

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 353**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7052 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2003 PCT/US2003/036714**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2004 WO04046331**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2003 E 03796412 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 1576138**

54 Título: **2'-Metil nucleósidos en combinación con interferón y mutación de Flaviviridae**

30 Prioridad:

15.11.2002 US 426675 P

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

13.07.2017

73 Titular/es:

IDENIX PHARMACEUTICALS LLC (50.0%)

320 Bent Street

Cambridge, MA 02141, US y

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI (50.0%)

72 Inventor/es:

SOMMADOSSI, JEAN-PIERRE;

LA COLLA, PAOLO;

STANDRING, DAVID;

BICHKO, VADIM y

QU, LIN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 624 353 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

2'-Metil nucleósidos en combinación con interferón y mutación de *Flaviviridae*

La presente solicitud reivindica la prioridad con respecto a la solicitud provisional de EE.UU. n.º 60/426.675, presentada el 15 de noviembre de 2002.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona el uso en un método de tratamiento de la infección por *Flaviviridae* en un hospedador, tal como un ser humano, que necesita dicha terapia, de un nucleósido de 2'-metilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con interferón, que inducen de manera directa o indirecta una mutación en un *Flaviviridae* en una ubicación distinta de una mutación de un nucleósido que genera un cambio de serina a un aminoácido diferente en la secuencia de consenso altamente conservada, XRXSGXXT, del dominio B de la región de la ARN polimerasa. La invención también incluye un método de detección de una cepa mutante de *Flaviviridae*, y kits y materiales para dicha detección.

Antecedentes de la invención

La familia de virus *Flaviviridae* comprende al menos tres géneros distintos: los pestivirus, que causan enfermedades en vacas y cerdos; los flavivirus, que son la causa principal de enfermedades tales como la fiebre del dengue y la fiebre amarilla; y los hepacivirus, cuyo único miembro es el VHC. El género *Flavivirus* incluye más de 68 miembros separados en grupos basándose en la relación serológica (Calisher *et al.*, *J. Gen. Virol.*, **1993**, *70*, 37-43). Los síntomas clínicos varían e incluyen fiebre, encefalitis y fiebre hemorrágica ("Fields Virology", editores: Fields, B. N., Knipe, D. M. y Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, Pensilvania, **1996**, capítulo 31, 931-959). Los flavivirus de preocupación global que están asociados con enfermedades humanas incluyen el virus de la fiebre hemorrágica del dengue (FHD), el virus de la fiebre amarilla, el virus del Nilo Occidental, el síndrome de shock y el virus de la encefalitis japonesa (Halstead, S. B., *Rev. Infect. Dis.*, **1984**, *6*, 251-264; Halstead, S. B., *Science*, *239*:476-481, 1988; Monath, T. P., *New Eng. J. Med.*, **1988**, *319*, 641-643).

El género pestivirus incluye el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV, también denominado virus del cólera porcino) y el virus de la enfermedad de la frontera (BDV) de las ovejas (Moennig, V. *et al. Adv. Vir. Res.* **1992**, *41*, 53-98). Las infecciones por pestivirus del ganado (vacas, cerdos y ovejas) causan importantes pérdidas económicas a nivel mundial. El BVDV causa la enfermedad de la mucosa en las vacas y es de una gran importancia económica para la industria del ganado (Meyers, G. y Thiel, H.-J., "Advances in Virus Research", **1996**, *47*, 53-118; Moennig V., *et al. Adv. Vir. Res.* **1992**, *41*, 53-98). Los pestivirus humanos no se han caracterizado tan extensivamente como los pestivirus animales. Sin embargo, hay sondeos serológicos que indican la exposición considerable de los pestivirus en los seres humanos.

Los pestivirus y los hepacivirus son grupos de virus estrechamente relacionados dentro de la familia *Flaviviridae*. Otros virus estrechamente relacionados de esta familia incluyen los virus GB de tipo A, agentes de tipo virus GB de tipo A, virus GB de tipo B y virus GB de tipo C (también denominados virus G de la hepatitis, HGV). El grupo de los hepacivirus (virus de la hepatitis C; (VHC) consiste en un número de virus estrechamente relacionados, pero diferenciables genotípicamente que infectan a los seres humanos. Hay aproximadamente 6 genotipos del VHC y más de 50 subtipos. El VHC es una causa principal de hepatitis a nivel global. La mayoría de las infecciones por VHC se vuelven persistentes, y aproximadamente el 75 % de los casos desarrolla la enfermedad hepática crónica. La infección por VHC crónica puede conducir al desarrollo de cirrosis, carcinoma hepatocelular e insuficiencia hepática. Debido a las similitudes entre los pestivirus y los hepacivirus, combinadas con la poca habilidad de los hepacivirus para crecer de manera eficaz en los cultivos celulares, se suele usar el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) como sustituto para estudiar el virus VHC.

La organización genética de los pestivirus y los hepacivirus es muy parecida. Estos virus de ARN de cadena positiva poseen un solo marco de lectura abierto (ORF) de gran tamaño que codifica todas las proteínas víricas necesarias para la replicación vírica. Estas proteínas son expresadas como una poliproteína que es procesada durante y después de la traducción por proteinasas codificadas tanto por células como por virus para producir las proteínas víricas maduras. Las proteínas víricas responsables de la replicación del genoma de ARN vírico están ubicadas dentro de aproximadamente los dos tercios carboxi-terminales del ORF, y se denominan proteínas no estructurales (NS). La organización genética y el procesamiento de la poliproteína de la parte de proteína no estructural del ORF para los pestivirus y los hepacivirus son muy similares. Tanto para los pestivirus como para los hepacivirus, las proteínas maduras no estructurales (NS), en orden secuencial desde el extremo amino-terminal de la región de codificación de la proteína no estructural hasta el extremo carboxi-terminal del ORF, consisten en p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

Las proteínas NS de los pestivirus y los hepacivirus comparten los dominios de secuencia que son característicos de las funciones de las proteínas específicas. Por ejemplo, las proteínas NS3 de los virus de ambos grupos poseen motivos de secuencia de aminoácidos característicos de las serina proteinasas y de las helicasas (Gorbalenya *et al.* (1988) *Nature* 333:22; Bazan y Fletterick (1989) *Virology* 171:637-639; Gorbalenya *et al.* (1989) *Nucleic Acid Res.* 17:3889-3897). Del mismo modo, las proteínas NS5B de los pestivirus y los hepacivirus tienen los motivos

característicos de las ARN polimerasas dirigidas por el ARN (Koonin, E. V. y Dolja, V. V. (1993) *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 28:375-430).

Además, los papeles y las funciones reales de las proteínas NS de los pestivirus y los hepacivirus en el ciclo de la vida de los virus son directamente análogos. En ambos casos, la serina proteinasa NS3 es responsable de todo el procesamiento proteolítico de los precursores de la poliproteína cadena abajo de su posición en el ORF (Wiskerchen y Collett (1991) *Virology* 184:341-350; Bartenschlager *et al.* (1993) *J. Virol.* 67:3835-3844; Eckart *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 192:399-406; Grakoui *et al.* (1993) *J. Virol.* 67:2832-2843; Grakoui *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:10583-10587; Hijikata *et al.* (1993) *J. Virol.* 67:4665-4675; Tome *et al.* (1993) *J. Virol.* 67:4017-4026). La proteína NS4A, en ambos casos, actúa como un cofactor con la serina proteasa NS3 (Bartenschlager *et al.* (1994) *J. Virol.* 68:5045-5055; Failla *et al.* (1994) *J. Virol.* 68:3753-3760; Lin *et al.* (1994) 68:8147-8157; Xu *et al.* (1997) *J. Virol.* 71:5312-5322). La proteína NS3 de ambos virus también funciona como una helicasa (Kim *et al.* (1995) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 215: 160-166; Jin y Peterson (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, 323:47-53; Warrener y Collett (1995) *J. Virol.* 69:1720-1726). Finalmente, las proteínas NS5B de los pestivirus y los hepacivirus tienen la actividad predicha de ARN polimerasas dirigida por el ARN. (Behrens *et al.* (1996) *EMBO J.* 15:12-22; Lchmann *et al.* (1997) *J. Virol.* 71:8416-8428; Yuan *et al.* (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 232:231-235; Hagedorn, documento PCT WO 97/12033; Zhong *et al.*, (1998) *J. Virol.* 72.9365-9369).

Los ejemplos de agentes antivíricos que se han identificado como agentes activos contra la familia de virus *Flaviviridae* incluyen:

(1) Interferón

Los interferones (IFN) son compuestos que han estado disponibles en el mercado para el tratamiento de la hepatitis crónica durante casi una década. Los IFN son glicoproteínas producidas por las células inmunes en respuesta a una infección vírica. Los IFN inhiben la replicación vírica de muchos virus, incluyendo el VHC, y cuando se usan como el único tratamiento para la infección por hepatitis C, el IFN suprime el ARN del VHC en suero hasta niveles indetectables. Además, el IFN normaliza los niveles de amino transferasa en suero. Desafortunadamente, los efectos del IFN son temporales, y se produce una respuesta sostenida en solo el 8 %-9 % de los pacientes infectados de manera crónica con el VHC (Gary L. Davis. *Gastroenterology* 118:S104-S114, 2000).

Hay un número de patentes que describen tratamientos del VHC usando terapias a base del interferón. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.980.884 de Blatt *et al.* describe métodos para la repetición del tratamiento de pacientes afectados por el VHC usando interferón de consenso. La patente de EE.UU. n.º 5.942.223 de Bazer *et al.* describe una terapia anti-VHC usando interferón tau ovino o bovino. La patente de EE.UU. n.º 5.928.636 de Alber *et al.* describe la terapia de combinación de interleucina-12 e interferón alfa para el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo el VHC. La patente de EE.UU. n.º 5.908.621 de Glue *et al.* describe el uso de interferón modificado con polietilenglicol para el tratamiento del VHC. La patente de EE.UU. n.º 5.849.696 de Chretien *et al.* describe el uso de timosinas, solas o en combinación con interferón, para el tratamiento del VHC. La patente de EE.UU. n.º 5.830.455 de Valtuena *et al.* describe una terapia de combinación del VHC que emplea interferón y un neutralizante de radicales libres. La patente de EE.UU. n.º 5.738.845 de Imakawa describe el uso de proteínas de interferón tau humanas para el tratamiento del VHC. Otros tratamientos a base de interferón para el VHC se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.676.942 de Testa *et al.*, la patente de EE.UU. n.º 5.372.808 de Blatt *et al.* y la patente de EE.UU. n.º 5.849.696.

(2) Ribavirina (Battaglia, A. M. *et al.*, *Ann. Pharmacother*, **2000**, 34, 487-494); Berenguer, M. *et al.*, *Antivir. Ther.* **1998**, 3 (Supl. 3), 125-136).

La ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1-1,2,4-triazol-3-carboxamida) es un análogo de nucleósido antivírico sintético, no inductor de interferón, de amplio espectro. Se comercializa con los nombres comerciales Virazole™ (The Merck Index, 11ª edición, Editor: Budavari, S., Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, página 1304, 1989); Rebetol (Schering Plough) y Co-Pegasus (Roche). La patente de EE.UU. n.º 3.798.209 y el documento RE 29.835 (ICN Pharmaceuticals) describen y reivindican la ribavirina. La ribavirina es estructuralmente similar a la guanosina, y tiene actividad *in vitro* contra varios virus de ADN y ARN incluyendo los *Flaviviridae* (Gary L. Davis. *Gastroenterology* 118:S104-S114, 2000). La patente de EE.UU. n.º 4.211.771 (de ICN Pharmaceuticals) describe el uso de la ribavirina como agente antivírico. La ribavirina reduce los niveles de la amino transferasa en suero hasta niveles normales en el 40 % de pacientes, pero no reduce los niveles del ARN del VHC en suero (Gary L. Davis. *Gastroenterology* 118:S104-S114, 2000). Por lo tanto, la ribavirina sola no es eficaz para reducir los niveles de ARN vírico. Además, la ribavirina tiene una toxicidad significativa, y se sabe que provoca anemia.

Combinación de interferón y ribavirina

Schering-Plough comercializa ribavirina en forma de cápsulas Rebetol® (200 mg) para la administración a pacientes con VHC. La FDA estadounidense ha aprobado las cápsulas de Rebetol para tratar la infección crónica por VHC en combinación con los productos de interferón alfa-2b de Schering Intron®; A y PEG-Intron™. Las cápsulas de Rebetol no están aprobadas para la monoterapia (es decir, la administración independiente de Intron® A o PEG-Intron), aunque el Intron A y el PEG-Intron sí están aprobados para la monoterapia (es decir, la administración sin ribavirina).

- Hoffman La Roche comercializa la ribavirina con el nombre de Co-Pegasus en Europa y Estados Unidos, también para su uso en combinación con el interferón para el tratamiento del VHC. Otros productos de interferón alfa entre los que se incluyen Roferon-A (Hoffmann-La Roche), Infergen® (t (Intermune, anteriormente producto de Amgen) y Wellferon® (Wellcome Foundation) están actualmente aprobados por la FDA para la monoterapia contra el VHC. Los
- 5 productos de interferón actualmente en desarrollo para el VHC incluyen: Roferon-A (interferón alfa-2a) de Roche, PEGASYS (interferón alfa-2a pegilado) de Roche, INFERGEN (interferón alfacon-1) de InterMune, OMNIFERON (interferón natural) de Viragen, ALBUFERON de Human Genome Sciences, REBIF (interferón beta-1a) de Ares-Serono, Interferón omega de BioMedicine, Interferón alfa oral de Amarillo Biosciences e Interferón gamma-1b de InterMune.
- 10 Se ha informado que la combinación de IFN y ribavirina para el tratamiento de la infección por VHC es eficaz en el tratamiento de pacientes sin tratamiento previo de IFN (Battaglia, A. M. *et al.*, *Ann. Pharmacother.* 34:487-494, 2000). El tratamiento combinado es eficaz tanto antes de que se desarrolle la hepatitis como cuando se presenta una enfermedad histológica (Berenguer, M. *et al. Antivir. Ther.* 3 (Supl. 3): 125-136, 1998). Actualmente, la terapia
- 15 más eficaz para el VHC es la terapia de combinación del interferón pegilado con ribavirina (2002 NIH Consensus Development Conference on the Management of Hepatitis C). Sin embargo, los efectos secundarios de la terapia de combinación pueden ser significativos e incluyen hemólisis, síntomas parecidos a la gripe, anemia y fatiga (Gary L. Davis. *Gastroenterology* 118: S104-S114, 2000).
- (3) Inhibidores de la proteasa NS3 basados en un sustrato (por ejemplo, Attwood *et al.*, "Antiviral peptide derivatives", documento PCT WO 98/22496, **1998**; Attwood *et al.*, "Antiviral Chemistry and Chemotherapy" **1999**, 10, 259-273; Attwood *et al.*, "Preparation and use of amino acid derivatives as anti-viral agents", publicación de patente alemana DE 19914474; Tung *et al.* "Inhibitors of serine proteases, particularly hepatitis C virus NS3 protease", PCT
- 20 WO 98/17679), incluyendo las alfacetoamidas y las hidrazinoureas, e inhibidores que terminan en un electrófilo tal como un ácido borónico o un fosfonato (Llinas-Brunet *et al.*, "Hepatitis C inhibitor peptide analogues", documento PCT WO 99/07734).
- (4) Inhibidores no basados en el sustrato, por ejemplo, derivados de 2,4,6-trihidroxi-3-nitro-benzamida (Sudo K. *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1997**, 238, 643-647; Sudo K. *et al.* "Antiviral Chemistry and Chemotherapy", **1998**, 9, 186), incluyendo RD3-4082 y RD3-4078, el primero sustituido en la amida con una
- 25 cadena de 14 átomos de carbonos, y el segundo procesando un grupo *para*-fenoxifenilo.
- (5) Derivados de tiazolidina que muestran una inhibición relevante en un ensayo de HPLC de fase inversa con una proteína de fusión NS3/4A y un sustrato NS5A/5B (por ejemplo, Sudo K. *et al.*, "Antiviral Research", **1996**, 32, 9-18), en concreto, el compuesto RD-1-6250, que posee una fracción cinamoilo fusionada sustituida con una cadena larga
- 30 de alquilo, RD4 6205 y RD4 6193.
- (6) Tiazolidinas and benzanilidas (por ejemplo, Kakiuchi N. *et al. J. EBS Letters* 421, 217-220; Takeshita N. *et al. Analytical Biochemistry*, **1997**, 247, 242-246).
- (7) Una fenantrenoquinona que posee actividad contra la proteasa en un ensayo de SDS-PAGE y de autorradiografía aislada del caldo de cultivo de fermentación de *Streptomyces* sp., por ejemplo, Sch 68631 (Chu M. *et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1996**, 37, 7229-7232), y Sch 351633, aislado del hongo *Penicillium griseofulvum*, que
- 35 demuestra actividad en un ensayo de proximidad de centelleo (Chu M. *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9, 1949-1952).
- (8) Inhibidores selectivos de NS3, por ejemplo, los basados en la macromolécula elgin c, aislada de la sanguijuela (Qasim M. A. *et al.*, *Biochemistry*, **1997**, 36, 1598-1607).
- (9) Inhibidores de helicasa (por ejemplo, Diana G. D. *et al.*, "Compounds, compositions and methods for treatment of hepatitis C", patente de EE.UU. n.º 5.633.358; Diana G. D. *et al.*, "Piperidine derivatives, pharmaceutical compositions thereof and their use in the treatment of hepatitis C", documento PCT WO 97/36554).
- 45 (10) Inhibidores de la polimerasa, por ejemplo, análogos de nucleótido y gliotoxina (Ferrari R. *et al. Journal of Virology*, **1999**, 73, 1649- 1654) y el producto natural cerulenina (Lohmann V. *et al.*, *Virology*, **1998**, 249, 108-118).
- (11) Oligodesoxinucleótidos de fosforotioato antisentido (S-ODN) complementarios a la secuencia que se extiende en la región no codificante 5' (NCR) del virus (Alt M. *et al.*, *Hepatology*, **1995**, 22, 707-717) o los nucleótidos 326-348 que comprenden el extremo 3' de la NCR y los nucleótidos 371-388 situados en la región de codificación del núcleo
- 50 del ARN del VCH (Alt M. *et al.*, *Archives of Virology*, **1997**, 142, 589-599; Galderisi U. *et al.*, *Journal of Cellular Physiology*, **1999**, 181, 251-257).
- (12) Inhibidores de la traducción dependiente de IRES (Ikeda N *et al.*, "Agent for the prevention and treatment of hepatitis C", publicación de patente japonesa JP-08268890; Kai Y. *et al.* "Prevention and treatment of viral diseases", publicación de patente japonesa JP-10101591).
- 55 (13) Ribozimas resistentes a las nucleasas (Maccjak, D. J. *et al.*, *Hepatology* **1999**, 30, resumen 995).

(14) También se han desarrollado análogos de nucleósidos para el tratamiento de infecciones por *Flaviviridae*.

Idenix Pharmaceuticals Ltd. describe nucleósidos ramificados y su uso en el tratamiento del VHC, y los flavivirus y pestivirus en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2003/0050229 A1 y la publicación de patente de EE.UU. n.º 2003/0060400 A1, que corresponden a las publicaciones internacionales n.º WO 01/90121 y WO 01/92282. En concreto, en las publicaciones de Idenix, se describe un método para el tratamiento de la infección por hepatitis C (y flavivirus y pestivirus) en seres humanos y otros animales hospedadores, que incluye la administración de una cantidad eficaz de un nucleósido biológicamente activo 1',2',3' o 4'-ramificado β -D o β -L, o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo, administrado bien solo o en combinación, opcionalmente, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5
10
15
20
Otras solicitudes de patente que describen el uso de ciertos análogos de nucleósidos para tratar el virus de la hepatitis C incluyen: las publicaciones de patente internacionales n.º WO 01/32153 (PCT/CA00/01316; presentada el 3 de noviembre de 2000) y el documento WO 01/60315 (PCT/CA01/00197; presentado el 19 de febrero de 2001) presentadas por BioChem Pharma, Inc. (ahora Shire Biochem, Inc.); la publicación de patente de EE.UU. n.º 2002/0147160 y las correspondientes publicaciones de patente internacionales n.º WO 02/057425 (PCT/US02/01531; presentada el 18 de enero de 2002) y WO 02/057287 (PCT/US02/03086; presentada el 18 de enero de 2002) presentadas por Merck & Co., Inc.; las publicaciones de patente de EE.UU. n.º 2003/083307 A1 y US 2003/008841 A1, y las correspondientes publicaciones de patente internacionales n.º WO 02/18404 (PCT/EP01/09633; publicada el 21 de agosto de 2001); WO 02/100415 y WO 02/094289, presentadas por Hoffman-LaRoche; la publicación de patente de EE.UU. n.º 2003/028013 A1 y las correspondientes publicaciones de patente internacionales n.º WO 03/062255 y WO 03/061385, presentadas por Ribapharm; y WO 01/79246 y WO 02/32920 presentadas por Pharmasset.

25
30
(15) Otros diversos compuestos que incluyen 1-amino-alkilciclohexanos (patente de EE.UU. n.º 6.034.134 de Gold *et al.*), alquillípidos (patente de EE.UU. n.º 5.922.757 de Chojkier *et al.*), vitamina E y otros antioxidantes (patente de EE.UU. n.º 5.922.757 de Chojkier *et al.*), escualeno, amantadina, ácidos biliares (patente de EE.UU. n.º 5.846.964 de Ozeki *et al.*), ácido *N*-(fosfonoacetil)-L-aspartico (patente de EE.UU. n.º 5.830.905 de Diana *et al.*), bencenodicarboxamidas (patente de EE.UU. n.º 5.633.388 de Diana *et al.*), derivados de ácido poliadenílico (patente de EE.UU. n.º 5.496.546 de Wang *et al.*), 2',3'-didesoxiinosina (patente de EE.UU. n.º 5.026.687 de Yarchoan *et al.*) y bencimidazoles (patente de EE.UU. n.º 5.891.874 de Colacino *et al.*).

35
40
45
(16) Otros compuestos actualmente en desarrollo clínico para el tratamiento del virus de la hepatitis C incluyen: Interleucina-10 de Schering-Plough, IP-501 de Interneuron, Merimebodib (VX-497) de Vertex, AMANTADINE (Symmetrel) de Endo Labs Solvay, HEPTAZYME de RPI, IDN-6556 de Idun Pharma., XTL-002 de XTL., HCV/MF59 de Chiron, CIVACIR de NABI, LEVOVIRIN de ICN, VIRAMIDINE de ICN, ZADAXIN (timosina alfa-1) de Sci Clone, CEPLENE (dihidrocloruro de histamina) de Maxim, VX 950/LY 570310 de Vertex/Eli Lilly, ISIS 14803 de Isis Pharmaceutical/Elan, IDN-6556 de Idun Pharmaceuticals, Inc. y JTK 003 de AKROS Pharma.

50
55
Pueden surgir variantes de virus resistentes a los fármacos tras un tratamiento prolongado con un agente antivírico. La resistencia a los fármacos se produce más normalmente por la mutación de un gen que codifica una enzima usada en la replicación vírica y, por ejemplo, en el caso del VIH, la transcriptasa inversa, la proteasa o la ADN polimerasa. Se ha demostrado que la eficacia de un fármaco frente a la infección vírica puede prolongarse, aumentarse o restablecerse mediante la administración del compuesto en combinación o alternancia con un segundo, y tal vez un tercer, compuesto antivírico que sea eficaz en la lucha contra el virus. La farmacocinética, la biodistribución u otro parámetro del fármaco pueden ser modificados por dicha terapia de combinación o de alternancia. En general, normalmente, se prefiere la terapia de combinación a la terapia de alternancia, porque induce múltiples presiones simultáneas sobre el virus. Sin embargo, no se puede predecir qué mutaciones serán inducidas en el genoma vírico por un fármaco dado, si la mutación es permanente o transitoria, o cómo responderá una célula infectada con o sin una secuencia vírica mutada a la terapia con otros agentes en combinación o alternancia. Esto se ve agravado por el hecho de que existe una escasez de datos sobre la cinética de resistencia a fármacos en los cultivos celulares a largo plazo tratados con los agentes antivíricos modernos.

Es un objeto de la presente invención optimizar el tratamiento de la infección por VHC.

50
Es un objeto adicional proporcionar la administración óptima de nucleósidos ramificados en 2', y en particular, nucleósidos de pirimidina ramificados en 2', para el tratamiento de infecciones por *Flaviviridae*.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método y una composición que incluya nucleósidos ramificados en 2' para el tratamiento de pacientes infectados por pestivirus, flavivirus o hepaticivirus que presenten parámetros farmacocinéticos, de biodistribución, metabólicos, de resistencia u otros parámetros ventajosos o mejorados frente a la administración solo de nucleósidos de pirimidina ramificados en 2'.

55
Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un método y una composición para el tratamiento de pacientes infectados por *Flaviviridae* a quienes se administran nucleósidos ramificados en 2' y, en particular, nucleósidos de pirimidina ramificados en 2', en combinación y/o alternancia con uno o más compuestos que actúan de forma sinérgica o ventajosa con nucleósidos de pirimidina ramificados en 2' contra el virus.

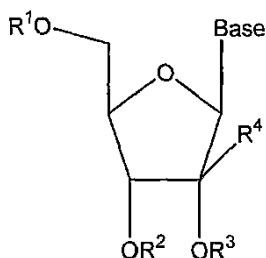
Es otro objeto más de la presente invención proporcionar un método y una composición para el tratamiento de pacientes infectados por una forma resistente a los fármacos de pestivirus, flavivirus o hepacivirus.

Es también un objeto de la invención proporcionar un método y un kit para identificar una cepa mutante de *Flaviviridae*.

5 **Compendio de la invención**

Se ha descubierto que el uso prolongado de un nucleósido ramificado en 2', por ejemplo, de un nucleósido ramificado en 2' representado a continuación y, en particular, un nucleósido de pirimidina ramificado en 2', tal como el compuesto β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en 2', incluyendo el compuesto β -D-2'-CH₃-riboAdenosina o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilamino adenosina, se asocia con una mutación en un nucleótido que codifica la serina en la secuencia de consenso altamente conservada, XRXSGXXXT, del dominio B de la región de ARN polimerasa (**Figura 11**) de *Flaviviridae*, que genera un cambio en el resto de aminoácido serina a un aminoácido diferente, por ejemplo, treonina. Este dominio se encuentra en la región NS5B del genoma de VHC, así como en genomas de otros flavivirus. Está altamente conservado entre todos los genomas de hepacivirus, pestivirus y flavivirus (**Figura 11**, Lai *et al. J Virol.* **1999**, 73, 10129-36).

15 Como se describe en la presente memoria, el nucleósido ramificado en 2' es de fórmula general:



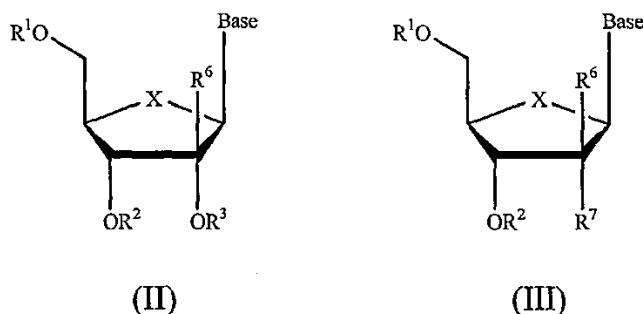
o su profármaco y/o sal farmacéuticamente aceptable, en donde

20 R¹, R² y R³ son independientemente H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un profármaco de fosfato estabilizado); acilo (incluyendo acilo inferior); alquilo (incluyendo alquilo inferior); éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en la presente memoria; lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R¹, R² o R³ es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*; y

25 R⁴ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo (incluyendo alquilo inferior), azido, ciano, alqueno, alquino, Brvinilo, -C(O)O(alquilo), -C(O)O(alquilo inferior), -O(acilo), -O(acilo inferior), -O(alquilo), -O(alquilo inferior), -O(alqueno), cloro, bromo, flúor, yodo, NO₂, NH₂, -NH(alquilo inferior), -NH(acilo), -N(alquilo inferior)₂, o -N(acilo)₂;

y Base es una purina o pirimidina como se describe además en la presente memoria.

30 También como se describe en la presente memoria, el nucleósido ramificado en 2' es de fórmula general:



o su profármaco y/o sal farmacéuticamente aceptable, en donde

Base es una purina o pirimidina como se define en la presente memoria;

35 R¹, R² y R³ son independientemente H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un fosfato estabilizado); alquilo de cadena lineal, ramificado o cíclico (incluyendo alquilo inferior); acilo (incluyendo acilo inferior); CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoialquilo, CO-ariloxialquilo, arilo sustituido con CO, éster de sulfonato (incluyendo alquil-

5 o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en el presente memoria; alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R^1 , R^2 o R^3 es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*;

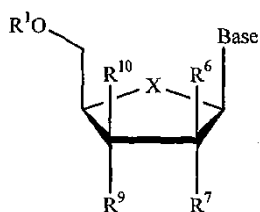
R^6 es alquilo (incluyendo alquilo inferior y alquilo halogenado), CH_3 , CF_3 , azido, ciano, alquenilo, alquinilo, Br-vinilo, 2-Br-etilo, $-C(O)O$ (alquilo), $-C(O)O$ (alquilo inferior), $-O$ (acilo), $-O$ (acilo inferior), $-O$ (alquilo), $-O$ (alquilo inferior), $-O$ (alquenilo), CF_3 , cloro, bromo, flúor, yodo, NO_2 , NH_2 , $-NH$ (alquilo inferior), $-NH$ (acilo), $-N$ (alquilo inferior) $_2$, $-N$ (acilo) $_2$; y

10 R^7 es hidrógeno, OR^3 , hidroxí, alquilo (incluyendo alquilo inferior), azido, ciano, alquenilo, alquinilo, Br-vinilo, $-C(O)O$ (alquilo), $-C(O)O$ (alquilo inferior), $-O$ (acilo), $-O$ (acilo inferior), $-O$ (alquilo), $-O$ (alquilo inferior), $-O$ (alquenilo), flúor, cloro, bromo, yodo, NO_2 , NH_2 , $-NH$ (alquilo inferior), $-NH$ (acilo), $-N$ (alquilo inferior) $_2$, $-N$ (acilo) $_2$; y

X es O, S, SO_2 o CH_2 ; y

Base es una purina o pirimidina como se describe además en la presente memoria.

15 También como se describe en la presente memoria, el nucleósido ramificado en 2' es de fórmula general:



(IV)

en donde:

Base es una purina o pirimidina como se define en la presente memoria;

20 R^6 es alquilo (incluyendo alquilo inferior y alquilo halogenado), CH_3 , CF_3 , azido, ciano, alquenilo, alquinilo, Br-vinilo, 2-Br-etilo, $-C(O)O$ (alquilo), $-C(O)O$ (alquilo inferior), $-O$ (acilo), $-O$ (acilo inferior), $-O$ (alquilo), $-O$ (alquilo inferior), $-O$ (alquenilo), CF_3 , flúor, cloro, bromo, yodo, NO_2 , NH_2 , $-NH$ (alquilo inferior), $-NH$ (acilo), $-N$ (alquilo inferior) $_2$, $-N$ (acilo) $_2$;

25 R^7 es OR^2 , hidroxí, alquilo (incluyendo alquilo inferior), azido, ciano, alquenilo, alquinilo, Br-vinilo, halo-vinilo, $-C(O)O$ (alquilo), $-C(O)O$ (alquilo inferior), $-O$ (acilo), $-O$ (acilo inferior), $-O$ (alquilo), $-O$ (alquilo inferior), $-O$ (alquenilo), flúor, cloro, bromo, yodo, NO_2 , NH_2 , $-NH$ (alquilo inferior), $-NH$ (acilo), $-N$ (alquilo inferior) $_2$, $-N$ (acilo) $_2$;

R^9 es hidrógeno, OR^3 , hidroxí, alquilo (incluyendo alquilo inferior), azido, ciano, alquenilo, alquinilo, Br-vinilo, $-C(O)O$ (alquilo), $-C(O)O$ (alquilo inferior), $-O$ (acilo), $-O$ (acilo inferior), $-O$ (alquilo), $-O$ (alquilo inferior), $-O$ (alquenilo), cloro, bromo, yodo, NO_2 , NH_2 , $-NH$ (alquilo inferior), $-NH$ (acilo), $-N$ (alquilo inferior) $_2$, $-N$ (acilo) $_2$;

R^{10} es H, alquilo (incluyendo alquilo inferior), flúor, cloro, bromo o yodo;

30 R^1 , R^2 y R^3 son independientemente H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un fosfato estabilizado); alquilo de cadena lineal, ramificado o cíclico (incluyendo alquilo inferior); acilo (incluyendo acilo inferior); CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, arilo sustituido con CO, éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en el presente memoria;

35 alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R^1 , R^2 o R^3 es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*; y

X es O, S, SO_2 o CH_2 .

40 En el caso de la infección por BVDV, los nucleósidos ramificados en 2' y, en particular, los nucleósidos de pirimidina ramificados en 2' tales como el compuesto β -D-2'- CH_3 -riboC inducen una mutación de una guanina (G) a citidina (C) en el resto 1.214 de la ARN polimerasa del BVDV, que produce un cambio en el resto de aminoácido serina a treonina de la posición 405 de la enzima. Este resto de serina se ubica en la secuencia de consenso conservada (XRXS \underline{S} GXXXT) del dominio B de la ARN polimerasa (**Figuras 5 y 11**), identificado por análisis mutacional Lai V. C., Kao C. C., Ferrari E., Park J., Uss A.S., Wright-Minogue J., Hong Z., y J. Y. Lau. "Mutational analysis of bovine viral diarrhoea virus RNA-dependent RNA polymerase" *J Virol.* **1999**, 73, 10129-36).

45

En el caso de la infección por VHC, los nucleósidos ramificados en 2' y, en particular, los nucleósidos de pirimidina ramificados en 2' tales como el compuesto β -D-2'-CH₃-riboC inducen una mutación en un nucleótido que codifica la Serina₂₈₂ en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa (**Figura 11**), que produce un cambio del resto serina a un aminoácido diferente, tal como treonina.

- 5 Además, se ha descubierto que los nucleósidos ramificados en 2' y el interferón actúan sinérgicamente para inhibir *Flaviviridae*. En particular, los nucleósidos de pirimidina ramificados en 2', tales como el compuesto β -D-2'-CH₃-riboC o un nucleósido de purina ramificado en 2' tal como el compuesto β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilamino adenosina e interferón alfa-2b, administrado en combinación y/o alternancia actúan sinérgicamente para inhibir *Flaviviridae*. Además, se ha descubierto que las poblaciones víricas resistentes, que emergen tras el tratamiento con nucleósidos ramificados en 2', por ejemplo, el tratamiento con β -D-2'-CH₃-riboC, muestran una mayor sensibilidad al tratamiento posterior con interferón. Por lo tanto, la terapia secuencial y/o de combinación de un nucleósido ramificado en 2' e interferón puede reducir sustancialmente las infecciones por *Flaviviridae*.

15 La presente invención proporciona un nucleósido con metilo en 2', o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento de la hepatitis C en un hospedador, en donde el método comprende administrar dicho nucleósido con metilo en 2' o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y administrar interferón, en donde dicho nucleósido con metilo en 2' ha causado una mutación en el nucleótido 8443 (de G a C) del genoma del virus de la hepatitis C o del aminoácido 282 Serina a Treonina de la región de la ARN polimerasa del virus de la hepatitis C.

20 La presente invención también proporciona interferón para su uso en un método de tratamiento de la hepatitis C en un hospedador, en donde el hospedador ha recibido un nucleósido con metilo en 2', o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, que ha causado una mutación en el nucleótido 8443 (de G a C) del genoma del virus de la hepatitis C o del aminoácido 282 Serina a Treonina de la región de la ARN polimerasa del virus de la hepatitis C.

25 Dicho nucleósido con metilo en 2' es como se define en las reivindicaciones.

Dicho método puede comprender además las etapas definidas en las reivindicaciones.

30 En la presente memoria, se describe un método de tratamiento de una infección por *Flaviviridae* mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un nucleósido ramificado en 2', por ejemplo, un nucleósido de pirimidina ramificado en 2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC, o su profármaco y/o sal farmacéuticamente aceptable, a un hospedador, tal como un ser humano, que necesita dicha terapia, en combinación y/o alternancia con uno o más fármacos que inducen directa o indirectamente una mutación en un *Flaviviridae*, en una ubicación de distinta de una mutación de un nucleótido que genera un cambio de la serina a un aminoácido diferente en la secuencia de consenso altamente conservada, XRXSGXXXXT, del dominio B de la región de la ARN polimerasa, y/o uno o más fármacos que están asociados con dicha mutación. Este resto de serina altamente conservado corresponde a la posición de aminoácido 405 de la región de ARN polimerasa del genoma de BVDV. También corresponde a la posición de aminoácido 282 de la región de ARN polimerasa del genoma de VHC (**Figura 11**; Lai *et al. J Virol.*, **1999**, 73, 10129-36).

40 También se describe en la presente memoria un método de tratamiento y/o curación sustancial de una infección por *Flaviviridae* en un hospedador infectado con un *Flaviviridae* que contiene una mutación de serina a treonina en el residuo de serina conservado de un *Flaviviridae* (**Figura 11**), por ejemplo, aminoácido 405 de la región de ARN polimerasa de BVDV o aminoácido 282 de la ARN polimerasa de VHC, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de interferón. En una realización específica de la presente invención, se administra el interferón alfa-2b.

También se describe en la presente memoria al menos uno de los siguientes.

45 (i) Una composición farmacéutica eficaz para el tratamiento de una infección por *Flaviviridae* en un hospedador, tal como un ser humano, que comprende una cantidad eficaz de un nucleósido ramificado en 2', por ejemplo, un nucleósido ramificado en 2' tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco, tal como el profármaco del 3'-valinaéster, o un profármaco y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en combinación con uno o más fármacos que inducen directa o indirectamente una mutación en un *Flaviviridae*, en una ubicación distinta de una mutación de un nucleótido que genera un cambio de la serina a un aminoácido diferente en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXXT, del dominio B de la región de ARN polimerasa, por ejemplo, distinto del nucleótido 1214 (de G a C) o Ser 405 a Thr de la región de ARN polimerasa de BVDV o nucleótido 8.443 (de G a C) del genoma de VHC o Ser 282 a Thr de la región de ARN polimerasa del VHC (**Figura 11**; Lai *et al. J Virol.*, **1999**, 73, 10129-36) y/o uno o más fármacos que están asociados con dicha mutación.

(ii) Una composición farmacéutica eficaz para el tratamiento de una infección por *Flaviviridae* en un hospedador,

tal como un ser humano, que comprende una cantidad eficaz de un nucleósido ramificado en 2', por ejemplo, nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco, tal como el profármaco del 3'-valinaéster, o un profármaco y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en combinación con interferón. Los interferones incluyen: Intron-A (interferón alfa-2b) de Schering, PEG-INTRON (interferón alfa-2b pegilado) de Schering, Roferon-A (interferón alfa-2a) de Roche, PEGASYS (interferón alfa-2a pegilado) de Roche, INFERGEN (interferón alfacon-1) de InterMune, OMNIFERON (interferón natural) de Viragen, ALBUFERON de Human Genome Sciences, REBIF (interferón beta-1a) de Ares-Serono, interferón Omega de BioMedicine, interferón alfa oral de Amarillo Biosciences e Interferón gamma-1b de InterMune.

(iii) Una composición farmacéutica eficaz para el tratamiento de una infección por *Flaviviridae* en un hospedador, tal como un ser humano, que comprende:

una cantidad eficaz de un profármaco 2', 3' y/o 5' de un nucleósido ramificado en 2', por ejemplo, un nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco, incluyendo el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco, incluyendo el profármaco del 3'-valinaéster, o un profármaco y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en combinación con uno o más fármacos que inducen directa o indirectamente una mutación en un *Flaviviridae*, en una ubicación distinta de una mutación de un nucleótido que genera un cambio de la serina a un aminoácido diferente en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXT, del dominio B de la región de ARN polimerasa, y/o uno o más fármacos que están asociados con dicha mutación.

(iv) Un método de tratamiento de una infección por *Flaviviridae* en un hospedador, tal como un ser humano, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un nucleósido ramificado en 2', tal como un nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o su profármaco y/o sal farmacéuticamente aceptable al ser humano, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en combinación y/o alternancia con uno o más fármacos que inducen directa o indirectamente una mutación en un *Flaviviridae* en una ubicación distinta de una mutación de un nucleótido que genera un cambio de serina a un aminoácido diferente en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa, por ejemplo, distinto del nucleótido 1214 (de G a C) o Ser 405 a Thr de la región de la ARN polimerasa del BVDV o nucleótido 8443 (de G a C) del genoma del VHC o Ser 282 a Thr de la región de la ARN polimerasa del VHC (Figura 11; Lai *et al. J Virol.*, 1999, 73, 10129-36), y/o uno o más fármacos que están asociados con dicha mutación.

(v) Un método de tratamiento de una infección por *Flaviviridae* en un hospedador, tal como un ser humano, que comprende administrar una cantidad eficaz de un nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina, o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o un profármaco y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo al hospedador, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en combinación y/o alternancia con interferón. Los interferones incluyen: Intron-A (interferón alfa-2b) de Schering, PEG-INTRON (interferón alfa-2b pegilado) de Schering, Roferon-A (interferón alfa-2a) de Roche, PEGASYS (interferón alfa-2a pegilado) de Roche, INFERGEN (interferón alfacon-1) de InterMune, OMNIFERON (interferón natural) de Viragen, ALBUFERON de Human Genome Sciences, REBIF (interferón beta-1a) de Ares-Serono, Interferón Omega de BioMedicine, Interferón Alfa Oral de Amarillo Biosciences, e Interferón gamma-1b de InterMune.

(vi) Un método de tratamiento de un paciente infectado con un virus *Flaviviridae* que es resistente a un nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC o a un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende administrar una cantidad eficaz de interferón, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, de una manera que elimine sustancialmente la carga vírica.

(iv) Un método de tratamiento de un paciente infectado con *Flaviviridae* que comprende:

administrar una cantidad eficaz de un profármaco 2', 3' y/o 5' de un nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por

ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

5 en combinación y/o alternancia con uno o más fármacos que inducen directa o indirectamente una mutación en un *Flaviviridae* en una ubicación distinta de una mutación de un nucleótido que genera un cambio de serina a un aminoácido diferente en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa, y/o uno o más fármacos que están asociados con dicha mutación.

(v) Un método de tratamiento de un paciente infectado con *Flaviviridae* que comprende:

10 (a) administrar al paciente una cantidad eficaz de un nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina, o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

15 (b) ensayar la sangre del paciente para analizar la seroconversión del virus de tipo silvestre al mutante; y
(c) administrar una cantidad eficaz de interferón; opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 (vi) Un método de ensayo de una muestra sospechosa de contener un *Flaviviridae* resistente a un nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; que comprende:

25 (a) poner en contacto una muestra que contiene una secuencia de ácido nucleico de *Flaviviridae* con una sonda de oligonucleótido detectable que tiene una secuencia complementaria al codón que codifica una serina en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa de *Flaviviridae* (**Figura 11**);

(b) permitir que la sonda se hibride con la secuencia; y

(c) detectar la hibridación de la secuencia de la sonda.

30 (vii) Un método de ensayo de una muestra sospechosa de contener un *Flaviviridae* resistente a un nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; que comprende:

35 (a) poner en contacto una muestra que contiene una secuencia de ácido nucleico de *Flaviviridae* con una sonda de oligonucleótido detectable que tiene una secuencia complementaria a la citidina del nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa del BVDV o la citidina del nucleótido 8443 del VHC;

(b) permitir que la sonda se hibride con la secuencia; y

40 (c) detectar la hibridación de la sonda a la citidina del nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa del BVDV o del nucleótido 8.443 del VHC.

(viii) Un método de tratamiento de un paciente infectado con *Flaviviridae* que comprende:

45 (a) administrar una cantidad eficaz de un nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

(b) obtener una muestra vírica del paciente;

(c) determinar la capacidad de replicación del virus;

50 (d) determinar si la capacidad de replicación del virus de la muestra es inferior a la capacidad de replicación del virus de tipo silvestre, que indica resistencia hacia el nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de

pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina, o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

5 (e) administrar una cantidad eficaz de interferón a los pacientes que son resistentes al nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina, o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 (ix) Un método de tratamiento de un paciente infectado con *Flaviviridae* que comprende:

(a) administrar una cantidad eficaz de un nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

(b) obtener una muestra de cultivo vírico del paciente;

(c) cultivar la muestra y comparar el crecimiento de placa entre la muestra y el virus de tipo silvestre;

20 (d) determinar si el crecimiento de la placa de la muestra es inferior al crecimiento de la placa del tipo silvestre, que indica resistencia hacia el nucleósido ramificado en 2'; y

(e) administrar una cantidad eficaz de interferón a los pacientes que son resistentes al nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(x) Un método de diagnóstico de la presencia de un *Flaviviridae* resistente a un nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en un paciente que comprende:

(a) obtener una muestra sospechosa de contener una secuencia de ácido nucleico de *Flaviviridae*;

(b) poner en contacto la muestra con una sonda de oligonucleótido detectable que tiene una secuencia complementaria al codón que codifica una serina en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa de *Flaviviridae* (**Figura 11**);

35 (b) permitir que la sonda se hibride con la secuencia; y

(c) detectar la hibridación de la secuencia de la sonda para determinar la presencia de un *Flaviviridae* resistente al nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(xi) Un método de diagnóstico de la presencia de un *Flaviviridae* resistente al nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en un paciente que comprende:

(a) obtener una muestra sospechosa de contener una secuencia de ácido nucleico de *Flaviviridae*;

(b) poner en contacto la muestra con una sonda de oligonucleótido detectable que tiene una secuencia complementaria a la citidina del nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa del BVDV o la citidina del nucleótido 8.443 del VHC;

50 (b) permitir que la sonda se hibride con la secuencia; y

(c) detectar la hibridación de la sonda a la citidina del nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa del

5 BVDV o del nucleótido 8.443 del VHC para determinar la presencia de un *Flaviviridae* resistente al nucleósido ramificado en 2', tal como nucleósido de pirimidina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o un nucleósido de purina ramificado en β -D-2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboA o β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La combinación descrita y/o las pautas de alternancia son útiles en la prevención y el tratamiento de infecciones por *Flaviviridae*, incluyendo BVDV, BDV, CSFV, DHF, virus de la fiebre amarilla, síndrome de choque, virus de encefalitis japonesa y VHC.

10 Además, las secuencias de aminoácidos correspondientes de los marcadores víricos de *Flaviviridae* que diagnostican la respuesta a largo plazo de los portadores de *Flaviviridae* a la terapia con nucleósido ramificado en 2' pueden determinarse a partir de las secuencias de nucleótidos ilustrativas de *Flaviviridae*.

15 Además de identificar marcadores víricos con el fin de identificar cepas de *Flaviviridae* que estén asociadas con un fallo del nucleósido ramificado en 2', la presente invención también se puede utilizar para identificar cepas de *Flaviviridae* que respondan a la terapia con nucleósido ramificado en 2'. En este sentido, se puede usar la ausencia de marcadores víricos correlacionados con la terapia de nucleósido ramificado en 2' para prescribir un curso de tratamiento que incluya el nucleósido ramificado en 2' como una modalidad para los individuos que portan *Flaviviridae* carentes de marcadores víricos correlacionados con un fracaso de la terapia de nucleósido ramificado en 2'.

20 También se describe un cebador de oligonucleótido para amplificar una secuencia de ácido nucleico de *Flaviviridae*. El oligonucleótido puede tener al menos 14 nucleótidos de longitud y puede hibridarse en condiciones de hibridación rigurosas específicas de la secuencia a una secuencia de nucleótidos que contiene el marcador correlacionado con el fracaso de la terapia.

25 Las secuencias de oligonucleótidos usadas como la región de hibridación de un cebador también se pueden usar como la región de hibridación de una sonda. La idoneidad de una secuencia de cebador para su uso como una sonda depende de las características de hibridación del cebador. De forma similar, se puede usar como cebador un oligonucleótido usado como sonda.

30 Además, en la presente memoria, se describe un método, materiales y un kit para detectar proteínas, péptidos o fragmentos peptídicos que contengan aminoácidos (como se describe ampliamente en la presente memoria) que son predictivos de la respuesta a largo plazo de un portador de *Flaviviridae* a la terapia con nucleósido ramificado en 2' o anticuerpos contra aquellas proteínas, péptidos o fragmentos peptídicos. Los sueros o tejidos del hospedador se pueden ensayar bien para la proteína o para el péptido o el anticuerpo contra la proteína o el péptido, dependiendo de la conveniencia y, tal vez, de la concentración del material de diagnóstico.

35 La proteína, el péptido o el fragmento peptídico pueden confirmarse mediante la reacción con un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, usando un método de transferencia Western. Como alternativa, la proteína o el péptido se pueden aislar y secuenciar o identificarse de otro modo mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo mediante PAGE 2D. Un anticuerpo reactivo puede unirse a una secuencia de proteína o secuencia peptídica de *Flaviviridae* que incluye una treonina en lugar de una serina en la secuencia de consenso altamente conservada, XRXSGXXXT , del dominio B de la región de la ARN polimerasa, por ejemplo, en la posición 405 de la región de la ARN polimerasa del genoma del BVDV o en la posición 282 de la región de la ARN polimerasa del genoma del VHC.

45 El anticuerpo reactivo puede unirse específicamente a una secuencia peptídica que incluye una treonina en lugar de una serina en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa, por ejemplo, en la posición 405 de la región de la ARN polimerasa del genoma del BVDV o en la posición 282 de la región de la ARN polimerasa del genoma del VHC, que representan mutaciones puntuales específicas en la región de la ARN polimerasa de *Flaviviridae* que está correlacionada con el fracaso terapéutico.

Se puede usar un anticuerpo que se una al menos a un péptido o un fragmento peptídico codificado por las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1-31.

Para la presente invención, se usa un anticuerpo que se une al menos a un péptido o fragmento peptídico codificado por las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 32-62.

50 Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** de referencia muestra la aparición de BVDV resistente a β -D-2'-CH₃-riboC de BVDV sin tratar.

La **Figura 2** de referencia ilustra el fenotipo de formación de focos por (**A**) BVDV de tipo silvestre (wt) (cepa I-N-dInS) y por (**B**) el BVDV resistente a β -D-2'-CH₃-riboC (I-N-dInS β -D-2'-CH₃-riboC-R).

La **Figura 3** de referencia muestra la cinética de crecimiento de I-N-dInS de BVDV de tipo silvestre y su mutante

resistente a β -D-2'-CH₃-riboC, I-N-dlNs β -D-2'-CH₃-riboC-R (mutante resistente).

La **Figura 4** de referencia muestra el efecto de β -D-2'-CH₃-riboC en el rendimiento del virus en células MDBK infectadas *de novo* (en las que I-N-dlNs es BVDV wt y el mutante resistente es I-N-dlNs β -D-2'-CH₃-riboC-R (BVDV resistente a β -D-2'-CH₃-riboC)).

5 La **Figura 5** de referencia es una representación esquemática de la región NS5B de BVDV que muestra los dominios funcionales propuestos, basándose en el análisis mutacional (Vassilev, V. B. y R. O. Donis, (2000) "Bovine viral diarrhea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation". *Virus Res.* 69 (2): 95-107). La flecha grande indica la posición del único cambio de aminoácido encontrado en la región NS5B del BVDV resistente a β -D-2'-CH₃-riboC (Ser 405 a Thr 405).

10 La **Figura 6** de referencia muestra el efecto del interferón alfa-2b en el rendimiento del virus en células MDBK infectadas *de novo* (I-N-dlNs: BVDV wt; I-N-dlNs β -D-2'-CH₃-riboC-R: BVDV resistente a β -D-2'-CH₃-riboC (mutante resistente)).

La **Figura 7** de referencia muestra el efecto de β -D-2'-CH₃-riboC y del interferón alfa-2b en los títulos de BVDV (cepa I-N-dlNs) en células MDBK infectadas persistentemente.

15 La **Figura 8** de referencia muestra el efecto de β -D-2'-CH₃-riboC en combinación con interferón alfa-2b en los títulos de BVDV de tipo silvestre (cepa I-N-dlNs) en células MDBK infectadas persistentemente.

La **Figura 9** de referencia muestra el efecto β -D-2'-CH₃-riboC y del interferón alfa-2b (Intron A) en los títulos de BVDV (cepa NY-1) en células MDBK infectadas persistentemente.

20 La **Figura 10** de referencia ilustra el efecto de β -D-2'-CH₃-riboC y del interferón alfa-2b (Intron A) en los títulos de BVDV de tipo silvestre (cepa I-N-dlNs) en células MDBK infectadas persistentemente.

La **Figura 11** ilustra la alineación de la ARN Polimerasa en el dominio B de diversos *Flaviviridae*; la fuente en negrita de mayor tamaño muestra los aminoácidos que están 100 % conservados; los restos de aminoácidos de serina subrayados son aquellos que pueden ser mutados a treonina después del tratamiento con un nucleósido ramificado en 2'. [El resto de serina conservado al 100 % también está subrayado y representa el aminoácido que se ha mutado a Treonina tras el tratamiento con un nucleósido ramificado en 2' (Ser₄₀₅ de la región de la ARN polimerasa de BVDV; Ser₂₈₂ de la región de la ARN polimerasa del VHC). Véase Lai *et al. J Virol.* **1999**, 73, 10129-36.

Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto que el uso prolongado de un nucleósido ramificado en 2', por ejemplo, un nucleósido ramificado en 2' representado a continuación y, en particular, un nucleósido de pirimidina ramificado en 2' tal como el compuesto β -D-2'-CH₃-riboC, se asocia con una mutación en un nucleótido que codifica la serina en la secuencia de consenso altamente conservada, XRXSGXXXT, del dominio B de la región de ARN polimerasa (**Figura 11**) de *Flaviviridae*, generando un cambio en el resto de aminoácido serina a un aminoácido diferente, por ejemplo, treonina. Este dominio se encuentra en la región NS5B del genoma del VHC, así como en genomas de otros flavivirus. Está altamente conservado entre todos los genomas de hepacivirus, pestivirus y flavivirus (**Figura 11**, Lai *et al. J Virol.* **1999**, 73, 10129-36).

En el caso de la infección por BVDV, los nucleósidos ramificados en 2' y, en particular, los nucleósidos de pirimidina ramificados en 2' tales como el compuesto β -D-2'-CH₃-riboC, inducen una mutación de una guanina (G) a citidina (C) en el resto 1.214 de la ARN polimerasa del BVDV, generando un cambio en el resto de aminoácido serina a treonina de la posición 405 de la enzima. Este resto de serina se ubica en la secuencia de consenso conservada (XRXSGXXXT) del dominio B de la ARN polimerasa (**Figuras 5 y 11**), identificado por análisis mutacional (Lai V. C., Kao C.C., Ferrari E., Park J., Uss A. S., Wright-Minogue J., Hong Z., y J.Y. Lau. "Mutational analysis of bovine viral diarrhea virus RNA-dependent RNA polymerase" *J Virol.* **1999**, 73, 10129-36).

En el caso de la infección por VHC, los nucleósidos ramificados en 2' y, en particular, los nucleósidos de pirimidina ramificados en 2' tales como el compuesto β -D-2'-CH₃-riboC inducen una mutación en un nucleótido que codifica la Serina₂₈₂ en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa (**Figura 11**), generando un cambio del resto serina a un aminoácido diferente, tal como treonina.

Además, se ha descubierto que los nucleósidos ramificados en 2' y el interferón actúan sinérgicamente para inhibir *Flaviviridae*. En particular, los nucleósidos de pirimidina ramificados en 2' tales como el compuesto β -D-2'-CH₃-riboC y el interferón alfa-2b administrados en combinación y/o alternancia actúan sinérgicamente para inhibir *Flaviviridae*. Además, se ha descubierto que las poblaciones víricas resistentes, que surgen después del tratamiento con nucleósido ramificado en 2', por ejemplo, el tratamiento con β -D-2'-CH₃-riboC, muestran mayor sensibilidad al tratamiento posterior con interferón. Por lo tanto, la terapia secuencial y/o de combinación de un nucleósido ramificado en 2' e interferón puede reducir sustancialmente las infecciones por *Flaviviridae*.

55 La presente invención proporciona un nucleósido con metilo en 2', o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento

de la hepatitis C en un hospedador, en donde el método comprende administrar dicho nucleósido con metilo en 2' o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y administrar interferón, en donde dicho nucleósido con metilo en 2' ha causado una mutación en el nucleótido 8443 (de G a C) del genoma del virus de la hepatitis C o del aminoácido 282 Serina a Treonina de la región de la ARN polimerasa del virus de la hepatitis C.

La presente invención también proporciona interferón para su uso en un método de tratamiento de la hepatitis C en un hospedador, en donde el hospedador ha recibido un nucleósido con metilo en 2', o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, que ha causado una mutación en el nucleótido 8.443 (de G a C) del genoma del virus de la hepatitis C o del aminoácido 282 Serina a Treonina de la región de la ARN polimerasa del virus de la hepatitis C.

Dicho nucleósido con metilo en 2' es como se define en las reivindicaciones.

Dicho método puede comprender además las etapas definidas en las reivindicaciones.

I. Definiciones

Como se usa en la presente memoria, la expresión "virus resistente" se refiere a un virus que presenta un aumento del triple y, más normalmente, del quintuple o superior en la CE₅₀ en comparación con el virus sin tratamiento previo.

El término "aminoácido" incluye aminoácidos α , β , γ o δ naturales y sintéticos, e incluye, pero no está limitado a, los aminoácidos encontrados en las proteínas, es decir, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina, e histidina. En una realización preferida, el aminoácido está en la configuración L, pero también puede estar en la configuración D. Como alternativa, el aminoácido puede ser un derivado de alanilo, valinilo, leucinilo, isoleucinilo, prolinilo, fenilalaninilo, triptofanilo, metioninilo, glicinilo, serinilo, treoninilo, cisteinilo, tirosinilo, asparaginilo, glutaminilo, aspartoilo, glutaroilo, lisinilo, argininilo, histidinilo, β -alanilo, β -valinilo, β -leucinilo, β -isoleucinilo, β -prolinilo, β -fenilalaninilo, β -triptofanilo, β -metioninilo, β -glicinilo, β -serinilo, β -treoninilo, β -cisteinilo, β -tirosinilo, β -asparaginilo, β -glutaminilo, β -aspartoilo, β -glutarilo, β -lisinilo, β -argininilo o β -histidinilo.

Las abreviaturas de los aminoácidos usadas en la presente memoria se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Aminoácidos		Codones
Alanina	Ala A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp D	GAC GAU GAC GAU
Ácido glutámico	Glu E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe F	UUC UUU
Glicina	Gly G	GGA GCG GGG GGU
Histidina	His H	CAC CAU
Isoleucina	Ile I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys K	AAA AAG
Leucina	Leu L	UUA UUG CUA CUC CUG GUU
Metionina	Met M	AUG
Asparagina	Asn N	AAC AAU
Prolina	Pro P	CCA CCC CCG CCU

Aminoácidos		Codones
Glutamina	Gln Q	CAA CAG
Arginina	Arg R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp W	UGG
Tirosina	Tyr Y	UAC UAU

La expresión "reactivos de amplificación" se refiere a diversos tampones, enzimas, cebadores, trifosfatos de desoxinucleósido (tanto convencionales como no convencionales) y cebadores usados para realizar el procedimiento de amplificación seleccionado.

5 "Amplificar" o "amplificación", que normalmente se refiere a un aumento "exponencial" en el ácido nucleico diana, se usa en la presente memoria para describir aumentos tanto lineales como exponenciales en los números de una secuencia diana seleccionada de ácido nucleico.

10 La expresión "se une/n esencialmente" se refiere a la hibridación complementaria entre un oligonucleótido y una secuencia diana, y abarca desapareamientos menores que pueden estar contenidos mediante la rigurosidad del medio de hibridación para conseguir el cebado deseado para las polimerasas de PCR o la detección de la señal de hibridación.

"Hibridación" se refiere a la unión de dos ácidos nucleicos monocatenarios a través de un emparejamiento de bases complementarias.

15 "Ácido nucleico" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma monocatenaria o bicatenaria, y a menos que se limite de otro modo, englobaría análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de manera similar a los nucleótidos naturales,

La expresión "polimerasas de nucleótidos" se refiere a enzimas capaces de catalizar la síntesis de ADN o ARN a partir de precursores de nucleósidos trifosfato. En las reacciones de amplificación, las polimerasas dependen del molde y, normalmente, añaden nucleótidos al extremo 3' del polímero que se está formando. La polimerasa puede ser termoestable como se describe en las patentes de EE.UU. n.º 4.889, 818 y 5.079.352.

20 El término "oligonucleótido" se refiere a una molécula compuesta por dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos tales como cebadores, sondas, fragmentos de ácido nucleico que se va a detectar y a controles de ácidos nucleicos. El tamaño exacto de un oligonucleótido depende de muchos factores y de la función o del uso final del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se pueden preparar mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas y síntesis química directa mediante un método tal como el método de fosfotriéster de Narang *et al.*, *Meth. Enzymol.* **1979**, 68:90-99; el método de fosfodiéster de Brown *et al.*, *Meth. Enzymol.*, **1979**, 68:109-151; el método de dietilfosforamida de Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22: 1859-1862; y el método de soporte sólido de la patente de EE.UU. n.º 4.458.066.

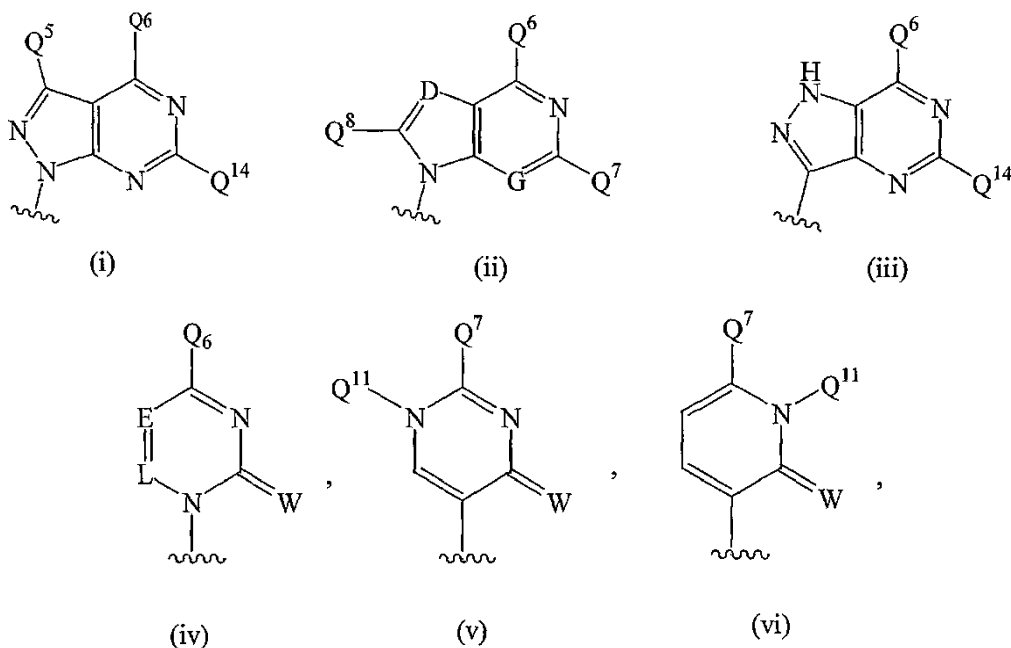
30 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, ya sea natural o sintético, capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y un agente para la polimerización (es decir, ADN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Un cebador es preferiblemente un oligodesoxirribonucleótido monocatenario. La longitud apropiada de un cebador depende del uso pretendido del cebador, pero normalmente varía entre aproximadamente 14 o aproximadamente 15 a 25 o 30 nucleótidos. Las moléculas cortas de cebador, en general, requieren 35 temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde, pero debe ser suficientemente complementario para hibridarse con un molde.

40 El término "cebador" puede referirse a más de un cebador, en particular, en caso de que haya alguna ambigüedad en la información relativa a uno o ambos extremos de la región diana que se vaya a amplificar. Por ejemplo, si una región muestra niveles significativos de polimorfismo en una población, se pueden preparar mezclas de cebadores

- que amplifiquen secuencias alternativas. Un cebador puede marcarse, si se desea, incorporando un marcador detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ^{32}P , colorantes fluorescentes, reactivos densos de electrones, enzimas (como se usan comúnmente en un ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales. También se puede usar un marcador para "capturar" el cebador, con el fin de facilitar la inmovilización del cebador o de un producto de extensión del cebador, tal como ADN amplificado, sobre un soporte sólido.
- "Sonda" se refiere a un oligonucleótido que se une a través de un emparejamiento de bases complementarias a una subsecuencia de un ácido nucleico diana. El experto en la técnica entenderá que normalmente las sondas se unirán esencialmente a secuencias diana carentes de complementariedad completa con la secuencia de sonda dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas se marcan preferiblemente directamente con isótopos o se marcan indirectamente tal como con biotina a la que un complejo de estreptavidina puede unirse más tarde. Mediante el ensayo de la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la diana.
- "Subsecuencia" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprenden una parte de una secuencia más larga de ácidos nucleicos.
- La expresión "región diana" se refiere a una región de un ácido nucleico que se va a analizar y que puede incluir una región polimórfica.
- El término alquilo, como se usa en la presente memoria, a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico, primario, secundario o terciario, normalmente, de C_1 a C_{10} , e incluye en concreto metilo, CF_3 , CCl_3 , CFCl_2 , CF_2Cl , etilo, CH_2CF_3 , CF_2CF_3 , 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 grupos alquilo tanto sustituidos como no sustituidos, y en particular, incluye grupos alquilo halogenados, e incluso más concretamente, grupos alquilo fluorados. Las fracciones con las que el grupo alquilo puede estar sustituido se seleccionan del 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 desprotegidos o protegidos según sea necesario, como es conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Greene *et al.*, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición 1991.
- El término alquilo inferior, como se usa en la presente memoria, y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un grupo alquilo C_1 a C_4 saturado, lineal, ramificado o, si procede, cíclico (por ejemplo, ciclopropilo), incluyendo tanto formas sustituidas como no sustituidas. A menos que se especifique de otro modo en la presente solicitud, cuando alquilo es una fracción adecuada, se prefiere alquilo inferior. De manera similar, cuando alquilo o alquilo inferior es una fracción adecuada, se prefiere alquilo o alquilo inferior no sustituido.
- El término alquilamino o arilamino se refiere a un grupo amino que tiene uno o dos sustituyentes alquilo o arilo, respectivamente.
- El término "protegido", como se usa en la presente memoria, y a menos que se defina lo contrario, se refiere a un grupo que se añade a un átomo de oxígeno, nitrógeno o fósforo para evitar su reacción posterior o para otros fines. Los expertos en la técnica de la síntesis orgánica conocen una amplia variedad de grupos protectores de oxígeno y nitrógeno.
- El término arilo, como se usa en la presente memoria, y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a fenilo, bifenilo o naftilo, y preferiblemente, a fenilo. El término incluye fracciones tanto sustituidas como no sustituidas. El grupo arilo puede estar sustituido con una o más fracciones seleccionadas del 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 desprotegidos o protegidos según sea necesario, como es conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Greene, *et al.*, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991.
- El término alcarilo o alquilarilo se refiere a un grupo alquilo con un sustituyente arilo. El término aralquilo o arilalquilo se refiere a un grupo arilo con un sustituyente alquilo.
- El término halo, como se usa en la presente memoria, incluye cloro, bromo, yodo y flúor.
- El término base se refiere a cualquier base de purina o pirimidina incluyendo, pero no se limitan a, guanina, adenina, hipoxantina, 2,6-diaminopurina, 6-cloropurina, N^6 -alquilpurinas, N^6 -acilpurinas (en donde acilo es $\text{C}(\text{O})$ (alquilo, arilo, alquilarilo, o arilalquilo), N^6 -bencilpurina, N^6 -halopurina, N^6 -vinilpurina, N^6 -purina acetilénica, N^6 -acil-purina, N^6 -hidroxialquil-purina, N^6 -tioalquil-purina, N^2 -alquilpurinas, N^2 -alquil-6-tiopurinas, timina, citosina, 5-fluorcitosina, 5-metilcitosina, 6-azapirimidina, incluyendo 6-azacitosina, 2- y/o 4-mercaptopirimidina, uracilo, 5-halouracilo, incluyendo 5-fluoruracilo, C^5 -alquilpirimidinas, C^5 -bencilpirimidinas, C^5 -halopirimidinas, C^5 -vinilpirimidina, C^5 -pirimidina acetilénica, C^5 -acil-pirimidina, C^5 -hidroxialquil-purina, C^5 -amidopirimidina, C^5 -cianopirimidina, C^5 -nitropirimidina, C^5 -amino-pirimidina, N^2 -alquilpurinas, N^2 -alquil-6-tiopurinas, 5-azacitidinilo, 5-aza-uracililo,

triazolopiridinilo, imidazolopiridinilo, pirrolopirimidinilo, pirazolopirimidinilo,

una base de fórmula:



5 en donde:

G y L son cada uno independientemente CH o N;

10 D es N, CH, C-CN, C-NO₂, C-₃alquilo C₁₋₃, C-NHCONH₂, C-CONQ¹¹Q¹¹, C-CSNQ¹¹Q¹¹, CCOOQ¹¹, C-C(=NH)NH₂, C-hidroxi, C-alcoxi C₁₋₃, C-amino, C-alquilamino C₁₋₄, C-di(alquil C₁₋₄)amino, C-halógeno, C-(1,3-oxazol-2-ilo), C-(1,3-tiazol-2-ilo) o C-(imidazol-2-ilo); en donde alquilo no está sustituido o está sustituido con de uno a tres grupos seleccionados independientemente entre halógeno, amino, hidroxi, carboxi y alcoxi C₁₋₃;

E es N o CQ⁵;

W es O, S, o NR;

R es H, OH, alquilo;

15 Q⁶ es H, OH, SH, NH₂, alquilamino C₁₋₄, di(alquil C₁₋₄)amino, cicloalquilamino C₃₋₆, halógeno, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄ o CF₃;

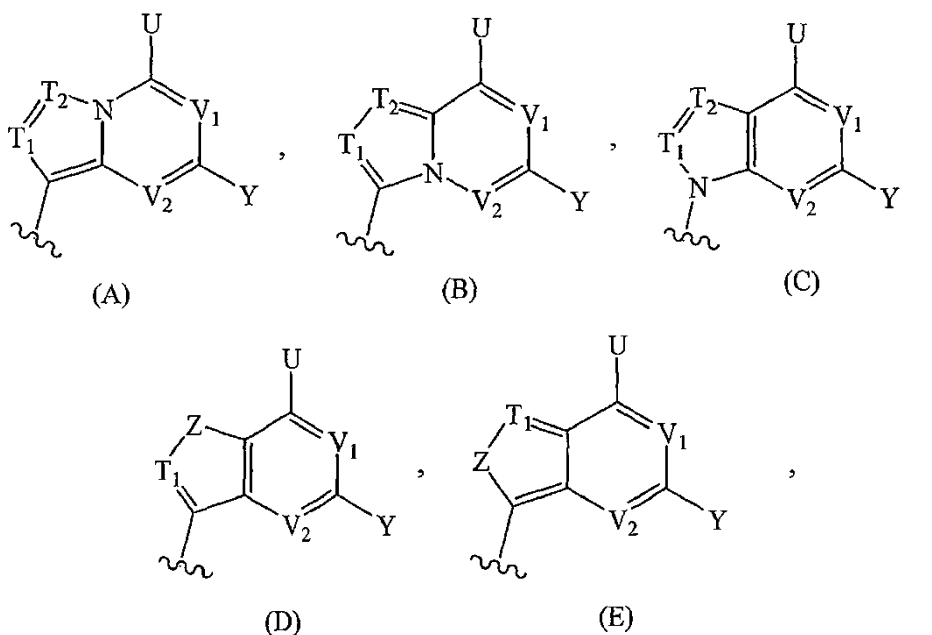
20 Q⁵ es H, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, alquilamino C₁₋₄, CF₃, halógeno, N, CN, NO₂, NHCONH₂, CONQ¹¹Q¹¹, CSNQ¹¹Q¹¹, COOQ¹¹, C(=NH)NH₂, hidroxi, alcoxi C₁₋₃, amino, alquilamino C₁₋₄, di(alquil C₁₋₄)amino, halógeno, 1,3-oxazol-2-ilo, 1,3-tiazol-2-ilo, o imidazol-2-ilo; en donde alquilo no está sustituido o está sustituido con de uno a tres grupos seleccionados independientemente entre halógeno, amino, hidroxi, carboxi y alcoxi C₁₋₃;

25 Q⁷ y Q¹⁴ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, CF₃, OH, SH, OR, SR alquilo C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, cicloalquilamino C₃₋₆ y di(alquil C₁₋₄)amino;

Q¹¹ es independientemente H o alquilo C₁₋₆;

30 Q⁸ es H, halógeno, CN, carboxi, alquilo carbonilo C₁₋₄, N₃, amino, alquilamino C₁₋₄, di(alquil C₁₋₄)amino, hidroxi, alcoxi C₁₋₆, alquiltio C₁₋₆, alquilsulfonilo C₁₋₆, (alquil C₁₋₄)₀₋₂aminometilo, NH₂, CN, NO₂, alquilo C₁₋₃, NHCONH₂, CONQ¹¹Q¹¹, CSNQ¹¹Q¹¹, COOQ¹¹, C(=NH)NH₂, 1,3-oxazol-2-ilo, 1,3-tiazol-2-ilo o imidazol-2-ilo, en donde alquilo no está sustituido o está sustituido con de uno a tres grupos seleccionados independientemente entre halógeno, amino, hidroxi, carboxi y alcoxi C₁₋₃;

una base de fórmula:



en donde:

T_1 y T_2 se seleccionan independientemente entre N, CH o C-Q¹⁶;

5 Q¹⁶, U e Y se seleccionan independientemente entre H, OH, alquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, cicloalquilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoialquilo, cloro, bromo, flúor, yodo, OR⁴, NR⁴R⁵ o SR⁵, Br-vinilo, -O-alquilo, -O-alqueno, -O-alquino, -O-arilo, -O-aralquilo, -O-acilo, -O-cicloalquilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, NH-acilo, N-arilo, N-aralquilo, NH-cicloalquilo, SH, S-alquilo, S-acilo, S-arilo, S-cicloalquilo, S-aralquilo, CN, N₃, COOH, CONH₂, CO₂-alquilo, CONH-alquilo, CON-dialquilo, OH, CF₃, CH₂OH, (CH₂)_mOH, (CH₂)_mNH₂, (CH₂)_mCOOH, (CH₂)_mCN, (CH₂)_mNO₂, (CH₂)_mCONH₂, alquilamino C₁₋₄, di(alquil C₁₋₄)amino, cicloalquilamino C₃₋₆, alcoxi C₁₋₄, alcoxycarbonilo C₁₋₄, alquiltio C₁₋₆, alquilsulfonilo C₁₋₆, (alquil C₁₋₄)₀₋₂aminometilo, o -NHC(=NH)NH₂;

15 R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, acilo (incluyendo acilo inferior), o alquilo (incluyendo, pero no se limitan a metilo, etilo, propilo y ciclopropilo);

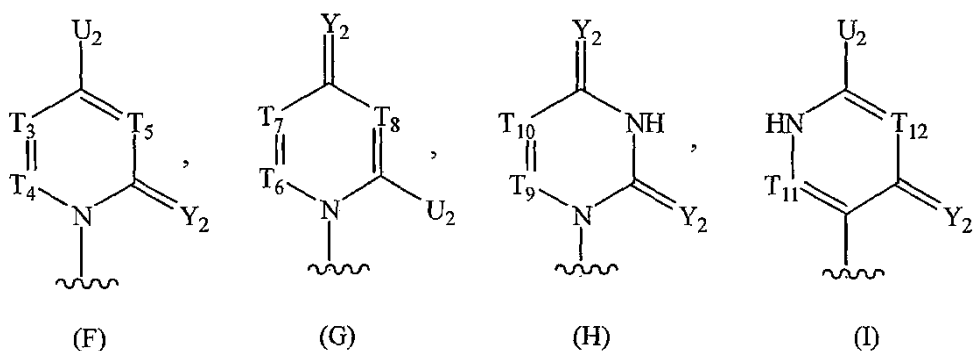
m es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

Z es S, SO, SO₂, C=O o NQ²⁰;

Q²⁰ es H o alquilo; y

V₁ y V₂ se seleccionan independientemente entre CH o N;

una base de fórmula:



20

en donde:

T_3 y T_4 se seleccionan independientemente entre N o CQ²²;

Q²² se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no

5 sustituido, alquino sustituido o no sustituido, cicloalquilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxilquilo, cloro, bromo, flúor, yodo, OR⁴, NR⁴R⁵ o SR⁵, Br-vinilo, -O-alquilo, -O-alqueno, -O-alquino, -O-arilo, -O-aralquilo, -O-acilo, -O-cicloalquilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, NH-acilo, N-arilo, N-aralquilo, NH-cicloalquilo, SH, S-alquilo, S-acilo, S-arilo, S-cicloalquilo, S-aralquilo, CN, N₃, COOH, CONH₂, CO₂-alquilo, CONH-alquilo, CON-dialquilo, OH, CF₃, CH₂OH, (CH₂)_mOH, (CH₂)_mNH₂, (CH₂)_mCOOH, (CH₂)_mCN, (CH₂)_mNO₂, (CH₂)_mCONH₂, alquilamino C₁₋₄, di(alquil C₁₋₄)amino, cicloalquilamino C₃₋₆, alcoxi C₁₋₄, alcoxycarbonilo C₁₋₄, alquiltio C₁₋₆, alquilsulfonilo C₁₋₆, (alquil C₁₋₄)₀₋₂aminometilo o -NHC(=NH)NH₂;

T₅ es NH;

10 R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, acilo (incluyendo acilo inferior), o alquilo (incluyendo pero no se limitan a metilo, etilo, propilo y ciclopropilo);

m es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

T₆, T₇, T₈, T₉, T₁₀, T₁₁ y T₁₂ se seleccionan independientemente entre N o CH;

U₂ es H, alquilo de cadena lineal, ramificado o cíclico, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxilquilo, cloro, bromo, flúor, yodo, OR⁴, NR⁴R⁵ o SR⁵;

15 Y₂ es O, S, NH, NR o CQ²⁴Q²⁶, donde R es H, OH o alquilo;

Q²⁴ y Q²⁶ se seleccionan independientemente entre H, alquilo, alquilo de cadena lineal, ramificado o cíclico, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxilquilo, cloro, bromo, flúor, yodo, OR⁴, NR⁴R⁵ o SR⁵.

20 Otros ejemplos adicionales de bases de purina incluyen, pero no se limitan a, guanina, adenina, hipoxantina, 2,6-diaminopurina, 6-cloropurina y 6-N-metilamino-purina. Los grupos funcionales de oxígeno y nitrógeno en la base se pueden proteger según sea necesario o se desee. Los grupos protectores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen trimetilsililo, dimetilhexilsililo, *t*-butildimetilsililo y *t*-butildifenilsililo, tritilo, grupos alquilo y grupos acilo tales como acetilo y propionilo, metanosulfonilo y *p*-toluenosulfonilo.

25 El término acilo o la expresión éster enlazado a O se refieren a un grupo de fórmula C(O)R', en donde R' es un alquilo lineal, ramificado o cíclico (incluyendo alquilo inferior), aminoácido, arilo incluyendo fenilo, alcarilo, aralquilo incluyendo bencilo, alcoxilquilo incluyendo metoximetilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo; o alquilo sustituido (incluyendo alquilo inferior), arilo incluyendo fenilo opcionalmente sustituido con cloro, bromo, flúor, yodo, alquilo C₁ a C₄ o alcoxi C₁ a C₄, éster de sulfonatos tal como alquil- o aralquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo, el éster de mono-, di- o trifosfato, tritilo o monometoxitritilo, bencilo sustituido, alcarilo, aralquilo incluyendo bencilo, alcoxilquilo incluyendo metoximetilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo. Los grupos arilo de los ésteres comprenden óptimamente un grupo fenilo. En particular, los grupos acilo incluyen acetilo, trifluoroacetilo, metilacetilo, ciclopropilacetilo, propionilo, butirilo, hexanoílo, heptanoílo, octanoílo, neo-heptanoílo, fenilacetilo, 2-acetoxi-2-fenilacetilo, difenilacetilo, α -metoxi- α -trifluorometil-fenilacetilo, bromoacetilo, 2-nitro-bencenoacetilo, 4-clorobencenoacetilo, 2-cloro-2,2-difenilacetilo, 2-cloro-2-fenilacetilo, trimetilacetilo, clorodifluoroacetilo, perfluoroacetilo, fluoroacetilo, bromodifluoroacetilo, metoxiacetilo, 2-tiofeneacetilo, clorosulfonilacetilo, 3-metoxifenilacetilo, fenoxiacetilo, *tert*-butilacetilo, tricloroacetilo, monocloro-acetilo, dicloroacetilo, 7*H*-dodecafluoroheptanoílo, perfluoro-heptanoílo, 7*H*-dodeca-fluoroheptanoílo, 7-clorododecafluoro-heptanoílo, 7-cloro-dodecafluoro-heptanoílo, 7*H*-dodecafluoroheptanoílo, 7*H*-dodeca-fluoroheptanoílo, nona-fluor-3,6-dioxa-heptanoílo, nonafluor-3,6-dioxaheptanoílo, perfluoroheptanoílo, metoxibenzóilo, metil-3-amino-5-feniltiofene-2-carboxilo, 3,6-dicloro-2-metoxi-benzóilo, 4-(1,1,2,2-tetrafluoroetoxi)-benzóilo, 2-bromo-propionilo, omega-aminocapriló, decanoílo, n-pentadecanoílo, estearilo, 3-ciclopentil-propionilo, 1-benceno-carboxilo, O-acetilmandelilo, pivaloilacetilo, 1-adamantanocarboxilo, ciclohexano-carboxilo, 2,6-piridindicarboxilo, ciclopropano-carboxilo, ciclobutano-carboxilo, perfluorociclohexilcarboxilo, 4-metilbenzóilo, clorometilisoxazolil-carbonilo, perfluorociclohexil-carboxilo, crotonilo, 1-metil-1*H*-indazol-3-carbonilo, 2-propenilo, isovalerilo, 1-pirrolidincarbonilo, 4-fenilbenzóilo.

45 Como se usa en la presente memoria, la expresión "esencialmente exento/a de" o "esencialmente en ausencia de" se refiere a una composición de nucleósido que incluye al menos del 95 % al 98 % en peso, e incluso más preferiblemente del 99% al 100 % en peso, del enantiómero designado de ese nucleósido. En una realización preferida, en los métodos y compuestos de la presente invención, los compuestos están esencialmente exentos de enantiómeros.

50 Del mismo modo, el término "aislado/a" se refiere a una composición de nucleósido que incluye al menos del 95 % al 98 % en peso, e incluso más preferiblemente del 99% al 100 % en peso, del nucleósido, comprendiendo el resto otras especies químicas o enantiómeros.

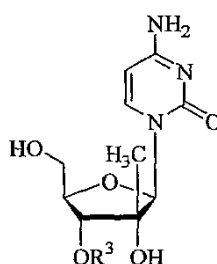
55 El término "hospedador", como se usa en la presente memoria, se refiere a un organismo unicelular o multicelular en el que el virus puede replicarse, incluyendo líneas celulares y animales, y preferiblemente un ser humano. Como alternativa, el hospedador puede ser portador de una parte del genoma vírico de *Flaviviridae*, cuya replicación o función puede ser alterada por los compuestos de la presente invención. El término hospedador se refiere específicamente a células infectadas, células transfectadas con todo o parte del genoma de *Flaviviridae* y animales,

en particular, primates (incluyendo chimpancés) y seres humanos. En la mayoría de las aplicaciones animales de la presente invención, el hospedador es un paciente humano. Las aplicaciones veterinarias, en ciertas indicaciones, sin embargo, están claramente anticipadas por la presente invención (tal como los chimpancés).

II. Nucleósidos con metilo en 2'

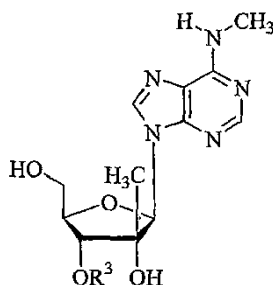
- 5 La presente invención proporciona un nucleósido con metilo en 2' como se define en las reivindicaciones, o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento de la hepatitis C en un hospedador, en donde el método comprende administrar dicho nucleósido con metilo en 2' o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y administrar interferón, en donde dicho nucleósido con metilo en 2' ha causado una mutación en el nucleótido 8.443 (de G a C) del genoma del virus de la hepatitis C o del aminoácido 282 Serina a Treonina de la región de la ARN polimerasa del virus de la hepatitis C.

En una realización específica, el nucleósido 2'-metil-pirimidina se representa mediante el compuesto β -D-2'-CH₃-riboC, que se representa por la fórmula:



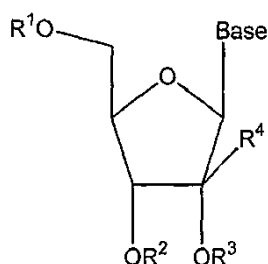
- 15 en donde R³ es H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un fármaco de fosfato estabilizado); acilo (incluyendo acilo inferior); alquilo (incluyendo alquilo inferior); éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en el presente memoria; lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R³ es H o fosfato cuando se administra *in vivo*.

En otra realización específica, el nucleósido 2'-metil-purina se representa mediante el compuesto β -D-2'-CH₃-ribo-6-N-metilaminopurina, que se representa por la fórmula:



- 25 en donde R³ es H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un fármaco de fosfato estabilizado); acilo (incluyendo acilo inferior); alquilo (incluyendo alquilo inferior); éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en el presente memoria; lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R³ es H o fosfato cuando se administra *in vivo*.

- 30 En una realización de la invención, el nucleósido con metilo en 2' es de fórmula general:



o su profármaco y/o sal farmacéuticamente aceptable, en donde

R¹, R², y R³ son independientemente H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un profármaco de fosfato estabilizado); acilo (incluyendo acilo inferior); alquilo (incluyendo alquilo inferior); éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en la presente memoria; lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R¹, R² o R³ es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*; y

R⁴ es metilo;

y Base es una purina o pirimidina como se describe más adelante en la presente memoria.

Síntesis general de nucleósidos ramificados en 2':

1. Glicosilación de la nucleobase con un azúcar modificado apropiadamente

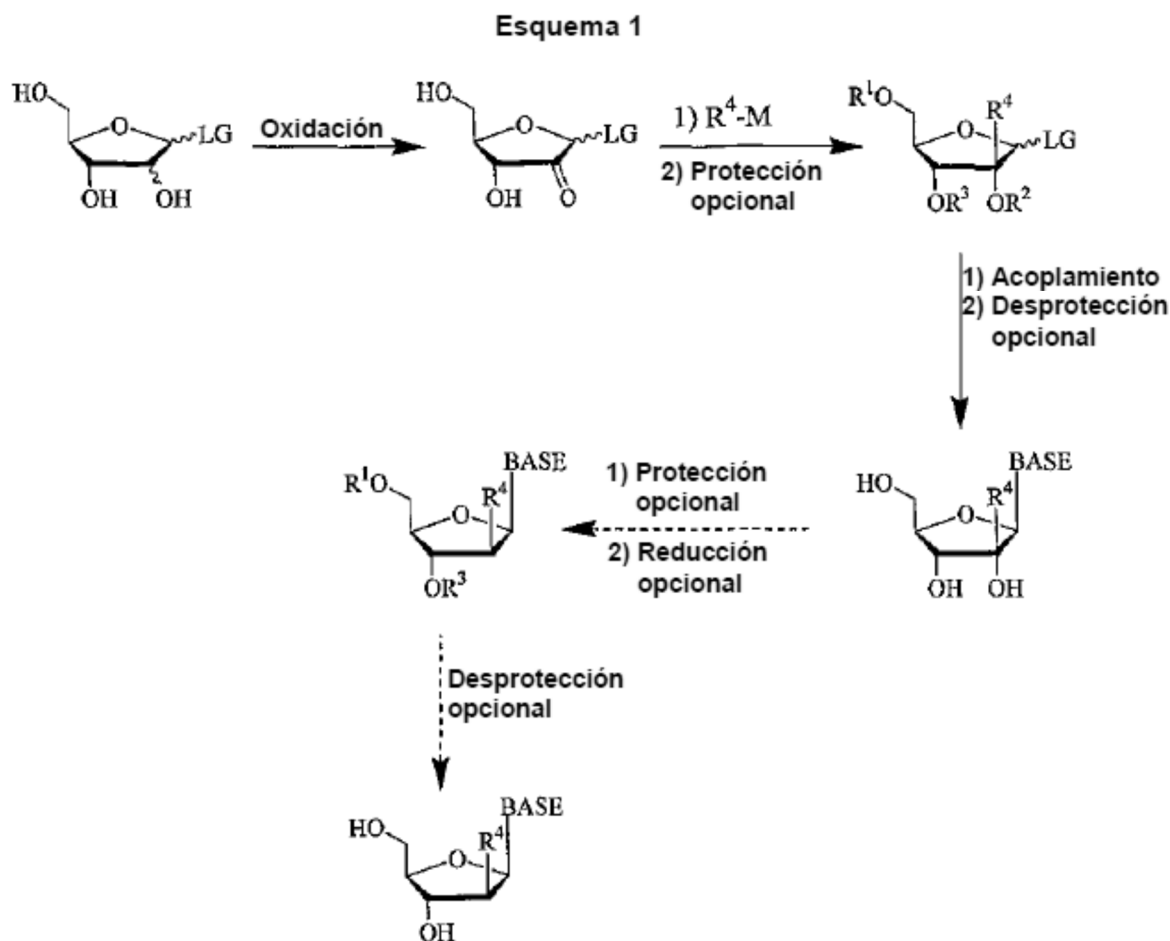
El material de partida clave para este proceso puede ser un azúcar apropiadamente sustituido con un 2'-OH y 2'-H, con el grupo saliente apropiado (LG), por ejemplo, un grupo acilo o un grupo cloro, bromo, flúor o yodo. El azúcar puede adquirirse o puede prepararse mediante cualquier medio conocido incluyendo técnicas convencionales de epimerización, sustitución, oxidación y reducción. El azúcar sustituido se puede oxidar luego con el agente oxidante apropiado en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para producir el azúcar modificado en 2'. Los agentes oxidantes posibles son el reactivo de Jones (una mezcla de ácido crómico y ácido sulfúrico), el reactivo de Collins (óxido de Cr (VI) y dipiridina, reactivo de Corey (clorocromato de piridinio), dicromato de piridinio, dicromato ácido, permanganato de potasio, MnO₂, tetróxido de rutenio, catalizadores de transferencia de fase tales como ácido crómico o permanganato soportado sobre un polímero, Cl₂-piridina, H₂O₂-molibdato de amonio, NaBrO₂-CAN, NaOCl en HOAc, cromito de cobre, óxido de cobre, níquel Raney, acetato de paladio, reactivo de Meerwin-Pondorf-Verley (*t*-butóxido de aluminio con otra cetona) y *N*-bromosuccinimida.

A continuación, el acoplamiento de un nucleófilo de carbono organometálico, tal como un reactivo de Grignard, un organolitio, dialquilocobre y litio o R⁴-SiMe₃ (en donde R⁴ se define a continuación) en TBAF con la cetona con el disolvente no prótico apropiado a una temperatura adecuada, proporciona el azúcar alquilado en 2'. El azúcar alquilado puede protegerse opcionalmente con un grupo protector adecuado, preferiblemente con un grupo acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991.

El azúcar opcionalmente protegido se puede acoplar entonces a la BASE mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Townsend, "Chemistry of Nucleosides and Nucleotides", Plenum Press, 1994. Por ejemplo, se puede acoplar un azúcar acilado a una base sililada con un ácido de Lewis, tal como tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio o trimetilsililtriflato en el disolvente apropiado a una temperatura adecuada. Como alternativa, se puede acoplar un halo-azúcar a una base sililada con la presencia de trimetilsililtriflato.

Posteriormente, el nucleósido puede desprotegerse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991.

Se puede desear el ribonucleósido ramificado en 2'-C. La síntesis de un ribonucleósido se muestra en el **Esquema 1**. Como alternativa, se puede usar el desoxirribonucleósido. Para obtener estos nucleósidos, el ribonucleósido formado se puede proteger opcionalmente mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991, y luego se puede reducir el 2'-OH con un agente reductor adecuado. Opcionalmente, el 2'-hidroxilo puede activarse para facilitar la reducción; es decir, mediante la reducción de Barton.



en donde:

LG es un grupo saliente;

5 R^1 , R^2 , y R^3 son independientemente H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un profármaco de fosfato estabilizado); acilo (incluyendo acilo inferior); alquilo (incluyendo alquilo inferior); éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en el presente memoria; lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R^1 , R^2 o R^3 es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*; y

10 R^4 es hidrógeno, hidroxilo, alquilo (incluyendo alquilo inferior), azido, ciano, alquenilo, alquinilo, Br, vinilo, -C(O)O(alquilo), -C(O)O(alquilo inferior), -O(acilo), -O(acilo inferior), -O(alquilo), -O(alquilo inferior), -O(alquenilo), cloro, bromo, flúor, yodo, NO₂, NH₂, -NH(alquilo inferior), -NH(acilo), -N(alquilo inferior)₂ o -N(acilo)₂.

2. Modificación de un nucleósido previamente formado

15 El material de partida clave para este proceso puede ser un nucleósido apropiadamente sustituido con un 2'-OH y 2'-H. El nucleósido puede adquirirse o puede prepararse mediante cualquier medio conocido incluyendo técnicas de acoplamiento convencionales. Opcionalmente, el nucleósido puede protegerse con grupos protectores adecuados, preferiblemente, con grupos acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991.

20 El nucleósido adecuadamente protegido se puede oxidar luego con el agente oxidante apropiado en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para producir el azúcar modificado en 2'. Los agentes oxidantes posibles son el reactivo de Jones (una mezcla de ácido crómico y ácido sulfúrico), el reactivo de Collins (óxido de Cr (VI) y dipiridina, reactivo de Corey (clorocromato de piridinio), dicromato de piridinio, dicromato ácido, permanganato de potasio, MnO₂, tetróxido de rutenio, catalizadores de transferencia de fase tales como ácido crómico o permanganato soportado sobre un polímero, Cl₂-piridina, H₂O₂-molibdato de amonio, NaBrO₂-CAN, NaOCl en

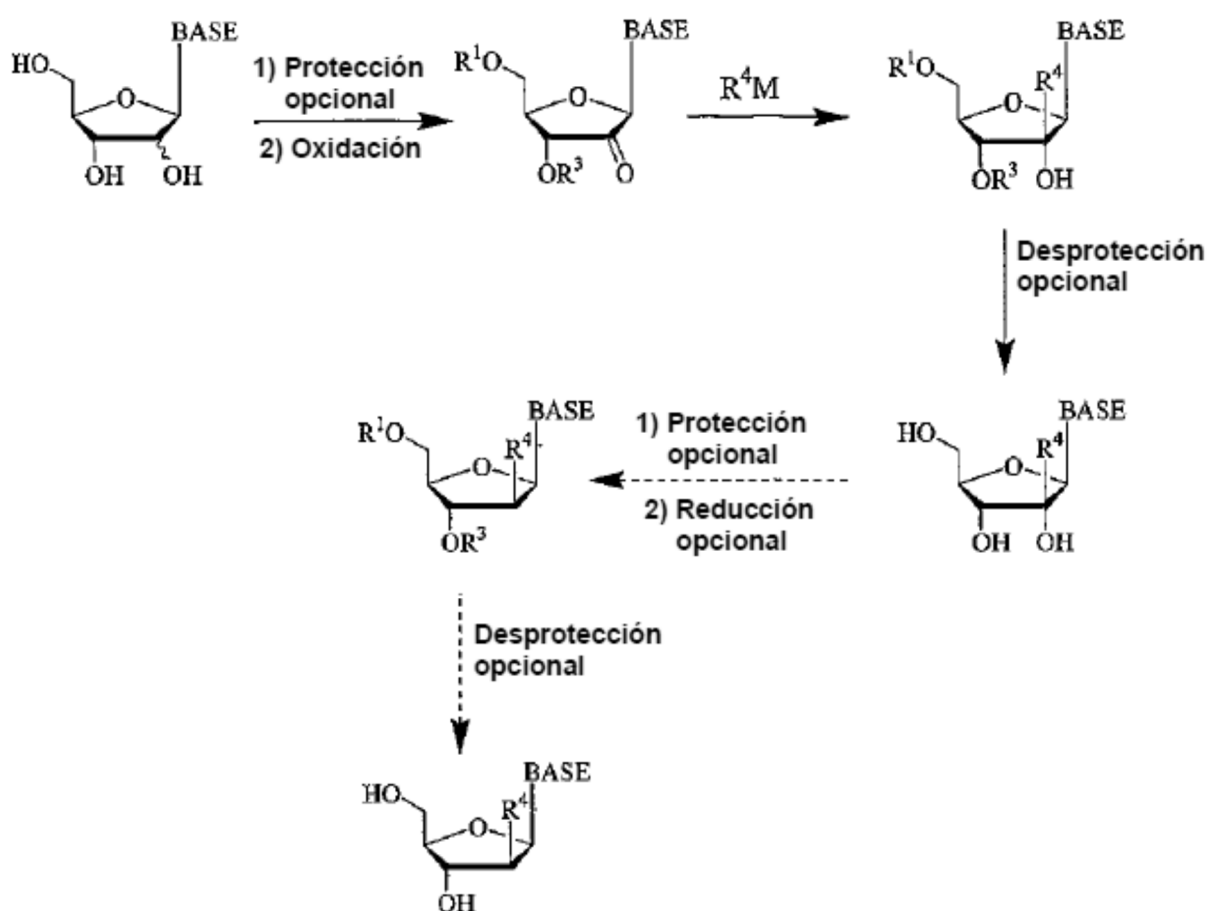
25

HOAc, cromito de cobre, óxido de cobre, níquel Raney, acetato de paladio, reactivo de Meerwin-Pondorf-Verley (*t*-butóxido de aluminio con otra cetona) y *N*-bromosuccinimida.

Posteriormente, el nucleósido puede desprotegerse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991.

Se puede desear el ribonucleósido ramificado en 2'-C. La síntesis de un ribonucleósido se muestra en el **Esquema 2**. Como alternativa, se puede usar el desoxirribonucleósido. Para obtener estos nucleósidos, el ribonucleósido formado se puede proteger opcionalmente mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991, y luego se puede reducir el 2'-OH con un agente reductor adecuado. Opcionalmente, el 2'-hidroxilo puede activarse para facilitar la reducción; es decir, mediante la reducción de Barton.

Esquema 2



en donde:

R^1 y R^3 son independientemente H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un profármaco de fosfato estabilizado); acilo (incluyendo acilo inferior); alquilo (incluyendo alquilo inferior); éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en el presente memoria; lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R^1 o R^3 es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*; y

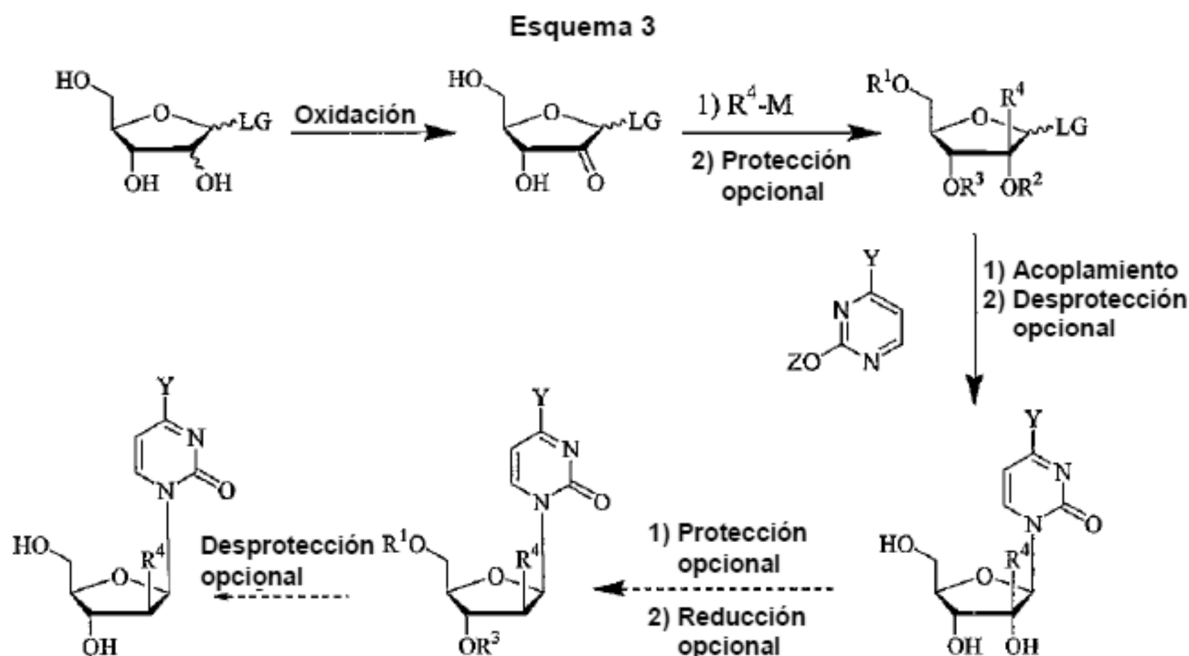
R^4 es hidrógeno, hidroxilo, alquilo (incluyendo alquilo inferior), azido, ciano, alqueno, alquino, Br, vinilo, $-C(O)O$ (alquilo), $-C(O)O$ (alquilo inferior), $-O$ (acilo), $-O$ (acilo inferior), $-O$ (alquilo), $-O$ (alquilo inferior), $-O$ (alqueno), cloro, bromo, flúor, yodo, NO_2 , NH_2 , $-NH$ (alquilo inferior), $-NH$ (acilo), $-N$ (alquilo inferior) $_2$ o $-N$ (acilo) $_2$.

Síntesis general de nucleósido de pirimidina ramificado en 2'**1. Glicosilación de la pirimidina con un azúcar modificado apropiadamente**

En el **Esquema 3** se describe un método general representativo para la preparación de nucleósido de pirimidina ramificado en 2'. Este esquema ilustra el nucleósido de pirimidina ramificado en 2' en la configuración β -D-ribo. Como alternativa, un experto en la técnica podría modificar el esquema general para producir nucleósido de 2'- β -L-pirimidina. El material de partida clave para este proceso puede ser un azúcar apropiadamente sustituido con un 2'-OH y 2'-H, con el grupo saliente apropiado (LG), por ejemplo, un grupo acilo o un grupo cloro, bromo, flúor o yodo. El azúcar puede adquirirse o puede prepararse mediante cualquier medio conocido incluyendo técnicas convencionales de epimerización, sustitución, oxidación y reducción. El azúcar sustituido se puede oxidar luego con el agente oxidante apropiado en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para producir el azúcar modificado en 2'. Los agentes oxidantes posibles son el reactivo de Jones (una mezcla de ácido crómico y ácido sulfúrico), el reactivo de Collins (óxido de Cr (VI) y dipiridina, reactivo de Corey (clorocromato de piridinio), dicromato de piridinio, dicromato ácido, permanganato de potasio, MnO_2 , tetróxido de rutenio, catalizadores de transferencia de fase tales como ácido crómico o permanganato soportado sobre un polímero, Cl_2 -piridina, H_2O_2 -molibdato de amonio, $NaBrO_2$ -CAN, $NaOCl$ en HOAc, cromito de cobre, óxido de cobre, níquel Raney, acetato de paladio, reactivo de Meerwin-Pondorf-Verley (t-butóxido de aluminio con otra cetona) y *N*-bromosuccinimida.

El acoplamiento de un nucleófilo de carbono organometálico, tal como un reactivo de Grignard, un organolitio, dialquilcobre y litio o R^4 -SiMe₃ en TBAF con la cetona con el disolvente no prótico apropiado a una temperatura adecuada, proporciona el azúcar alquilado en 2'. El azúcar alquilado puede protegerse opcionalmente con un grupo protector adecuado, preferiblemente con un grupo acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991.

El azúcar opcionalmente protegido se puede acoplar entonces a una base de pirimidina mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Townsend, "Chemistry of Nucleosides and Nucleotides", Plenum Press, 1994. Por ejemplo, se puede acoplar un azúcar acilado a una pirimidina sililada, tal como citidina, con un ácido de Lewis, tal como tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio o trimetilsililtriflato en el disolvente apropiado a una temperatura adecuada. Como alternativa, se puede acoplar un halo-azúcar a una pirimidina sililada, tal como una citidina, con la presencia de trimetilsililtriflato.



30

en donde:

R^1 , R^2 , y R^3 son independientemente H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un profármaco de fosfato estabilizado); acilo (incluyendo acilo inferior); alquilo (incluyendo alquilo inferior); éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en el presente memoria; lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente

35

farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R^1 , R^2 o R^3 es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*; y

R^4 es hidrógeno, hidroxilo, alquilo (incluyendo alquilo inferior), azido, diano, alqueno, alquino, Brvinilo, $-C(O)O(\text{alquilo})$, $-C(O)O(\text{alquilo inferior})$, $-O(\text{acilo})$, $-O(\text{acilo inferior})$, $-O(\text{alquilo})$, $-O(\text{alquilo inferior})$, $-O(\text{alqueno})$, cloro, bromo, flúor, yodo, NO_2 , NH_2 , $-NH(\text{alquilo inferior})$, $-NH(\text{acilo})$, $-N(\text{alquilo inferior})_2$ o $-N(\text{acilo})_2$.

2. Modificación de un nucleósido de pirimidina ramificado en 2' previamente formado

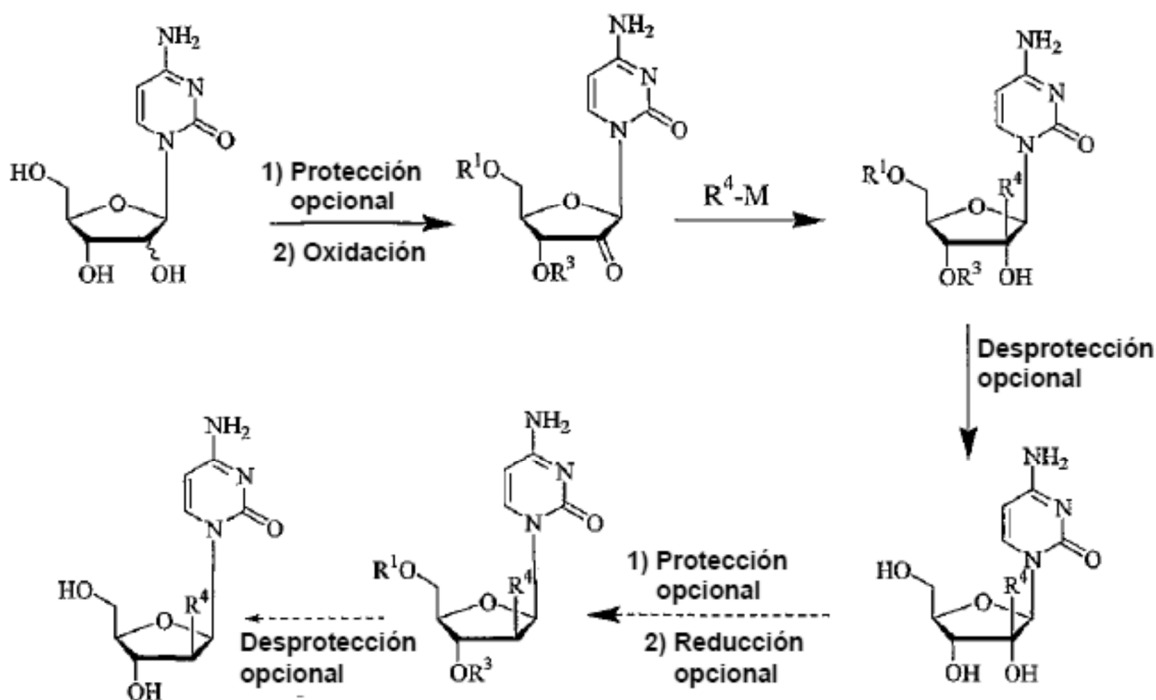
El material de partida clave para este proceso puede ser un nucleósido de pirimidina ramificado en 2' apropiadamente sustituido con un 2'-OH y 2'-H. El nucleósido de pirimidina ramificado en 2' puede adquirirse o puede prepararse mediante cualquier medio conocido incluyendo técnicas de acoplamiento convencionales. Opcionalmente, el nucleósido de pirimidina ramificado en 2', protegido con grupos protectores adecuados, preferiblemente, con grupos acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991.

El nucleósido de pirimidina ramificado en 2' adecuadamente protegido se puede oxidar luego con el agente oxidante apropiado en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para producir el azúcar modificado en 2'. Los agentes oxidantes posibles son el reactivo de Jones (una mezcla de ácido crómico y ácido sulfúrico), el reactivo de Collins (óxido de Cr (VI) y dipiridina, reactivo de Corey (clorocromato de piridinio), dicromato de piridinio, dicromato ácido, permanganato de potasio, MnO_2 , tetróxido de rutenio, catalizadores de transferencia de fase tales como ácido crómico o permanganato soportado sobre un polímero, Cl_2 -piridina, H_2O_2 -molibdato de amonio, $NaBrO_2$ -CAN, $NaOCl$ en HOAc, cromito de cobre, óxido de cobre, níquel Raney, acetato de paladio, reactivo de Meerwin-Pondorf-Verley (*t*-butóxido de aluminio con otra cetona) y *N*-bromosuccinimida.

Posteriormente, el nucleósido de pirimidina ramificado en 2' puede desprotegerse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991.

Se puede desear el ribonucleósido ramificado en 2'-C. La síntesis de un ribonucleósido se muestra en el **Esquema 4**. Como alternativa, se puede usar el desoxirribonucleósido. Para obtener estos nucleósidos, el ribonucleósido formado se puede proteger opcionalmente mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991, y luego se puede reducir el 2'-OH con un agente reductor adecuado. Opcionalmente, el 2'-hidroxilo puede activarse para facilitar la reducción; es decir, mediante la reducción de Barton.

Esquema 4



en donde:

R^1 y R^3 son independientemente H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un profármaco de fosfato

estabilizado); acilo (incluyendo acilo inferior); alquilo (incluyendo alquilo inferior); éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en el presente memoria; lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R¹ o R³ es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*; y

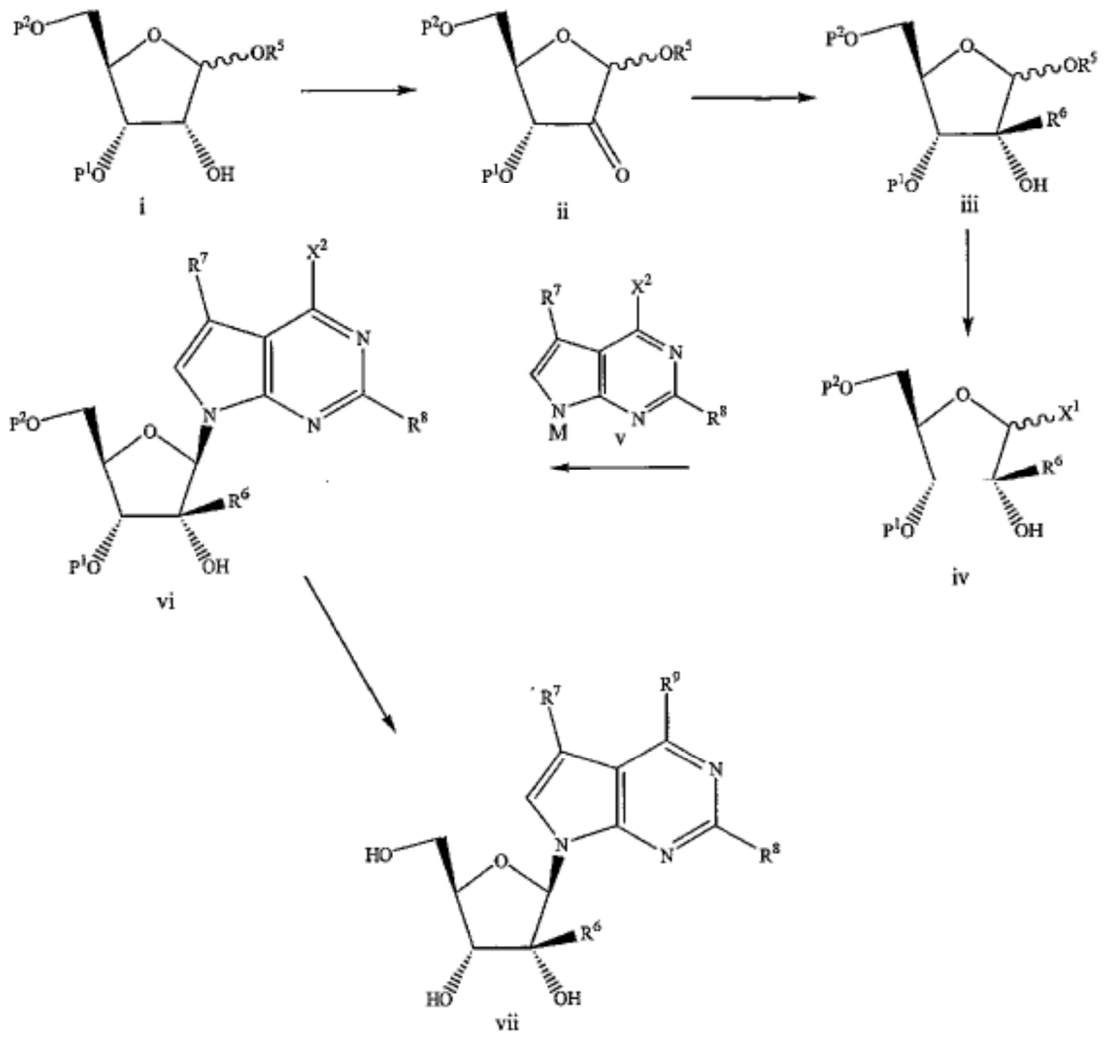
R⁴ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo (incluyendo alquilo inferior), azido, ciano, alquenoilo, alquinoilo, Br-vinilo, -C(O)O(alquilo), -C(O)O(alquilo inferior), -O(acilo), -O(acilo inferior), -O(alquilo), -O(alquilo inferior), -O(alquenoilo), cloro, bromo, flúor, yodo, NO₂, NH₂, -NH(alquilo inferior), -NH(acilo), -N(alquilo inferior)₂ o -N(acilo)₂.

10 **Síntesis general de nucleósido de purina ramificado en 2'**

1. Glicosilación de la pirimidina con un azúcar modificado apropiadamente

En el siguiente **Esquema 5**, se describe un método general representativo para la preparación de nucleósido de purina ramificado en 2'. Dicho esquema ilustra la síntesis de nucleósido de purina ramificado en 2' en la configuración β-D-ribo. Como alternativa, es bien apreciado que los expertos en la técnica son capaces de preparar la configuración β-L-ribo usando el material de partida apropiado. El material de partida es un furanosuro de alquilo 3,5-bis-prottegido, tal como furanosuro de metilo, de fórmula estructural (i). El grupo hidroxilo C-2 se oxida luego con un agente oxidante adecuado, tal como un trióxido de cromo o reactivo de cromato o peryodinano de Dess-Martin, o mediante oxidación de Swern, para proporcionar una cetona C-2 de fórmula estructural (ii). La adición de un reactivo de Grignard, tal como un haluro de alquil-, alquenoil- o alquinoil-magnesio (por ejemplo, MeMgBr, EtMgBr, vinil-MgBr, alil-MgBr y etinil-MgBr) o un alquil-, alquenoil- o alquinoil-litio, tal como MeLi, a través del doble enlace de carbonilo (ii) en un disolvente orgánico adecuado, tal como tetrahidrofurano, éter dietílico y similares, proporciona el alcohol terciario C-2 de fórmula estructural (iii). A continuación, se introduce un buen grupo saliente (tal como F, Cl, Br y I) en la posición C-1 (anomérica) del derivado de azúcar de furanosa mediante el tratamiento del furanosido de fórmula (iii) con un haluro de hidrógeno en un disolvente orgánico adecuado, tal como bromuro de hidrógeno en ácido acético, para proporcionar el haluro de furanosilo intermedio (iv). Un C-sulfonato, tal como metanosulfonato (MeSO₂O-), trifluorometanosulfonato (CF₃SO₂O-) o *p*-toluenosulfonato (-OTs), también puede servir como un grupo saliente útil en la reacción subsiguiente para generar el enlace glucosídico (nucleosídico). El enlace nucleosídico se construye mediante el tratamiento del compuesto intermedio de fórmula estructural (iv) con la sal metálica (tal como litio, sodio o potasio) de una 1H-pirrollo[2,3-d]pirimidina (v) apropiadamente sustituida, tal como una 4-halo-1H-pirrollo[2,3-d]pirimidina apropiadamente sustituida, que puede generarse *in situ* mediante el tratamiento con un hidruro alcalino (tal como hidruro sódico), un hidróxido alcalino (tal como hidróxido potásico), un carbonato alcalino (tal como carbonato de potasio) o una hexametildisilazida alcalina (tal como NaHMDS) en un disolvente orgánico anhidro adecuado, tal como acetonitrilo, tetrahidrofurano, 1-metil-2-pirrolidinona o *N,N*-dimetilformamida (DMF). La reacción de desplazamiento puede catalizarse usando un catalizador de transferencia de fase, tal como TDA-1 o cloruro de trietilbencilamonio, en un sistema bifásico (sólido-líquido o líquido-líquido). Los grupos protectores opcionales del nucleósido protegido de fórmula estructural (vi) se escinden después siguiendo metodologías de desprotección establecidas, tales como las descritas en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", P ed., John Wiley & Sons, 1999. La introducción opcional de un grupo amino en la posición 4 del núcleo de pirrollo[2,3-d]pirimidina se efectúa mediante el tratamiento del compuesto intermediario 4-halo (vi) con la amina apropiada, tal como amoniaco alcohólico o amoniaco líquido, para generar una amina primaria en la posición C-4 (-NH₂), una alquilamina para generar una amina secundaria (-NHR), o una dialquilamina para generar una amina terciaria (-NRR'). Un compuesto de 7H-pirrollo[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona puede derivarse mediante la hidrólisis de (vi) con base acuosa, tal como hidróxido sódico acuoso. La alcoholisis (tal como la metanolisis) de 1-6 proporciona un alcóxido C-4 (-OR), mientras que el tratamiento con un alquilmercaptido proporciona un derivado de alquiltio C-4 (-SR). Pueden requerirse manipulaciones químicas subsiguientes bien conocidas por los expertos en la técnica de la química orgánica/medicinal para obtener los compuestos deseados de la presente invención.

Esquema 5



en donde:

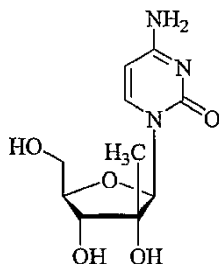
P^1 y P^2 son independientemente un grupo protector; como alternativa, P^1 y P^2 pueden unirse para formar un grupo protector cíclico;

5 R^5 y R^6 son independientemente grupo alquilo;

M es Li, Na o K;

X^1 y X^2 son independientemente F, Cl, Br o I;

R^7 , R^8 , y R^9 son independientemente hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxi, amino, alquilamino o alquilo.

Síntesis de β -2'-CH₃-riboC β -D-2'-CH₃-riboC

5 Las siguientes síntesis proporcionadas son etapas no limitantes para conseguir el compuesto β -D-2'-CH₃-riboC. Un experto en la técnica puede modificar la síntesis de cualquier manera conocida para conseguir el compuesto β -D-2'-CH₃-riboC.

1. Glicosilación de la nucleobase con un azúcar modificado apropiadamente

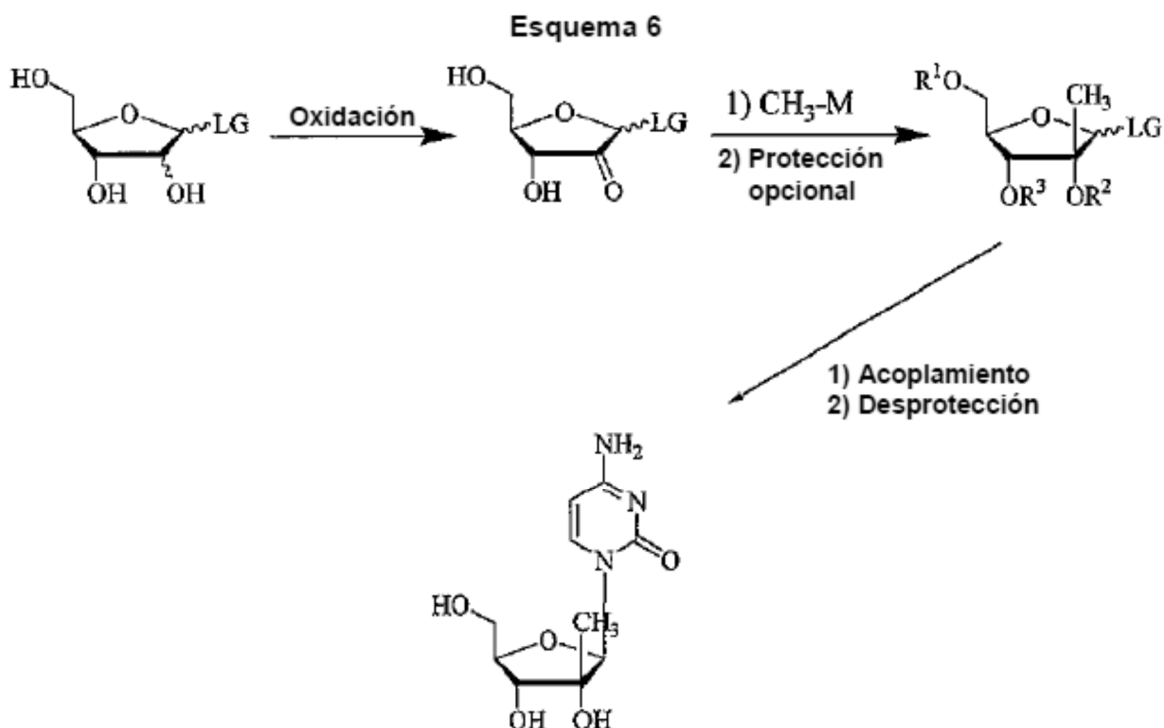
10 El material de partida clave para este proceso puede ser un azúcar apropiadamente sustituido con un 2'-OH y 2'-H, con el grupo saliente apropiado (LG), por ejemplo, un grupo acilo o un grupo cloro, bromo, flúor o yodo. El azúcar puede adquirirse o puede prepararse mediante cualquier medio conocido incluyendo técnicas convencionales de epimerización, sustitución, oxidación y reducción. El azúcar sustituido se puede oxidar luego con el agente oxidante apropiado en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para producir el azúcar modificado en 2'. Los agentes oxidantes posibles son el reactivo de Jones (una mezcla de ácido crómico y ácido sulfúrico), el reactivo de Collins (óxido de Cr (VI) y dipiridina, reactivo de Corey (clorocromato de piridinio), dicromato de piridinio, dicromato ácido, permanganato de potasio, MnO₂, tetróxido de rutenio, catalizadores de transferencia de fase tales como ácido crómico o permanganato soportado sobre un polímero, Cl₂-piridina, H₂O₂-molibdato de amonio, NaBrO₂-CAN, NaOCl en HOAc, cromito de cobre, óxido de cobre, níquel Raney, acetato de paladio, reactivo de Meerwin-Pondorf-Verley (*t*-butóxido de aluminio con otra cetona) y *N*-bromosuccinimida.

20 El acoplamiento de un nucleófilo de carbono organometálico, tal como un reactivo de Grignard, un organolitio, dialquilcobre y litio o CH₃-SiMe₃ en TBAF con la cetona con el disolvente no prótico apropiado a una temperatura adecuada, proporciona el azúcar metilado en 2'. El azúcar metilado puede protegerse opcionalmente con un grupo protector adecuado, preferiblemente con un grupo acilo o siliilo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991.

25 El azúcar opcionalmente protegido se puede acoplar entonces a la BASE mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Townsend, "Chemistry of Nucleosides and Nucleotides", Plenum Press, 1994. Por ejemplo, se puede acoplar un azúcar acilado a una base siliilada con un ácido de Lewis, tal como tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio o trimetilsililtriflato en el disolvente apropiado a una temperatura adecuada. Como alternativa, se puede acoplar un halo-azúcar a una base siliilada con la presencia de trimetilsililtriflato.

30 Posteriormente, el nucleósido con metilo en 2' puede desprotegerse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Segunda edición, 1991.

En el **Esquema 6**, se muestra la síntesis de un 2'-metil-nucleósido.



en donde:

LG es un grupo saliente; y

R^1 , R^2 y R^3 son independientemente H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un profármaco de fosfato estabilizado); acilo (incluyendo acilo inferior); alquilo (incluyendo alquilo inferior); éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en el presente memoria; lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R^1 , R^2 o R^3 es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*.

2. Modificación de un nucleósido con metilo en 2' previamente formado

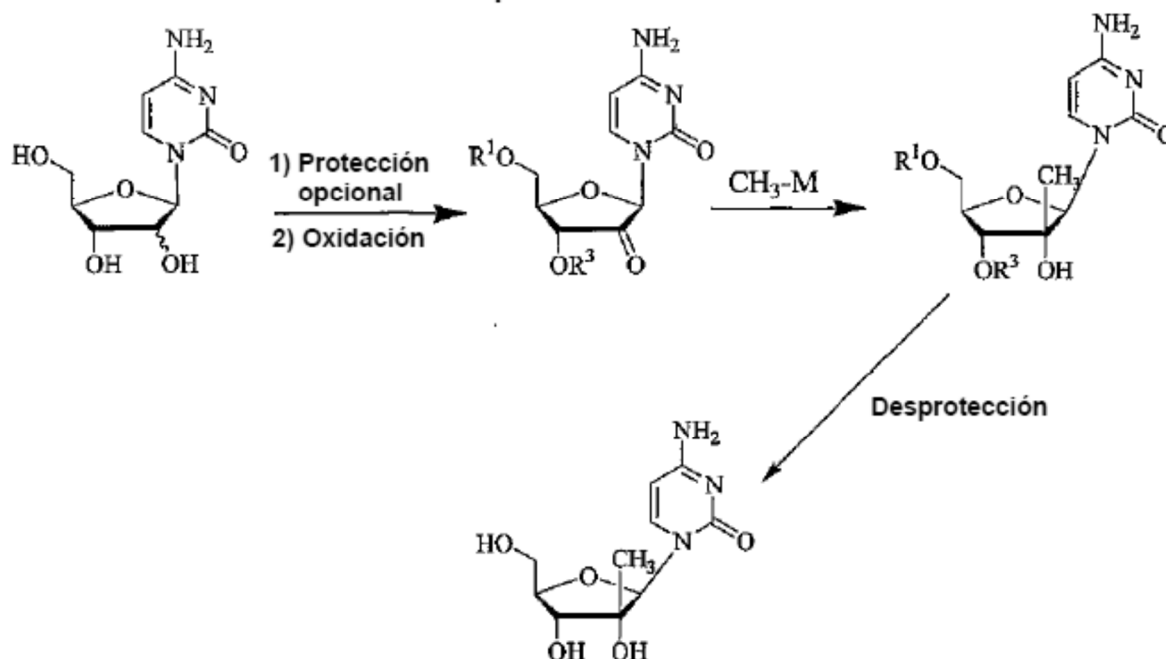
El material de partida clave para este proceso puede ser un nucleósido de 2'-metil-citidina apropiadamente sustituido con un 2'-OH y 2'-H. El nucleósido puede adquirirse o puede prepararse mediante cualquier medio conocido incluyendo técnicas de acoplamiento convencionales. Opcionalmente, el nucleósido puede protegerse con grupos protectores adecuados, preferiblemente, con grupos acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991.

El nucleósido de 2'-metil-citidina adecuadamente protegido se puede oxidar luego con el agente oxidante apropiado en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para producir el azúcar con metilo en 2'. Los agentes oxidantes posibles son el reactivo de Jones (una mezcla de ácido crómico y ácido sulfúrico), el reactivo de Collins (óxido de Cr (VI) y dipiridina, reactivo de Corey (clorocromato de piridinio), dicromato de piridinio, dicromato ácido, permanganato de potasio, MnO_2 , tetróxido de rutenio, catalizadores de transferencia de fase tales como ácido crómico o permanganato soportado sobre un polímero, Cl_2 -piridina, H_2O_2 -molibdato de amonio, $NaBrO_2$ -CAN, $NaOCl$ en HOAc, cromito de cobre, óxido de cobre, níquel Raney, acetato de paladio, reactivo de Meerwin-Pondorf-Verley (*t*-butóxido de aluminio con otra cetona) y *N*-bromosuccinimida.

Posteriormente, el nucleósido puede desprotegerse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991.

En el **Esquema 7**, se muestra la síntesis de un nucleósido de 2'-metil-citidina.

Esquema 7



en donde:

R¹ y R³ son independientemente H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un profármaco de fosfato estabilizado); acilo (incluyendo acilo inferior); alquilo (incluyendo alquilo inferior); éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la definición de arilo dada en el presente memoria; lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R¹ o R³ es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*.

10 Profármacos farmacéuticamente aceptables

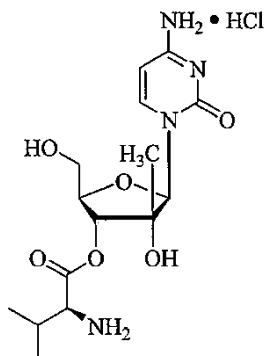
El término "profármaco y/o sal farmacéuticamente aceptable" se usa en toda la memoria descriptiva para describir cualquier forma farmacéuticamente aceptable (tal como un éster, éster de fosfato, sal de un éster o un grupo relacionado) de un compuesto nucleósido que, tras la administración a un paciente, proporciona el compuesto nucleósido precursor. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales adecuadas incluyen las derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre muchos otros ácidos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Los profármacos farmacéuticamente aceptables se refieren a un compuesto que se metaboliza, por ejemplo, se hidroliza o se oxida, en el hospedador para formar el compuesto. Los ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos protectores biológicamente lábiles sobre una fracción funcional del compuesto activo. Los profármacos incluyen compuestos que se pueden oxidar, reducir, aminorar, desaminar, hidroxilar, deshidroxilar, hidrolizar, deshidrolizar, alquilar, desalquilar, acilar, desacilar, fosforilar, desfosforilar para producir el compuesto activo. Los compuestos poseen actividad antivírica frente a *Flaviviridae*, o se metabolizan en un compuesto que presenta dicha actividad.

Los nucleósidos ramificados en 2', incluyendo el nucleósido de pirimidina ramificado en 2', tal como β-D-2'-CH₃-riboC, o compuestos relacionados administrados como profármacos acilados o nucleósidos se pueden usar en terapia de combinación o de alternancia.

Cualquiera de los nucleósidos descritos en la presente memoria u otros compuestos que contienen una función hidroxilo o amina pueden administrarse como un profármaco nucleósido para aumentar la actividad, la biodisponibilidad, la estabilidad o alterar de otro modo las propiedades del nucleósido. Se conoce un número de ligandos de profármaco nucleósido. En general, la alquilación, acilación u otra modificación lipófila del grupo hidroxilo del compuesto o del mono-, di- o trifosfato del nucleósido aumentará la estabilidad del nucleósido. Los ejemplos de grupos sustituyentes que pueden sustituir uno o más hidrógenos en la fracción fosfato o hidroxilo son alquilo, arilo, esteroides, hidratos de carbono, incluyendo azúcares, 1,2-diacilglicerol y alcoholes. Muchos se describen en R. Jones y N. Bischofberger, "Antiviral Research", 27 (1995) 1-17. Cualquiera de estos se puede usar en combinación con los nucleósidos descritos u otros compuestos para conseguir un efecto deseado.

El nucleósido activo u otro compuesto que contiene hidroxilo también puede proporcionarse como un lípido de éter (y, en particular, un lípido de éter en 5' para un nucleósido), como se describe en las siguientes referencias: Kucera, L. S., N. Iyer, E. Leake, A. Raben, Modest E. K., D. L. W., y C. Piantadosi. 1990. "Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation". *AIDS Res. Hum. Retro Viruses*. 6:491-501; Piantadosi, C., J. Marasco C. J., S. L. Morris-Natschke, K. L. Meyer, F. Gumus, J. R. Surles, K. S. Ishaq, L. S. Kucera, N. Iyer, C. A. Wallen, S. Piantadosi y E. J. Modest. 1991. "Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV activity". *J. Med. Chem.* 34:1408.1414; Hosteller, K. Y., D. D. Richman, D. A. Carson, L. M. Stuhmiller, G. M. T. van Wijk y H. van den Bosch. 1992. "Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3',-deoxythymidine". *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2025.2029; Hostetler, K. Y., L. M. Stuhmiller, H. B. Lenting, H. van den Bosch y D. D. Richman, 1990. "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides". *J. Biol. Chem.* 265:61127. Los ejemplos no limitantes de patentes de EE.UU. que describen sustituyentes lipófilos adecuados que se pueden incorporar covalentemente al nucleósido u otro compuesto que contiene hidroxilo o amina, preferiblemente en la posición 5'-OH del nucleósido o preparaciones lipófilas, incluyen las patentes de EE.UU. n.º 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.*). Las solicitudes de patentes extranjeras que describen sustituyentes lipófilos que se pueden unir a los nucleósidos de la presente invención, o preparaciones lipófilas, 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.

Los profármacos 2', 3' y 5' de nucleósidos β-D ramificados en 2', o sus sales farmacéuticamente aceptables o formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos compuestos pueden usarse para tratar infecciones por *Flaviviridae*. En concreto, el profármaco de 3'-valinaéster de β-D-2'-CH₃-riboC representado por la fórmula.



o su sal farmacéuticamente aceptable, se puede administrar a un sujeto para el tratamiento de una infección por *Flaviviridae*.

El profármaco 2' de nucleósido β-D ramificado en 2' puede incluir fracciones biológicamente escindibles en las posiciones 2' y/o 5'. Las fracciones preferidas son ésteres de D- o L-aminoácidos naturales o sintéticos, incluyendo D- o L-valilo, aunque preferiblemente son ésteres de L-aminoácidos, tales como L-valilo, y ésteres de alquilo incluyendo acetilo. La presente invención incluye específicamente éster de D- o L-aminoácido en 2' y éster de D- o L-diaminoácido en 2',5', preferiblemente éster de L-aminoácido de nucleósidos β-D o β-L con metilo en 2' con cualquier base de purina o pirimidina deseada, en donde el fármaco precursor tiene opcionalmente una CE₅₀ inferior a 15 micromolar, e incluso más preferiblemente inferior a 10 micromolar; 2'-(alquil)éster o 2',5'-di(alquil)éster de nucleósidos β-D o β-L con metilo en 2' con cualquier base de purina o pirimidina deseada, en donde el fármaco precursor tiene opcionalmente una CE₅₀ inferior a 10 o 15 micromolar; y 2',5'-diésteres de nucleósidos β-D o β-L con metilo en 2' en donde (i) el éster 2' es un éster de D- o L-aminoácido natural o sintético, aunque preferiblemente un éster de L-aminoácido, y el éster 5' es un éster de alquilo; (ii) ambos ésteres son independientemente éster de D- o L-aminoácido natural o sintético, aunque preferiblemente ambos son ésteres de L-aminoácido; (iii) ambos ésteres son independientemente ésteres de alquilo e (iv) el éster 2' es independientemente un alquiléster y el éster 5' es un éster de D- o L-aminoácido natural o sintético, aunque preferiblemente un éster de L-aminoácido, en donde el fármaco precursor tiene opcionalmente una CE₅₀ inferior a 10 o 15 micromolar.

Los ejemplos englobados por la invención son 2'-D- o L-valinaéster de β-D-2'-metil-citidina; β-D-2',6-dimetil-citidina; 2'-L-valinaéster de β-D-2',6-dimetil-timidina; 2'-L-valinaéster de β-D-2',8-dimetil-adenosina; 2'-L-valinaéster de β-D-2',8-dimetil-guanosina; 2'-L-valinaéster de β-D-2',6-dimetil-5-fluorocitidina; 2'-L-valinaéster de β-D-2',6-dimetil-uridina; 2'-acetiléster de β-D-2',6-dimetil-citidina; 2'-acetiléster de β-D-2',6-dimetil-timidina; 2'-acetiléster de β-D-2',8-dimetil-adenosina; 2'-acetiléster de β-D-2',8-dimetil-guanosina; 2'-acetiléster de β-D-2',6-dimetil-5-fluor-citidina; y 2'-ésteres

de β -D-2',6-dimetil-(citidina, 5-fluorocitidina, uridina o timidina) o 2'-ésteres de β -D-2'-metil-citidina o β -D-2',8-dimetil-(guanosina, adenosina o inosina) en donde (i) el éster 2' es un éster de aminoácido; o (ii) el éster 2' es un alquiléster.

Otros ejemplos adicionales que se engloban en la invención son 2',5'-L-divalinaéster de β -D-2'-metil-citidina; β -D-2',6-dimetil-citidina (dival-2',6-diMe-L-dC); 2',5'-L-divalinaéster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 2',5'-L-divalinaéster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 2',5'-L-divalinaéster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 2',5'-L-divalinaéster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; 2',5'-L-divalinaéster de β -D-2',6-dimetil-uridina; 2',5'-diacetiléster de β -D-2',6-dimetil-citidina; 2',5'-diacetiléster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 2',5'-diacetiléster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 2',5'-diacetiléster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 2',5'-diacetiléster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; y 2',5'-diésteres de β -D-2',6-dimetil-(citidina, 5-fluorocitidina, uridina o timidina) o 2',5'-diésteres de β -D-2'-metil-citidina o β -D-2',8-dimetil-(guanosina, adenosina o inosina) en donde (i) el éster 2' es un éster de aminoácido y el éster 5' es un alquil- o aril-éster; (ii) ambos ésteres son ésteres de aminoácido; (iii) ambos ésteres son independientemente alquil- o aril-ésteres; o (iv) el éster 2' es un alquiléster y el éster 5' es un éster de aminoácido.

El profármaco 3' de nucleósido β -D ramificado en 2' puede incluir fracciones biológicamente escindibles en las posiciones 3' y/o 5'. Las fracciones preferidas son ésteres de D- o L-aminoácido naturales o sintéticos, tales como valilo, aunque preferiblemente son ésteres de L-aminoácidos tales como L-valil- y alquil-ésteres, incluyendo acetilo. La presente invención proporciona en concreto éster de L-aminoácido 3' y éster de L-aminoácido 3',5' de nucleósidos β -D o β -L con metilo en 2' con cualquier base de purina o pirimidina deseada, en donde el fármaco precursor tiene opcionalmente una CE_{50} inferior a 15 micromolar, e incluso más preferiblemente inferior a 10 micromolar; 3'-(alquil)éster o 3',5'-L-di(alquil)éster de nucleósidos β -D o β -L con metilo en 2' con cualquier base de purina o pirimidina deseada, en donde el fármaco precursor tiene opcionalmente una CE_{50} inferior a 10 o 15 micromolar; y 3',5'-diésteres de nucleósidos β -D o β -L de metilo en 2', en donde (i) el éster 3' es un éster de D- o L-aminoácido natural o sintético y el éster 5' es un alquiléster; (ii) ambos ésteres son ésteres de D- o L-aminoácido natural o sintético; (iii) ambos ésteres son independientemente alquilésteres; e (iv) el éster 3' es independientemente un alquiléster y el éster 5' es un éster de D- o L-aminoácido natural o sintético, en donde el fármaco precursor tiene opcionalmente una CE_{50} inferior a 10 o 15 micromolar.

Los ejemplos englobados por la invención son 3'-L-valinaéster de β -D-2'-metil-citidina; β -D-2',6-dimetil-citidina; 3'-L-valinaéster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 3'-L-valinaéster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 3'-L-valinaéster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 3'-L-valinaéster de β -D-2',6-dimetil-5-fluorocitidina; 3'-L-valinaéster de β -D-2',6-dimetil-uridina; 3'-acetiléster de β -D-2',6-dimetil-citidina; 3'-acetiléster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 3'-acetiléster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 3'-acetiléster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 3'-acetiléster de β -D-2'-metil-citidina; 3'-acetiléster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; y 3'-ésteres de β -D-2',6-dimetil-(citidina, 5-fluorocitidina, uridina o timidina) o 3'-ésteres de β -D-2',8-dimetil-(guanosina, adenosina o inosina) en donde (i) el éster 3' es un éster de aminoácido; o (ii) el éster 3' es un alquiléster.

Otros ejemplos adicionales que se engloban en la invención son 3',5'-L-divalinaéster de β -D-2'-metil-citidina; β -D-2',6-dimetil-citidina (dival-2',6-diMe-L-dC); 3',5'-L-divalinaéster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 3',5'-L-divalinaéster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 3',5'-L-divalinaéster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 3',5'-L-divalinaéster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; 3',5'-L-divalinaéster de β -D-2',6-dimetil-uridina; 3',5'-diacetiléster de β -D-2',6-dimetil-citidina; 3',5'-diacetiléster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 3',5'-diacetiléster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 3',5'-diacetiléster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 3',5'-diacetiléster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; y 3',5'-diésteres de β -D-2',6-dimetil-(citidina, 5-fluorocitidina, uridina o timidina) o 3',5'-diésteres de β -D-2',8-dimetil-(guanosina, adenosina o inosina) en donde (i) el éster 3' es un éster de aminoácido y el éster 5' es un alquiléster; (ii) ambos ésteres son ésteres de aminoácido; (iii) ambos ésteres son independientemente alquilésteres; o (iv) el éster 3' es un alquiléster y el éster 5' es un éster de aminoácido.

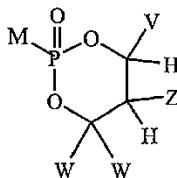
El profármaco de nucleósido β -D ramificado en 2' incluye fracciones biológicamente escindibles en las posiciones 2', 3' y/o 5'. Las fracciones preferidas son ésteres de D- o L-aminoácido naturales o sintéticos, incluyendo D o L-valilo, aunque preferiblemente son ésteres de L-aminoácido, tales como L-valil- y alquilésteres incluyendo acetilo. La presente invención proporciona, en concreto, éster 2',3'-L o D-diaminoácido y éster 2',3',5'-L o D-triaminoácido de nucleósidos β -D o β -L con metilo en 2', preferiblemente L-aminoácido, con cualquier base de purina o pirimidina deseada, en donde el fármaco precursor tiene opcionalmente una CE_{50} inferior a 15 micromolar, e incluso más preferiblemente inferior a 10 micromolar; 2',3'-di(alquil)éster o 2',3',5'-L-tri(alquil)éster de nucleósidos β -D o β -L con metilo en 2' con cualquier base de purina o pirimidina deseada, en donde el fármaco precursor tiene opcionalmente una CE_{50} inferior a 10 o 15 micromolar; y 2',3'-diésteres de nucleósidos β -D o β -L con metilo en 2' en donde (i) el éster 2' es un éster de aminoácido y el éster 3' es un alquiléster; (ii) ambos ésteres son ésteres de aminoácido; (iii) ambos ésteres son independientemente alquilésteres; e (iv) el éster 2' es independientemente un alquiléster y el éster 3' es un éster de aminoácido, en donde el fármaco precursor tiene opcionalmente una CE_{50} inferior a 10 o 15 micromolar. Además, 2',3',5'-triésteres o nucleósidos β -D o β -L con metilo en 2' en donde (i) los tres ésteres son ésteres de aminoácido; (ii) los tres ésteres son independientemente alquilésteres; (iii) el éster 2' es un éster de aminoácido, el éster 3' es un éster de aminoácido y el éster 5' es un alquiléster; (iv) el éster 2' es un éster de aminoácido, el éster 3' es un alquiléster y el éster 5' es un alquiléster; (v) el éster 2' es un alquiléster, el éster 3' es un alquiléster y el éster 5' es un éster de aminoácido; (vi) el éster 2' es un alquiléster, el éster 3' es un éster de aminoácido y el éster 5' es un éster de aminoácido; (vii) el éster 2' es un alquiléster, el éster 3' es un éster de aminoácido y el éster 5' es un alquiléster; y (viii) el éster 2' es un éster de aminoácido, el éster 3' es un alquiléster y

el éster 5' es un éster de aminoácido; en donde el fármaco precursor tiene opcionalmente una CE_{50} inferior a 10 o 15 micromolar.

Los ejemplos englobados por la invención incluyen 2',3'-L-divalinaéster de β -D-2'-metil-citidina; β -D-2',6-dimetil-citidina (dival-2',6-diMe-L-dC); 2',3'-L-divalinaéster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 2',3'-L-divalinaéster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 2',3'-L-divalinaéster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 2',3'-L-divalinaéster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; 2',3'-L-divalinaéster de β -D-2',6-dimetil-uridina; 2',3'-diacetiléster de β -D-2',6-dimetil-citidina; 2',3'-diacetiléster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 2',3'-diacetiléster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 2',3'-diacetiléster de β -D-2'-metil-citidina; 2',3'-diacetiléster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 2',3'-diacetiléster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; y 2',3'-diésteres de β -D-2',6-dimetil-(citidina, 5-fluorocitidina, uridina o timidina) o 2',3'-diésteres de β -D-2',8-dimetil-(guanosina, adenosina o inosina) en donde (i) el éster 2' es un éster de aminoácido y el éster 3' es un alquiléster; (ii) ambos ésteres son ésteres de aminoácido; (iii) ambos ésteres son independientemente alquilésteres; o (iv) el éster 2' es un alquiléster y el éster 3' es un éster de aminoácido.

Otros ejemplos adicionales englobados por la invención incluyen 2',3',5'-L-trivalinaéster de β -D-2'-metil-citidina; β -D-2',6-dimetil-citidina (trival-2',6-diMe-L-dC); 2',3',5'-L-trivalinaéster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 2',3',5'-L-trivalinaéster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 2',3',5'-L-trivalinaéster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 2',3',5'-L-trivalinaéster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; 2',3',5'-L-trivalinaéster de β -D-2',6-dimetil-uridina; 2',3',5'-triacetiléster de β -D-2',6-dimetil-citidina; 2',3',5'-triacetiléster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 2',3',5'-triacetiléster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 2',3',5'-triacetiléster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 2',3',5'-triacetiléster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; y 2',3',5'-triésteres de β -D-2',6-dimetil-(citidina, 5-fluorocitidina, uridina o timidina) y 2',3',5'-triésteres de β -D-2',8-dimetil-(guanosina, adenosina o inosina) en donde (i) los tres ésteres son ésteres de aminoácido; (ii) los tres ésteres son independientemente alquilésteres; (iii) el éster 2' es un éster de aminoácido, el éster 3' es un éster de aminoácido y el éster 5' es un alquiléster; (iv) el éster 2' es un éster de aminoácido, el éster 3' es un alquiléster y el éster 5' es un alquiléster; (v) el éster 2' es un alquiléster, el éster 3' es un alquiléster y el éster 5' es un éster de aminoácido; (vi) el éster 2' es un alquiléster, el éster 3' es un éster de aminoácido y el éster 5' es un éster de aminoácido; (vii) el éster 2' es un alquiléster, el éster 3' es un éster de aminoácido y el éster 5' es un alquiléster; y (viii) el éster 2' es un éster de aminoácido, el éster 3' es un alquiléster y el éster 5' es un éster de aminoácido.

Otros ejemplos adicionales de profármacos como se describen en la presente memoria incluyen los profármacos descritos en las patentes de EE.UU. n.º 6.284.748 y 6.312.662. En particular, los profármacos incluyen compuestos de estructura:



en donde:

V, W y W' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en --H, alquilo, aralquilo, alicíclico, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, 1-alqueno y 1-alquino; o

V y Z juntos están conectados a través de 3-5 átomos adicionales para formar un grupo cíclico que contiene 5-7 átomos, opcionalmente, 1 heteroátomo, sustituido con hidroxilo, acilooxi, alcóxicarbonilo o ariloxycarbonilo unido a un átomo de carbono que está tres átomos desde ambos grupos O unidos al fósforo; o

V y Z juntos están conectados a través de 3-5 átomos adicionales para formar un grupo cíclico, opcionalmente, que contiene 1 heteroátomo, que está fusionado a un grupo arilo en la posición beta y gamma al O unido al fósforo; o

V y W juntos están conectados a través de 3 átomos de carbono adicionales para formar un grupo cíclico opcionalmente sustituido que contiene 6 átomos de carbono y sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, acilooxi, alcóxicarbonilo, alquiltiocarbonilo y ariloxycarbonilo, unido a uno de dichos átomos de carbono que está tres átomos desde un O unido al fósforo

Z y W juntos están conectados a través de 3-5 átomos adicionales para formar un grupo cíclico que contiene opcionalmente un heteroátomo, y V debe ser arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido;

W y W' juntos están conectados a través de 2-5 átomos adicionales para formar un grupo cíclico que contiene opcionalmente 0-2 heteroátomos, y V debe ser arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo;

Z se selecciona del grupo que consiste en $-\text{CHR}^2\text{OH}$, $-\text{CHR}^2\text{OC}(\text{O})\text{R}^3$, $-\text{CHR}^2\text{OC}(\text{S})\text{R}^3$, $-\text{CHR}^2\text{OC}(\text{S})\text{OR}^3$, $-\text{CHR}^2\text{OC}(\text{O})\text{SR}^3$, $-\text{CHR}^2\text{OCO}_2\text{R}^3$, $-\text{OR}^2$, $-\text{SR}^2$, $-\text{CHR}^2\text{N}_3$, $-\text{CH}_2\text{arilo}$, $-\text{CH}(\text{arilo})\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}=\text{CR}^2_2)\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{C}\equiv\text{CR}^2_2)\text{OH}$, $-\text{R}^2$, $-\text{NR}^2_2$, $-\text{OCOR}^3$, $-\text{OCO}_2\text{R}^3$, $-\text{COR}^3$, $-\text{SCO}_2\text{R}^3$, $-\text{NHCOR}^2$, $-\text{NHCO}_2\text{R}^3$, $-\text{CH}_2\text{NHarilo}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{-OR}^{12}$ y $-(\text{CH}_2)_p\text{-SR}^{12}$;

p es un número entero 2 o 3;

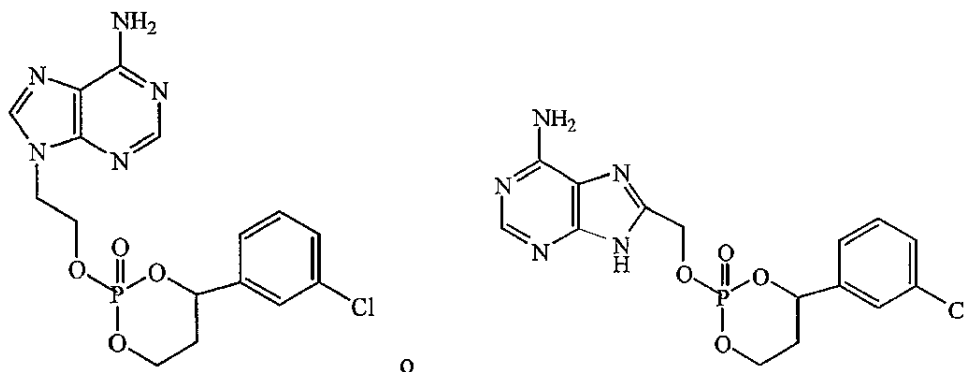
R² se selecciona del grupo que consiste en R³ y --H;

R³ se selecciona del grupo que consiste en alquilo, arilo, alicíclico y aralquilo;

R¹² se selecciona del grupo que consiste en --H y acilo inferior;

- 5 M se selecciona del grupo que, unido a PO₃²⁻, P₂O₆³⁻ o P₃O₉⁴⁻, es un nucleósido ramificado en 2', y está unido al fósforo a través de un átomo de carbono, oxígeno, azufre o nitrógeno.

En un ejemplo no limitante, el profármaco está unido al nucleósido como en los siguientes compuestos:

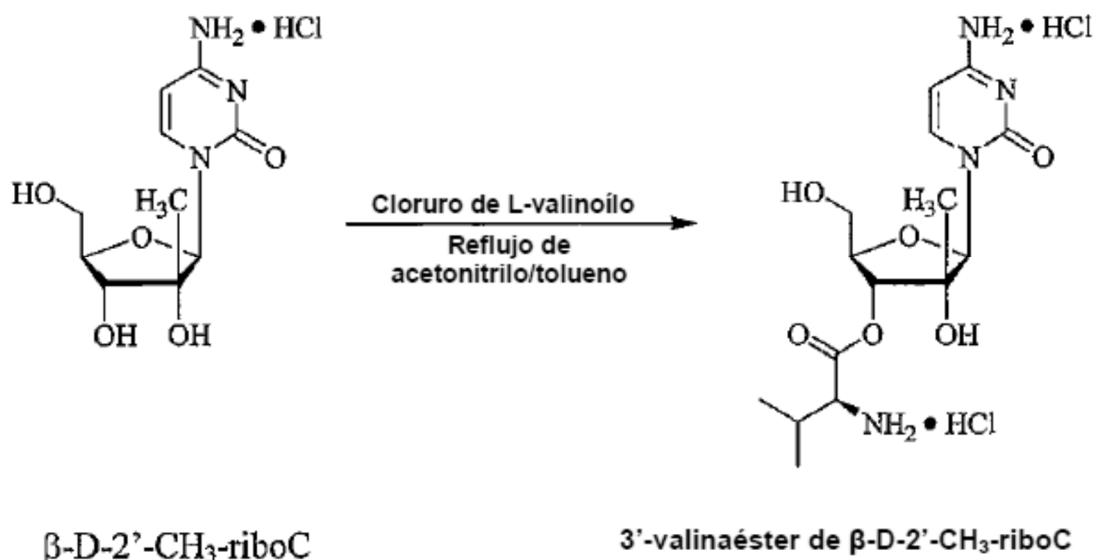


Síntesis general de profármacos 2' y/o 3':

- 10 El material de partida clave para este proceso es un nucleósido β-D ramificado en 2' apropiadamente sustituido. El nucleósido ramificado puede adquirirse o puede prepararse mediante cualquier medio conocido incluyendo las técnicas descritas en la presente memoria. Opcionalmente, el nucleósido ramificado puede protegerse con un grupo protector adecuado, preferiblemente, con grupos sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, según las enseñanzas de Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Segunda edición, 1991. El nucleósido ramificado protegido se puede acoplar luego con un donante de acilo adecuado, tal como un cloruro de acilo y/o un anhídrido de acilo con el disolvente prótico o aprótico apropiado a una temperatura adecuada, para dar el profármaco 2' y/o 3' de nucleósido β-D ramificado en 2'. Como alternativa, el nucleósido ramificado protegido se puede acoplar luego con un acilo adecuado, tal como un ácido carboxílico, tal como ácido alcanoico y/o resto de aminoácido, opcionalmente con un agente de acoplamiento adecuado, con el disolvente aprótico apropiado a una temperatura adecuada, para dar el profármaco 2' y/o 3' de nucleósido β-D ramificado en 2'. Los posibles reactivos de acoplamiento son cualquier reactivo que potencie el acoplamiento, incluyendo, pero sin limitarse a, reactivos de Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con trifenilfosfina o diversas carbodiimidas.

- 25 Por ejemplo, los amino-alcoholes simples pueden esterificarse usando cloruros de ácido en una mezcla de acetonitrilo-benceno a reflujo (Véase el siguiente **Esquema 8**: *Synthetic Communications*, 1978, 8(5), 327-333). Como alternativa, la esterificación puede conseguirse usando un anhídrido, como se describe en *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121(24), 5661-5664.

Esquema 8



III. Detección de la mutación inducida por $\beta\text{-D-2'-CH}_3\text{-riboC}$ en un genoma de *Flaviviridae*

Se describe un método de tratamiento de un paciente infectado con *Flaviviridae* que comprende:

- 5 (i) administrar una cantidad eficaz de $\beta\text{-D-2'-CH}_3\text{-riboC}$ o un profármaco tal como el profármaco de 3'-valinaéster de $\beta\text{-D-2'-CH}_3\text{-riboC}$, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (ii) identificar la resistencia vírica a $\beta\text{-D-2'-CH}_3\text{-riboC}$ en el paciente;
- 10 (iii) administrar una cantidad eficaz de uno o más fármacos en combinación y/o alternancia con uno o más fármacos que inducen directa o indirectamente una mutación en un *Flaviviridae* en una ubicación distinta de una mutación de un nucleótido que genera un cambio de serina a un aminoácido diferente en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa, y/o uno o más fármacos que están asociados con dicha mutación.

Se describe un método de tratamiento de un paciente infectado con HCV que comprende:

- 15 (i) administrar una cantidad eficaz de $\beta\text{-D-2'-CH}_3\text{-riboC}$ o un profármaco tal como un profármaco de 3'-valinaéster de $\beta\text{-D-2'-CH}_3\text{-riboC}$, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (ii) identificar la resistencia vírica a $\beta\text{-D-2'-CH}_3\text{-riboC}$ en el paciente;
- 20 (iii) administrar una cantidad eficaz de uno o más fármacos que inducen directa o indirectamente una mutación en un *Flaviviridae* en una ubicación distinta de una mutación de un nucleótido que genera un cambio de la serina de la posición 282 a un aminoácido diferente, tal como treonina, en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa, y/o uno o más fármacos que están asociados con dicha mutación.

Se describe un método de tratamiento de un hospedador infectado con BVDV que comprende:

- (i) administrar una cantidad eficaz de $\beta\text{-D-2'-CH}_3\text{-riboC}$ o un profármaco tal como un profármaco de 3'-valinaéster de $\beta\text{-D-2'-CH}_3\text{-riboC}$, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 25 (ii) identificar la resistencia vírica a $\beta\text{-D-2'-CH}_3\text{-riboC}$ en el hospedador;
- (iii) administrar una cantidad eficaz de uno o más fármacos que inducen directa o indirectamente una mutación en un *Flaviviridae* en una ubicación distinta de una mutación de un nucleótido que genera un cambio de la serina de la posición 405 a un aminoácido diferente, tal como treonina, en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa, y/o uno o más fármacos que están asociados con dicha mutación.

30 También se describe en la presente memoria un método de tratamiento de un paciente infectado con *Flaviviridae* que comprende:

- (i) administrar una cantidad eficaz de $\beta\text{-D-2'-CH}_3\text{-riboC}$ o un profármaco tal como un profármaco de 3'-valinaéster

de β -D-2'-CH₃-riboC, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(ii) identificar la resistencia vírica a β -D-2'-CH₃-riboC en el paciente;

(iii) administrar una cantidad eficaz de interferón.

5 La presente invención proporciona un nucleósido con metilo en 2' como se define en las reivindicaciones, o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento de la hepatitis C en un hospedador, en donde el método comprende administrar dicho nucleósido con metilo en 2' o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y administrar interferón, en donde dicho nucleósido con metilo en 2' ha causado una mutación en el nucleótido 8443 (de G a C) del genoma del virus de la hepatitis C o del aminoácido 282 Serina a
10 Treonina de la región de la ARN polimerasa de hepatitis C virus, en donde dicho nucleósido con metilo en 2' es β -D-2'-CH₃-riboC y en donde el método comprende además la etapa de identificación de la resistencia vírica en el hospedador.

15 En ciertas realizaciones, la identificación de la resistencia vírica a β -D-2'-CH₃-riboC en el paciente se puede determinar mediante un análisis fenotípico del crecimiento de la placa vírica. En otra realización, la identificación de la resistencia vírica a β -D-2'-CH₃-riboC en el paciente se puede determinar mediante la capacidad de replicación del virus. En una realización adicional, la identificación de la resistencia vírica a β -D-2'-CH₃-riboC en el paciente se puede determinar mediante la detección de la presencia de citidina en el nucleótido 8443 del VHC.

También se describe un método de tratamiento de un paciente infectado con *Flaviviridae* que comprende:

20 (i) administrar una cantidad eficaz de β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como un profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(ii) obtener una muestra de cultivo vírico del paciente;

(iii) cultivar la muestra y comparar el crecimiento de placa entre la muestra y el virus de tipo silvestre;

(iv) determinar si el crecimiento de la placa de la muestra es inferior al crecimiento de la placa del tipo silvestre, lo que indica resistencia a β -D-2'-CH₃-riboC;

25 (v) administrar una cantidad eficaz de interferón a aquellos pacientes que son resistentes a β -D-2'-CH₃-riboC.

También se describe un método de tratamiento de un paciente infectado con *Flaviviridae* que comprende:

(i) administrar una cantidad eficaz de β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como un profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(ii) obtener una muestra vírica del paciente;

30 (iii) determinar la capacidad de replicación del virus;

(iv) determinar si la capacidad de replicación de la muestra es inferior a la capacidad de replicación del virus de tipo silvestre, lo que indica resistencia a β -D-2'-CH₃-riboC;

(v) administrar una cantidad eficaz de interferón a los pacientes que son resistentes a β -D-2'-CH₃-riboC.

35 La presente invención proporciona un nucleósido con metilo en 2' como se define en las reivindicaciones, o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento de la hepatitis C en un hospedador, en donde el método comprende administrar dicho nucleósido con metilo en 2' o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y administrar interferón, en donde dicho nucleósido con metilo en 2' ha causado una mutación en el nucleótido 8443 (de G a C) del genoma del virus de la hepatitis C o del aminoácido 282 Serina a
40 Treonina de la región de la ARN polimerasa del virus de la hepatitis C, en donde el método comprende además la etapas de:

(a) obtener una muestra vírica del hospedador;

(b) determinar la capacidad de replicación del virus;

45 (c) determinar si la capacidad de replicación del virus de la muestra es inferior a la capacidad de replicación del virus de tipo silvestre, lo que indica resistencia hacia el nucleósido con metilo en 2';

tras la administración del nucleósido con metilo en 2' al hospedador.

En una realización, se pueden cuantificar el crecimiento de la placa vírica y/o la capacidad de replicación vírica mediante un ensayo de placa vírica. En otras realizaciones, se pueden usar otros ensayos tales como el ensayo del

centro infeccioso, el ensayo de indicador inducible por el virus, el ensayo de transformación, el ensayo de dilución de punto final o la tecnología de RT-PCR para cuantificar los títulos víricos (Flint *et al.* "Principles of Virology (ASM)" Capítulo 2; Wagner & Hewlett. *Basic Virology* (Blackwell), Capítulos 9 y 10).

5 Se puede realizar un ensayo de placa para cuantificar el crecimiento de la placa vírica y/o la capacidad de replicación. Se puede aplicar una solución diluida del virus a una placa de cultivo que contiene una monocapa de células hospedadoras. Se pueden cubrir las células con una capa semisólida (tal como un medio viscoso, por ejemplo, agar) para evitar la difusión del virus de una célula infectada a otra. Después de la incubación se pueden reconocer las "placas" y estimarse el número de partículas de virus infeccioso en la suspensión original. Un método de reconocimiento de las placas es mediante el uso de métodos de tinción de anticuerpos para detectar antígenos víricos dentro de células infectadas en la monocapa. Estas células infectadas se pueden visualizar luego usando un cromógeno o un marcador fluorescente en el anticuerpo específico del virus. Las placas se pueden observar para el análisis fenotípico y/o contarse para determinar los títulos víricos. Los títulos víricos se pueden calcular en unidades de formación de enfoque (UFE)/ml, usando la siguiente ecuación: $T_{UFE/ml} = N \times 5 \times D$; donde T es un título vírico en UFE/ml; N es un número de placas por pocillo; y D es un factor de dilución para la muestra de virus correspondiente. 10 (Por ejemplo, si se encontraron 12 placas en un pocillo correspondiente a una dilución de 10^{-5} de la muestra de virus, entonces $T = 12 \times 5 \times 10^5 = 6 \times 10^6$ UFE/ml), y entonces se puede determinar la capacidad de replicación vírica, que es la capacidad replicativa global para producir progenie infectada en un ambiente hospedador definido. 15

También se describe un método de detección de la presencia de la mutación del nucleótido 1.214 de G a C de la región de ARN polimerasa del BVDV (causante de una mutación de serina a treonina en el aminoácido 405). Dado que se reconoce que Ser₄₀₅, la posición de aminoácido del dominio B de NS5B funcional putativo del BVDV, está altamente conservada entre todos los genomas de hepacivirus, pestivirus y flavivirus (Figura 11, Lai *et al.*, *J. Virol.*, 1999, 73, 10129-36), se pueden detectar los restos de serina correspondientes del dominio B de NS5B funcional putativo del BVDV de otros *Flaviviridae* que están mutados de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, Ser₄₀₅ del dominio de ARN polimerasa del BVDV corresponde a Ser₂₈₂ del dominio de la ARN polimerasa del VHC. Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención también incluyen una mutación de G a C en el nucleótido 8443 del genoma del VHC (que corresponde al nucleótido 1214 del dominio de ARN polimerasa del BVDV). 20 25

También se describe un proceso de detección de una mutación que indica resistencia a β -D-2'-CH₃-riboC, que incluye poner en contacto una muestra que contiene una secuencia de ácido nucleico de *Flaviviridae* con una sonda de oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria a una parte del genoma de *Flaviviridae* que incluye la mutación; y luego determinar si el oligonucleótido se hibrida con el ácido nucleico vírico. 30

También se describe un método de tratamiento de un paciente infectado con *Flaviviridae* que comprende:

- (i) administrar una cantidad eficaz de β -D-2'-CH₃-riboC o un profármaco tal como un profármaco de 3'-valinaéster de β -D-2'-CH₃-riboC, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 35 (ii) ensayar la sangre del paciente para analizar la seroconversión del virus de tipo silvestre al mutante;
- (iii) administrar una cantidad eficaz de interferón.

La presente invención proporciona un nucleósido con metilo en 2' como se define en las reivindicaciones, o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento de la hepatitis C en un hospedador, en donde el método comprende administrar dicho nucleósido con metilo en 2' o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y administrar interferón, en donde dicho nucleósido con metilo en 2' ha causado una mutación en el nucleótido 8.443 (de G a C) del genoma del virus de la hepatitis C o del aminoácido 282 Serina a Treonina de la región de la ARN polimerasa del virus de la hepatitis C, en donde el método comprende además la etapa de ensayar la sangre del hospedador para analizar la seroconversión del virus de tipo silvestre al mutante tras la administración del nucleósido con metilo en 2' al hospedador. 40 45

También se describe un método de ensayo de una muestra sospechosa de contener un *Flaviviridae* resistente a β -D-2'-CH₃-riboC que comprende:

- (i) poner en contacto una muestra que contiene una secuencia de ácido nucleico de *Flaviviridae* con una sonda de oligonucleótido detectable que tiene una secuencia complementaria a la citidina del nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa del BVDV o nucleótido 8.443 del genoma del VHC;
- 50 (ii) permitir que la sonda se hibride con la secuencia;
- (iii) detectar la hibridación de la sonda a la citidina del nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa del BVDV o nucleótido 8.443 del genoma del VHC;

También se describe un método de ensayo de una muestra sospechosa de contener una Thr en lugar de una Ser en la secuencia de consenso altamente conservada XRX_SGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa de 55

un *Flaviviridae*, lo que indica que el virus es hipersensible al tratamiento con interferón, que comprende:

(i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener una secuencia de ácido nucleico de *Flaviviridae* con una sonda de oligonucleótido detectable que tiene una secuencia complementaria a un codón que codifica la Thr de la posición de Ser en la secuencia de consenso conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa de un *Flaviviridae*;

(ii) permitir que la sonda se hibride con la secuencia;

(iii) detectar la hibridación de la sonda a la secuencia.

También se describe un método de ensayo de una muestra sospechosa de contener una Thr en lugar de una Ser en la posición del aminoácido 405 o una citidina en el nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa del BVDV, lo que indica que el virus es hipersensible al tratamiento con interferón, que comprende:

(i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener una secuencia de ácido nucleico de BVDV con una sonda de oligonucleótido detectable que tiene una secuencia complementaria a la citidina del nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa;

(ii) permitir que la sonda se hibride con la secuencia;

(iii) detectar la hibridación de la sonda a la citidina del nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa del BVDV.

La invención proporciona un método de ensayo de una muestra sospechosa de contener una Thr en lugar de una Ser en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa en la posición altamente conservada del aminoácido 282 o una citidina en el nucleótido 8.433 del genoma del VHC, lo que indica que el virus es hipersensible al tratamiento con interferón, que comprende:

(i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener una secuencia de ácido nucleico del VHC con una sonda de oligonucleótido detectable que tiene una secuencia complementaria a la citidina del nucleótido 8.443;

(ii) permitir que la sonda se hibride con la secuencia;

(iii) detectar la hibridación de la sonda a la citidina del nucleótido 8.443 del genoma del VHC.

25 Sondas de oligonucleótido

Se describen sondas de oligonucleótidos que son capaces de detectar la presencia de una mutación de *Flaviviridae* inducida por nucleósido de pirimidina ramificado en 2'. Las sondas son complementarias a las secuencias de ácidos nucleicos víricos que incluyen la mutación. Estas sondas se pueden usar en procesos y kits. Las sondas de oligonucleótidos pueden detectar el nucleótido citidina en el nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa de BVDV o en el nucleótido 8.443 de la región de la ARN polimerasa del VHC u otros nucleótidos de *Flaviviridae* que codifican la serina conservada del dominio B de la ARN polimerasa dentro del genoma de un *Flaviviridae* (**Figura 11**).

Las sondas de oligonucleótidos son preferiblemente de al menos 14 nucleótidos de longitud, y preferiblemente, son de al menos 15, 20, 25 o 30 nucleótidos de longitud. En general, no se prefiere usar una sonda que sea superior a aproximadamente 25 o 30 nucleótidos de longitud. La sonda de oligonucleótido puede diseñarse para identificar el cambio de la base de guanina a citidina en el nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa de un BVDV. Para la presente invención, la sonda de oligonucleótido puede diseñarse para identificar el cambio de la base de guanina a citidina en el nucleótido 8.443 del VHC. La sonda de oligonucleótido puede diseñarse de manera que la región mutada esté situada en la parte interior del segmento hibridado o, como alternativa, puede estar bien en el extremo 3' o 5' del segmento hibridado. Se prefiere que la región mutada esté situada cerca del centro de la sonda para permitir una hibridación eficaz.

La siguiente **Tabla 2** proporciona ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos del BVDV que incluyen la posición del nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa, denominada como alternativa posición de nucleótido 11.136 (véase el número de acceso de Genbank AJ133739, Vassilev y Donis (2000) *Virus Res* 69(2) 95-107). Dadas estas secuencias, el experto en la técnica, usando algoritmos convencionales, puede construir sondas de oligonucleótidos que sean complementarias o esencialmente complementarias a las siguientes secuencias de nucleótidos. Las reglas para el emparejamiento complementario son bien conocidas: la citidina ("C") siempre se empareje con la guanina ("G") y la timina ("T"), o el uracilo ("U") siempre se una a la adenina ("A"). Se reconoce que no es necesario que la sonda sea un 100 % complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, siempre y cuando la sonda se hibride lo suficiente y pueda reconocer el nucleótido de diagnóstico. En general, se tolera un cierto grado de desapareamiento de pares de bases.

Tabla 2: Ejemplos no limitantes de secuencias de ácido nucleico con una sola mutación puntual en el nucleótido 1.214 (también citado como posición 11.136: véase el número de acceso del Genebank AJ133739; Vassiliev y Donis, *Virus Res* **2000**, 69(2), 95-107) de la región de ARN polimerasa del BVDV

AGC	405 S
AAGTATATAAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC	GGCCAGCCAGACACAAGTGCTGGCAACAG. (SEQ ID NO: 1)
AAGTATATAAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC	(SEQ ID NO: 2)
AGTATATAAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC G.	(SEQ ID NO: 3)
GTATATAAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC GG.	(SEQ ID NO: 4)
TATATAAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC GGC.	(SEQ ID NO: 5)
ATATAAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC GGCC.	(SEQ ID NO: 6)
TATATAAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC GGCCA.	(SEQ ID NO: 7)
ATATAAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC GGCCAG.	(SEQ ID NO: 8)
TATAAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC GGCCAGC.	(SEQ ID NO: 9)
ATAAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC GGCCAGCC.	(SEQ ID NO: 10)
TAAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC GGCCAGCCA.	(SEQ ID NO: 11)
AAGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC GGCCAGCCAG.	(SEQ ID NO: 12)
AGAAAATGGGCAGAGAGGG ACC GGCCAGCCAGA.	(SEQ ID NO: 13)
GAAAATGGGCAGAGAGGG ACC GGCCAGCCAGAC.	(SEQ ID NO: 14)
AAATGGGCAGAGAGGG ACC GGCCAGCCAGACA.	(SEQ ID NO: 15)
AATGGGCAGAGAGGG ACC GGCCAGCCAGACAC.	(SEQ ID NO: 16)
ATGGGCAGAGAGGG ACC GGCCAGCCAGACACA.	(SEQ ID NO: 17)
TGGGCAGAGAGGG ACC GGCCAGCCAGACACAAA.	(SEQ ID NO: 18)
GGGCAGAGAGGG ACC GGCCAGCCAGACACAAG.	(SEQ ID NO: 19)
GGCAGAGAGGG ACC GGCCAGCCAGACACAAGT.	(SEQ ID NO: 20)
GCAGAGAGGG ACC GGCCAGCCAGACACAAGTG.	(SEQ ID NO: 21)
CAGAGAGGG ACC GGCCAGCCAGACACAAGTGC.	(SEQ ID NO: 22)
AGAGAGGG ACC GGCCAGCCAGACACAAGTGCT.	(SEQ ID NO: 23)
GAGAGGG ACC GGCCAGCCAGACACAAGTGCTG.	(SEQ ID NO: 24)
AGAGGG ACC GGCCAGCCAGACACAAGTGCTGG.	(SEQ ID NO: 25)
GAGGG ACC GGCCAGCCAGACACAAGTGCTGGC.	(SEQ ID NO: 26)
AGGG ACC GGCCAGCCAGACACAAGTGCTGGCA.	(SEQ ID NO: 27)
GGG ACC GGCCAGCCAGACACAAGTGCTGGCAA.	(SEQ ID NO: 28)
GG ACC GGCCAGCCAGACACAAGTGCTGGCAAC.	(SEQ ID NO: 29)
G ACC GGCCAGCCAGACACAAGTGCTGGCAACA.	(SEQ ID NO: 30)
GGCCAGCCAGACACAAGTGCTGGCAACAG.	(SEQ ID NO: 31)

Por lo tanto, en un ejemplo, el oligonucleótido tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 desapareamientos de la complementariedad con la secuencia de nucleótidos de *Flaviviridae*.

5 Se describe un método de tratamiento de una infección por *Flaviviridae* mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un nucleósido ramificado en 2', por ejemplo, un nucleósido de pirimidina ramificado en 2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC, o su profármaco y/o sal farmacéuticamente aceptable, a un ser humano que necesite
 10 terapia, en combinación y/o alternancia con uno o más fármacos que induzcan directa o indirectamente una mutación en un *Flaviviridae* en una ubicación distinta de una mutación de un nucleótido que genere un cambio de la serina a una treonina en la secuencia de consenso altamente conservada, XRXSGXXXT, del dominio B de la región de la ARN polimerasa, y/o uno o más fármacos que estén asociados con dicha mutación. Los codones ACA, ACG o ACU, que también codifican la Treonina, pueden ser sustituidos por el codón ACC (en negrita) de la **Tabla 2** anterior, para detectar la presencia de una Treonina en el dominio B de la región de la ARN polimerasa del BVDV.

También se describe un método de tratamiento y/o curación sustancial de una infección por *Flaviviridae* en un
 15 hospedador infectado con un *Flaviviridae* que contiene una mutación de Serina a Treonina en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de interferón. Por lo tanto, los codones ACA, ACG o ACU, que también codifican la Treonina pueden sustituirse por el codón ACC (en negrita) de la **Tabla 2** anterior, por ejemplo, para detectar la presencia de una Treonina en el resto 405 de la región ARN polimerasa del BVDV.

La siguiente **Tabla 3** proporciona realizaciones ilustrativas de secuencias de nucleótidos del VHC que incluyen la
 20 posición del nucleótido 8.443 del genoma del VHC (número de acceso del Genebank AJ238799; Lohmann *et al.* (1999) *Science* 285(5424)110-113). La posición del nucleótido 8.443 del genoma del VHC corresponde a la posición del nucleótido 11.136 del genoma del BVDV y representa el resto de Serina conservado de la ARN polimerasa de *Flaviviridae* (Ser₄₀₅ del genoma de BVDV, que corresponde a Ser₂₈₂ del genoma del VHC (véase la **Figura 11**)) que es mutado debido al tratamiento con β -D-2'-CH₃-riboC. Como se ha señalado anteriormente, dadas estas
 25 secuencias, el experto habitual, usando los algoritmos convencionales, puede construir sondas de oligonucleótidos que sean complementarias o sustancialmente complementarias a las siguientes secuencias de nucleótidos que se indican.

Tabla 3: Ejemplos no limitantes de secuencias de ácido nucleico que engloban una sola mutación puntual en el nucleótido 8.443 (número de acceso del Genebank AJ238799; Lohmann et al. (1999) *Science* 285(5424)110-113) de la región de ARN polimerasa del HCV

AGAACTGGCGGCTATCGCCGGTGCCCGCGG	AGC	282 S
AGAACTGGCGGCTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	GGTGTACTGACGACCAGCTGCCGGTAATAC. 282 T
AGAACTGGCGGCTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 32)
GAACTGCGGCTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 33)
AACTGCGGCTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 34)
ACTGCGGCTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 35)
CTGCGGCTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 36)
TGCGGCTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 37)
GCGGCTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 38)
CGGCTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 39)
GGCTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 40)
GCTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 41)
CTATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 42)
TATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 43)
ATCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 44)
TGCGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 45)
CGCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 46)
GCCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 47)
CCGGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 48)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 49)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 50)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 51)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 52)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 53)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 54)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 55)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 56)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 57)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 58)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 59)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 60)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 61)
GGTGCCCGCGG	ACC	(SEQ ID NO: 62)

Por lo tanto, en una realización, el oligonucleótido tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 desapareamientos de la complementariedad con la secuencia de nucleótidos del VHC.

La presente invención proporciona el uso, en un método de tratamiento de una infección por VHC, de un nucleósido con metilo en 2', por ejemplo, un nucleósido de pirimidina con metilo en 2', por ejemplo, β -D-2'-CH₃-riboC, o su sal farmacéuticamente aceptable, en combinación con interferón que induce directa o indirectamente una mutación en un VHC en una ubicación distinta de una mutación de un nucleótido que genera un cambio de serina a treonina en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa. Como ocurre anteriormente, los codones ACA, ACG o ACU, que también codifican la Treonina, pueden ser sustituidos por el codón ACC (en negrita) de la **Tabla 3** anterior, para detectar la presencia de una Treonina en el dominio B de la región de la ARN polimerasa del VHC.

También se describe un método de tratamiento y/o curación sustancial de una infección por *Flaviviridae* en un hospedador infectado con un *Flaviviridae* que contiene una mutación de Serina a Treonina en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de interferón. Los codones ACA, ACG o ACU, que también codifican la Treonina pueden sustituirse por el codón ACC (en negrita) de la **Tabla 3** anterior, por ejemplo, para detectar la presencia de una Treonina en el resto 282 de la región de la ARN polimerasa del VHC.

En otra realización, la invención proporciona un cebador de oligonucleótido para amplificar una secuencia de ácido nucleico de VHC. En una realización, el oligonucleótido tiene una longitud de al menos 14 nucleótidos y se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas y específicas de la secuencia con una secuencia de nucleótidos que contiene la mutación.

Las secuencias de oligonucleótidos usadas como la región de hibridación de un cebador también se pueden usar como la región de hibridación de una sonda. La adecuación de una secuencia de cebador para su uso como sonda depende de las características de hibridación del cebador. De igual manera, se puede usar un oligonucleótido usado como sonda como cebador.

Será evidente para los expertos en la técnica que, proporcionados con dichas realizaciones, los cebadores y las sondas específicos pueden prepararse, por ejemplo, mediante la adición de nucleótidos a los extremos 5' o 3', cuyos nucleótidos son complementarios a la secuencia diana o no son complementarios de la secuencia diana. Siempre que las composiciones de cebador sirvan como un punto de iniciación para la extensión sobre las secuencias diana, y siempre que los cebadores y las sondas comprendan al menos 14 nucleótidos consecutivos contenidos dentro de las realizaciones ilustradas, dichas composiciones están dentro del alcance de la invención.

La/s sonda/s del presente documento se pueden seleccionar mediante los siguientes criterios no limitantes, que no se consideran exclusivos ni determinantes: (1) las sondas se seleccionan de la región del genoma de *Flaviviridae* que contiene la mutación; (2) las sondas carecen de homología con cualquier secuencia de genomas víricos que se espera que comprometa el ensayo; y (3) las sondas carecen de formación de estructura secundaria en el ácido nucleico amplificado que, por ejemplo, pueda interferir con la extensión del ácido nucleico mediante una enzima de amplificación tal como ADN polimerasa de *E. coli*, tal como la parte de la ADN polimerasa denominada fragmento de Klenow. La prevención de la formación de la estructura secundaria se puede conseguir empleando hasta aproximadamente un 15 % en peso, preferiblemente del 5 al 10 % en peso, dimetilsulfóxido (DMSO) en el medio de amplificación y/o aumentando las temperaturas de amplificación a 30-40 °C.

Además, la sonda puede tener un contenido aproximado del 50 % de guanina y citidina, y puede no contener múltiples residuos consecutivos de adenina y timina en el extremo 3' del cebador, lo que puede dar lugar a híbridos menos estables.

Las sondas de la invención pueden tener una longitud de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de al menos 14, 15, 20, 25 o 30 nucleótidos. Los nucleótidos usados en la presente invención pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados tales como inosina o nucleótidos que contienen grupos modificados que no alteran esencialmente sus características de hibridación. Las secuencias de sonda se representan a lo largo de la memoria descriptiva como oligonucleótidos de ADN monocatenario desde el extremo 5' hasta el extremo 3'. Cualquiera de las sondas se puede usar como tal, en su forma complementaria o en su forma de ARN (en donde T se reemplaza por U).

Las sondas de acuerdo con la invención se pueden preparar clonando plásmidos recombinantes que contienen inserciones que incluyen las correspondientes secuencias de nucleótidos, opcionalmente, escindiendo estas últimas de los plásmidos clonados mediante el uso de nucleasas adecuadas y mediante su recuperación, por ejemplo, a través del fraccionamiento según el peso molecular. Las sondas de acuerdo con la presente invención también pueden sintetizarse químicamente, por ejemplo, mediante los métodos de fosfotriéster o fosfodiéster convencionales o realizaciones automatizadas de los mismos. En una de dichas realizaciones automatizadas, se usan dietilfosoramiditas como materiales de partida y se pueden sintetizar según lo descrito por Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Letters* (1981), 22:1859-1862. En la patente de EE.UU. n.º 4.458.066, se describe un método de síntesis de oligonucleótidos sobre un soporte sólido modificado. También es posible usar un cebador que se haya aislado de una fuente biológica (tal como un producto de la digestión con endonucleasas de restricción).

Los oligonucleótidos usados como cebadores o sondas también pueden comprender análogos de nucleótidos tales como fosforotiatos (Matsukura *et al.*, 1967), alquilfosforotiatos (Miller *et al.*, 1979), ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1993), ácidos nucleicos de morfolino, ácidos nucleicos bloqueados, oligonucleobases seudocíclicas, ácidos nucleicos puenteados con 2'-O-4'-C-etileno o pueden contener agentes intercalantes (Asseline *et al.*, 1984).

Para el diseño de sondas con las características deseadas, se pueden aplicar las siguientes directrices útiles conocidas por el experto en la técnica. Debido a que el alcance y la especificidad de las reacciones de hibridación están afectados por una serie de factores, la manipulación de uno o más de estos factores determinará la sensibilidad y especificidad exactas de una determinada sonda, ya sea perfectamente complementaria a su diana o no. La importancia y el efecto de diversas condiciones de ensayo, explicadas adicionalmente en la presente memoria, son conocidas por los expertos en la técnica.

La estabilidad de la sonda para un híbrido de ácido nucleico diana se debe seleccionar para que sea compatible con las condiciones de ensayo. Esto se puede lograr evitando secuencias largas ricas en AT, mediante la terminación de los híbridos con pares de bases GC y el diseño de la sonda con una T_m apropiada. El comienzo y el final de la sonda se deben seleccionar de modo que la longitud y el % de GC den lugar a una T_m de aproximadamente 2-10 °C superior a la temperatura a la que se realizará el ensayo final. La composición de bases de la sonda es importante, porque los pares de bases G-C presentan una mayor estabilidad térmica debido al puente de hidrógeno adicional en comparación con los pares de bases A-T. Así pues, la hibridación que implica ácidos nucleicos complementarios de mayor contenido en G-C será estable a temperaturas más altas. Las condiciones tales como la fuerza iónica y la temperatura de incubación en las que se usará la sonda también deben tenerse en cuenta al diseñar la sonda. Se sabe que la hibridación puede aumentar a medida que aumenta la fuerza iónica de la mezcla de reacción y que la estabilidad térmica de los híbridos puede aumentar con el aumento de la fuerza iónica. Por otro lado, los reactivos químicos, tales como la formamida, la urea, el DIVISO y los alcoholes, que alteran los enlaces de hidrógeno, pueden aumentar la rigurosidad de la hibridación. La desestabilización de los enlaces de hidrógeno por dichos reactivos puede reducir en gran medida la T_m . En general, la hibridación óptima para las sondas de oligonucleótido sintéticas de aproximadamente 10-50 bases de longitud se produce aproximadamente 5 °C por debajo de la temperatura de fusión para un dúplex dado. La incubación a temperaturas por debajo del óptimo puede permitir que las secuencias de bases desapareadas se hibriden y, por lo tanto, puede dar lugar a una especificidad reducida. Es deseable disponer de sondas que solo se hibriden en condiciones de alta rigurosidad, en las que solo se formarán híbridos de ácido nucleico altamente complementarios y/o híbridos sin un grado suficiente de complementariedad. Por consiguiente, la rigurosidad de las condiciones de ensayo determina el grado de complementariedad necesario entre dos cadenas de ácido nucleico que forman el híbrido. El grado de rigurosidad se escoge, por ejemplo, para aumentar al máximo la diferencia de la estabilidad entre el híbrido formado con la diana y el ácido nucleico no diana. En el presente caso, es necesario detectar cambios de un solo par de bases, lo que requiere condiciones de rigurosidad muy alta.

También se debe considerar la longitud de la secuencia de ácido nucleico diana y la longitud de la secuencia de la sonda. En algunos casos, puede haber varias secuencias de una determinada región, variando en su ubicación y longitud, lo que producirá sondas con las características de hibridación deseadas. En otros casos, una secuencia puede ser significativamente mejor que otra que simplemente difiera en una sola base.

Aunque es posible la hibridación de los ácidos nucleicos que no son perfectamente complementarios, el tramo más largo de secuencias de bases perfectamente complementarias normalmente determinará la estabilidad del híbrido. Aunque pueden usarse sondas de oligonucleótidos de diferentes longitudes y composiciones de bases, preferiblemente las sondas de oligonucleótidos de la presente invención tienen entre aproximadamente 14 y 30 bases de longitud y, opcionalmente, tienen además una longitud de secuencia suficiente que es perfectamente complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana.

Las regiones del ADN o ARN diana que se sabe que forman estructuras internas fuertes inhibitorias de la hibridación son menos preferidas. En una realización, se evitan las sondas con amplia autocomplementación. Como se ha explicado anteriormente, la hibridación es la asociación de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos complementarios para formar una doble cadena unida a hidrógeno. Está implícito que si una de las dos cadenas está incluida total o parcialmente en un híbrido, será menos capaz de participar en la formación de un nuevo híbrido. Pueden formarse híbridos intramoleculares e intermoleculares dentro de las moléculas de una sola sonda si hay suficiente autocomplementación. Dichas estructuras se pueden evitar a través del diseño cuidadoso de la sonda. Mediante el diseño de una sonda de modo que una parte sustancial de la secuencia de interés sea monocatenaria, se pueden aumentar la velocidad y el grado de hibridación considerablemente. Hay programas informáticos disponibles para buscar este tipo de interacción. Sin embargo, en ciertos casos, puede que no sea posible evitar este tipo de interacción.

Se pueden usar cebadores específicos y sondas de oligonucleótido específicas de la secuencia en una reacción en cadena de la polimerasa que permita la amplificación y detección de las secuencias genómicas víricas.

Un aspecto de la invención se refiere a cebadores de oligonucleótido específicos. La invención proporciona composiciones que comprenden un cebador de oligonucleótido para amplificar un ácido nucleico de *Flaviviridae* en

donde dicho cebador sea adecuado para amplificar una subsecuencia de ácido nucleico a partir de una mutación de *Flaviviridae*, en donde el cebador puede ser capaz de detectar un cambio de nucleótidos de G a C en el nucleótido 8.443 del genoma del VHC.

Amplificación y detección de una mutación de *Flaviviridae*

5 También se describen métodos de amplificación y detección de la presencia de una mutación de *Flaviviridae*.

El ADN o ARN se puede extraer de una muestra corporal, tal como sangre o material tisular, tal como de hígado, mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Se puede tratar una muestra impura, por ejemplo, muestras tomadas de plasma, suero o sangre, con una cantidad de un reactivo eficaz para abrir las células, fluidos, tejidos, cápsidas víricas o membranas de células animales de la muestra, y para exponer y/o separar la/s cadena/s de los ácido/s nucleico/s antes de la amplificación. Esta etapa de lisis y desnaturalización de ácidos nucleicos para exponer y separar las cadenas permitirá que se produzca la amplificación mucho más fácilmente.

10 También se describe un proceso de detección de una mutación en donde se amplifica una muestra sospechosa de contener una o varias secuencias de ácido nucleico de *Flaviviridae*; la secuencia amplificada se pone en contacto con una sonda de oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos de la mutación; y se detecta la secuencia hibridando la sonda con la secuencia. La amplificación se puede conseguir mediante el uso del método de reacción en cadena de la polimerasa. La mutación puede ser un cambio de nucleótidos de G a C en la posición 1.214 de la región de ARN polimerasa del genoma del BVDV. Para la presente invención, la mutación es un cambio de nucleótido de G a C en la posición 8.443 del genoma del VHC.

Amplificación

20 El método de amplificación usado puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Saiki *et al.*, 1988), la reacción en cadena de la ligasa (LCR, Landgren *et al.*, 1988; Wu y Wallace, 1989; Barany, 1991), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA; Guatelli *et al.*, 1990; Compton, 1991), sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS; Kwoh *et al.*, 1989), amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA; Duck, 1990; Walquer *et al.*, 1992), amplificación por medio de la replicasa Q9 (Lizardi *et al.*, 1988; Lomeli *et al.*, 1989) o cualquier otro método adecuado de amplificación de moléculas de ácido nucleico conocidas en la técnica.

Reacción en cadena de la polimerasa

El proceso de PCR para la amplificación es bien conocido en la técnica en general (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.683.202 y 4.683.194). El proceso de amplificación puede implicar una reacción en cadena enzimática para preparar, en cantidades exponenciales relativas al número de etapas de reacción implicadas, una secuencia de ácido nucleico específica, dado que los extremos de la secuencia requerida se conocen con suficiente detalle como para poder sintetizar cebadores de oligonucleótido que se hibridarán con los mismos, y que una pequeña cantidad de la secuencia está disponible para iniciar la reacción en cadena. Un cebador es complementario a la cadena negativa (-) y el otro es complementario a la cadena positiva (+). La hibridación de los cebadores con el ácido nucleico desnaturalizado seguida de la extensión con una enzima tal como el fragmento grande de la ADN polimerasa I (Klenow) y los nucleótidos da lugar a cadenas (+) y (-) recién sintetizadas que contienen la secuencia diana. Debido a que estas secuencias recién sintetizadas también son moldes para los cebadores, los ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación de cebador y extensión dan lugar a la acumulación exponencial de la región definida por el cebador. El producto de la reacción en cadena será un dúplex de ácido nucleico diferenciado con extremos correspondientes a los extremos de los cebadores específicos empleados.

40 Mediante el presente proceso, se puede producir cualquier secuencia de ácido nucleico específica. Solo es necesario que se conozca un número suficiente de bases en ambos extremos de la secuencia con suficiente detalle para poder preparar dos cebadores de oligonucleótido que se hibriden a diferentes cadenas de la secuencia deseada y en posiciones relativas a lo largo de la secuencia de manera que un producto de extensión sintetizado a partir de un cebador, cuando se separa de su molde (complemento), puede servir como molde para la extensión del otro cebador en un ácido nucleico de longitud definida. Cuanto mayor es el conocimiento sobre las bases en ambos extremos de la secuencia, mayor puede ser la especificidad de los cebadores para la secuencia de ácido nucleico diana y, por lo tanto, mayor es la eficiencia del proceso. Se entenderá que el término cebador como se usa de aquí en adelante, puede referirse a más de un cebador, en particular, en el caso en que haya alguna ambigüedad en la información relativa a la secuencia o secuencias terminales del fragmento que se vaya a amplificar. Por ejemplo, en el caso en el que se infiera una secuencia de ácido nucleico a partir de la información de la secuencia proteica, se puede usar una colección de cebadores que contenga secuencias que representan todas las posibles variaciones de codones basadas en la degeneración del código genético para cada cadena. Un cebador de esta colección puede conservarse esencialmente con el fin de la secuencia deseada que se vaya a amplificar.

55 Se produce una secuencia de ácido nucleico específica usando el ácido nucleico marcador de diagnóstico que contiene dicha secuencia como molde. Si la secuencia de ácido nucleico diana de la muestra contiene dos cadenas, es necesario separar las cadenas del ácido nucleico antes de que se puedan usar como molde, ya sea como una etapa separada o simultáneamente a la síntesis de los productos de extensión del cebador. Esta separación de cadenas se puede realizar usando cualquier técnica de desnaturalización adecuada, incluyendo medios físicos,

químicos o enzimáticos, en donde el término "desnaturalización", como se usa en la presente memoria, incluye la totalidad de dichos medios. Un método físico de separación de las cadenas del ácido nucleico implica calentar la unidad de ácido nucleico hasta que se desnaturalice. La desnaturalización térmica típica puede implicar temperaturas que varían de aproximadamente 80-150 °C durante períodos de tiempo que varían de aproximadamente 1 a 10 minutos. La separación de cadenas también puede ser inducida por una enzima de la clase de enzimas conocidas como helicasas o la enzima RecA, que tiene actividad de helicasa, y en presencia de riboATP se sabe que desnaturaliza el ADN. Las condiciones de reacción adecuadas para la separación de las cadenas de ácido nucleico con helicasas se describen por Kuhn Hoffmann-Berling, CSH-Quantitative Biology, 43:63 (1978), y las técnicas de uso de RecA se revisan en C. Radding, *Ann. Rev. Genetics*, 16:405-37 (1982).

Si el ácido nucleico original que contiene la secuencia que se va a amplificar es monocatenario, su complemento se sintetiza añadiendo uno o dos cebadores de oligonucleótido al mismo. Si se añade un solo cebador apropiado, se sintetiza un producto de extensión de cebador en presencia del cebador, un agente para la polimerización y los cuatro nucleósidos trifosfato descritos a continuación. El producto será parcialmente complementario al ácido nucleico monocatenario y se hibridará con la cadena de ácido nucleico para formar un dúplex de cadenas de longitud desigual que luego se pueden separar en cadenas simples como se ha descrito anteriormente para producir dos cadenas complementarias separadas individuales. Como alternativa, se pueden añadir dos cebadores apropiados al ácido nucleico monocatenario y llevarse a cabo la reacción.

Si el ácido nucleico original constituye la secuencia que se va a amplificar, el/los productos de extensión del cebador producidos serán completa o esencialmente completamente complementarios a las cadenas de ácido nucleico original y se hibridarán con ellos para formar un dúplex de cadenas de la misma longitud que se separarán en moléculas monocatenarias.

Cuando se separan las cadenas complementarias del ácido nucleico o de los ácidos nucleicos, independientemente de que el ácido nucleico sea originalmente bicatenario o monocatenario, las cadenas están listas para usarse como molde para la síntesis de cadenas de ácido nucleico adicionales. Esta síntesis se realiza en condiciones que permiten la hibridación de cebadores a moldes. En general, se produce en una solución acuosa tamponada, para obtener, por ejemplo, un intervalo de pH de 7-9. Se puede añadir un exceso molar (para el ácido nucleico genómico, normalmente aproximadamente 10⁸: 1 cebador: molde) de los dos cebadores de oligonucleótido al tampón que contiene las cadenas de molde separadas. Se entiende, sin embargo, que la cantidad de cadena complementaria no puede conocerse si el proceso se usa para aplicaciones de diagnóstico, de modo que la cantidad de cebador relativa a la cantidad de cadena complementaria no puede determinarse con certeza. Sin embargo, en la práctica, la cantidad de cebador añadida, en general, estará en exceso molar frente a la cantidad de cadena complementaria (molde) cuando la secuencia que se va a amplificar esté contenida en una mezcla de cadenas de ácido nucleico de cadena larga complicadas. Se prefiere un gran exceso molar para mejorar la eficacia del proceso.

También se añaden los trifosfatos de desoxirribonucleósido dATP, dCTP, dGTP y TTP a la mezcla de síntesis, ya sea por separado o junto con los cebadores, en cantidades adecuadas, y se calienta la solución resultante hasta aproximadamente 90-100 °C durante aproximadamente 1 a 10 minutos, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 4 minutos. Tras este período de calentamiento, se deja enfriar la solución hasta la temperatura ambiente, lo que es preferible para la hibridación de cebadores. A la mezcla enfriada, se añade un agente apropiado para efectuar la reacción de extensión del cebador (denominado en la presente memoria "agente para la polimerización"), y se deja que se produzca la reacción en condiciones conocidas en la técnica. El agente para la polimerización también se puede añadir junto con los otros reactivos si es termoestable. Esta reacción de síntesis puede ocurrir desde la temperatura ambiente hasta una temperatura por encima de la que el agente para la polimerización ya no funcione. Por lo tanto, por ejemplo, si se usa ADN polimerasa como agente, la temperatura, en general, no es superior a aproximadamente 40 °C. Lo más conveniente es que la reacción tenga lugar a temperatura ambiente.

El agente para la polimerización puede ser cualquier compuesto o sistema que pueda funcionar para realizar la síntesis de productos de extensión del cebador, incluyendo enzimas. Las enzimas adecuadas para este fin incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa I de *E. coli*, fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa de T4, otras ADN polimerasas disponibles, muteínas de polimerasas, transcriptasa/s inversa/s y otras enzimas, incluyendo enzimas termoestables (es decir, aquellas enzimas que realizan la extensión del cebador después de someterlas a temperaturas suficientemente elevadas para provocar la desnaturalización), lo que puede facilitar la combinación de los nucleósidos de manera apropiada para formar los productos de extensión del cebador que sean complementarios a cada cadena de ácido nucleico. En general, la síntesis se iniciará en el extremo 3' de cada cebador y procederá en la dirección 5' a lo largo de la cadena molde hasta que finalice la síntesis, produciendo moléculas de diferentes longitudes. Como alternativa, se pueden usar agentes para la polimerización que inicien la síntesis en el extremo 5' y continúen hacia el extremo 3', usando el mismo proceso que se ha descrito anteriormente.

La cadena recién sintetizada y su cadena de ácido nucleico complementaria formarán una molécula bicatenaria en las condiciones de hibridación descritas anteriormente si está presente la secuencia diana y este híbrido se usa en las etapas sucesivas del proceso. En la siguiente etapa, la muestra tratada en condiciones de hibridación se somete a condiciones de desnaturalización usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente para proporcionar moléculas monocatenarias si está presente la secuencia diana.

El nuevo ácido nucleico se sintetiza sobre las moléculas monocatenarias. Pueden añadirse agentes adicionales para la polimerización, nucleósidos y cebadores si es necesario para que la reacción proceda en las condiciones prescritas anteriormente. De nuevo, la síntesis se iniciará en un extremo de cada uno de los cebadores de oligonucleótido y procederá a lo largo de cada cadena del molde para producir ácido nucleico adicional. Después de esta etapa, la mitad del producto de extensión consistirá en la secuencia de ácido nucleico específica unida por los dos cebadores.

Las etapas de desnaturalización y extensión de la síntesis del producto pueden repetirse tantas veces como sea necesario para amplificar la secuencia de ácido nucleico diana en la medida necesaria para la detección. Como se describirá con más detalle a continuación, la cantidad de la secuencia de ácido nucleico específica producida se acumulará de una manera exponencial.

Cuando se desee producir más de una secuencia de ácido nucleico específica a partir del primer ácido nucleico o mezcla de ácidos nucleicos, se utiliza un número apropiado de cebadores de oligonucleótido diferentes. Por ejemplo, si se van a producir dos secuencias específicas diferentes de ácido nucleico, se utilizan cuatro cebadores. Dos de los cebadores son específicos para una de las secuencias específicas de ácido nucleico y los otros dos cebadores son específicos de la segunda secuencia específica de ácido nucleico. De esta manera, cada una de las dos secuencias específicas diferentes se puede producir exponencialmente mediante el presente proceso.

La presente invención se realiza de una manera escalonada en la que, después de cada etapa, se añadan nuevos reactivos, o simultáneamente o de una sola vez, en la que todos los reactivos se añadan en la etapa inicial, o parcialmente escalonada y parcialmente simultánea, en la que se añade nuevo reactivo después de un número dado de etapas. Si se emplea un método de desnaturalización, por ejemplo, calor, que puede inactivar el agente para la polimerización, como en el caso de una enzima termolábil, entonces es necesario reponer el agente después de cada etapa de separación de la cadena. El método simultáneo se puede utilizar cuando se use un medio enzimático para la etapa de separación de la cadena. En el procedimiento simultáneo, la mezcla de reacción puede contener, además de la cadena o cadenas de ácido nucleico con la secuencia deseada, la enzima separadora de cadenas (por ejemplo, helicasa), una fuente de energía apropiada para la enzima separadora de cadenas (por ejemplo, rATP), los cuatro nucleósidos trifosfato, los cebadores de oligonucleótido en exceso molar y el agente para la polimerización (por ejemplo, fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*).

Si se usa calor para la desnaturalización en un proceso simultáneo, puede emplearse un agente termoestable tal como una polimerasa termoestable que funcione a una temperatura elevada, por ejemplo, de aproximadamente 50-105 °C en función del agente, a cuya temperatura el ácido nucleico consistirá en cadenas simples y dobles en equilibrio. Para las longitudes menores de ácido nucleico, se pueden emplear temperaturas más bajas de aproximadamente 40-50 °C. El intervalo de temperatura superior dependerá de la temperatura a la que se degrade la enzima o de la temperatura por encima de la cual se producirá un nivel insuficiente de hibridación de cebadores. Se describe una enzima termoestable, por ejemplo, A. S. Kaledin *et al.*, *Biokhimiya*, 45, 644-651 (1980). Para que esta reacción a temperatura constante tenga éxito, los cebadores tienen sus extremos 3' dentro de 6-8 pares de bases entre sí. Cada etapa del proceso ocurrirá secuencialmente a pesar de la presencia inicial de todos los reactivos. Se pueden agregar materiales adicionales según sea necesario. Una vez transcurrido el tiempo apropiado para producir la cantidad deseada de la secuencia de ácido nucleico específica, la reacción puede detenerse inactivando las enzimas de cualquier manera conocida o separando los componentes de la reacción.

La amplificación también puede llevarse a cabo usando una reacción de ciclos de temperatura en la que la temperatura se aumente en incrementos para permitir la extensión, la hibridación y la desnaturalización usando una enzima termoestable.

El proceso de la presente invención puede realizarse de forma continua. En una realización de un proceso automatizado, la reacción se puede ciclar a través de una región desnaturalizante, una región de adición de reactivo y una región de reacción. En otra realización, la enzima usada para la síntesis de productos de extensión del cebador puede inmovilizarse en una columna. Otros componentes de reacción pueden circular continuamente por una bomba a través de la columna y una bobina de calentamiento en serie, por lo que los ácidos nucleicos producidos pueden desnaturalizarse repetidamente sin inactivar la enzima.

El genotipado de *Flaviviridae* usando técnicas de PCR es comúnmente conocido en la técnica. Además, una vez realizada la PCR en muestras sospechosas de contener un *Flaviviridae*, se puede secuenciar el genoma de *Flaviviridae*.

Detección de hibridación de la sonda y secuencia diana

Se conocen en la técnica formatos de ensayo adecuados para detectar híbridos formados entre sondas y secuencias de ácido nucleico diana en una muestra (Sambrook *et al.*, 1985). La detección de la hibridación puede realizarse independientemente de si el ácido nucleico se ha amplificado o no.

Un método de detección es mediante el uso de una sonda marcada capaz de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico no amplificada o amplificada y la determinación de si la sonda se ha hibridado. Dicha sonda contiene necesariamente el nucleótido que se sospecha que está mutado, tal como 1.214 de la ARN polimerasa del BVDV, o

para la presente invención, el nucleótido 8.443 del genoma del VHC.

Los oligonucleótidos pueden marcarse incorporando un marcador detectable a través de medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Los marcadores útiles incluyen ^{32}P , colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (como las usadas comúnmente en los ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales.

El ácido nucleico se puede detectar analizándolo mediante transferencia Northern o transferencia de Southern con o sin sondas radiactivas. Por ejemplo, se analiza una pequeña muestra de ADN, por ejemplo, sangre periférica sospechosa de contener *Flaviviridae*, mediante una técnica de transferencia de Southern usando sondas de oligonucleótidos para detectar el marcador vírico de ácido nucleico específico. Como otro ejemplo, primero se amplifica una pequeña muestra de ADN de, por ejemplo, sangre periférica sospechosa de contener *Flaviviridae*, y luego se analiza a través de una técnica de transferencia de Southern usando sondas de oligonucleótido para detectar el marcador vírico de ácido nucleico específico.

Otro método implica la técnica de restricción de oligómeros (como se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.683.194). En este procedimiento, se desnaturaliza un ácido nucleico amplificado y se hibrida en solución a una sonda de oligonucleótido marcada que se hibrida específicamente con la secuencia diana (es decir, abarca la región conservada particular contenida por los cebadores) y abarca al menos un sitio de restricción de interés. El dúplex formado entre la diana y la sonda reconstituirá el sitio de restricción, y cuando se escinda con la enzima de restricción tal como, por ejemplo, G., BglI, PvuII o HinfI, libera un fragmento de sonda marcado que puede resolverse a partir de la sonda de longitud completa por electroforesis en gel. A continuación, se autorradiografía el gel resultante. El análisis del producto amplificado mediante este método puede ser rápido, es decir, de una cuantas pocas horas.

Otro método que se puede usar para analizar un producto amplificado es el método de transferencia de puntos. En un método de transferencia de puntos, el ADN diana amplificado se inmoviliza sobre un soporte sólido, tal como una membrana de nylon. Se incuba el complejo de membrana-diana con una sonda marcada en condiciones de hibridación adecuadas, se retira la sonda no hibridada por lavado en condiciones adecuadamente rigurosas y se monitoriza la membrana para detectar la presencia de sonda unida.

Un formato alternativo es un formato de transferencia de puntos "inverso", en el que se marca un ADN diana amplificado y las sondas se inmovilizan sobre un soporte sólido, tal como una membrana de nylon (véase Saiki *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:6230, y Publicación de patente PCT n.º 89/11548). El ADN diana normalmente se marca durante la amplificación mediante la incorporación de uno o más cebadores marcados. Se pueden marcar uno o ambos de los cebadores. El complejo de membrana-sonda se incuba con el ADN diana amplificado marcado en condiciones de hibridación adecuadas, se retira el ADN diana no hibridado mediante lavado en condiciones adecuadamente rigurosas, y a continuación, se monitoriza el filtro para determinar la presencia de ADN diana unido.

Como alternativa, el ensayo de transferencia de puntos inversa se puede llevar a cabo usando un soporte sólido que tenga una pluralidad de sitios de hibridación de la sonda o pocillos. Por ejemplo, una placa de micropocillos es particularmente útil en las aplicaciones clínicas a gran escala de los presentes métodos. Las sondas pueden inmovilizarse en una placa de micropocillos ya sea mediante la unión pasiva o a través de un compuesto intermedio de proteína, tal como albúmina de suero bovino (BSA), que se adhiera a las placas de micropocillos. Los métodos de transferencia de puntos inversa llevados a cabo en una placa de micropocillos se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.232.829, y Loeffelholz *et al.*, 1992, *J. Clin. Microbiol.* 30(11):2847-2851. Se puede llevar a cabo un ensayo de transferencia de puntos inversa usando placas de micropocillos, y marcarse los cebadores con biotina, como se describe en Levenson y Chang, 1989, en "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (Innis *et al.*, eds., Academic Press. San Diego) páginas 99-112. Las sondas se conjugan con BSA (véase Tung *et al.*, 1991, *Bioconjugate Chem.* 2:464-465) y se inmovilizan sobre una placa de micropocillos. Después de la amplificación usando los cebadores marcados y la hibridación con las sondas inmovilizadas, se detecta el ácido nucleico amplificado uniendo primero la biotina a la avidina-peroxidasa de rábano picante (A-HRP) o estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SAHRP), que se detecta luego llevando a cabo una reacción en la que la HRP cataliza un cambio de color de un cromógeno.

En un método alternativo de inmovilización de dúplex de hibridación para la detección, se unen sondas conjugadas con BSA a micropartículas magnéticas. Las sondas unidas se hibridan en solución al producto de amplificación marcado. Después de la hibridación, los dúplex de sonda-diana se retiran de la solución magnéticamente, y luego se detectan los dúplex de hibridación inmovilizados magnéticamente.

Otro método de detección se denomina ensayo de nucleasa 5' en el que las sondas de detección marcadas se añaden durante el proceso de amplificación por PCR. Las sondas se modifican para evitar que actúen como cebadores para la síntesis de ADN. Cualquier sonda que se hibrida con el ADN diana durante cada etapa de síntesis, es decir, durante la extensión del cebador, es degradada por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa, por ejemplo, ADN polimerasa de Taq. Entonces se detecta el producto de degradación de la sonda. Por lo tanto, la presencia del producto de descomposición de la sonda indica que se produjo tanto la hibridación entre la sonda y el ADN diana como la reacción de amplificación. Véase también, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º

5.210.015.

Los formatos de ensayo descritos anteriormente normalmente utilizan oligonucleótidos marcados para facilitar la detección de los dúplex de híbridos. Los oligonucleótidos pueden marcarse mediante cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente incorporando un marcador detectable a través de medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunológicos o químicos. Los marcadores útiles incluyen ^{32}P , colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (como las usadas comúnmente en los ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales.

Un método alternativo de detección de la amplificación de un ácido nucleico de *Flaviviridae* es mediante la monitorización del aumento de la cantidad total de ADN bicatenario en la mezcla de reacción (como se describe en Higuchi *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10:413-417; Higuchi *et al.*, 1993, *Bio/Technology* 11:1026-1030; y publicaciones de patente europea n.º 487.218 y 512.334. La detección de ADN diana bicatenario se basa en el aumento de la fluorescencia que el bromuro de etidio (EtBr) y otros marcadores de unión al ADN presentan cuando se unen a ADN bicatenario. El aumento del ADN bicatenario resultante de la síntesis de secuencias diana genera un aumento detectable de la fluorescencia.

Otro método útil más para la detección de las mutaciones de *Flaviviridae* es a través de ensayos de hibridación inversa. Esto es especialmente útil si hay una multitud de sondas implicadas. El conjunto seleccionado de sondas se puede inmovilizar en un soporte sólido en ubicaciones distintas conocidas (puntos, líneas u otras figuras). El conjunto seleccionado de sondas puede inmovilizarse en una tira de membrana de una manera lineal. Dichas sondas pueden inmovilizarse individualmente o como mezclas a lugares delimitados en el soporte sólido. Se puede usar un ensayo de sonda lineal para examinar los genotipos de *Flaviviridae* que contienen la mutación. El ensayo de sonda lineal implica múltiples sondas que se inmovilizan en líneas paralelas en una membrana, a continuación se realiza una hibridación inversa de fragmentos de ácido nucleico amplificados. El híbrido puede entonces detectarse a través de un acoplamiento de biotina-estreptavidina con un sistema de revelado de color no radiactivo. Véase, por ejemplo, el documento WO 97/40193.

También se pueden usar técnicas de genotipado de *Flaviviridae* para analizar la presencia de mutaciones de *Flaviviridae*. Por ejemplo, se pueden usar análisis filogenéticos basados en secuencias, hibridación diferencial, PCR o polimorfismo de longitud de fragmento.

Detección de marcadores de proteínas/péptidos de *Flaviviridae*

También se describe un proceso de detección de marcadores víricos de diagnóstico para el fracaso de la terapia con nucleósido ramificado en 2' a largo plazo para la infección por *Flaviviridae* en donde se analiza una muestra que contiene proteína, péptidos o fragmentos peptídicos de *Flaviviridae* para dichos marcadores víricos. Las proteínas, los péptidos o los fragmentos peptídicos correlacionados con el fracaso terapéutico pueden detectarse mediante cualquier tecnología de detección de proteínas generalmente aplicable conocida en la técnica, incluyendo la transferencia Western, electroforesis bidimensional en gel, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), quimioluminiscencia mejorada (ECL), inmunohistoquímica, ensayos de ELI-Spot, secuenciación de péptidos o tecnología de matriz de proteínas basada en anticuerpos. Por ejemplo, la expresión de proteínas de marcadores víricos de *Flaviviridae* de diagnóstico para el tratamiento con nucleósido ramificado en 2' puede analizarse con métodos inmunohistológicos clásicos. En éstos, el reconocimiento específico es proporcionado por el anticuerpo primario (policlonal o monoclonal) al marcador vírico específico, pero el sistema de detección secundario puede utilizar anticuerpos secundarios conjugados fluorescentes, enzimáticos u otros. Como resultado, se obtiene una tinción inmunohistológica de la sección de tejido infectada con *Flaviviridae* para el examen patológico.

Otro método de detección de proteínas, péptidos o fragmentos peptídicos que son de diagnóstico para la respuesta a largo plazo de los portadores de *Flaviviridae* a la terapia con nucleósido ramificado en 2' es la transferencia Western. En resumen, una muestra que contiene proteína, péptido o fragmentos peptídicos de *Flaviviridae* se separa por medio de un gel electroforético. A continuación, se transfieren las proteínas separadas a un medio tal como nitrocelulosa. Los anticuerpos que tienen un marcador detectable tal como estreptavidina-fosfatasa alcalina reactivo a secuencias de aminoácidos de *Flaviviridae* específicas correlacionadas con el fracaso del nucleósido ramificado en 2' se ponen entonces en contacto sobre el medio de nitrocelulosa que contiene las secuencias de aminoácidos de *Flaviviridae*. Los anticuerpos reactivos se unirán con la correspondiente secuencia de aminoácidos de *Flaviviridae*, y se pueden detectar usando un reactivo tal como tetrazolio nitobluo y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP). Véase, por ejemplo, Jalkanen, M., *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., *et al.*, *J. Cell. Biol.* 105:3087-3096 (1987).

Como alternativa, los anticuerpos reactivos presentes en los sueros de los portadores de *Flaviviridae* pueden usarse para detectar la presencia de marcadores víricos de *Flaviviridae* que son diagnósticos del tratamiento con nucleósido ramificado en 2'. Se puede usar cualquier técnica conocida de ensayo de anticuerpos conocida por los expertos en la técnica, incluyendo el inmunoensayo enzimático (EIA). Por ejemplo, se pone en contacto una muestra de un portador de *Flaviviridae* que contiene anticuerpos específicos de *Flaviviridae* con una matriz de soporte sólida que contiene péptidos *Flaviviridae* específicos correlacionados con el éxito y/o el fracaso de la terapia con nucleósido ramificado en 2'. A continuación, se detectan los anticuerpos reactivos usando anticuerpos anti-IgG humana de conejo marcados con estreptavidina-fosfatasa alcalina y un reactivo que contiene tetrazolio nitobluo y fosfato de 5-

bromo-4-cloro-3-indilo.

Otro método para detectar proteínas, péptidos o fragmentos peptídicos que sirven de diagnóstico para la respuesta a largo plazo de portadores de *Flaviviridae* a la terapia de nucleósido ramificado en 2' consiste en secuenciar la proteína, el péptido o el fragmento peptídico usando técnicas conocidas por un experto en la técnica (Véase, por ejemplo, Matsudaira, P., *J Biol Chem* 262: 10035-10038, (1987); Salinovich, O. y Montelano, R., *Anal. Biochem.* 156: 341, (1986); Tarr, G. E.: "Manual Edman Sequencing System". En: Shively, J. E., (ed.) "Methods of Protein Microcharacterization". The Humana Press Inc., Clifton, N J, 1986, pág.. 155-194; y Fernandez, J., Andrews, L. y Mische, S., *Anal. Biochem.* 218: 112-117, (1994)). Por ejemplo, se podría usar la técnica de Edman para determinar la secuencia de aminoácidos del péptido. En resumen, la química de Edman elimina los restos de aminoácidos del extremo N-terminal de una proteína/un péptido, de uno en uno en secuencia. Cada ciclo de la química de Edman, necesario para la eliminación de cada resto de aminoácido, consiste en tres etapas: un acoplamiento con isotiocianato de fenilo (PITC) en condiciones ligeramente alcalinas para formar un péptido de feniltiocarbamilo (PTC); la escisión para liberar el primer resto como su derivado de aminoácido de anilinoctiazolinona (ATZ); la conversión del derivado de ATZ a un derivado de aminoácido de feniltiohidantoína (PTH) más estable. El resto de aminoácido-PTH, retirado en cada ciclo de degradación de Edman, se identifica por RP-HPLC de micro o pequeño calibre. Tarr, G. E.: "Manual Edman Sequencing System". En: Shively, J. E., (ed.) "Methods of Protein Microcharacterization". The Humana Press Inc., Clifton, N J, 1986, pág. 155-194, ofrece una descripción completa del proceso y las posibles dificultades. Como alternativa, si una muestra no produce una secuencia N-terminal, el resto N-terminal se bloquea, se degrada durante los procedimientos preparativos, o por razones estéricas no disponibles para los reactivos químicos de Edman, entonces la muestra puede someterse a proteólisis específica controlada, donde los péptidos se fraccionan y después se analizan. Dicha metodología de fraccionamiento está descrita por Fernandez, J., Andrews, L. y Mische, S.: "An improved procedure for enzymatic digestion of polyvinilidene difluoride-bound proteins for internal sequence analysis". *Anal. Biochem.* 218: 112-117, 1994.

Matrices

Dichas matrices incluyen macromatrices de ADN, micromatrices de ADN y microchips de ADN. Las matrices de ADN, por ejemplo, se han descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.837.832, la patente de EE.UU. n.º 5.807.522, la patente de EE.UU. n.º 6.007.987, la patente de EE.UU. n.º 6.110.426, y los documentos WO 99/05324, 99/05591, WO 00/58516, WO 95/11995, WO 95/35505A1, WO99/42813, JP10503841T2, GR3030430T3, ES2134481T3, EP804731B1, DE69509925C0, CA2192095AA, AU2862995A1, AU709276B2, AT180570, EP 1066506 y AU 2780499. Dichas matrices se pueden incorporar a métodos informatizados para analizar los resultados de hibridación cuando las matrices se ponen en contacto con los nucleótidos de muestra preparados, por ejemplo, como se describe en la publicación PCT WO 99/05574, y las patentes de EE.UU. n.º 5.754.524; 6.228.575; 5.593.839; y 5.856.101. Los métodos de detección de marcadores de enfermedades también son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. n.º 6.228.586; 6.160.104; 6.083.698; 6.268.398; 6.228.578; y 6.265.174. Otras descripciones de los métodos de matriz de ADN pueden encontrarse, por ejemplo, en: Shoemaker D. D. *et al.*, *Nature* 409(6822): 922-927 (2001); Kane M. D., *et al.*, *Nucleic Acids Res* 28(22):4552-7 (2000); Taton T. A., *et al.*, *Science*. 289(5485): 1757-60 (2000); Jörg Reichert *et al.*, *Anal. Chem.*, 72(24):6025-6029 (2000); Reinke V., *Mol Cell* 6(3):605-16 (2000); Marx J. *Science* 289: 1670-1672 (2000); Lockhart D. J. *et al.*, *Nature* 405(6788):827-836 (2000); Cortese J. D., *The Scientist* 14[17]:25 (2000); Cortese J. D., *The Scientist* 14[11]:26 (2000); Fritz J. *et al.*, *Science*. 288(5464):316-8 (2000); Mark Schena (Ed.), *Microarray Biochip Technology*, Eaton Publishing Company, Distribuido por TeleChem/arrayit.com; Scherf U., *et al.*, *Nat Genet.* 24(3): 236-44 (2000); Ross D. T. *et al.*, *Nat Genet.* 24(3):227-35 (2000); Walt D. R., *Science* 287: 451-452 (2000); Afshari C. A. *et al.*, *Cancer Res* 59(19): 4759-60 (1999); Gwynne P. y Page G., *Science*, 6 de agosto de 1999. (suplemento publicitario especial; tiene una lista de empresas relacionadas con la micromatrices); Baldwin D. *et al.*, *Curr Opin Plant Biol* 2(2):96-103 (1999); Pollack J. R. *et al.*, *Nat Genet* 23(1):41-6 (1999); Khan J. *et al.*, *Electrophoresis* 20(2):223-9 (1999); Gerhold D. *et al.*, *Trends Biochem Sci* 24(5):168-73 (1999); Ekins R. y Chu F. W., *Trends in Biotechnology* 17:217-218 (1999); Nuwaysir, E. F. *et al.*, *Molecular Carcinogenesis* 24:153-159 (1999); Sinclair, B. *The Scientist*, 13(11):18-20 (1999); *The Chipping Forecast, Nature Genetics* (suplemento de enero de 1999); Schena, M. y Davis, R. W. *Genes, Genomes and Chips*. En "DNA Microarrays: A Practical Approach" (ed. M. Schena), Oxford University Press, Oxford, RU, 1999; Marton M. J. *et al.*, *Nat Med.* 4(11):1293-301 (1998); Wang D.G. *et al.*, *Science* 280(5366):1077-82 (1998); Schena, M. y R. W. Davis. "Parallel Analysis with Biological Chips". En "PCR Methods Manual" (eds. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky), Academic Press, San Diego, 1998; Lemieux, B. *et al.*, *Molecular Breeding* 4:277-289 (1998); Schena, M. *et al.*, *Trends in Biotechnology* 16:301-306 (1998); Service, R. F., *Science* 282(5388):396-399 (1998); Service, R. F., *Science* 282(5388):399-401 (1998); Kricka, L., *Nature Biotechnology* 16:513 (1998); Housman, D., *Nature Biotechnology* 16(6):492-493 (1998); Ramsay, G., *Nature Biotechnology* 16(1):40-44 (1998); Marshall, A. *et al.*, *Nature Biotechnology* 16(1):27-31 (1998); Kononen J. *et al.*, *Nat. Med.* 4(7):844-847 (1998); Blanchard, A. P. (1998) "Synthetic DNA Arrays"; en *Genetic Engineering*, Vol. 20, pág. 111-123, editado por J. K. Setlow, Plenum Press, Nueva York; Proudnikov D. *et al.*, *Anal Biochem* 259(1):34-41 (1998); Chen J. J. *et al.*, *Genomics* 51(3):313-24 (1998); Wallace R. W., *Molecular Medicine Today* 3:384-389 (1998); Covacci, A. *et al.*, *Drug Development Research* 41:180-192 (1997); Forozan, F. *et al.*, *Trends in Genetics* 13:405-409 (1997); Blanchard, A. P. y L. Hood, *Nature Biotechnology* 14:1649 (1996); Blanchard, A. P. *et al.*, *Biosensors & Bioelectronics* 11:687-690 (1996); DeRisi J. *et al.*, *Nat Genet* 14(4):457-60 (1996); Shalon D. *et al.*, *Genome Res* 6(7):639-45 (1996); Schena M. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 93(20):10614-9 (1996); y Schena M. *et al.*, *Science* 270(5235):467-70 (1995).

Las sondas en una matriz pueden ser de longitudes variables, incluyendo, pero no limitándose a, tan cortas como de aproximadamente 10-30 nucleótidos de longitud o tan largas como un gen de *Flaviviridae* entero o un clon de *Flaviviridae* entero, que pueden ser de hasta varias kilobases. Además, se pueden usar secuencias de las diversas longitudes como las descritas en las **Tablas 2 y 3** (SEQ ID NO: 1-62) como sondas. La matriz puede diseñarse de manera que todas las sondas de la matriz puedan hibridarse con sus genes correspondientes a aproximadamente la misma rigurosidad de hibridación. Las sondas para matrices deben ser únicas en las restricciones de hibridación usadas. Una única sonda solo es capaz de hibridarse con un tipo de ácido nucleico por diana. Una sonda no es única si en la rigurosidad de hibridación usada, se hibrida con ácidos nucleicos derivados de dos genes diferentes, es decir, genes relacionados o secuencias no homólogas. La homología de la secuencia de la sonda con el gen y la rigurosidad de hibridación usada ayudan a determinar si una sonda es única cuando se ensaya una muestra seleccionada. Las sondas también pueden no hibridarse con diferentes ácidos nucleicos derivados del mismo gen, es decir, variantes de corte y empalme. Dado que se conocen las variantes de corte y empalme de interés, se pueden seleccionar varias secuencias de sonda diferentes de la secuencia génica diana de interés para una matriz, de manera que cada sonda solo puede hibridarse con ácido nucleico derivado de una de las variantes de corte y empalme. Se pueden usar matrices que contienen las SEQ ID NO: 1-62 en condiciones de hibridación que permitan una hibridación selectiva. En las condiciones de hibridación selectiva, las sondas se hibridan con ácido nucleico a partir de solo una secuencia identificada. En condiciones de hibridación selectiva, las sondas se hibridan con ácido nucleico de una sola secuencia identificada. También se pueden usar matrices que contengan cualquier secuencia de *Flaviviridae* de interés se usan en condiciones de hibridación que permitan la hibridación selectiva. En condiciones de hibridación selectiva, las sondas se hibridan con ácido nucleico a partir de una sola secuencia identificada.

El uso de la micromatriz puede requerir primero la amplificación de genes de interés, tal como por transcripción inversa de ARNm o ARN total, seguida de la reacción en cadena de la polimerasa usando métodos conocidos en la técnica. A medida que se copia el ácido nucleico, se va marcando con un marcador que se pueda usar en los métodos de detección y cuantificación conocidos en la técnica. El ácido nucleico se puede marcar con marcadores radiactivos o no radiactivos, pero preferiblemente contiene marcadores fluorescentes. El ácido nucleico marcado se introduce en la micromatriz que contiene las sondas de secuencia de interés y se deja reaccionar durante un período de tiempo. Tras ello, se lava el sustrato de materiales foráneos, dejando los ácidos nucleicos sobre la diana unida a las moléculas de sonda fijas, permitiendo la detección y cuantificación mediante métodos conocidos en la técnica tales como por autorradiografía, recuento de centelleo líquido y/o fluorescencia. A medida que se mejoran las técnicas de hibridación y detección, pueden ser aplicadas fácilmente por un experto en la técnica. Como es bien conocido en la técnica, si las moléculas de sonda y las moléculas diana se hibridan formando un fuerte enlace no covalente entre las dos moléculas, puede suponerse razonablemente que la sonda y el ácido nucleico diana son esencialmente completamente complementarios si las etapas de hibridación y lavado se llevan a cabo en condiciones de alta rigurosidad. El marcador detectable proporciona un medio para determinar si se ha producido la hibridación. Mediante la obtención de una imagen de la matriz con un método de detección y cuantificación conocido en la técnica tal como autorradiografía, recuento de centelleo líquido o fluorescencia, se puede determinar si y en qué grado están presentes las secuencias de genes de *Flaviviridae*, comparando las intensidades en ubicaciones específicas de la matriz. Las altas señales de cuantificación indican que una determinada secuencia está presente en una muestra preparada, y una señal de cuantificación ausente muestra que una determinada secuencia no está presente. Se puede comparar directamente la presencia de diversas secuencias génicas en diferentes condiciones, tal como antes del tratamiento con nucleósido ramificado en 2' y durante el tratamiento con nucleósido ramificado en 2'. De igual manera, se puede determinar qué secuencias están presentes en respuesta a ciertos estímulos tales como un nucleósido ramificado en 2'.

Se puede rastrear el perfil de la secuencia de *Flaviviridae* de un paciente a lo largo del tiempo usando tecnologías de matriz de ADN. Un paciente con *Flaviviridae* que recibe nucleósido ramificado en 2' como una modalidad, u otra modalidad anti-*Flaviviridae*, puede monitorizarse, a lo largo del tiempo, para analizar los cambios producidos en las secuencias genómicas de *Flaviviridae* anteriormente mencionadas en respuesta al tratamiento.

Las matrices que contienen las SEQ ID NO: 1-62, o cualquier otra secuencia de interés identificada de *Flaviviridae*, se pueden preparar mediante cualquier método de síntesis de matrices conocido en la técnica, tal como la tecnología de aplicación puntual o la síntesis en fase sólida mediante fotolitografía. Las matrices también pueden imprimirse en sustratos sólidos, por ejemplo, portaobjetos de microscopio de vidrio. Antes de la impresión, se preparan portaobjetos para proporcionar un sustrato para la unión, como se conoce en la técnica. Las matrices se pueden imprimir usando cualquier técnica de impresión y máquinas conocidas en la técnica. La impresión implica colocar las sondas sobre el sustrato, unir las sondas al sustrato y bloquear el sustrato para evitar la hibridación inespecífica, como se conoce en la técnica. Preferiblemente, las matrices se sintetizan mediante síntesis en fase sólida usando una combinación de fotolitografía y química combinatoria. Algunos de los elementos clave de la selección de la sonda y el diseño de la matriz son comunes en la producción de todas las matrices. Las estrategias para optimizar la hibridación de la sonda, por ejemplo, se incluyen invariablemente en el proceso de selección de la sonda. La hibridación en condiciones particulares de pH, sal y temperatura puede optimizarse teniendo en cuenta las temperaturas de fusión y usando reglas empíricas que se correlacionan con los comportamientos de hibridación deseados (como se describe en Keller, G. H., y M. M. Manak (1987) "DNA Probes", Stockton Press, Nueva York, N.Y., pág. 169-170). Los modelos informáticos se pueden usar para predecir la intensidad y la dependencia de la

concentración de la hibridación de la sonda.

En la técnica, se conocen condiciones de rigurosidad moderada a alta para la hibridación. Un ejemplo de condiciones de alta rigurosidad para una transferencia es la hibridación a 68 °C en 5 x SSC/5 x solución de Denhardt/SDS al 0,1 % y lavado en 0,2 x SSC/SDS al 0,1 % a temperatura ambiente. Un ejemplo de condiciones de rigurosidad moderada es la hibridación a 68 °C en 5 x SSC/5 x solución de Denhardt/SDS al 0,1 % y lavado a 42 °C en 3 x SSC. Los parámetros de temperatura y concentración de sal se pueden variar para conseguir el nivel deseado de identidad de secuencia entre una sonda y un ácido nucleico diana. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (1995) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, NY, N.Y., para una orientación adicional sobre las condiciones de hibridación. La temperatura de fusión se describe mediante la siguiente fórmula (Beltz, G. A. *et al.*, [1983] *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman y K. Moldave [Eds.] Academic Press, Nueva York 100:266-285). $T_f = 81,5\text{ °C} + 16,6 \text{ Log}[\text{Na}^+] + 0,41(+G+C) - 0,61(\% \text{ de formamida}) - 600/\text{longitud del dúplex en pares de bases}$.

Se pueden crear ácidos nucleicos mediante la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos de PCR pueden confirmarse mediante electroforesis en gel de agarosa. La PCR es una síntesis repetitiva, enzimática, cebada de una secuencia de ácido nucleico. Este procedimiento es bien conocido y comúnmente usado por los expertos en esta técnica (Véase, por ejemplo, Mullis, patentes de EE.UU. n.º 4.683.195, 4.683.202, y 4.800.159; Saiki *et al.*, *Science* 230:1350-1354 (1985)). La PCR se usa para amplificar enzimáticamente un fragmento de ADN de interés que está flanqueado por dos cebadores de oligonucleótido que se hibridan con cadenas opuestas de la secuencia diana. Los cebadores están orientados con los extremos 3' apuntando entre sí. Los ciclos repetidos de desnaturalización por calor del molde, la hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias y la extensión de los cebadores hibridados con una ADN polimerasa dan lugar a la amplificación del segmento definido por los extremos 5' de los cebadores de PCR. Dado que el producto de extensión de cada cebador puede servir como molde para el otro cebador, cada ciclo duplica esencialmente la cantidad de molde de ADN producida en el ciclo anterior. Esto genera la acumulación exponencial del fragmento diana específico, hasta varios millones de veces en pocas horas. Mediante el uso de una ADN polimerasa termoestable tal como la polimerasa de Taq, que se aísla de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, el proceso de amplificación puede ser completamente automatizado. Se pueden usar otras enzimas conocidas por los expertos en la técnica.

Como alternativa, se pueden usar sondas hechas de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) como sustitutos de sondas hechas de oligonucleótidos para los mismos usos descritos anteriormente. La sustitución de los PNA por oligonucleótidos es bien conocida en la técnica: la síntesis de ácidos nucleicos peptídicos a través de monómeros preformados se ha descrito, por ejemplo, en las solicitudes de patente PCT WO 92/20702 y WO 92/20703. También se ha informado de recientes avances sobre la síntesis, estructura, propiedades biológicas y usos de los PNA. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente PCT WO 93/12129, la patente de EE.UU. n.º US6617422, concedida a Neilsen P. E. *et al.*, la patente de EE.UU. n.º 5.539.083, concedida a Cook *et al.*, la solicitud de patente de EE.UU. n.º US20030059789A1, la patente de EE.UU. n.º US6475721, concedida a Kleiber *et al.*, Egholm *et al.*, *Nature* :365, 566-568 (1993), Nielsen *et al.*, *Science* 254:1497-1500 (1991); y Egholm *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 114:1895-1897 (1992).

Kits

Un kit de ensayo adecuado para su uso en un ensayo de determinación del estado de resistencia de una muestra de *Flaviviridae* a un nucleósido ramificado en 2' que hace uso de una metodología según lo descrito en la presente memoria, comprende (1) un oligonucleótido que es complementario a una región de la secuencia de ADN de tipo silvestre (o su ARN correspondiente) o a una región de la secuencia de ADN mutante como se describe en la presente memoria; (2) materiales requeridos para la polimerización del ácido nucleico desde el extremo 3' del oligonucleótido; y (3) un medio de determinación de la presencia de un producto extendido de cebador de oligonucleótido. Los materiales de polimerización incluyen enzimas apropiadas, tampones, soluciones de lavado, marcadores y sustratos para el marcador, si es necesario. Si se usa la PCR para amplificar el ácido nucleico, entonces se deben incluir materiales adicionales tales como cebadores de oligonucleótidos apropiados que amplificarán una región de la secuencia de ADN de tipo silvestre (o su ARN correspondiente) o una región de la secuencia de ADN mutante como se describe en la presente memoria (o su ARN correspondiente) y dNTP (desoxinucleósido trifosfatos). También se pueden incluir las instrucciones para realizar el ensayo.

Un kit de ensayo adecuado para su uso en un ensayo de determinación de la sensibilidad de una muestra de *Flaviviridae* al interferón que hace uso de una metodología según lo descrito en la presente memoria, comprende un oligonucleótido que es complementario a una región de la secuencia de ADN de tipo silvestre (o su ARN correspondiente) o a la región pertinente de la secuencia de ADN mutante, junto con materiales requeridos para permitir la hibridación. Dichos materiales incluyen tampones apropiados, soluciones de lavado, marcadores y sustratos para los marcadores, si es necesario. El nucleótido se puede marcar. Si se usa la PCR para amplificar el ácido nucleico antes de la hibridación, entonces se deben incluir materiales adicionales tales como cebadores de oligonucleótidos apropiados que amplificarán una región de la secuencia de ADN de tipo silvestre (o su ARN correspondiente) o una región de la secuencia de ADN mutante, enzimas apropiadas y dNTP (desoxinucleósido trifosfatos). También se pueden incluir instrucciones para realizar el ensayo.

También se describe un kit para la detección de un marcador de resistencia al tratamiento con nucleósido ramificado

en 2' a largo plazo de una infección por *Flaviviridae*. El kit puede contener un compartimento que contiene una sonda de oligonucleótido que se une esencialmente a una subsecuencia de ácido nucleico de los *Flaviviridae* que contiene el marcador de diagnóstico. Como alternativa, el kit contiene ácido nucleico peptídico (PNA) u otra sonda imitativa antisentido en sustitución del oligonucleótido. El kit también puede contener reactivos para detectar la hibridación de la sonda con el marcador vírico de ácido nucleico de *Flaviviridae*. También se describen kits que pueden contener un cebador para la amplificación por PCR de ácidos nucleicos de *Flaviviridae*. Un kit también puede contener un medio para detectar ácidos nucleicos amplificados de *Flaviviridae*, tales como una sonda de oligonucleótido o de ácido nucleico de péptido. En algunos casos, la sonda se fija a una membrana de soporte apropiada. Otros componentes opcionales del kit incluyen, por ejemplo, un agente para catalizar la síntesis de los productos de extensión del cebador, el sustrato nucleósido trifosfato, medios usados para marcar (por ejemplo, un conjugado de avidina-enzima, y sustrato enzimático y cromógeno si el marcador es biotina), los tampones apropiados para la PCR o reacciones de hibridación, e instrucciones para llevar a cabo el presente método.

Además, el kit puede tener un recipiente que incluya un control positivo que contenga uno o más ácidos nucleicos con una secuencia del genoma vírico de *Flaviviridae* correlacionada con un fallo terapéutico y/o un recipiente que incluya un control negativo sin dichos ácidos nucleicos. Además, el kit puede tener un recipiente para una enzima de restricción capaz de escindir un ácido nucleico que contenga la secuencia diana en un sitio contenido en una secuencia en la sonda.

También se describe un kit para la detección y/o el análisis genético de uno o más marcadores víricos de *Flaviviridae* que están correlacionados con el fracaso terapéutico que puede estar presente en una muestra biológica que comprende los siguientes componentes: (i) cuando sea apropiado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos nucleicos presentes en la muestra; (ii) cuando sea apropiado, al menos un par de cebadores adecuado; (iii) al menos dos sondas como se ha definido anteriormente, posiblemente fijadas a un soporte sólido; (iv) un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón; (v) una solución de lavado, o componentes necesarios para producir dicha solución; (vi) cuando sea apropiado, un medio de detección de los híbridos resultantes de la hibridación precedente; (vii) cuando sea apropiado, un medio para unir dicha sonda a una ubicación conocida sobre un soporte sólido; y/o (viii) instrucciones para llevar a cabo el presente método.

Además, también se describe un kit que contiene peptídicos o fragmentos peptídicos que corresponden a marcadores víricos correlacionados con el fracaso de terapia con nucleósido ramificado en 2' que se puede usar en un inmunoensayo para detectar la presencia de anticuerpos reactivos en una muestra. El péptido puede estar en una solución estabilizada o liofilizada. Dicho kit puede contener una solución apropiada para hidrolizar un péptido liofilizado. El kit también puede contener un medio sólido apropiado para transferir el péptido mencionado anteriormente. El kit también puede contener un reactivo apropiado para detectar la presencia de anticuerpos reactivos al péptido, tal como un anticuerpo anti-IgG humana marcado con estreptavidina-fosfatasa alcalina. Además, el kit puede contener un agente de detección tal como tetrazolio nitobluo y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP).

Como alternativa, el kit puede contener anticuerpos reactivos a secuencias peptídicas específicas asociadas con la terapia de nucleósido ramificado en 2'.

IV. Tratamiento de infecciones por *Flaviviridae*

Tratamiento de combinación o alternancia con agentes anti-*Flaviviridae*

Pueden surgir variantes de *Flaviviridae* resistentes a los fármacos tras un tratamiento prolongado con un agente antivírico. La resistencia a los fármacos se produce más normalmente por un gen que codifica una enzima usada en la replicación vírica. La eficacia de un fármaco frente a la infección por *Flaviviridae* puede prolongarse, aumentarse o restablecerse mediante la administración del compuesto en combinación o alternancia con un segundo, y tal vez un tercer, compuesto antivírico que induzca una mutación diferente de la causada por el fármaco principal. La terapia de combinación induce múltiples estreses simultáneos en el virus. La farmacocinética, la biodistribución u otro parámetro del fármaco pueden ser modificados por dicha terapia de combinación o de alternancia.

En el presente documento, se describen métodos para lograr un tratamiento óptimo de una infección por *Flaviviridae* mediante la administración de un nucleósido ramificado en 2', o un profármaco y/o una sal farmacéuticamente aceptables del mismo, a un ser humano que necesita terapia en combinación y/o alternancia con uno o más fármacos que inducen directa o indirectamente una mutación en el genoma vírico en una ubicación distinta a una mutación de un nucleótido que genera un cambio de serina a un aminoácido diferente en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXXT del dominio B de la ARN polimerasa, y/o uno o más fármacos que están asociados con dicha mutación.

Tratamiento con interferón de infecciones por *Flaviviridae* mutante

También se describe un método de tratamiento y/o curación sustancial de una infección por *Flaviviridae* en un hospedador infectado con un *Flaviviridae* que contiene una mutación de Serina a Treonina en el resto de aminoácido de serina conservado del Dominio B de la región de la ARN polimerasa de un *Flaviviridae* (**Figura 11**) mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de interferón. Se describe un método de tratamiento y/o

curación sustancial de una infección por BVDV que contiene una mutación de serina a treonina en la posición del aminoácido 405 de la región de la ARN polimerasa mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de interferón. También se describe un método de tratamiento y/o curación sustancial de una infección por VHC que contiene una mutación de serina a treonina en la posición del aminoácido 282 de la región de la ARN polimerasa del VHC mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de interferón. Por ejemplo, se puede administrar interferón alfa-2b para tratar y/o curar esencialmente la infección por *Flaviviridae*.

También se describe un método de tratamiento y/o curación sustancial de una infección por *Flaviviridae* en un hospedador sospechoso de estar infectado con BVDV, que comprende: (i) obtener una muestra vírica del hospedador; (ii) identificar si el *Flaviviridae* de la muestra contiene una Treonina en el resto de aminoácido 405 de la ARN polimerasa; e (iii) administrar una cantidad eficaz de interferón al hospedador infectado con un *Flaviviridae* que contiene una mutación de Serina a Treonina en el aminoácido 405 de la región de ARN polimerasa.

También se describe un método de tratamiento y/o curación sustancial de una infección por *Flaviviridae* en un hospedador sospechoso de estar infectado con el VHC, que comprende: (i) obtener una muestra vírica del hospedador; (ii) identificar si el *Flaviviridae* de la muestra contiene una Treonina en el resto de aminoácido 282 de la ARN polimerasa; e (iii) administrar una cantidad eficaz de interferón al hospedador infectado con un *Flaviviridae* que contiene una mutación de Serina a Treonina en el aminoácido 282 de la región de ARN polimerasa.

Los interferones incluyen: Intron-A (interferón alfa-2b) de Schering, PEG-INTRON (interferón alfa-2b pegilado) de Schering, Roferon-A (interferón alfa-2a) de Roche, PEGASYS (interferón alfa-2a pegilado) de Roche, INFERGEN (interferón alfacon-1) de InterMune, OMNIFERON (interferón natural) de Viragen, ALBUFERON de Human Genome Sciences, REBIF (interferón beta-1a) de Ares-Serono, Interferón omega de BioMedicine, Interferón alfa oral de Amarillo Biosciences e Interferón gamma-1b de InterMune.

La identificación de la mutación de Serina a Treonina en la posición de aminoácido 405 de la región de ARN polimerasa del BVDV o la posición del aminoácido 282 de la región de la ARN polimerasa del VHC puede realizarse detectando la presencia de una mutación en el genoma de *Flaviviridae* que permitiría un cambio de aminoácido de Serina a Treonina. Por ejemplo, la presencia de citidina en el nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa de BVDV (donde el nucleótido 1.214 de la región de la ARN polimerasa corresponde al nucleótido 11, 136 del genoma de BVDV) se puede usar para detectar el cambio de aminoácidos. Por ejemplo, se pueden detectar las siguientes mutaciones dobles: 1.214 (de G a C) y 1.215 (de C a A); 1.214 (de G a C) y 1.215 (de C a G); o 1.214 (de G a C) y 1.215 (de C a U), que dan lugar a un cambio de aminoácidos de serina a treonina en la posición 405 de la región de la ARN polimerasa de BVDV. Por ejemplo, la presencia de citidina en el nucleótido 8.443 del genoma del VHC se puede usar para detectar el cambio de aminoácidos. Por ejemplo, se pueden detectar las siguientes mutaciones dobles: 8.443 (de G a C) y 8.444 (de C a A); 8.443 (de G a C) y 8.444 (de C a G); o 8.443 (de G a C) y 8.444 (de C a U), que dan lugar a un cambio de aminoácidos de serina a treonina en la posición 282 de la región de la ARN polimerasa de VHC. Las mutaciones se pueden detectar usando cualquiera de las técnicas de detección descritas anteriormente, tales como sondas marcadas, ensayos de hibridación inversa, transferencias de Southern o cualquier otra técnica de detección conocida por un experto en la técnica.

V. Preparación de composiciones farmacéuticas

Cualquier hospedador, incluyendo un ser humano, que presente una infección causada por un virus *Flaviviridae*, puede tratarse administrando al paciente una cantidad eficaz de un nucleósido ramificado en 2' o un profármaco y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como β -D-2'-CH₃-riboC o su profármaco de 3'-valinaéster, en presencia de un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para cualquiera de las indicaciones o modos de administración que se describen en detalle en la presente memoria en combinación o en alternancia con un fármaco que induce una mutación en el genoma vírico en una ubicación distinta de una mutación de un nucleótido que genera un cambio de la serina a un aminoácido diferente en la secuencia de consenso altamente conservada, XRXS \overline{G} XXXT, del dominio B de la región de la ARN polimerasa. El nucleósido ramificado en 2', tal como β -D-2'-CH₃-riboC, o un profármaco y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden administrarse solos, o en combinación o alternancia con otros agentes antivíricos como se describe en la presente memoria. Los materiales activos se pueden administrar por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica, en forma líquida o sólida.

Una dosis preferida de un compuesto estará en el intervalo de aproximadamente 1 a 50 mg/kg, preferiblemente de 1 a 20 mg/kg, de peso corporal al día, y más generalmente de 0,1 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal del receptor al día. El intervalo de dosis eficaz de las sales y profármacos farmacéuticamente aceptables puede calcularse basándose en el peso del nucleósido precursor por suministrar. Si el profármaco y/o la sal presentan actividad por sí mismos, la dosis eficaz se puede estimar usando el peso del profármaco y/o de la sal, o por otros medios conocidos por los expertos en la técnica.

El compuesto se puede administrar convenientemente en cualquier unidad y forma de dosificación adecuada, incluyendo, pero sin limitarse a, una que contenga de 7 a 3.000 mg, preferiblemente de 70 a 1.400 mg de principio activo por forma de dosificación unitaria. Por ejemplo, una dosis oral de 50 a 1.000 mg del principio activo suele ser conveniente.

Idealmente, el principio activo debería administrarse para alcanzar concentraciones máximas en plasma del compuesto activo de desde aproximadamente 0,2 a 70 μM , preferiblemente de aproximadamente 1,0 a 10 μM . Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la inyección intravenosa de una solución del 0,1 al 5 % del principio activo, opcionalmente en solución salina, o administrada en forma de un bolo del principio activo.

5 La concentración de compuesto activo en la composición del fármaco dependerá de las tasas de absorción, inactivación y excreción del fármaco, así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Cabe señalar que los valores de la dosis también variarán con la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Se ha de entender además que, para cualquier sujeto en particular, las pautas posológicas específicas deben ajustarse a lo largo del tiempo según cada necesidad y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la
10 administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos en la presente memoria son meramente ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance ni la práctica de la composición reivindicada. El principio activo se puede administrar de una vez, o puede dividirse en un número de dosis menores para ser administradas a intervalos variables de tiempo.

15 Un modo preferido de administración del compuesto activo es el oral. En general, las composiciones orales incluirán un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Se pueden incluir agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición.

20 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 disgregante tal como el ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante 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 una cápsula, puede
25 contener, además del material del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso. Además, las formas de dosificación unitarias pueden contener otros diversos materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca u otros agentes entéricos.

30 El compuesto se puede administrar como un componente de un elixir, una suspensión, un jarabe, una oblea, una goma de mascar o similares. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante y ciertos conservantes, tintes y colorantes y aromatizantes.

35 El compuesto, o un profármaco y/o una sal farmacéuticamente aceptables del mismo, también se puede mezclar con otros materiales activos que no perjudiquen la acción deseada, o con materiales que complementen la acción deseada tales como antibióticos, antifúngicos, antiinflamatorios u otros antiviricos, incluyendo otros compuestos nucleósidos. 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 no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como el alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como el ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes
40 quelantes tales como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como el cloruro sódico o dextrosa. La preparación parental puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Si se administra por vía intravenosa, los vehículos preferidos son solución salina fisiológica o solución salina tamponada de fosfato (PBS).

45 En una realización preferida, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation.

50 Las suspensiones liposomales (incluyendo los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) también se prefieren como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.522.811. Por ejemplo, pueden prepararse formulaciones de liposomas disolviendo uno o varios lípidos apropiados, tales como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, araquidoil fosfatidil colina y/o colesterol, en un disolvente inorgánico que luego se evapora, dejando una película delgada de lípido seco
55 sobre la superficie del recipiente. A continuación, se introduce una solución acuosa del compuesto activo o sus derivados monofosfato, difosfato, y/o trifosfato en el recipiente. Después, se agita el recipiente manualmente para liberar el material lipídico libre de las paredes del recipiente y para dispersar los agregados de lípido, formando de este modo la suspensión liposomal.

El/los compuesto/s activo/s se incluyen en el vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para suministrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto para inhibir la replicación vírica *in vivo*, en especial, la replicación de *Flaviviridae*, sin causar efectos tóxicos graves en el paciente tratado. Por "cantidad inhibidora" se entiende una cantidad de principio activo suficiente para ejercer un efecto inhibidor medido, por ejemplo, mediante un ensayo tal como los descritos en la presente memoria.

Formulaciones de liberación controlada

El campo de los polímeros biodegradables se ha desarrollado con rapidez desde que se informó de la síntesis y la biodegradabilidad del ácido poliláctico por Kulkarni *et al.*, en 1966 ("Polylactic acid for surgical implants", *Arch. Surg.*, 93:839). Los ejemplos de otros polímeros que se han presentado como útiles como material de matriz para dispositivos de suministro incluyen polianhídridos, poliésteres tales como poliglicólidos y polilactida-co-glicolidas, poliaminoácidos tales como polilisina, polímeros y copolímeros de óxido de polietileno, óxido de polietileno con extremo acrílico, poliamidas, poliuretanos, poliortoésteres, poliacrilonitrilos y polifosfacenos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.891.225 y 4.906.474, concedidas a Langer (polianhídridos), 4.767.628, concedida a Hutchinson (polilactida, ácido de polilactida-co-glicolida) y 4.530.840, concedida a Tice *et al.* (polilactida, poliglicolida y copolímeros). Véase también la patente de EE.UU. n.º 5.626.863, concedida a Hubbell *et al.*, que describe hidrogeles biodegradables fotopolimerizables como materiales de contacto con tejidos y vehículos de liberación controlada (hidrogeles de macrómeros polimerizados y reticulados que comprenden oligómeros hidrófilos que tienen extensiones monoméricas u oligoméricas biodegradables, que son monómeros u oligómeros protegidos terminalmente capaces de polimerización y reticulación); y el documento WO 97/05185, concedido a Focal, Inc. dirigido a hidrogeles biodegradables de múltiples bloques para su uso como agentes de liberación controlada para el suministro de fármacos y de agentes de tratamiento de tejidos.

Los materiales degradables de origen biológico, tales como la gelatina reticulada, son bien conocidos. El ácido hialurónico ha sido reticulado y usado como polímero degradable de hinchamiento para aplicaciones biomédicas (patente de EE.UU. n.º 4.957.744, concedida a Della Valle *et al.*; (1991) "Surface modification de polymeric biomaterials for reduced thrombogenicity", *Polym. Mater. Sci. Eng.*, 62:731-735).

Actualmente, hay muchos sistemas de dispersión en uso o que se están explorando para su uso, como vehículos de sustancias y, en particular, de compuestos biológicamente activos. Los sistemas de dispersión usados para formulaciones farmacéuticas y cosméticas pueden clasificarse como suspensiones o emulsiones. Las suspensiones se definen como partículas sólidas que varían en tamaño de unos cuantos nanómetros hasta cientos de micrómetros, dispersados en un medio líquido usando agentes de suspensión. Las partículas sólidas incluyen microesferas, microcápsulas y nanoesferas. Las emulsiones se definen como dispersiones de un líquido en otro, estabilizadas por una película interfacial de emulsionantes tales como tensioactivos y lípidos. Las formulaciones en emulsión incluyen emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, emulsiones múltiples, microemulsiones, microgotas y liposomas. Las microgotas son vesículas unilamelares de fosfolípidos que consisten en una capa lipídica esférica con una fase oleosa en su interior, como se define en las patentes de EE.UU. n.º 4.622.219 y 4.725.442, emitidas a Haynes. Los liposomas son vesículas de fosfolípidos preparadas mediante la mezcla de lípidos polares insolubles en agua con una solución acuosa. La entropía desfavorable causada por la mezcla del lípido insoluble en el agua produce un montaje altamente ordenado de membranas concéntricas cerradas de fosfolípido con solución acuosa atrapada.

La patente de EE.UU. n.º 4.938.763, concedida a Dunn, *et al.*, describe otro método de suministro de fármacos mediante la formación de un implante *in situ* mediante la disolución de un polímero termoplástico insoluble en agua, no reactivo, en un disolvente biocompatible soluble en agua para formar un líquido, colocar el líquido dentro del cuerpo y permitir que el disolvente se disipe produciendo un implante sólido. La solución de polímero se puede colocar en el cuerpo a través de una jeringa. El implante puede adoptar la forma de su cavidad circundante. En una realización alternativa, el implante se forma a partir de polímeros oligoméricos líquidos, reactivos, que no contienen disolvente y que curan en su lugar para formar sólidos, normalmente con la adición de un catalizador de curado.

Hay una serie de patentes que describen sistemas de suministro de fármacos que pueden usarse para administrar un nucleósido ramificado en 2', o un profármaco y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación y/o alternancia con un fármaco que induce una mutación en el genoma vírico en una ubicación distinta de una mutación de un nucleótido que genera un cambio de serina a un aminoácido diferente en la secuencia de consenso altamente conservada XRXSGXXT del dominio B de la región de la ARN polimerasa. La patente de EE.UU. n.º 5.749.847 describe un método de suministro de nucleótidos en organismos mediante electroforación. La patente de EE.UU. n.º 5.718.921 describe el uso de microesferas que comprenden un polímero y un fármaco dispersado en el mismo como un sistema de suministro. La patente de EE.UU. n.º 5.629.009 describe un sistema de suministro para la liberación controlada de factores bioactivos. La patente de EE.UU. n.º 5.578.325 describe el uso de nanopartículas y micropartículas de copolímeros de múltiples bloques hidrófilos e hidrófobos no lineales para el suministro de fármacos. La patente de EE.UU. n.º 5.545.409 describe un sistema de suministro para la liberación controlada de factores bioactivos. La patente de EE.UU. n.º 5.494.682 describe el uso de microcápsulas poliméricas reticuladas iónicamente como un sistema de suministro de fármacos.

La patente de EE.UU. n.º 5.728.402, concedida a Andrx Pharmaceuticals, Inc. describe una formulación de

liberación controlada que incluye una fase interna que comprende el fármaco activo, su sal o profármaco, mezclado con un agente formador de hidrogel y una fase externa que comprende un recubrimiento que resiste la disolución en el estómago. Las patentes de EE.UU. n.º 5.736.159 y 5.558.879, concedidas a Andrx Pharmaceuticals, Inc. describen formulaciones de liberación controlada para fármacos con poca solubilidad en agua en las que se forma un pasaje *in situ*. La patente de EE.UU. n.º 5.567.441, concedida a Andrx Pharmaceuticals, Inc. describe una formulación de liberación controlada de una vez al día. La patente de EE.UU. n.º 5.508.040 describe un sistema de liberación de fármaco pulsátil multiparticulado. La patente de EE.UU. n.º 5.472.708 describe un sistema de suministro de fármacos pulsátil basado en partículas. La patente de EE.UU. n.º 5.458.888 describe una formulación de comprimidos de liberación controlada que puede prepararse usando una mezcla que tiene una fase interna que contiene un fármaco y una fase externa que comprende un polímero de polietilenglicol que tiene un peso molecular medio en peso de 3.000 a 10.000. La patente de EE.UU. n.º 5.419.917 describe métodos de modificación de la velocidad de liberación de un fármaco de un hidrogel que se basa en el uso de una cantidad eficaz de un compuesto ionizable farmacéuticamente aceptable que es capaz de proporcionar una velocidad de liberación de orden esencialmente cero del hidrogel. La patente de EE.UU. n.º 5.458.888 describe una formulación en comprimidos de liberación controlada.

La patente de EE.UU. n.º 5.641.745, concedida a Elan Corporation, plc. describe una formulación farmacéutica de liberación controlada que comprende el fármaco activo en un polímero biodegradable para formar microesferas o nanoesferas. El polímero biodegradable es adecuadamente poli-D,L-lactida o una mezcla de poli-D,L-lactida y poli-D,L-lactida-co-glicolida. La patente de EE.UU. n.º 5.616.345, concedida a Elan Corporation plc. describe una formulación de absorción controlada para una administración una vez al día que incluye el compuesto activo en asociación con un ácido orgánico y una membrana de múltiples capas que rodea al núcleo y que contiene una proporción mayoritaria de un polímero sintético insoluble en agua, filmógeno, farmacéuticamente aceptable y una proporción menor de un polímero sintético soluble en agua filmógeno farmacéuticamente aceptable. La patente de EE.UU. n.º 5.641.515 describe una formulación de liberación controlada basada en nanopartículas biodegradables. La patente de EE.UU. n.º 5.637.320 describe una formulación de absorción controlada para la administración una vez al día. Las patentes de EE.UU. n.º 5.580.580 y 5.540.938 se dirigen a formulaciones y a su uso en el tratamiento de enfermedades neurológicas. La patente de EE.UU. n.º 5.533.995 se dirige a un dispositivo transdérmico pasivo con administración controlada de fármaco. La patente de EE.UU. n.º 5.505.962 describe una formulación farmacéutica de liberación controlada.

EJEMPLOS de referencia

Ejemplo 1:

Aislamiento de BVDV resistente a β -D-2'-CH₃-riboC

Se estableció una infección por BVDV persistente en la línea celular MDBK (ATCC, Manassas, VA, Catálogo n.º CCL-22) mediante la infección *in vitro* de células no tratadas previamente con un BVDV no citopático (ncp) (cepa I-N-dlns; Dr. R. Donis, U. de Nebraska, Lincoln, NE). La multiplicidad de infección (MOI) fue de 0,01. Las células se pasaron dos veces por semana (proporción de división de 1:15) hasta que se alcanzó el alto nivel estable de infección (10^6 - 10^7 unidades de formación de focos (UFF) por ml), como se determinó mediante un ensayo focal. A continuación, se cultivaron las células infectadas de forma persistente en placas de cultivo de 6 pocillos con 8 μ M o sin β -D-2'-CH₃-riboC (Idenix Pharmaceuticals). Se pasaron los cultivos celulares cada tres a cuatro días mediante separación con una proporción de 1:15 a 1:20. Tras ocho pasadas, se expandieron los cultivos celulares cultivados en presencia de β -D-2'-CH₃-riboC a un matraz de cultivo T-75, se congelaron/descongelaron dos veces, y se usaron como una reserva de virus BVDV resistentes a β -D-2'-CH₃-riboC para una posterior caracterización. Se monitorizan los títulos víricos en cultivos celulares al final de cada pasaje mediante el ensayo de los focos víricos.

Para realizar el ensayo de los focos víricos, se sembraron células MDBK en placas de 6 pocillos que contenían 2 x 10^5 células por pocillo y se cultivaron a 37 °C/CO₂ al 5 % durante al menos 5 horas antes de su uso. Se congelaron/descongelaron las muestras de ensayo (sobrenadantes de cultivo combinados con monocapas de células) dos veces, se diluyeron en serie 10 veces en medio y se usaron para inocular células de ensayo en placas de 6 pocillos a 0,2 ml por pocillo. Se retiró el inóculo tras 1 hora de adsorción, y se cubrieron las células con 3 ml de agarosa al 0,5 % en medio de crecimiento completo (1 x DMEM (Cellgro), suplementado con suero de caballo al 8 %, penicilina, estreptomina, L-glutamina, piruvato sódico y HEPES 25 mM). Después de 3 días de incubación a 37 °C/CO₂ al 5%, se fijaron las placas durante 1 hora con 3 ml de formaldehído al 7,4 % en PBS y se lavaron con PBS. Se permeabilizaron las monocapas de células con 1 ml de PBS-Triton X-100 al 0,25% por pocillo durante 10 minutos, y se incubaron con 0,5 ml de antisuero de cabra anti-BVDV (VMDR, Inc., diluido 1:1000 en PBS-Triton X-100 al 0,25 %) durante 1 hora. A continuación, se retiró el antisuero y se lavaron las monocapas de células con PBS (dos veces durante 15 min) y se incubaron con 0,5 ml de anticuerpo de burro anti-cabra conjugado con peroxidasa (diluido 1:1000 en PBS-Triton X-100 al 0,25 %) durante otra hora. Tras retirar el anticuerpo, se lavaron las monocapas de células con PBS (dos veces durante 15 min) y se incubaron con 0,5 ml de solución de sustrato de peroxidasa de diaminobencidina (Vector Laboratories) a temperatura ambiente hasta que los focos víricos se hicieron visibles (aproximadamente 15 minutos). Todas las incubaciones se realizaron con balanceo. La tinción se detuvo lavando con agua y las placas se dejaron secar al aire. Los títulos víricos se calcularon en UFF/ml, usando la siguiente ecuación: $T_{UFF/ml} = N \times 5 \times D$; donde T es un título vírico en UFF/ml; N es un número de focos por pocillo; y

D es un factor de dilución para la muestra de virus correspondiente. (Por ejemplo, si se encontraron 12 focos en un pocillo que corresponde a una dilución de 10^{-5} de la muestra del virus, $12 \times 5 \times 10^5 = 6 \times 10^6$ UFF/ml).

- 5 Por lo general, los títulos víricos alcanzaron 10^6 - 10^7 UFF/ml después de 2-3 pasajes, y no cambiaron significativamente después de pasar más de al menos 2 meses. Cuando se trató dicha línea celular infectada de forma persistente con β -D-2'-CH₃-riboC 8 μ M, el título vírico disminuyó rápidamente y el virus dejó de ser detectable tras dos pasadas (**Figura 1**). Sin embargo, después de la pasada adicional en presencia del inhibidor, el virus reapareció en cultivo (normalmente, en la pasada 3 a 5) y el título vírico alcanzó la meseta a 10^5 UFF/ml, aproximadamente diez veces inferior al del cultivo no tratado (**Figura 1**). Esta diferencia de 10 veces en los títulos víricos se observó incluso después de 28 días de tratamiento. Este experimento se repitió tres veces y se obtuvieron resultados similares. El fenotipo del virus reaparecido fue notablemente diferente al del virus inicial de tipo silvestre: produjo focos mucho menores, normalmente, de 3 a 10 veces inferiores en diámetro que los del virus de tipo silvestre (**Figura 2**). Este fenotipo no cambió después de una pasada prolongada en cultivo en presencia del inhibidor durante al menos 72 días, sino que rápidamente se volvió al fenotipo de tipo silvestre (focos grandes) tras la interrupción del tratamiento.
- 10
- 15 Tomados en conjunto, estos datos demuestran que el virus de tipo silvestre desapareció del cultivo celular después del tratamiento, y la variante del virus resistente a β -D-2'-CH₃-riboC demostró una menor capacidad de replicación en el cultivo de tejidos.

Ejemplo 2:

Cinética del crecimiento vírico

- 20 Se compararon las cinéticas de crecimiento tanto BVDV de tipo silvestre como del BVDV resistente a β -D-2'-CH₃-riboC. Se sembraron células MDBK en placas de 6 pocillos (2×10^5 células por pocillo) y se cultivaron a 37 °C/CO₂ al 5% durante la noche. Se infectaron las células con BVDV I-N-dlms o el mutante resistente a β -D-2'-CH₃-riboC, I-N-dlms β -D-2'-CH₃-riboC-R, a una multiplicidad de infección de 0,1. Tras una adsorción de 1 hora, se eliminó el inóculo y se lavaron las células con PBS y después se cubrieron con 2 ml de medio de crecimiento recién preparado. Para
- 25 BVDV I-N-dlms β -D-2'-CH₃-riboC-R, se prepararon pocillos por duplicado en presencia o ausencia de β -D-2'-CH₃-riboC 8 μ M. Los cultivos celulares se incubaron a 37 °C/CO₂ al 5%. A las 0 (fin del período de adsorción), 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 horas después de la infección, se congelaron/descongelaron los cultivos dos veces, y se cuantificaron los títulos víricos mediante el ensayo de enfoque como se ha descrito anteriormente.

- 30 A las 12 horas de la infección, la progenie del virus de tipo silvestre alcanzó un nivel significativo de más de 10^4 UFF/ml, coincidente con el ciclo de vida completo del BVDV de 8-14 horas. Por el contrario, la progenie de la variante resistente del virus seguía sin ser detectable en ese punto (**Figura 3**). La replicación del virus resistente se detectó primero a las 24 horas después de la infección. A las 36 horas después de la infección, la replicación del virus resistente era todavía aproximadamente 100 veces menos eficaz que la del virus de tipo silvestre. Estos datos demuestran claramente que el BVDV resistente a β -D-2'-CH₃-riboC se replica significativamente más despacio que el virus de tipo silvestre, especialmente en las primeras etapas de la infección. Estos datos también coinciden con los resultados presentados en las **Figuras 1 y 2**.
- 35

Ejemplo 3

Evaluación de la resistencia a β -D-2'-CH₃-riboC

- 40 La variante de BVDV seleccionada (I-N-dlms β -D-2'-CH₃-riboC-R) es más resistente a β -D-2'-CH₃-riboC que el BVDV de tipo silvestre, ya que puede replicarse de forma estable a niveles razonablemente altos en células MDBK en presencia del compuesto durante un período de tiempo prolongado (al menos 72 días) sin cambios en el fenotipo ni en los niveles de títulos víricos. Para cuantificar esta resistencia, se realizó un ensayo de reducción del rendimiento del virus, usando tanto el virus de tipo silvestre como la variante vírica.

- 45 Para realizar el ensayo de reducción del rendimiento del virus, se sembraron células MDBK en placas de 24 pocillos (1×10^5 células por pocillo) y se hicieron crecer a 37 °C/CO₂ al 5% durante la noche. Se infectaron las células con BVDV a una multiplicidad de infección de 0,1. Después de 1 hora de adsorción, se retiró el inóculo y se lavaron las células con PBS, y después se recubrieron con 1 ml de medio de cultivo recién preparado, que contenía diluciones en serie con factor de dilución de 2 del compuesto de ensayo (0 - 32 μ M para β -D-2'-CH₃-riboC y 0-800 UI/ml para Intron®A). Tras la incubación a 37 °C/CO₂ al 5% durante 48 horas, se congelaron/descongelaron las placas a -70 °C dos veces para lisar los cultivos celulares. Se cuantificó el título vírico en el cultivo celular mediante ensayo de enfoque como se ha descrito anteriormente. Las concentraciones eficaces del 50%, 90% y 4 log (Valores medios \pm desviación típica) para el compuesto de ensayo se basaron en pocillos por duplicado. Los valores de registro de CE₅₀, CE₉₀ y CE_{4-log} se obtuvieron mediante ajuste de curvas usando el software XLFit. Los valores de CE₅₀, CE₉₀ y CE_{4-log} son concentraciones del compuesto de ensayo que reducirán el título vírico en un 50%, 90% y 99,99%, respectivamente.
- 50
- 55

La generación de las partículas de BVDV de tipo silvestre infeccioso fue inhibida muy eficazmente por β -D-2'-CH₃-riboC, con valores CE₅₀ y CE₉₀ de $0,59 \pm 0,12$ μ M y $1,49 \pm 0,28$ μ M, respectivamente (**Figura 4 y Tabla 4**). A la

concentración DE β -D-2'-CH₃-riboC de $7,14 \pm 1,26 \mu\text{M}$, el rendimiento del virus de tipo silvestre se redujo en 4 log, y a los títulos víricos de $16 \mu\text{M}$ cayó por debajo del límite de detección (<10 UFF/ml). Por el contrario, no se observó ningún efecto sobre el rendimiento del virus resistente a la concentración más alta de β -D-2'-CH₃-riboC ensayada ($32 \mu\text{M}$). Por tanto, el virus I-N-dlNs β -D-2'-CH₃-riboC-R resultó ser al menos 54 veces más resistente al inhibidor que el virus de tipo silvestre, basado en los valores de CE₅₀ obtenidos mediante el ensayo de reducción del rendimiento del virus ($>32 \mu\text{M}$ frente a $0,59 \pm 0,12 \mu\text{M}$).

Tabla 4: Resultados del ensayo de reducción del rendimiento de BVDV

Compuesto	Cepa de BVDV	Biotipo ¹	CE ₅₀ (μM)	CE ₉₀ (μM)	CE _{4log} (μM)
β -D-2'-CH ₃ -riboC	I-N-dlNs	ncp	$0,59 \pm 0,12$	$1,49 \pm 0,28$	$7,14 \pm 1,26$
	I-N-dlNs β -D-2'-CH ₃ -riboC-R	ncp	>32	>32	>32
	I-NADL	cp	$0,68 \pm 0,08$	$1,73 \pm 0,11$	$8,22 \pm 0,05$
	I-NADL S3674T	cp	>32	>32	>32
IFN	I-N-dlNs	ncp	$2,64 \pm 1,40$	$119 \pm 34,1$	>800
	I-N-dlNs β -D-2'-CH ₃ -riboC-R	ncp	$0,19 \pm 0,04$	$3,15 \pm 0,72$	>800

cp = citopático; ncp = no citopático.

Ejemplo 4

10 **Análisis de secuencias de ácido nucleico: Identificación de una o varias mutaciones genéticas responsables del fenotipo resistente a β -D-2'-CH₃-riboC**

Basándose en la naturaleza del inhibidor, es decir, el análogo de nucleósido, se consideró la polimerasa vírica como una diana molecular plausible. Así pues, los presentes inventores comenzaron con la secuenciación de la región NS5B tanto para el BVDV de tipo silvestre como para el BVDV resistente a β -D-2'-CH₃-riboC. El ARN vírico se extrajo de los lisados del cultivo tisular después de 8 pasadas de tratamiento con o sin β -D-2'-CH₃-riboC (**Figura 1**), se sometió toda la región NS5B a RT-PCR y secuenciación. Se extrajo el ARN vírico de los cultivos celulares usando el Mini Kit de ARN vírico QIAamp® (QIAGEN) de acuerdo con el protocolo de fabricación. Se transcribió toda la región NS5B y se amplificó usando el kit de RT-PCR QIAGEN® OneStep. Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación de PCR QIAquick® (QIAGEN) y se secuenciaron usando el protocolo de secuenciación ABI PRISM® en un secuenciador de ADN ABI automatizado (Perkin-Elmer) en Tufts Core Facility, Boston, MA.

Cada región se secuenció en ambas direcciones usando al menos dos productos DE RT-PCR independientes. No se encontraron mutaciones en el virus de tipo silvestre en comparación con el Secuencia previamente publicada del genoma de longitud completa de BVDV (cepa I-N-dlNs) (Vassilev, V. B. y R. O. Donis. (2000) *Virus Res.* 69 (2): 95-107). La apoptosis inducida por el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) se correlaciona con el aumento de la acumulación intracelular de ARN vírico. Solo se encontró la sustitución de un nucleótido en el virus I-N-dlNs β -D-2'-CH₃-riboC-R : de G1214 a C, cambiando el resto de aminoácido Ser a Thr en la posición 405. Curiosamente, esta posición de aminoácidos se encuentra en el supuesto dominio B de NS5B funcional (**Figura 5**), identificado mediante análisis mutacional (Lai V. C., Kao C. C., Ferrari E., Park J., Uss A.S., Wright-Minogue J., Hong Z., y J. Y. Lau. "Mutational analysis of bovine viral diarrhea virus RNA-dependent RNA polymerase" *J Virol.* 1999, 73, 10129-36). Este dominio también se encuentra en la región NS5B del genoma del VHC, así como en los genomas de otros flavivirus. Además, la posición de aminoácido Ser₄₀₅ está altamente conservada entre todos los genomas de plaguicidas y flavivirus.

Ejemplo 5

Hipersensibilidad a Intron A

Se realizó una comparación del virus I-N-dlNs de tipo silvestre y la variante I-N-dlNs β -D-2'-CH₃-riboC-R por su sensibilidad al Intron A en células MDBK infectadas *de novo* usando el ensayo de reducción del rendimiento del virus, como se ha descrito anteriormente. Una vez más, los presentes inventores encontraron una notable diferencia entre los dos virus. El virus de tipo silvestre fue moderadamente inhibido por el Intron A con un valor de CE₉₀ de $119 \pm 34,1 \mu\text{M}$ y una reducción aproximada de 1,5 log en el rendimiento del virus a la concentración de fármaco más alta ensayada (**Figura 6**). Por el contrario, se encontró que la variante vírica I-N-dlNs β -D-2'-CH₃-riboC-R era mucho más sensible al Intron A, con un valor CE₉₀ de $3,15 \pm 0,72 \mu\text{M}$ y la reducción máxima del rendimiento vírico de casi 4 log (**Figura 6**). Basándose en la comparación de los valores de CE₉₀, el virus resistente a β -D-2'-CH₃-riboC resultó ser aproximadamente 40 veces más sensible al Intron A que al BVDV de tipo silvestre.

Ejemplo 6

Tratamiento de combinación con β -D-2'-CH₃-riboC e Intron A

Se estudió además el efecto del Intron A, solo o en combinación con β -D-2'-CH₃-riboC, en el BVDV de tipo silvestre en células MDBK infectadas de forma persistente. En un entorno experimental, los títulos víricos se determinaron después de 7 días (dos pasadas) de tratamiento simple o doble con varias concentraciones de inhibidor. Los resultados de este experimento, presentados en las **Tablas 5A y 5B**, y también en las **Figuras 7 y 8**, se pueden resumir de la siguiente manera. β -D-2'-CH₃-riboC solo inhibió fuertemente la propagación de BVDV (cepa I-N-dIns) de una manera dependiente de la dosis en las condiciones experimentales descritas. El tratamiento con β -D-2'-CH₃-riboC 8 μ M redujo el título vírico 6,2 registros (**Figura 7**). El interferón alfa-2b solo tuvo un efecto antivírico mínimo (reducción de 0,1 log en los títulos víricos). El tratamiento único con β -D-2'-CH₃-riboC 2 μ M o 2000 UI/ml de interferón alfa-2b redujo los títulos víricos 1,61 log y 0,1 log, respectivamente. El efecto de un tratamiento de combinación con las mismas concentraciones fue de 2,22 log, que fue 0,51 log superior al efecto aditivo calculado (1,71 log). El tratamiento único con β -D-2'-CH₃-riboC 4 μ M o 2.000 UI/ml de interferón alfa-2b redujo los títulos víricos 2,06 log y 0,1 log, respectivamente (**Tabla 5B, Figura 8**). El efecto de un tratamiento de combinación con las mismas concentraciones fue de 4,56 log, que fue 2,4 log superior al efecto aditivo calculado (2,16 log). Así pues, β -D-2'-CH₃-riboC e interferón alfa-2b actuaron sinérgicamente para inhibir el BVDV, especialmente cuando se usó β -D-2'-CH₃-riboC a una concentración de 4 μ M.

Tabla 5A. Efecto de β -D-2'-CH₃-riboC e interferón alfa-2b en títulos de BVDV (cepa I-N-dIns) en células MDBK infectadas de forma persistente. Los números representan los valores del título de BVDV en UFF/ml.

	β -D-2'-CH ₃ -riboC 0 μ M	β -D-2'-CH ₃ -riboC 2 μ M	β -D-2'-CH ₃ -riboC 4 μ M	β -D-2'-CH ₃ -riboC 8 μ M
0 UI/ml de Interferón alfa-2b	4,03 x 10 ⁶ ± 2,34 x 10 ⁶	1,25 x 10 ⁵ ± 3,54 x 10 ⁴	3,58 x 10 ⁴ ± 1,06 x 10 ³	2,50 x 10 ⁰ ± 2,89 x 10 ⁰
5 UI/ml de Interferón alfa-2b	6,44 x 10 ⁶ ± 3,15 x 10 ⁶	2,63 x 10 ⁵ ± 7,42 x 10 ⁴	1,00 x 10 ⁴ ± 3,54 x 10 ³	1,25 x 10 ⁰ ± 2,50 x 10 ⁰
50 UI/ml de Interferón alfa-2b	8,85 x 10 ⁶ ± 4,53 x 10 ⁶	2,13 x 10 ⁵ ± 6,72 x 10 ⁴	5,75 x 10 ² ± 4,84 x 10 ²	0,00 x 10 ⁰ ± 0,00 x 10 ⁰
200 UI/ml de Interferón alfa-2b	5,38 x 10 ⁶ ± 3,03 x 10 ⁶	5,75 x 10 ⁴ ± 1,32 x 10 ⁴	2,38 x 10 ² ± 2,06 x 10 ²	0,00 x 10 ⁰ ± 0,00 x 10 ⁰
1.000 UI/ml de Interferón alfa-2b	2,60 x 10 ⁶ ± 1,14 x 10 ⁶	3,93 x 10 ⁴ ± 1,80 x 10 ⁴	1,34 x 10 ² ± 2,35 x 10 ²	0,00 x 10 ⁰ ± 0,00 x 10 ⁰
2.000 UI/ml de Interferón alfa-2b	3,23 x 10 ⁶ ± 1,77 x 10 ⁶	2,44 x 10 ⁴ ± 2,07 x 10 ⁴	1,12 x 10 ² ± 1,93 x 10 ²	0,00 x 10 ⁰ ± 0,00 x 10 ⁰

Tabla 5B. Efecto de β -D-2'-CH₃-riboC e interferón alfa-2b en los títulos de BVDV (cepa I-N-dIns) en células MDBK infectadas de forma persistente. Los números representan los valores logarítmicos de los títulos de BVDV.

	β -D-2'-CH ₃ -riboC 0 μ M	β -D-2'-CH ₃ -riboC 2 μ M	β -D-2'-CH ₃ -riboC 4 μ M	β -D-2'-CH ₃ -riboC 8 μ M
0 UI/ml de Interferón alfa-2b	6,61	5,10	4,55	0,40
5 UI/ml de Interferón alfa-2b	6,81	5,42	4,00	0,10
50 UI/ml de Interferón alfa-2b	6,95	5,33	2,76	0,00
200 UI/ml de Interferón alfa-2b	6,73	4,76	2,38	0,00
1.000 UI/ml de Interferón alfa-2b	6,41	4,59	2,13	0,00

	β -D-2'-CH ₃ -riboC 0 μ M	β -D-2'-CH ₃ -riboC 2 μ M	β -D-2'-CH ₃ -riboC 4 μ M	β -D-2'-CH ₃ -riboC 8 μ M
2.000 UI/ml de Interferón alfa-2b	6,51	4,39	2,05	0,00

En otro entorno experimental, el tiempo de tratamiento se extendió a 10 días y los títulos víricos (cepa NY-1) se monitorizaron después de cada pasada (cada tres a cuatro días). De nuevo, se observó un efecto inhibitorio sinérgico similar de β -D-2'-CH₃-riboC e interferón alfa-2b (**Figura 9**). En particular, cuando se trataron los cultivos de células con 8 μ M de β -D-2'-CH₃-riboC en combinación con 200 UI/ml de Intron A, el virus se volvió indetectable tras 7 días de tratamiento y no reapareció tras pasar más de 27 días. Estos datos coinciden con el hallazgo de los presentes inventores previamente descrito, que es que la variante de BVDV resistente a β -D-2'-CH₃-riboC, que surge después del tratamiento de las células infectadas de forma persistente, es sensible al Intron A. Tomados conjuntamente, estos datos sugieren además que las poblaciones de virus resistentes, que surgen después del tratamiento de la infección del virus persistente con β -D-2'-CH₃-riboC, pueden eliminarse mediante un tratamiento posterior con el Intron A.

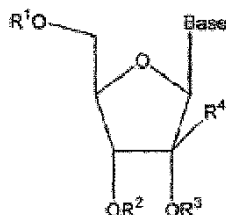
5

10

REIVINDICACIONES

1. Un nucleósido con metilo en 2', o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento del virus de la hepatitis C en un hospedador, en donde el método comprende administrar dicho nucleósido con metilo en 2' o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y administrar interferón, en donde dicho nucleósido con metilo en 2' ha causado una mutación en el nucleótido 8.443 (de G a C) del genoma del virus de la hepatitis C o del aminoácido 282 Serina a Treonina de la región de la ARN polimerasa del virus de la hepatitis C.

2. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según la reivindicación 1, en donde el nucleósido con metilo en 2' es de fórmula:



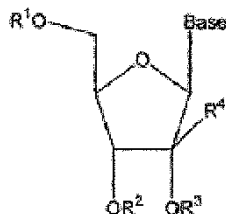
o su sal farmacéuticamente aceptable, en donde

R^1 , R^2 y R^3 son independientemente H, fosfato (incluyendo mono-, di- o trifosfato y un fosfato estabilizado); acilo; alquilo; éster de sulfonato (incluyendo alquil- o arilalquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; lípido (incluyendo un fosfolípido); aminoácido; hidrato de carbono; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R^1 , R^2 o R^3 es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*; y

R^4 es metilo;

y Base es una purina o pirimidina.

3. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según la reivindicación 2, en donde el nucleósido con metilo en 2' es de fórmula:



o su sal farmacéuticamente aceptable, en donde

R^1 y R^2 son independientemente H; mono-, di- o trifosfato; acilo; éster de sulfonato; bencilo; un éster de aminoácido; un hidrato de carbono; un péptido; un colesterol o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que proporciona un compuesto en donde R^1 o R^2 es independientemente H o fosfato cuando se administra *in vivo*;

R^3 es hidrógeno;

R^4 es metilo; y

Base es pirimidina.

4. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde R^1 , R^2 o R^3 es un éster de D- o L-aminoácido natural o sintético.

5. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde R^1 , R^2 o R^3 es un éster de D- o L-aminoácido natural o sintético o un alquiléster.

6. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el nucleósido con metilo en 2' es β -D-2'-CH₃-riboC.

7. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según la reivindicación 6, en donde R^2 es un éster de aminoácido.

8. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según la reivindicación 7, en donde R² es un L-valiniléster.
9. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde R¹ es un mono-, di- o tri-fosfato.
- 5 10. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el nucleósido con metilo en 2' es β -D-2'-CH₃-riboC y en donde el método comprende además la etapa de identificar la resistencia vírica en el hospedador.
11. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el método comprende además la etapa de ensayar la sangre del hospedador para analizar la seroconversión del virus de tipo silvestre a mutante tras la administración del nucleósido con metilo en 2' al hospedador.
- 10 12. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el método comprende además las etapas de:
- (a) obtener una muestra vírica del hospedador;
 - (b) determinar la capacidad de replicación del virus;
 - 15 (c) determinar si la capacidad de replicación del virus de la muestra es inferior a la capacidad de replicación del virus de tipo silvestre, lo que indica resistencia hacia el nucleósido con metilo en 2';
- tras la administración del nucleósido con metilo en 2' al hospedador.
13. El nucleósido con metilo en 2' para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el método comprende además las etapas de:
- (a) obtener una muestra vírica del hospedador;
 - 20 (b) cultivar la muestra y comparar el crecimiento de placa entre la muestra y el virus de tipo silvestre;
 - (c) determinar si el crecimiento de la placa de la muestra es inferior al crecimiento de la placa del tipo silvestre, lo que indica resistencia hacia el nucleósido con metilo en 2';
- tras la administración del nucleósido con metilo en 2' al hospedador.
- 25 14. Interferón para su uso en un método de tratamiento del virus de la hepatitis C en un hospedador, en donde el hospedador ha recibido un nucleósido con metilo en 2', o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, que ha causado una mutación en el nucleótido 8.443 (de G a C) del genoma del virus de la hepatitis C o del aminoácido 282 Serina a Treonina de la región de la ARN polimerasa del virus de la hepatitis C.
- 30 15. Interferón para el uso en un método según la reivindicación 14 que comprende además cualquiera de las características de las reivindicaciones 2 a 13.

Figura 1

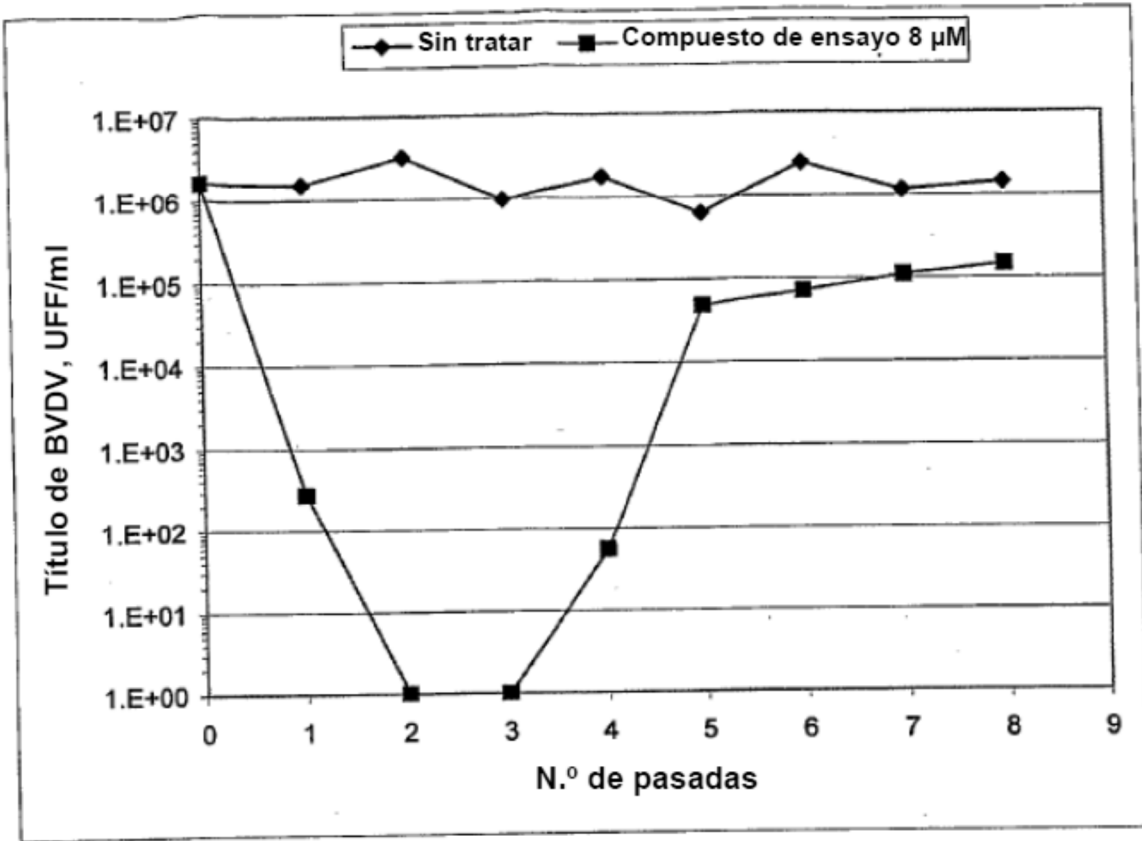


Figura 2

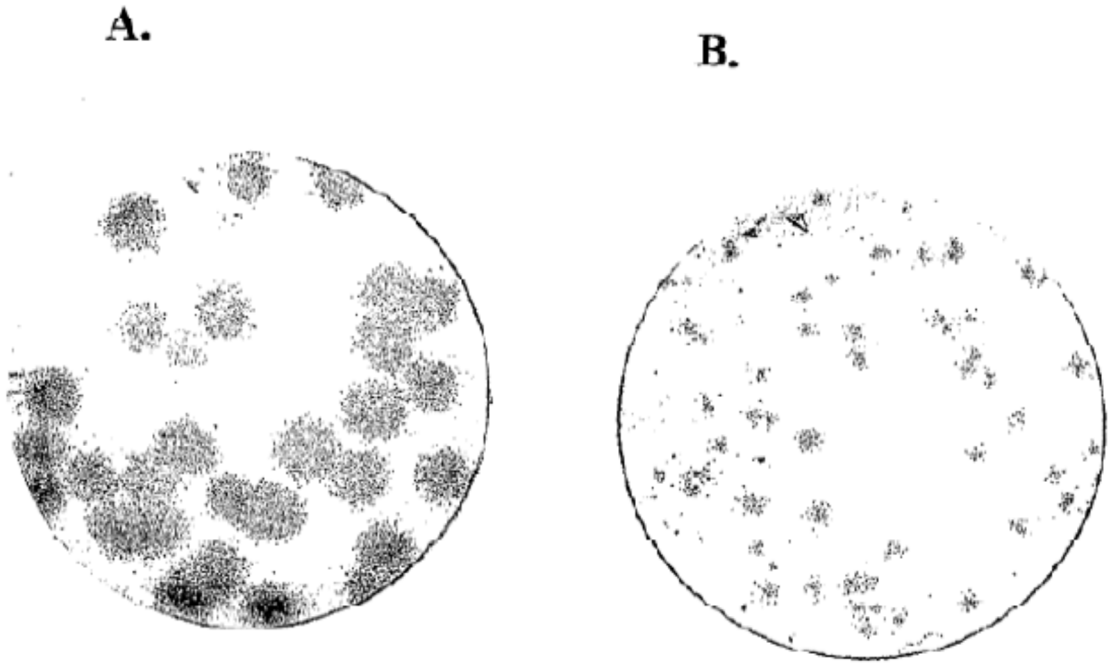


Figura 3

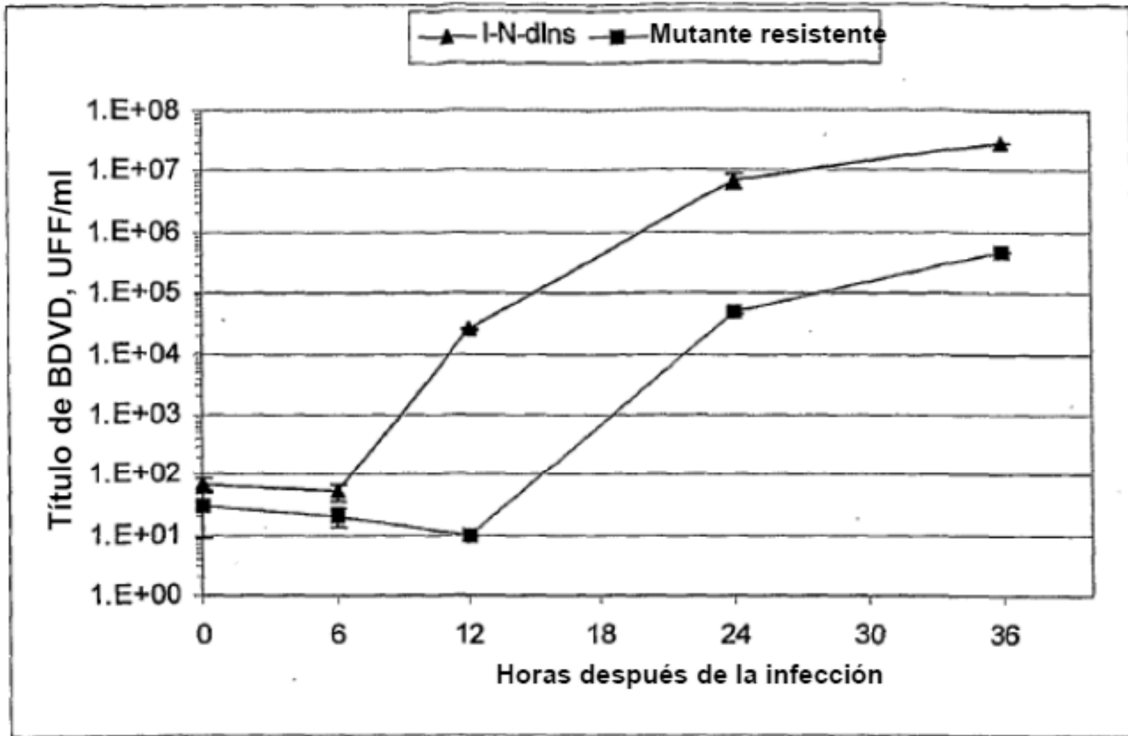


Figura 4

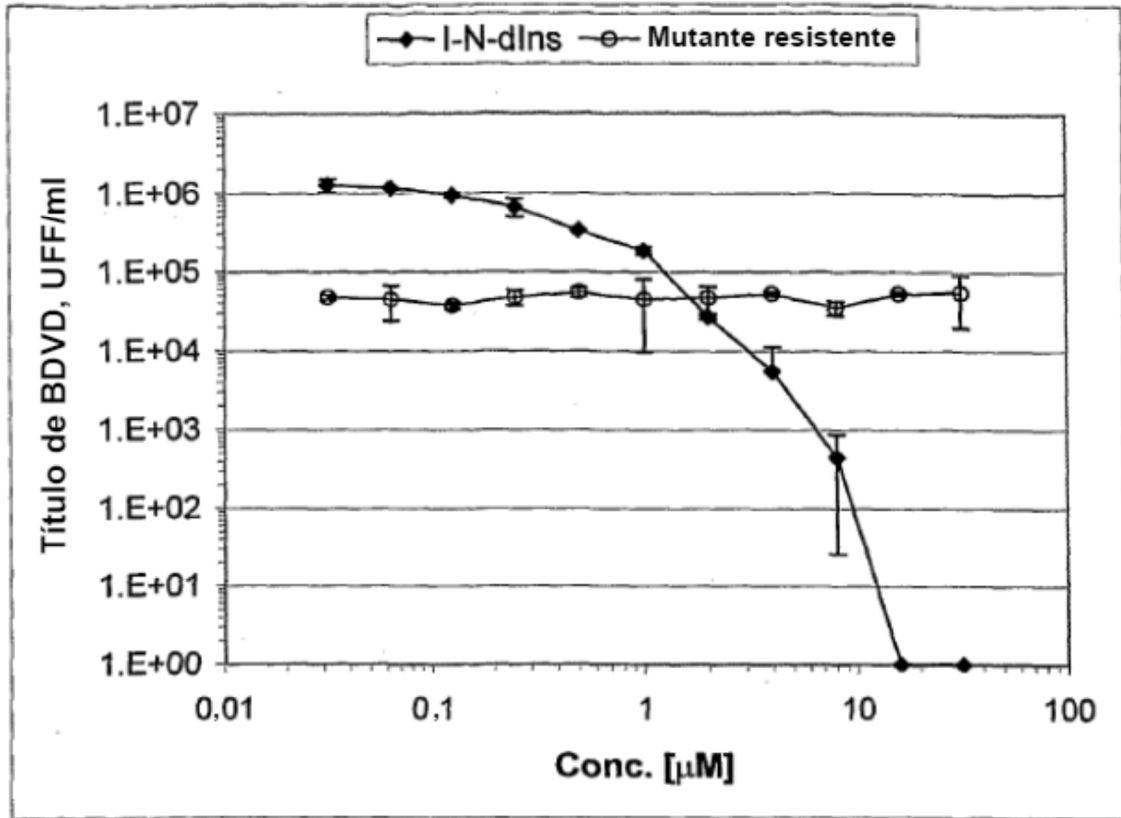


Figura 5

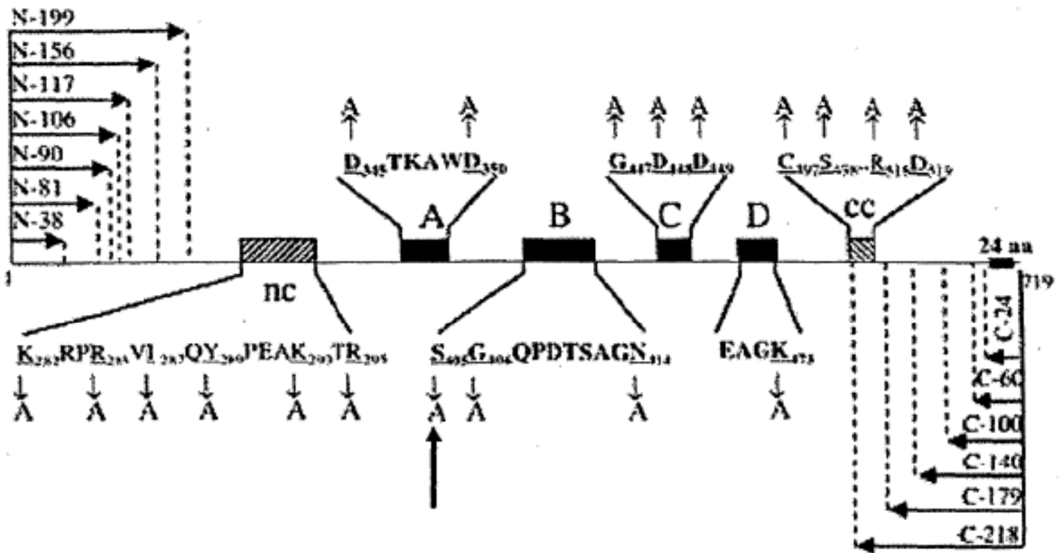


Figura 6

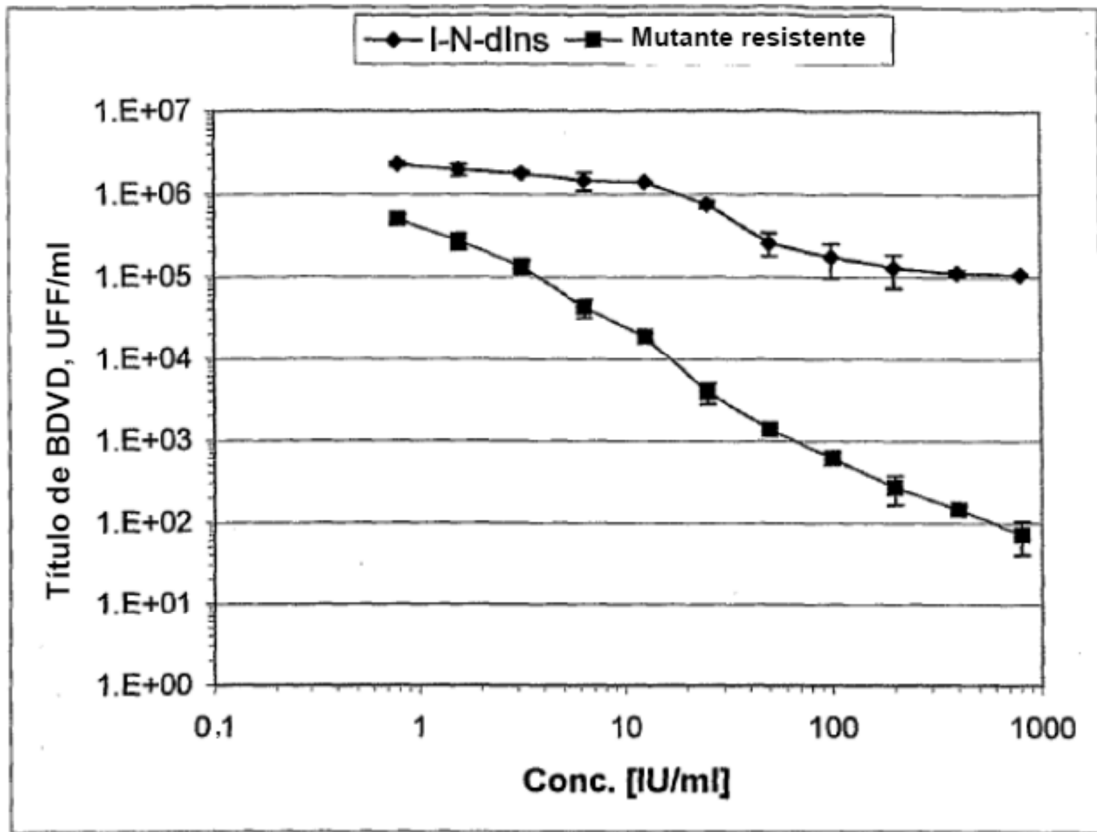


Figura 7

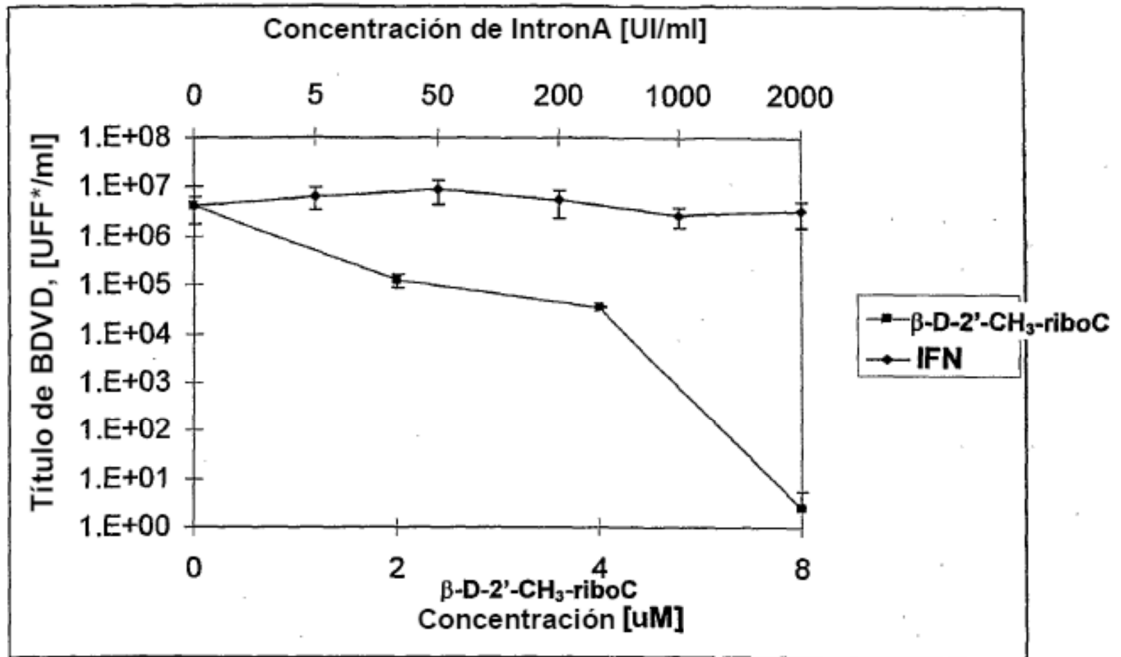


Figura 8

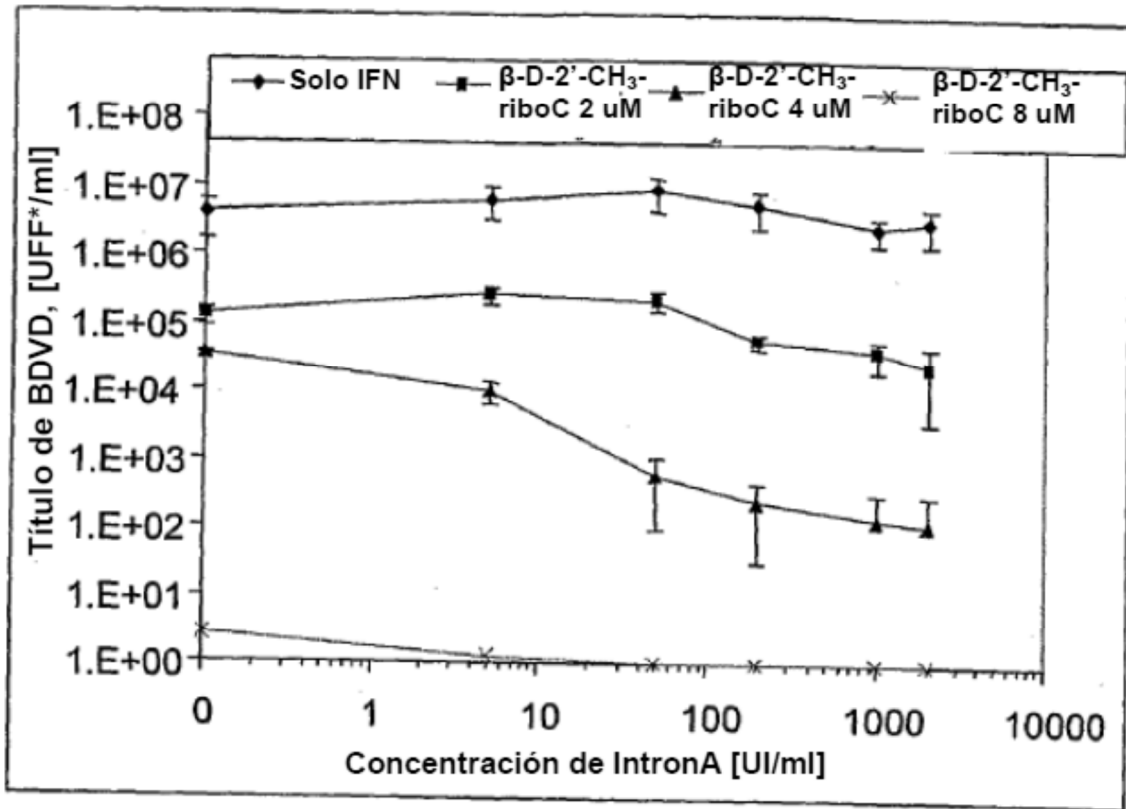


Figura 9

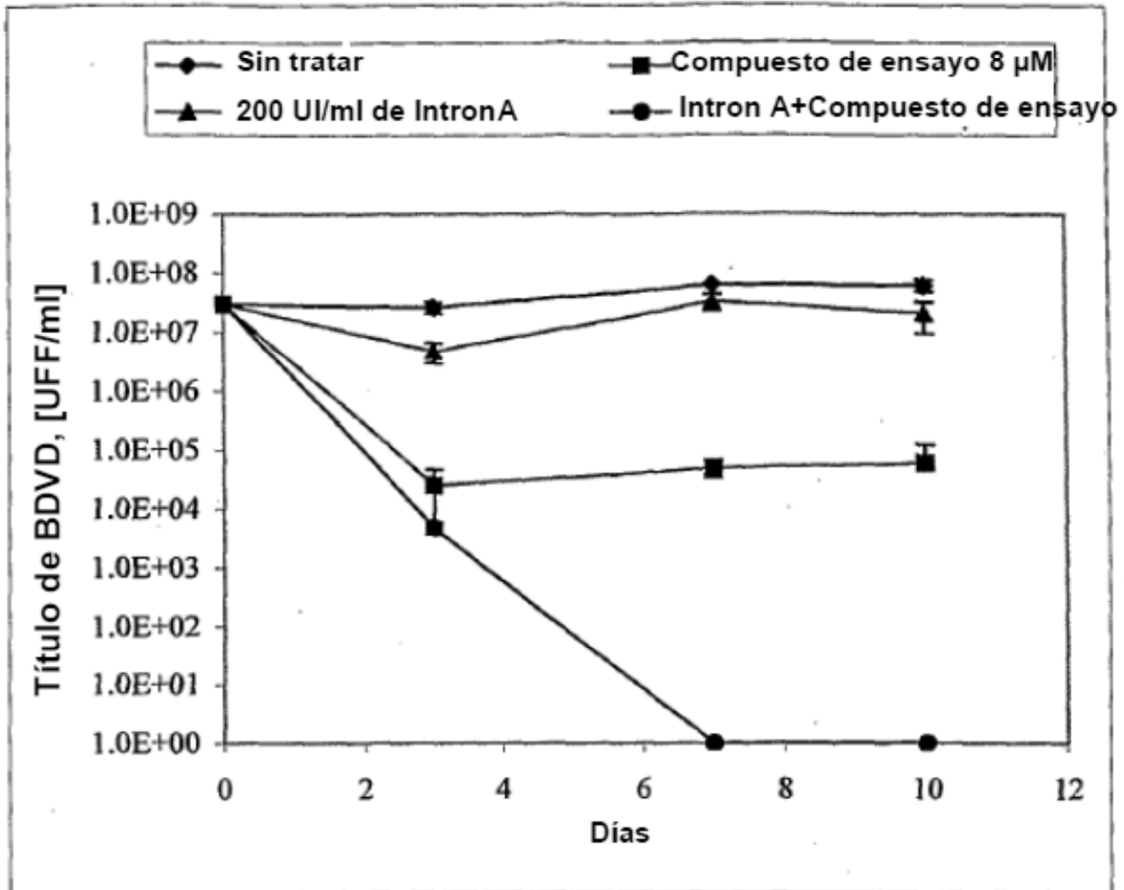


Figura 10

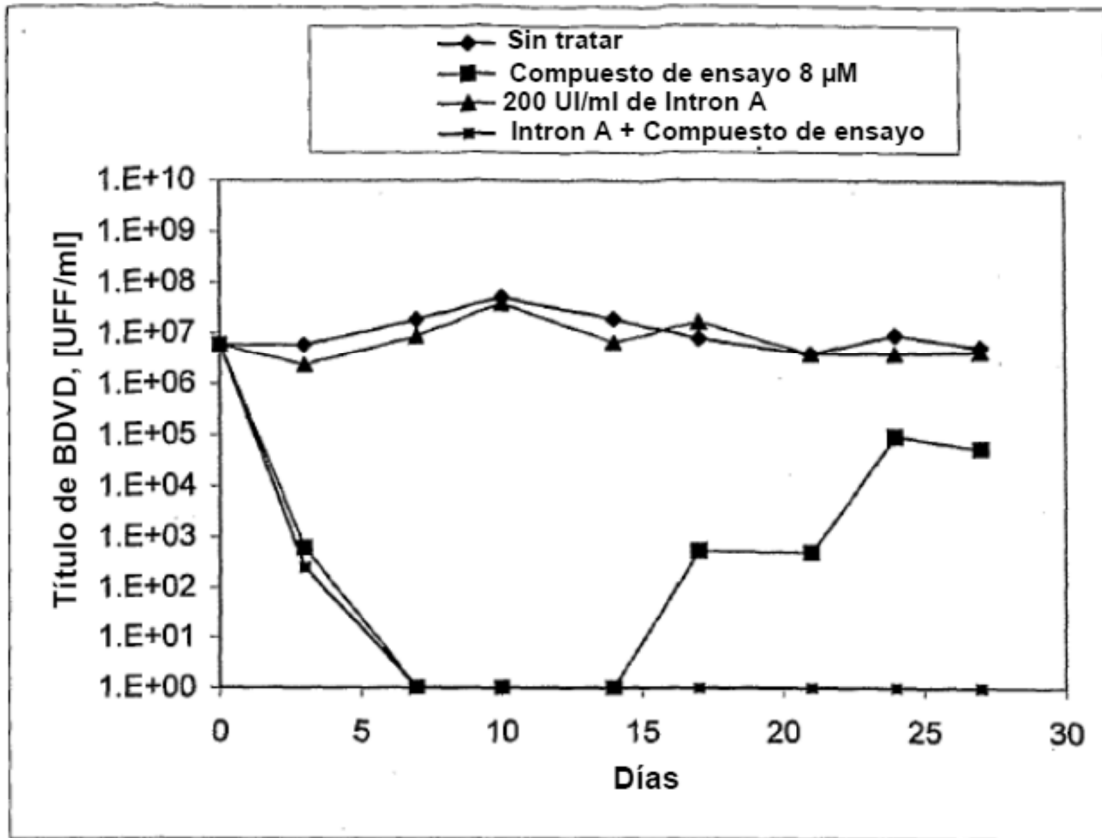


Figura 11

Virus	Secuencia de aminoácidos del dominio B (NS5B) de la ARN polimerasa
HCV-1b	C <u>R</u> A <u>S</u> G <u>V</u> LT <u>T</u> SCGN
HCV-2A	C <u>R</u> A <u>S</u> G <u>V</u> LT <u>T</u> SCGN
BVDV *	Q <u>R</u> G <u>S</u> G <u>Q</u> PD <u>T</u> SAGN
CSFV *	Q <u>R</u> G <u>S</u> G <u>Q</u> PD <u>T</u> SAGN
HGV *	C <u>R</u> s <u>S</u> G <u>V</u> LT <u>T</u> SASN
GBV-B *	C <u>R</u> s <u>S</u> G <u>V</u> YT <u>T</u> SSSN
Kunjin *	Q <u>R</u> G <u>S</u> G <u>Q</u> VV <u>T</u> YALN
Dengue *	Q <u>R</u> G <u>S</u> G <u>Q</u> VG <u>T</u> YGLN

* = como referencia