. Los datos mostrados son los valores promedio ($\pm$ SEM) de dos experimentos independientes. El medio de cultivo fue reemplazado a las 24 horas y a las 48 horas.

FIG. 2

ADN de HBV secretado por Huh7 en la presencia de DEB025



ADN de HBV secretado por HepG2215 en la presencia de DEB025

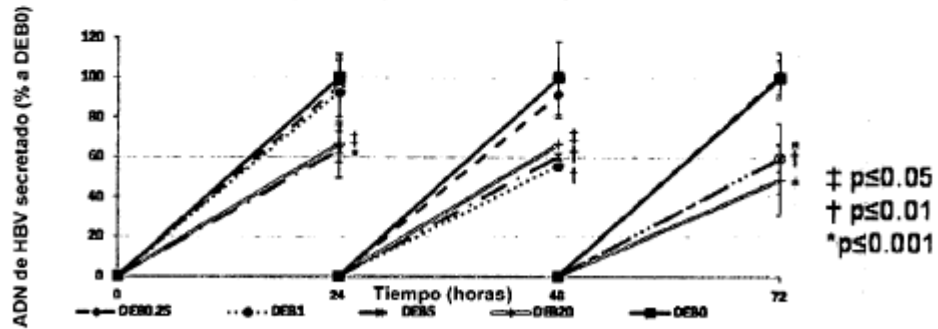
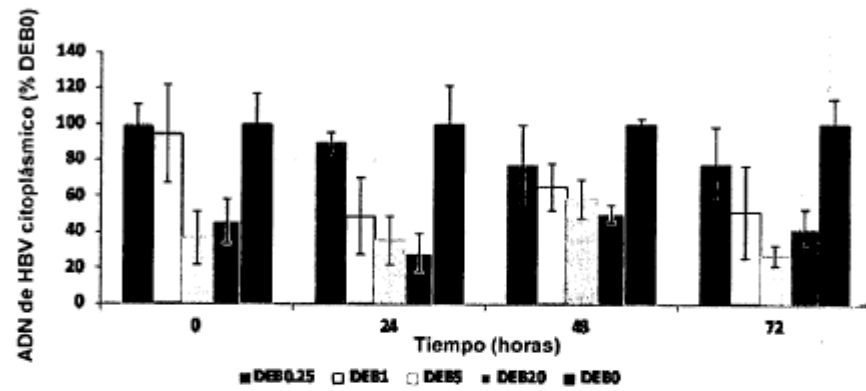


FIG. 3

ADN de HBV citoplásmico de Huh7 en la presencia de DEB025



ADN de HBV citoplásmico de HepG2215 en la presencia de DEB025

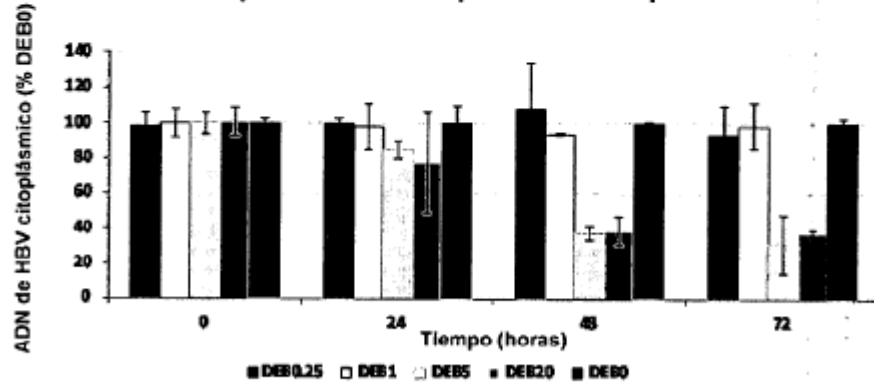
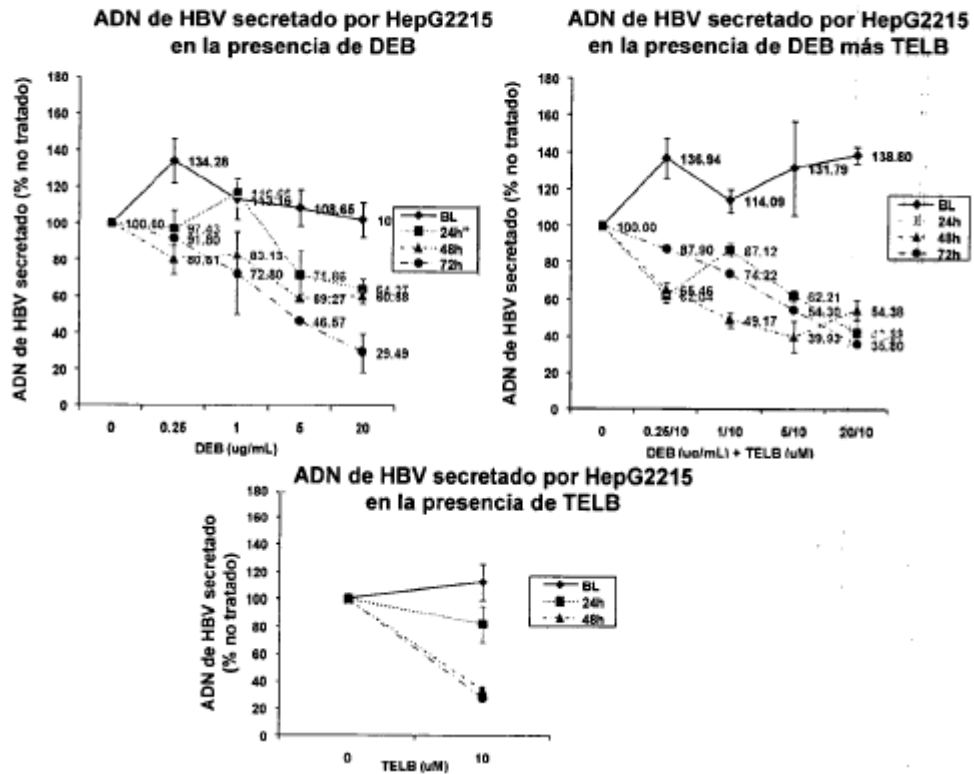
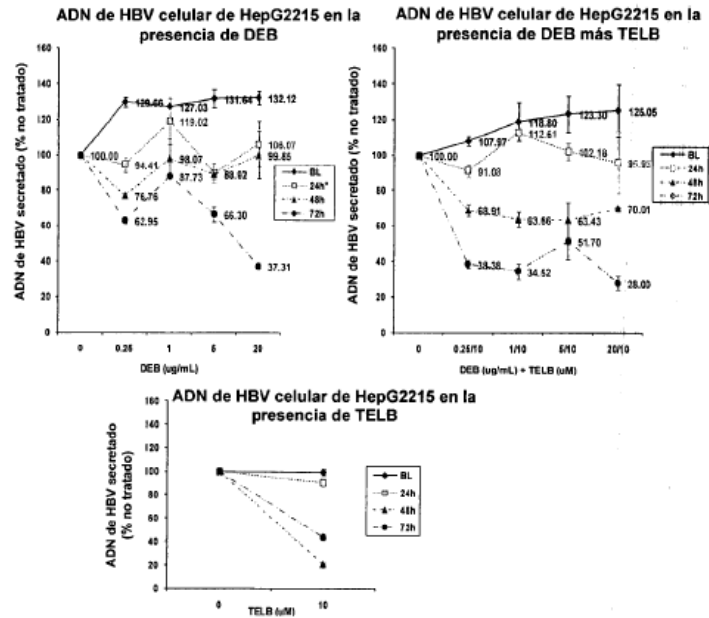


FIG. 4



- La combinación de DEB025 (DEB) y Telbivudina (TELB) tiene un mayor efecto en los puntos del tiempo tempranos (24 horas y 48 horas) en comparación con el DEB025 solo.
- La reducción del ADN de HBV secretado es mayor a partir de las células tratadas con 0.25, 1 y 5 µg/ml de DEB en combinación con TELB, comparándose con el DEB025 solo.

FIG. 5



La combinación de DEB025 (DEB) y Telbivudina (TELB) tuvo un mayor efecto antiviral comparándose con el DEB025 solo - a las 48 horas y a las 72 horas, la combinación indujo una mayor disminución del ADN de HBV intracelular.

FIG. 6