(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 651 308**

(51) Int. CI.:

A61K 31/7115 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2010 PCT/US2010/052911**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011 WO11047312**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010 E 10824199 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2512491**

(54) Título: **Inhibidores antisentido de HBV**

(30) Prioridad:

16.10.2009 US 252380 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.01.2018

(73) Titular/es:

GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB

(72) Inventor/es:

HAMATAKE, ROBERT

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Inhibidores antisentido de HBV

campo de la invención

La presente invención se refiere a oligonucleótidos antisentido útiles para la modulación de la expresión génica y con ello para tratar enfermedades, especialmente oligómeros antisentido para el tratamiento de las condiciones del virus de la hepatitis B (HBV) y de las condiciones relacionadas con el virus de la hepatitis B en animales, incluidos los seres humanos. Las formas de realización más particulares de la presente invención se refieren a oligómeros antisentido con nucleósidos modificados para el tratamiento del HBV en animales, más concretamente a oligómeros antisentido que incluyen nucleósidos con azúcares puenteados con 2'O–4'C–metileno, y nucleósidos con otros azúcares ligados descritos más adelante en la presente, también conocidos como ácidos nucleicos bloqueados (LNA, locked nucleic acids), para el tratamiento del HBV en animales y más particularmente para el tratamiento del HBV en humanos.

antecedentes de la técnica

La hepatitis B es una enfermedad viral que se transmite parenteralmente mediante material contaminado, como la sangre y hemoderivados, agujas contaminadas, por vía sexual y verticalmente, desde madres infectados a sus descendientes. En aquellas áreas del mundo en las que la enfermedad es común, la transmisión vertical en una edad temprana resulta en que una elevada proporción de los individuos se transforman en portadores crónicos de hepatitis B. La Organización Mundial de la Salud estima que masa de dos mil millones de personas han sido infectadas a nivel mundial, con aproximadamente 4 millones de casos agudos por año, 1 millón de muertos por año y 350–400 millones portadores crónicos. Aproximadamente el 25% de los portadores mueren de hepatitis crónica, cirrosis o cáncer de hígado y cerca del 75% de los portadores crónicos son asiáticos. El virus de la hepatitis B es el segundo carcinógeno más importante después del tabaco, y causa del 60% al 80% de todos los cánceres de hígado primarios. El HBV es 100 veces más contagioso que el VIH.

Las infecciones virales por la hepatitis B son un problema médico continuo porque, como cualquier agente infeccioso rápidamente replicante, hay continuas mutaciones que ayudan a que algunas subpoblaciones del HBV se vuelven resistentes a los regímenes de tratamiento actuales, En la actualidad no hay agentes terapéuticos efectivos para tratar seres humanos infectados con HBV que resulten en la seroconversión al virus en el cuerpo o que implementen una reducción del 90% del antígeno, en comparación con los números de línea de base de referencia antes del tratamiento en personas que sufren de una infección viral de hepatitis B. En la actualidad las terapias recomendadas para la infección crónica por HBV por la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD, American Association for the Study of Liver Diseases) y por la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL, European Association for the Study of Liver) incluyen el interferón alfa (INFa), el interferón alfa–2a pegilado (Peg–1 FN2a), el entecavir y el tenofovir. Sin embargo, la terapia típica con el interferón es de 48 semanas y resulta en efectos secundarios graves y desagradables y la seroconversión de HBeAg, 24 semanas después de haber cesado la terapia, varía en un 27–36% solamente. La seroconversión del HBsAg es incluso más baja: solamente se observa un 3% inmediatamente después de que cesa el tratamiento, con un aumento de más del 12% después de 5 años.

Las terapias con nucleósidos y nucleótidos entecavir y tenofovir son exitosas en la reducción de la carga viral, pero los coeficientes de la seroconversión e HBeAg y la pérdida de HBsAg son aún más bajos que los obtenidos mediante la terapia con IFNa. Otras terapias similares, que incluyen la lamivudina (3TC), la telbivudina (LdT) y el adefovir también se usan, pero para las terapias con nucleósidos/nucleótidos en general, la aparición de la resistencia limita la eficacia terapéutica.

Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica de descubrir y desarrollar nuevas terapias antivirales. Más particularmente, hay una necesidad de nuevas terapias anti–HBV capaces de aumentar las tasas de seroconversión de HBeAg y de HBsAg. Estos marcadores séricos son indicativos del control inmunológico de la infección por HBV y conducen a un mejor pronóstico, es decir, a una prevención de la enfermedad hepática y de su progresión a cirrosis, a una prevención de la insuficiencia hepática, prevención del cáncer hepatocelular (HCC, hepatocellular cancer), prevención del trasplante relacionado con enfermedad hepática, y prevención de la muerte.

Recientes investigaciones clínicas han encontrado una correlación entre la seroconversión y reducciones en HBeAg (Fried et al (2008) Hepatology 47: 428) y las reducciones en HBsAg (Moucari et al. (2009) Hepathology 49: 1151). Las reducciones en los niveles de antígeno pueden haber permitido el control inmunológico de la infección por HBV porque se cree que los elevados niveles de antígenos inducen una tolerancia inmunológica. Las terapias de nucleósidos actuales para el HBV son capaces de reducir drásticamente los niveles séricos de HBV, pero tienen poco impacto en los niveles de HBeAg y HBsAg. La terapia antisentido difiere de la terapia con nucleósido en que puede dirigir los transcriptos para los antígenos y con ello reducir los niveles séricos de HBeAg y HBsAg. Debido a los múltiples transcriptos solapantes producidos en la infección por HBV, hay también una oportunidad de que un único oligómero antisentido reduzca el ADN de HBV además de tanto el HBeAg como el HBsAg.

La terapia antisentido es una forma de tratamiento para los trastornos o infecciones genéticos. Cuando se sabe que

la secuencia genética de un gen particular es causante de una enfermedad particular, si el gen es un gen original de mamífero, un oncogén o gen de un organismo infeccioso, o un gen de una especie bacteriana, un gen de un hongo, un gen de un parásito o un gen de un virus, es posible sintetizar una cadena de ácido nucleico (ADN, ARN o un análogo químico), que se unirá al ARN mensajero (ARNm), producido por dicho gen y lo desactivará, “apagándose” efectivamente dicho gen. Esto se debe a que el ARNm debe ser monocatenario para su traducción. Como alternativa, la cadena podría ser apuntada para unirse a un sitio de empalme en pre–ARNm y modificar el contenido de exón de un ARNm [1].

Una secuencia monocatenaria de ADN a menudo se denomina cadena con sentido (o cadena con sentido positivo) si se traduce una versión de ARN que tiene la misma secuencia (excepto U en ARN para T en ADN), o es traducible, en proteína y la cadena complementaria recibe la denominación de cadena antisentido (o cadena con sentido negativo (–)).

Algunas regiones tienen una doble cadena de código de ADN para los genes, que usualmente son instrucciones que especifican el orden de los aminoácidos en una proteína expresada o traducida, junto con secuencias reguladoras, sitios de empalme, intrones no codificantes y otras regiones. Para que una célula exprese la proteína codificada por el ADN, una cadena del ADN sirve como plantilla para la síntesis de una cadena de ARN complementaria. La cadena de ADN de plantilla se denomina cadena transcrita y su secuencia es antisentido o complementaria, para el trascrito de ARNm, que tiene la misma secuencia que la secuencia del ADN bicatenaria original. Debido a que el ADN es bicatenario, la cadena complementaria a la secuencia antisentido se denomina cadena no transcrita o cadena con sentido y tiene la misma secuencia que el transcrito de ARNm (con la salvedad de que las nucleobases en la secuencia de ADN se sustituyen con nucleobases en secuencia de ARN).

Un ácido nucleico que es complementario al ARN transcrito a partir del ADN lleva la denominación de oligonucleótido "antisentido" porque su secuencia de bases es complementaria al ARN mensajero (ARNm) del gen – la secuencia de "sentido". Por lo tanto, una región de ADN codificante que tiene una secuencia sentido de 5'–AAGGTC–3 se transcribirá para producir un ARNm que tiene una secuencia sentido de 5'–AAGGUC–3 'y un oligómero antisentido para una secuencia sentido tendrá una secuencia de 3'–UUCCAG–5 si comprende nucleobases de ARN o 3'–TTCCAG–5' si el oligómero sentido comprende nucleobases de ADN.

Habitualmente, un enfoque principal de terapia antisentido implica el uso de un oligómero u oligonucleótido, de aproximadamente 20 nucleótidos/nucleósidos de longitud, sintetizado para ser complementario al “sentido” específico (orientación de 5 'a 3') de ADN o de ARNm responsable de la expresión o traducción de una proteína diana.

Una vez introducido en una célula, el oligonucleótido antisentido se hibrida su correspondiente secuencia de ARNm por medio de unión de Watson–Crick, formándose un heterodúplex. Una vez que se ha formado un dúplex, se inhibe la traducción de la proteína codificada por la secuencia del ARNm unido. Existen varios mecanismos mediante los que el dúplex oligonucleótido/ARNm puede inhibir la subsiguiente traducción. La explicación más ampliamente aceptada para diversos agentes antisentido implican la degradación del ARNm en el heterodúplex por la ARNasa H ubicua. La ARNasa H es atraída por el heterodúplex y escinde el ARNm unido, mientras deja intacta la secuencia de oligonucleótidos, permitiendo que el oligonucleótido continúe buscando y se una a las secuencias de ARNm correspondientes. Algunas otras explicaciones aceptadas de la inhibición de la traducción a través de terapias antisentido que pueden ocurrir por separado o en conjunto con la actividad de Nasa H incluyen, pero no están limitadas a, el bloqueo de un conjunto ribosómico apropiado que deshabilita la capacidad del complejo ribosomal para traducir, bloquear el empalme de ARN, y/o impedir la exportación apropiada de ARNm.

Un medio aparentemente separado utilizado para los organismos para controlar la expresión génica mediante la limitación de la traducción, se conoce como interferencia de genes, que implica el despliegue de secuencias cortas de ARN que "silencian" el gen diana. Estas cortas secuencias de ARN se conocen como pequeños ARN o ARNsi. La interferencia de ARN es un proceso genético antiguo en el cual los genes dirigidos, los planos para la producción de determinadas a proteínas, pueden ser desactivados.

Es sabido que una enzima conocida como Dicer juega un papel clave en la interferencia de ARN. Dicer es una ribonucleasa que reconoce las moléculas de ARN bicatenarias y las corta en ARNds cortos de aproximadamente 20–25 nucleótidos de longitud, generalmente con un saliente de dos bases en el extremo 3’ final. Los pequeños fragmentos de ARNds creados por Dicer se asimilan seguidamente en un gran complejo de múltiples proteínas que guían las moléculas de ARNds a destinos en los que se une a su secuencia de ARNm diana y desactiva los genes. Este complejo se conoce como complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, RNA–induced silencing complex). RISC tiene un componente catalítico, argonauta, que es una endonucleasa capaz de degradar el ARN mensajero (ARNm) si el ARNm tiene una secuencia complementaria a la cadena guía ARNsi ARNt. El dicer, RISC es un sistema de silenciamiento génico ARNsi es por lo tanto una etapa necesaria en muchos eventos biológicos fundamentales, incluida la reorganización del genoma, la diferenciación de células madre, el desarrollo del cerebro y la defensa viral.

Es interesante observar que el tamaño de los pequeños ARNds – los ARNsi – es un determinante de su función. Los ARNds son demasiado grandes o demasiado pequeños, y por lo tanto, no se convierten el complejo RISC y no se

produce ningún silenciamiento génico.

Los oligómeros antisentido difieren de los ARNsi en varias maneras; lo más importante es que los oligómeros antisentido son monocatenarios. También son sintéticos y están típicamente modificados a lo largo de la columna vertebral a menudo en posiciones seleccionadas de las nucleobases.

En el campo de la terapia antisentido, la introducción de nucleósidos químicamente modificados en moléculas de ácido nucleico, particularmente en moléculas de ácido ribonucleico (RNA) proporciona una herramienta poderosa para superar las limitaciones potenciales de la estabilidad y biodisponibilidad *in vivo* a moléculas de ARN o ADN nativas que son suministradas por vía exógena. Por ejemplo, el uso de moléculas de ácido nucleico químicamente modificadas puede usarse para disminuir la dosis de una molécula particular de ácido nucleico para un dado efecto terapéutico ya que las moléculas químicamente modificadas tienden a tener una mayor semivida en el suero. Además, determinadas modificaciones químicas pueden mejorar la biodisponibilidad de moléculas de ácido nucleico mediante el apuntamiento a células o tejidos en particular y/o mejorar la incorporación de la molécula de ácido nucleico. En consecuencia, aun si la actividad de una molécula de ácido nucleico químicamente modificada se reduce en comparación con una molécula de ácido nucleico nativa, por ejemplo, en comparación con una molécula de ácido nucleico completamente ARN, la actividad global de la molécula de ácido nucleico modificada puede ser mayor que la de la molécula nativa debido a la estabilidad y/o suministro mejoradas de la molécula.

Una modificación química útil, denominada LNA (locked nucleic acid, ácido nucleico bloqueado) introduce un puente alquileno 2'O–4'O en donde el puente alquileno es un puente alquileno C^, más particularmente, un puente metileno 2'O–4'C, en uno o más restos de nucleósidos de ARN o ARN. Cuando se incorporan los LNA en oligómeros antisentido han demostrado incrementar considerablemente la estabilidad de la molécula de ARN o ADN antisentido y por lo tanto de incrementar considerablemente el ARN o ADN antisentido por la célula huésped. Otras modificaciones químicas útiles que pueden introducirse en los oligómeros ARN o ARN antisentido para incrementar la estabilidad y biodisponibilidad incluyen las ligaciones de fosfodiéster que se presentan entre los nucleótidos de ARN y ADN individuales.

Compendio de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones, en una primera instancia de la descripción que comprende la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un oligómero de ARN o ADN de acuerdo con la invención, el oligómero de ARN o ADN o una de sus sales, hidratos, solvatos o ésteres farmacéuticamente aceptables, esencialmente complementario de los transcriptos de ARN correspondientes a las secuencias de ADN CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC (SEQ ID NO: 1);

AGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGG (SEQ ID NO:2);

T G GAT GT GT CT GC G GCGTTTT AT CAT (SEQ ID NO: 3);

CATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTT (SEQ ID NO: 4);

CAAGGTATGTTGCCCGT (SEQ ID NO: 5);

TGTATTCCCATCCCATC (SEQ ID NO: 6);

CCTATGGGAGTGGGCCTCAG (SEQ ID NO: 7);

TGGCTCAGTTTACTAGTGC (SEQ ID NO: 8);

GGGCTTTCCCCCACTGT (SEQ ID NO: 9);

TCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCT (SEQ ID NO: 10);

CGCACCTCTCTTTACGCGG (SEQ ID NO: 11);

GGAGTGTGGATTCGCAC (SEQ ID NO: 12); o

GAAGAAGAACTCCCTCGCCT (SEQ ID NO: 13),

en donde la molécula de ARN o ADN antisentido comprende una pluralidad de nucleósidos y/o nucleótidos modificados; y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una segunda instancia de la descripción que comprende la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un oligómero de ARN o ADN de acuerdo con la invención, el oligómero de ARN o ADN o una de sus sales, hidratos, solvatos o ésteres farmacéuticamente aceptables, esencialmente complementario de los transcriptos de ARN correspondientes a las secuencias de ADN GAGAGAAGTCCACCAC (SEQ ID NO: 14); TGAGAGAAGTCCACCA (SEQ ID NO:15); GAGGCATAGCAGCAGG (SEQ ID NO: 16); TGAGGCATAGCAGCAG (SEQ ID NO: 17); GAT GAG G CAT AG C AG C (SEQ ID NO: 18); GATGGGATGGGAATAC (SEQ ID NO: 19);

GGCCCACTCCCATAGG (SEQ ID NO: 20); AGGCCCACTCCCATAG (SEQ ID NO: 21); o CTGAGGCCCACTCCCA (SEQ ID NO: 22, en donde la molécula de ARN o ADN antisentido comprende una pluralidad de nucleósidos y/o nucleótidos modificados; y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Una instancia proporciona un oligómero antisentido para usar en la reducción de la cantidad de un antígeno de ADN y HBV de virus de hepatitis B en una célula de mamífero o un organismo, en donde el oligómero antisentido es una secuencia contigua de 10 a 26 nucleósidos de largo y tiene una secuencia establecida en la fórmula 1:

$5'–LNA_n–P–LNA_p–P–N_m–P–N|–P–LNA_r–P–LNA_q–3'$ (fórmula 1)

en donde LNA es un ácido nucleico bloqueado; P es una ligación de internucleósido seleccionada de una ligación de fosfodiéster, fosfotriéster, fosforotioato, fosforoditioato, H–fosfonato o fosfonato de alquilo entre un LNA y un N contiguo o entre un N y un N contiguo o entre N y un LNA contiguo o entre un LNA y un LNA contiguo, de una dirección 5' a 3' de la secuencia de la fórmula (1); y en donde N está seleccionado de una unidad de nucleósido G, C, A, T, U o Z; n y r y p y q son cada uno, de modo independiente, un número entero seleccionado de 1, 2 ó 3; l y m son cada uno, de modo independiente, un número entero de 1 a 22; y

en donde Z está seleccionado de una inosina, N^7–metilinosina, N^7–metil guanidina, 5–metil uridina, 5–metil–citidina, 5–fluorouridina, 5–fluorotimidina, xantosina, dihidrouridina, pseudouridina, 2–aminoadenosina, 2–tiotimidina, 7–metil–7–desazaguanosina, 7–etil–7–desazaguanosina, N4–metilcitidina, N4–etilcitidina; o una de sus sales, solvatos, hidratos o ésteres.

Las realizaciones particulares proporcionan un oligómero antisentido como se describió, en donde al menos 4 de las unidades de nucleósido del oligómero pueden ser unidades de LNA. En algunas realizaciones, el LNA es una unidad de ácido nucleico bloqueado que tiene una ligación 2'–O–alquil–4'C, en donde el alquilo puede ser un alquilo $C_{1–6}$ sustituido o no sustituido. En realizaciones adicionales, al menos dos de las ligaciones de internucleósido presentes entre las unidades de nucleósido de la secuencia de nucleósido contigua son ligaciones de internucleósido de fosforotioato. En algunas realizaciones relacionadas, todas las ligaciones de internucleósido presentes entre las unidades de nucleósido de la secuencia de nucleósidos contiguos del oligómero antisentido pueden ser ligaciones de internucleósido de fosforotioato.

En algunas instancias particulares, n, p, r y q son cada uno, de modo independiente, 1 ó 2, y l y m son cada uno, de modo independiente, 2, 3, 4, 5 ó 6 y en algunas instancias particulares, n, p, r y q son cada uno, de modo independiente, 1 y l y m son cada uno, de modo independiente, 6. En otras instancias particulares, se proporciona un oligonucleótido antisentido, en donde la secuencia puede ser cualquiera de las SEQ ID NOs 14, 16, 16 ó 20.

En realizaciones particulares, los oligómeros antisentido descritos con anterioridad pueden ser esencialmente complementarios de una de las SEQ ID NOs. 1–13 y el virus de la hepatitis B puede ser un virus de hepatitis B humano y la célula o el organismo pueden ser humanos. En realizaciones particulares relacionadas, el virus de hepatitis B puede ser cualquiera de los genotipos geográficos humanos: A (Europa occidental del norte, Norteamérica, América Central); B (Indonesia, China, Vietnam); C (Asia Oriental, Corea, China, Japón, Polinesia, Vietnam); D (área mediterránea, Este Medio, India); E (África); F (Americanos nativos, Polinesia); G (Estados Unidos, Francia); o H (América Central).

En realizaciones particulares, los oligómeros antisentido descritos con anterioridad puede tener una secuencia que es esencialmente una cualquiera de las SEQ ID NOs. 14–22 y el virus de hepatitis B puede ser un virus de hepatitis B humano y la célula o el organismo puede ser humano. En realizaciones particulares relacionadas, el virus de hepatitis B puede ser cualquiera de los genotipos geográficos humanos: A (Europa occidental del norte, Norteamérica, América Central); B (Indonesia, China, Vietnam); C (Asia Oriental, Corea, China, Japón, Polinesia, Vietnam); D (área mediterránea, Este Medio, India); E (África); F (Americanos nativos, Polinesia); G (Estados Unidos, Francia); o H (América Central).

Una realización particular proporciona una formulación farmacéutica para usar en el tratamiento de infección por virus de hepatitis B en un mamífero que comprende una cantidad efectiva de cualquier oligómero antisentido de ácido nucleico como se describió con anterioridad o una de sus sales, solvatos, hidratos o ésteres farmacéuticamente aceptables y un diluyente farmacéuticamente aceptable. El oligómero antisentido de tal formulación farmacéutica puede ser esencialmente complementario de cualquiera de las SEQ: ID NOs 1–13 o puede tener una secuencia que es esencialmente una cualquiera de las SEQ ID NOs 14–22, y también puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable.

Otra realización de la invención proporciona el tratamiento de una infección por virus de hepatitis B o una condición relacionada con el virus de hepatitis B en un mamífero, donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier composición farmacéutica como se describió con anterioridad a un mamífero que lo necesita, de modo de tratar infección por virus de hepatitis B o la condición relacionada con el virus de hepatitis B. En realizaciones relacionadas, el mamífero es un humano y la infección por virus de hepatitis B o la condición relacionada con el virus de hepatitis B es una infección por virus de hepatitis B de un virus de hepatitis B humano. Más en particular, el virus de hepatitis B humano puede ser cualquiera de los genotipos geográficos humanos: A (Europa occidental del norte, Norteamérica, América Central); B (Indonesia, China, Vietnam); C (Asia

Oriental, Corea, China, Japón, Polinesia, Vietnam); D (área mediterránea, Este Medio, India); E (África); F (Americanos nativos, Polinesia); G (Estados Unidos, Francia); o H (América Central).

Las realizaciones relacionadas proporcionan el tratamiento de una infección de virus de hepatitis B o una condición relacionada con el virus de hepatitis B en un mamífero, donde el tratamiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier composición farmacéutica como se describió con anterioridad a un mamífero que lo necesita, como se describió con anterioridad, en donde la condición relacionada con el virus de hepatitis B puede ser ictericia, cáncer de hígado, inflamación hepática, fibrosis hepática, cirrosis hepática, insuficiencia hepática, enfermedad inflamatoria hepatocelular difusa, síndrome hemofagocítico o hepatitis sérica.

En realizaciones relacionadas, el tratamiento también puede comprender la administración del oligómero antisentido en combinación con un agente terapéutico adicional, en donde el oligómero antisentido y el agente terapéutico adicional se administran ya sea juntos en una formulación simple o se administran por separado en diferentes formulaciones y en donde la administración del oligómero de ácido nucleico y el segundo agente terapéutico se realiza de modo concomitante o en serie.

En otras realizaciones relacionadas, el agente terapéutico adicional puede ser un agente HBV, un agente HCV, un agente quimioterapéutico, un antibiótico, un analgésico, un agente antiinflamatorio no esteroide (NSAID), un agente antifúngico, un agente antiparasitario, un agente antinauseoso, un agente antidiarreico o un agente inmunosupresor.

En realizaciones relacionadas particulares, el agente HBV adicional puede ser interferón alfa–2b, interferón alfa–2a e interferón alfacon–1 (pegilado y no pegilado), ribavirina; un inhibidor de replicación de HBV ARN; un segundo oligómero antisentido; una vacuna terapéutica HBV; una vacuna profilática HBV; lamivudina (3TC); entecavir (ETV); diisoproxilfumarato de tenofovir (TDF); telbivudina (LdT); adefovir; o una terapia de anticuerpos HBV (monoclonal o policlonal).

En otras realizaciones relacionadas particulares, el agente de HCV adicional puede ser interferón alfa–2b, interferón alfa–2a e interferón alfacon–1 (pegilado o no pegilado); ribavirina; un inhibidor de replicación de HCV ARN (por ejemplo, serie VP50406 de ViroPharma); un agente antisentido HCV; una vacuna terapéutica de HCV; un inhibidor de HCV proteasa; un inhibidor de HCV helicasa; o una terapia de anticuerpo monoclonal o policlonal HCV.

Otra realización proporciona la reducción de una cantidad de ADN HBV y una cantidad de antígeno HBV en un mamífero infectado con un virus de hepatitis B, donde el tratamiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica como se describió con anterioridad a un mamífero que lo necesita, de modo de reducir la infección por virus de hepatitis B y el antígeno de hepatitis B, en comparación con la cantidad de HBV ADN y la cantidad de antígeno HBV en el mamífero antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el mamífero puede ser humano y el virus de hepatitis B puede ser un virus de hepatitis B humano. Más en particular, el virus de hepatitis B humano puede ser cualquiera de los genotipos geográficos humanos: A (Europa occidental del norte, Norteamérica, América Central); B (Indonesia, China, Vietnam); C (Asia Oriental, Corea, China, Japón, Polinesia, Vietnam); D (área mediterránea, Este Medio, India); E (África); F (Americanos nativos, Polinesia); G (Estados Unidos, Francia); o H (América Central).

Una realización particular proporciona la reducción de una cantidad de HBV ADN y una cantidad de antígeno HBV en un mamífero infectado con un virus de hepatitis B, donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica como se describió con anterioridad a un mamífero que lo necesita de modo de reducir la infección por virus de hepatitis B y el antígeno de hepatitis B, en comparación con la cantidad de HBV ADN y la cantidad de antígeno HBV en el mamífero antes del tratamiento, en donde la cantidad de ADN se reduce el 90% en comparación con la cantidad antes de la administración del oligómero antisentido. En métodos relacionados, el antígeno HBV puede ser HBsAg o puede ser HBeAg y más en particulari, la cantidad de antígeno HBV se puede reducir suficientemente para dar como resultado la seroconversión, definida como ausencia de HBeAg sérica más presencia de HBeAb sérica si el control de HBeAg como el determinante para la seroconversión o definido como ausencia de HBsAg sérica si el control de HBsAg como el determinante para la seroconversión, como se determina por límites de detección actualmente disponibles de los sistemas comerciales de ELISA.

En una realización más particular, los tratamientos descritos con anterioridad también pueden comprender la administración del oligómero antisentido en combinación con un agente terapéutico adicional, en donde el oligómero antisentido y el agente terapéutico adicional se administran ya sea juntos en una formulación simple o se pueden administrar por separado en diferentes formulaciones, y en donde la administración del oligómero de ácido nucleico y el segundo agente terapéutico se realiza de modo concomitante o en serie. En realizaciones relacionadas particulares, el agente terapéutico adicional puede ser un agente HBV, un agente HCV, un agente quimioterapéutico, un antibiótico, un analgésico, un agente antiinflamatorio no esteroide (NSAID), un agente antifúngico, un agente antiparasitario, un agente antinauseoso, un agente antidiarreico y un agente inmunosupresor. En realizaciones relacionadas más particulares, el agente HBV adicional puede ser interferón alfa–2b, interferón alfa–2a e interferón alfacon–1 (pegilado o no pegilado), ribavirina; un inhibidor de replicación de HBV ARN; un segundo oligómero antisentido; una vacuna terapéutica HBV; una vacuna profilática HBV; lamivudina (3TC); entecavir; tenofovir; telbivudina (LdT); adefovir; o una terapia de anticuerpos HBV (monoclonal o policlonal), y el agente de HCV adicional

puede ser interferón alfa–2b, interferón alfa–2a e interferón alfacon–1 (pegilado y no pegilado); ribavirina; un inhibidor de replicación de HCV ARN (por ejemplo, serie VP50406 de ViroPharma); un agente antisentido HCV; una vacuna terapéutica de HCV; un inhibidor de HCV proteasa; un inhibidor de HCV helicasa; o una terapia de anticuerpo HCV (monoclonal o policlonal).

Otra realización proporciona la promoción de la seroconversión de un virus de hepatitis B en un mamífero infectado con HBV, donde el tratamiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica como se describió con anterioridad a un mamífero infectado con hepatitis B; control de la presencia de HBeAg más HBeAb en una muestra sérica del mamífero o control de la presencia de HBsAg en una muestra sérica del mamífero, de modo tal que la ausencia de HBeAg más la presencia de HBeAb en la muestra sérica si el control de HBeAg como el determinante para la seroconversión o la ausencia de HBsAg en la muestra sérica si el control de HBsAg como el determinante para seroconversión, como se determina por límites de detección actuales de sistemas comerciales de ELISA, es la indicación de la seroconversión en el mamífero.

Para cualquiera de las realizaciones descritas con anterioridad que proporcionan el tratamiento de una infección por virus de hepatitis B o condición relacionada con el virus de hepatitis B, reducción de una cantidad de HBV ADN y una cantidad de antígeno HBV en un mamífero infectado con un virus de hepatitis B, promoción de seroconversión de un virus de hepatitis B en un mamífero infectado con HBV, en donde el tratamiento, la reducción o la promoción comprende la administración de un oligómero antisentido como se describe en la presente, administración del oligómero antisentido, solo o en combinación y si está presente en una formulación farmacéutica o simplemente presente en un diluyente, la administración puede ser oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica o intratraqueal.

Breve descripción de los dibujos

Las siguientes características de la invención se comprenderán más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada, tomada con referencia a los dibujos acompañantes, en donde:

La **Figura 1** es un diagrama de la historia natural de infección por HBV.

La **Figura 2** es un diagrama para pacientes con HBV con enfermedad compensada que se consideran HBeAg Positivos.

La **Figura 3** es un diagrama para pacientes con HBV con enfermedad compensada que se consideran HBeAg Negativos.

La **Figura 4** es un esquema de transcripción de HBV, que muestra los principales transcriptos codificados por el genoma HBV, incluyendo el prenúcleo o la proteína de núcleo, la ADN polimerasa dependiente de ARN y ADN (actividad de transcriptasa inversa), la proteína X y las proteínas S grandes, medias y pequeñas, así como las colas poli–A, respecto de los largos de los transcriptos, y la superposición de los transcriptos de proteína S grande, media y pequeña. Las cadenas más y menos de HBV ADN también están indicadas.

La **Figura 5** muestra un análisis biológico computacional que compara el porcentaje de identidad entre secuencias de ADN genómico de múltiples genotipos de HBV, graficados por región genómica de HBV.

La **Figura 6** es una tabla de diversos genotipos geográficos HBV que se identificaron.

Descripción detallada de realizaciones específicas

Definiciones. Como se usa en esta descripción y las reivindicaciones acompañantes, los siguientes términos pueden tener los significados indicados, a menos que el contexto requiera otra cosa:

Como se usa en la presente, la expresión “cantidad eficaz” significa la cantidad de un fármaco o sustancia farmacológica o agente farmacéutico, incluyendo un oligómero de ácido nucleico, que producirá la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que es buscada, por ejemplo, por el investigador o clínico. Por otra parte, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa cualquier cantidad que, en comparación con un correspondiente sujeto que no recibió tal cantidad, da como resultado un mejor tratamiento, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto colateral o una reducción en la tasa de avance de una enfermedad o trastorno. La expresión también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para mejorar la función fisiológica normal.

Como se usa en la presente, la expresión “esencialmente complementario” significa que la secuencia de oligómeros antisentido tiene una secuencia completamente complementaria de su secuencia con sentido diana usando los pares de base estándar de Watson–Crick A–T, A–U y G–C. Además, la expresión esencialmente complementario incluye una secuencia de oligómeros antisentido completamente complementaria de su secuencia con sentido diana, usando pares de base no estándar de Watson–Crick incluyendo, pero sin limitación, G:U, I:U, I:A, I:C, X:A, X:C, R:C, R:T, R:U, m7I:U, m7I–A, m7I:C, m7G:U, m7G:C, m5U:A, 5–FU:A, 5–FT:A, m5C:G, D:A, ψA y ψ:C. Como se usa en la presente, G es guanosina, I es inosina, A es adenosina, C es citidina, U es uridina, T es timidina, X es xantosina,

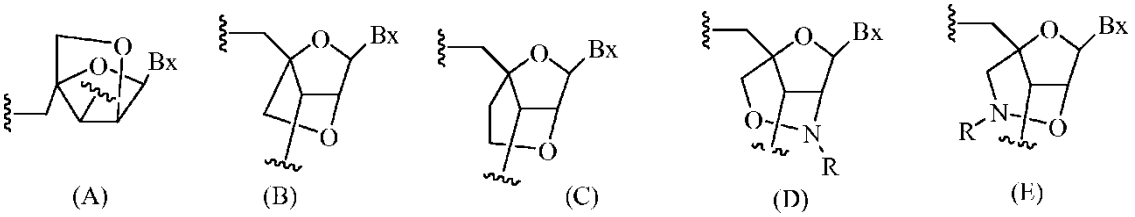
R es ribavirina, m7G es N7–metilguanosina, m7I es N7–metilinosina, 5FU es 5–fluorouridina, 5FT es 5–fluorotimidina, D es dihidrouridina, m5U es 5–metiluridina, m5C es 5–metilcitidina y ψ es pseudouridina.

La expresión “esencialmente complementario” también comprende oligómeros antisentido que tienen una o varias nucleobases sintéticas en la secuencia que exhibe pseudocomplementariedad de nucleobases naturales en una secuencia de ácidos nucleicos de ADN o ARN diana. Los ejemplos de nucleobases que resultan en pseudocomplementariedad con secuencias de ácidos nucleicos natural incluyen 2–aminoadenina o 2–aminoadenosina (nA), 2–tiotimina o 2–tiotimidina (sT), 7–alquil–7–desazaguanina o 7–alquil–7–desazaguanosina (7al–7daG) y N4–alquilcitosina o N4–alquilcitidina (N4–alC; donde alquilo = metilo o etilo). Los pares de bases de no Watson–Crick nA:T y A:sT son pares de bases estables, como 7–alquil–7–desazaguanina con C (7al–7daG:C) y N4–alquilcitosina con G (N4–alC:G). Cuando se incorporan cuatro nucleobases sintéticas nA, sT, 7al–7daG y N4–alC en un ASO dado, la secuencia ASO resultante será ampliamente libre de una estructura secundaria y se unirá con un ácido nucleico diana con pseudocomplementariedad. En realizaciones, una o varias nucleobases sintéticas pueden estar presentes en la secuencia de ASO, dando como resultado uno o varios pares de bases de no Watson–Crick de “pseudocomplementariedad” entre ASO y la secuencia de ácidos nucleicos diana. Se entiende que un ASO que tiene una o varias bases de pseudocomplementariedad, formando así uno o varios pares de pseudobases con nucleobases en la secuencia de ácidos nucleicos diana, se considerará esencialmente complementario de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

El término “esencialmente”, como cuando se usa con la fase “un oligonucleósido que tiene esencialmente la secuencia de SEQ ID NO X”, se usa en la presente para indicar cualquier secuencia que se une en pares de bases con una secuencia complementaria con la SEQ ID NO X, según se escribe, pero que puede contener una o varias nucleobases sintéticas en la secuencia que exhiben pseudocomplementariedad con las nucleobases naturales en una secuencia de ácidos nucleicos de ADN o ARN diana. Los ejemplos de nucleobases que resultan en una pseudocomplementariedad con secuencias de ácidos nucleicos naturales incluyen 2–aminoadenina o 2–aminoadenosina (nA), 2–tiotimina o 2–tiotimidina (sT), 7–alquil–7–desazaguanina o 7–alquil–7–desazaguanosina (7al–7daG) y N4–alquilcitosina o N4–alquilcitidina (N4–alC; donde alquilo = metilo o etilo). Los pares de bases no de Watson–Crick nA:T y A:sT son pares de bases estables, como son 7–alquil–7–desazaguanina con C (7al–7daG:C) y N4–alquilcitosina con G (N4–alC:G). Cuando todas las cuatro nucleobases sintéticas nA, sT, 7al–7daG y N4–alC se incorporan en un ASO dado, la secuencia de ASO resultante estará ampliamente libre de estructura secundaria y se unirá con un ácido nucleico diana con pseudocomplementariedad. En realizaciones, una o varias nucleobases sintéticas pueden estar presentes en la secuencia de ASO, dando como resultado uno o varios pares de bases de “pseudocomplementariedad” no Watson–Crick entre el ASO y la secuencia de ácidos nucleicos diana. Se entiende que un ASO que tiene una o varias bases de pseudocomplementariedad, formando así uno o varios pares de pseudobases con nucleobases en la secuencia de ácidos nucleicos diana, se considerarán que tienen esencialmente la secuencia de SEQ ID NO X, como se escribió, referida a una secuencia de ácidos nucleicos diana dados.

La expresión “oligómero de ácido nucleico” como se usa en la presente significa una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 2 y no más de 100 unidades de nucleósido o nucleótido unidas en forma covalente ligadas consecutivamente. Cada unidad de nucleósido o nucleótido individual puede comprender un azúcar de o desoxirribosa y, así, el oligómero puede comprender una combinación de azúcares de ribosa y desoxirribosa. Los nucleótidos o nucleósidos en el oligómero de ácido nucleico se pueden ligar de modo que el oligómero comprenda ligaciones de fosfodiéster tradicionales o alternativamente el oligómero puede comprender una o varias ligaciones de fosfotriéster, ligaciones de fosfonato, ligaciones de alquilfosfonato, ligaciones de fosforotioato o ligaciones de fosforoditioato. Además, el oligómero de ácido nucleico puede comprender uno o varios nucleósidos modificados, incluyendo nucleósidos ligados con 2’O–4’C y adicional o alternativamente, el oligómero de ácido nucleico puede comprender uno o varios nucleósidos con otras modificaciones en la posición 2’, incluyendo modificaciones de 2’–O–alquilo tales como modificación de 2’–O–metilo, modificación de 2’–O–etilo u otras modificaciones de 2’.

El término LNA (locked nucleic acid) como se usa en la presente comprende monómeros de ácido nucleico que tienen una ligación química entre la posición 2’ y 4’ de la unidad de azúcar de nucleósido (es decir, el azúcar furanosa de un monómero de ácido nucleico tiene una ligación 2’O–4’C o 4’C–2’O, si se describe de acuerdo con el nombre generalmente aceptado de la direccionalidad 5’ a 3’ de un oligonucleótido), incluyendo, pero sin limitación, A) a–L–Metilenoxi (4’–CH_2–O–2’) LNA, (B) (3–D–Metilenoxi (4’–CH_2–O–2’) LNA, (C) Etilenoxi (4’–$(CH_2)_2$–O–2’) LNA, (D) Aminooxi (4’–CH_2–O–N(R)–2’) LNA y (E) Oxiamino (4’–CH_2–N(R)–O–2’) LNA, como se muestra más abajo.



Como se usa en la presente, los compuestos de LNA incluyen, pero sin limitación, compuestos que tienen al menos

un puente entre la posición 4' y 2' del azúcar, en donde cada uno de los puentes comprende, de modo independiente, 1 o de 2 a 4 grupos ligados independientemente seleccionados de $–[C(R_1)(R_2)]_n–$, $–C(R_1)=C(R_2)–$, $–C(R_1)=N–$, $–C(=NR_1)–$, $–C(=O)–$, $–C(=S)–$, $–O–$, $–Si(R_1)_2–$, $–S(=O)_x–$ y $–N(R_1)–$; en donde: x es 0, 1 ó 2; n es 1 , 2 , 3 ó 4; cada R_1 y R_2 es, de modo independiente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo $C_1–C_{12}$, alquilo $C_1–C_{12}$ sustituido, alquenilo $C_2–C_{12}$, alquenilo $C_2–C_{12}$ sustituido, alquinilo $C_2–C_{12}$, alquinilo $C_2–C_{12}$ sustituido, arilo $C_5–C_{20}$, arilo $C_5–C_{20}$ sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico $C_5–C_7$, radical alicíclico $C_5–C_7$ sustituido, halógeno, OJ_1, NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $COOJ_1$, acilo (C(=O)–H), acilo sustituido, CN, sulfonilo $(S(=O)_2–J_1)$, o sulfoxilo $(S(=O)–J_1)$; y cada J_1 Y J_2 es, de modo independiente, H, alquilo $C_1–C_{12}$, alquilo $C_1–C_{12}$ sustituido, alquenilo $C_2–C_{12}$, alquenilo $C_2–C_{12}$ sustituido, alquinilo $C_2–C_{12}$, alquinilo $C_2–C_{12}$ sustituido, arilo $C_5–C_{20}$, arilo $C_5–C_{20}$ sustituido, acilo (C(=O)–H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, aminoalquilo $C_1–C_{12}$, aminoalquilo $C_1–C_{12}$ sustituido o un grupo protector.

Los ejemplos de puentes de 4'C– 2'O específicos comprendidos por la definición de LNA incluyen puentes de $–[C(R_1)(R_2)]_n–$, $–[C(R_1)(R_2)]_n–O–$, $–C(R_1R_2)–N(R_1)–O–$ o $–C(R_1R_2)–O–N(R_1)–$. Otros puentes comprendidos por la definición de LNA son puentes 4'–CH_2–2', 4'–$(CH_2)_2$–2', 4'–$(CH_2)_3$–2', 4'–CH_2–O–2', 4'–$(CH_2)_2$–O–2', 4'–CH_2–O–$N(R_1)$–2' y 4'–CH_2–$N(R_1)$–O–2'–, en donde cada R_1 es, de modo independiente, H, un grupo protector o alquilo $C_1–C_{12}$.

También están incluidos dentro de la definición de LNA de acuerdo con la invención los LNAs en los que el grupo 2'–hidroxilo del azúcar ribosilo se liga con el átomo de carbono 4' del anillo de azúcar formando así una ligación de metilenoxi (4'–CH_2–O–2') para formar el resto de azúcar bicíclico. La ligación puede ser un grupo metileno (–CH_2–) en puente con el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', para el que la expresión metilenoxi (4'–CH_2–O–2') LNA se usa para el resto bicíclico; en el caso de un grupo etileno en esta posición, se usa la expresión etilenoxi (4'–CH_2CH_2–O– 2') LNA. Alfa–L–metilenoxi (4'–CH_2–O–2'), un isómero de metilenoxi (4'–CH_2–O–2') LNA también está comprendido dentro del significado de LNA, como se usa en la presente.

La expresión "ligación de 2'–O–alquil–4'C" como se usa en la presente se refiere a ligación química o puente de 2'–O–4'–C (o 4'C–2'O, si se describe de acuerdo con el nombre generalmente aceptado de la direccionalidad 5' a 3' de un oligonucleótido), en un ácido nucleico bloqueado (LNA). La ligación de alquilo puede ser un alquilo sustituido o no sustituido, en donde "alquilo", como se usa en la presente, significa $–[C(R_1)(R_2)]_n–$, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6; cada R_1 y R_2 es, de modo independiente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo $C_1–C_{12}$, alquilo $C_1–C_{12}$ sustituido, alquenilo $C_2–C_{12}$, alquenilo $C_2–C_{12}$ sustituido, OJ_1, NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $COOJ_1$, acil (C(=O)–H) y cada J_1 y J_2 es, de modo independiente, H, alquilo $C_1–C_{12}$, alquilo $C_1–C_{12}$ sustituido, alquenilo $C_2–C_{12}$, alquenilo $C_2–C_{12}$ sustituido, aminoalquilo $C_1–C_{12}$, aminoalquilo $C_1–C_{12}$ sustituido o un grupo protector.

Como se usa en el presente documento, el término "HBV" significa virus de la hepatitis B en mamíferos, que incluye el virus de la hepatitis B humana. El término engloba los genotipos geográficos del virus de la hepatitis B, particularmente el virus de la hepatitis B humano, como también las cepas variantes de genotipos del virus de la hepatitis B.

Tal como se usa en la presente, las expresiones "condición relacionada con la hepatitis B" o "condición relacionada con el HBV", se refiere a cualquier enfermedad, afección biológica, afección médica o evento que se exacerba, es causado por, o está relacionado o puede rastrearse a, infección, exposición o enfermedad de HBV. La expresión "condición relacionada con la hepatitis B" incluye ictericia, cáncer de hígado, inflamación hepática, fibrosis hepática, cirrosis hepática, insuficiencia hepática, enfermedad inflamatoria hepatocelular difusa, síndrome hemofagocítico, suero de hepatitis, viremia de HBV y condiciones que tienen incluir síntomas que pueden incluir los siguientes: enfermedad similar a la gripe, debilidad, dolores de cabeza, fiebre, pérdida del apetito, diarrea, ictericia, náuseas y vómitos, dolor en el área del hígado, heces de color gris, picazón en todas partes y orina oscura, acoplados con un test positivo para la presencia de un virus positivo de la hepatitis B, el antígeno viral de la hepatitis B o una prueba positiva para detectar la presencia de un anticuerpo específico para el antígeno viral de la hepatitis B.

Los oligonucleótidos antisentido (ASO, oligonucleótido antisentidos) de la invención pueden existir tanto en formas solvatadas como no solvatadas. El término "solvato" se utiliza en este documento para describir un complejo de moléculas que comprende el compuesto de la invención y unas moléculas de solvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol. El término 'hidrato' se usa cuando dicho solvente es agua. Los solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen hidratos y otros solvatos en donde el solvente de cristalización puede estar opcionalmente sustituido, por ejemplo, por D_2O, acetona, DMSO.

Dentro de los alcances de los compuestos reivindicados en la presente se incluyen todos los estereoisómeros, isómeros geométricos y formas tautoméricas de compuestos de fórmula (I), lo que incluye los compuestos que presentan más de un tipo de isomería y mezclas de uno o más de ellos.

Los ASO de la presente invención se pueden administrar como profármacos. Por lo tanto, determinados derivados de los ASO descritos en la presente, que de por sí pueden tener poca o ninguna actividad farmacológica, cuando ingresan en el cuerpo o se aplican a éste, pueden convertirse en ASO esencialmente complementarios a las SEQ ID NOs: 1–13 que tienen la actividad deseada, por ejemplo, mediante escisión hidrolítica. Tales derivados se conocen como 'profármacos'

En función de la naturaleza del oligómero de ácido nucleico antisentido específico, los ASO pueden ser administrados al huésped usando cualquier medio conveniente capaz de resultar en la reducción deseada de transcritos virales diana, cantidad de genoma o carga en la célula diana. Por lo tanto, el oligómero antisentido se puede incorporar en una variedad de formulaciones para su administración terapéutica. Más concretamente, los oligómeros antisentido de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas mediante la combinación adecuada con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y pueden formularse en preparaciones sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, cuentos como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes y aerosoles. Como tales, la administración de los oligómeros antisentido puede lograrse de diversas maneras, lo que incluye la administración oral, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratraqueal, etc.

En formas farmacéuticas de dosificación, los ASO se pueden administrar solos o en asociación apropiada, como también en combinación, con otros agentes farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes se dan a título de ejemplos solamente y ninguna manera son limitantes. Los ASO descritos en la presente pueden administrarse en combinación con un vehículo, excipiente, convencionales o similares (por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, croscarmelosa de sodio, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares). Si se desea, la composición farmacéutica puede también contienen cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes solubilizantes, agentes tamponantes del pH, y similares (por ejemplo, acetato de sodio, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitano, acetato de trietanolamina, y similares).

Para preparaciones orales, puede usar los ASO solo o en combinación con aditivos apropiados para producir comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con ligantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con agentes de desintegración tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con agentes lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyente, agentes de tamponamiento, agentes humectantes, agentes de conservación y saborizantes.

Los ASO pueden formularse como preparaciones inyectables mediante disolución, suspensión o emulsionar en un solvente acuoso o no acuoso, tales como aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos de ácido alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos habituales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes. Se pueden preparar composiciones líquidas farmacéuticamente administrables mediante disolución, dispersión, etc., de al menos una ASO y adyuvantes farmacológicos opcionales en un vehículo (por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicol, etanol, o similares) de manera de formar una solución o suspensión. Los inyectables pueden prepararse en forma de soluciones o suspensiones líquidas, como emulsiones o en formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en líquido antes de la inyección. El porcentaje de ASO contenido en tales composiciones parenterales depende en elevado grado de la naturaleza específica de la aplicación, como también de la actividad del ASO y de las necesidades del sujeto. Sin embargo, se utilizan porcentajes de ingrediente activo del 0,01% al 10% en solución y serán mayores si la composición es un sólido que se diluirá a los porcentajes anteriores. En determinadas formas de realización, la composición comprenderá de aproximadamente el 0,2 al 2% del agente ASO activo en solución.

Los agentes ASO se pueden usar en formulaciones en aerosol para ser administrados a través de inhalación. Los ASO de la presente invención se pueden formular en propulsores presurizados aceptables tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. Para el suministro vía inhalación los ASO se puede formular como solución líquida, suspensiones, propulsores de aerosol o de polvo seco y cargarse en un dispensador adecuado para administración. Hay varios tipos de inhaladores: inhaladores nebulizadores, inhaladores de dosis medidas (MDI, metered dose inhalers) e inhaladores de polvo seco inhaladores de polvo (DPI). Los dispositivos nebulizadores producen una corriente de aire de alta velocidad que hace que los agentes terapéuticos (que se formulan en forma líquida) sean rociados como una niebla en el tracto respiratorio del paciente. Los MDI son típicamente formulaciones envasadas empacadas con un gas comprimido Al ser accionado, el dispositivo descarga una cantidad medida de agente terapéutico por el gas comprimido, proporcionándose por lo tanto un método confiable para administrar una cantidad determinada de agente. Los DPI proporcionan agentes terapéuticos en la forma de un polvo que fluye libremente y que puede redispersarse en la corriente de aire inhalada por el paciente durante la inhalación. Para obtener un polvo que fluye libremente, el agente terapéutico se formula con un excipiente tal como lactosa. Una cantidad medida del agente terapéutico se almacena en forma de cápsula y se dispensa con cada accionamiento.

Además, los agentes ASO se pueden convertir en supositorios mediante el mezclado con una variedad de bases como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los ASO de la presente invención se puede administrar por vía rectal mediante un supositorio. Los supositorios pueden incluir vehículos tales como manteca de cacao, carboceras y polietilenglicoles, que se derriten en a la temperatura corporal, pero que están sólidos a temperatura ambiente.

En general, los agentes ASO proporcionados se usarán en un cantidad terapéuticamente efectiva mediante cualquiera de los modos de administración aceptados para los agentes de ASO que cumplen utilidades similares. La

cantidad real del oligómero antisentido, es decir, el ingrediente activo, dependerá de múltiples factores como la gravedad de la enfermedad a tratar, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del ASO utilizado, la vía y la forma de administración y otros factores. La composición farmacéutica puede ser administrarse más de una vez por día, tal como una o dos veces al día. En formas de realización particulares, la composición farmacéutica de ASO se administrará una vez a la semana o dos veces por semana a lo largo de 24, 36 ó 48 semanas o más tiempo, según sea necesario, para tratar de manera efectiva la infección por el HBV, lo que incluye reducir la carga viral, reducir los antígenos virales, producir la seroconversión, reforzar la respuesta inmune del sujeto y/o disminuir los niveles de ADN del HBV y normalizar los niveles de alanina transferasa (ALT).

Pueden proporcionarse formas de dosificación unitarias para la administración oral o rectal tales como jarabes, elixires y suspensiones en donde cada dosis unitaria, por ejemplo, una cuchara de té, cuchara de mesa, comprimido o supositorios, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más inhibidores. De manera similar, las formas de dosificación unitarias para la administración o para la administración intravenosa pueden comprender el o los inhibidores en una composición en forma de una solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión “forma de dosificación unitaria” tal como se usa en el presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en combinación con un diluyente, portador o vehículo, farmacéuticamente aceptables. Las especificaciones para las formas de dosificación unitarias de la presente invención dependen del compuesto particular utilizado y del efecto que se desea obtener, y de las características farmacodinámicos asociadas a cada compuesto en el huésped.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, son fácilmente accesibles para el público. Por otra parte, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes para ajustar el pH y de tamponamiento, agentes para ajustar la tonicidad, agentes estabilizantes, agentes humectantes y similares están disponibles al público.

Los expertos en la materia comprenderán fácilmente que los niveles de las dosis pueden variar en función del agente ASO específico, la naturaleza del vehículo de la administración, y similares. Las dosificaciones preferidas para un ASO dado son fácilmente determinables por los expertos en la especialidad en base a una variedad de medios.

Los ejemplos de métodos de suministro para la administración de agentes terapéuticos ASO descritos en la presente, como también detalles de formulaciones farmacéuticas, solvatos, hidratos, sales, y ésteres son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen en la bibliografía especializada.

Se puede introducir una cantidad efectiva de un agente inhibidor de ASO en la célula diana usando cualquier protocolo conveniente para introducir un agente ASO en una célula diana. Los métodos incluyen el uso de agentes tales como lipofectamina, aminas policatiónicas, tales como espermina, espermidina y similares, incluida la electroporación, microinyección, encapsulación de liposomas y más, de acuerdo con protocolos estándar disponibles en la técnica. En algunos casos, no es necesario un agente exógeno para la incorporación del ASO en una célula diana. La introducción de una cantidad efectiva de un agente ASO en una célula de mamífero da como resultado una modulación, es decir, la reducción, de la expresión del o de los genes diana del HBV, lo que conduce a la reducción de la carga del HBV, reducción del ADN de HBV, normalización de la actividad de ALT, seroconversión, cura y mejor respuesta inmune.

En última instancia, la elección de la formulación y de la dosificación depende de diversos factores tales como el modo de administración del fármaco y de la biodisponibilidad de la sustancia del fármaco.

Los métodos de la presente invención funcionarán en cualquier célula de mamífero, en donde las células de mamífero representativas de interés incluyen sin limitación las células de animales ungulados o de pezuña, por ejemplo, ganado, cabras, cerdos, ovejas, etc.; roedores, por ejemplo hámsteres, ratones, ratas, etc.; lagomorfos, por ejemplo, conejos, primates por ejemplo monos, babuinos, seres humanos, etc.; y similares.

Las composiciones de ASO pueden ser ventajosamente combinadas o utilizadas en combinación y/o alternancia con otros agentes antivirales que son sea agentes terapéuticos sea preventivos y diferentes de los compuestos de la presente. Las composiciones también pueden ser ventajosamente combinadas y/o utilizadas en combinación con agentes para tratar condiciones a menudo asociado con infecciones virales tales como agentes anti–HCV o agentes inmunosupresores. En determinadas formas de realización, la administración conjunta con composiciones refuerza la eficacia de tales agentes. De acuerdo con ello, los compuestos de la presente, cuando se combinan o administran en combinación con agentes antivirales, se pueden usar en ciertas formas de realización en dosis que son inferiores a las cantidades previstas cuando se utilizan solas o inferiores a las cantidades calculadas para la terapia combinada.

Los ASO y las composiciones de ASO de la presente invención también se pueden usar con agentes que mejoran el sistema inmune del cuerpo, lo que incluye bajas dosis de ciclofosfamida, timostimulina, vitaminas y suplementos

nutricionales (por ejemplo, antioxidantes, incluyendo vitaminas A, C, E, betacaroteno, zinc, selenio, glutatión, coenzima Q–10 y equinácea) y vacunas, por ejemplo, el complejo inmunoestimulante (ISCOM), que incluía una formulación de vacuna que combina una presentación multimérica de antígeno y un adyuvante.

Como comprenderán las personas expertas en la especialidad, la dosificación depende de la gravedad y del grado de respuesta del estado de enfermedad sometido a tratamiento y del desarrollo del tratamiento que requiere desde varios días a varios meses o hasta que se obtenga una cura o una disminución del estado de enfermedad. Los programas de dosificación óptimos pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación de agente activo ASO en el cuerpo del paciente. La dosis óptima puede variar en función de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales. En términos generales, puede estimarse en base que a las EC_{50} considerados como efectivos en modelo de animales *in vitro* e *in vivo*. En términos generales, la dosificación es de 0,01 µg a 1 g por kilo de peso corporal y puede administrarse una o varias veces por día, por semana, por mes o anualmente o aun cada 2 a 10 años o mediante infusión continua durante varias horas a varios meses. Los coeficientes de repetición para la dosificación pueden estimarse sobre la base de los tiempos de residencia medidos y de la concentración del fármaco en los fluidos y tejidos corporales. Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable que el paciente sea sometido a una terapia de mantenimiento a efectos de prevenir la recurrencia del estado de enfermedad. Más particularmente, el desarrollo del tratamiento durará de aproximadamente 48 semanas, administrándose una vez por semana, en forma de una inyección subcutánea con dosis de aproximadamente 0,01 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 g/kilo de peso corporal.

Las formas de realización de la invención se refieren a una composición farmacéutica, que comprende por lo menos un oligómero antisentido de la invención como un ingrediente activo. Debe entenderse que la composición farmacéutica de acuerdo con la invención incluye un diluyente y que opcionalmente comprende un vehículo farmacéutico y que la composición farmacéutica comprende opcionalmente otros compuestos, tales como compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antivirales, analgésicos, narcóticos, antibióticos, compuestos antifúngicos, compuestos antiparasitarios, y/o compuestos inmunomoduladores.

Los oligonucleótidos de la invención puede usarse “tal cual” o en forma de una variedad de sales farmacéuticamente aceptables. Tal como se utiliza en la presente, la expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada de los oligonucleótidos identificados en la presente y que presenten efecto toxicológicos indeseados mínimos. Los ejemplos, no limitantes, de tales sales pueden formarse con aminoácidos orgánicos y sales de adición de base formados con cationes metálicos tales como cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio y similares, con un catión formado seleccionado entre amoníaco, N,N–dibenciletilen–diamina, D–glucosamina, tetraetilamonio o etilendiamina.

En una forma de realización particular, el oligonucleótido puede estar en forma de un profármaco. Los oligonucleótidos, que en su forma natural tienen normalmente los nucleótidos individuales ligados mediante una columna vertebral fosfodiéster, por lo general existen con oxígeno de fosfato mayoritariamente desprotonado a pH 7, por lo que son moléculas cargadas negativamente. Dado que las membranas de las células son de naturaleza lipofílica, la incorporación celular de los oligonucleótidos está frecuentemente reducida en comparación con los equivalentes neutros o lipofílicos. Una solución consiste en utilizar el enfoque de profármaco (ver, por ejemplo Crooke, R. M. (1998) in: Crooke, S. T. Antisense research and Application. Springer–Verlag, Berlín, Alemania, vol. 131, pp. 103–140).

Los agentes de unión y adyuvantes farmacéuticamente aceptables pueden también comprender parte del fármaco formulado.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen sin limitación formulaciones que contienen soluciones, ilusiones y liposomas, Estos compuestos pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen sin limitación líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos auto emulsionantes. El suministro de la composición de ASO a los tejidos puede ser reforzado mediante un suministro mediado por portador que incluye sin limitación, liposomas catiónicas, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polímeros de polietilenimina, nanopartículas y microesferas (Dass, C R. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54(1):3–27). Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosis unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacológica. Tales técnicas incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos con el o los portadores farmacéuticos o el o los excipientes. En general las formulaciones se preparan mediante la asociación uniforme e íntima de los ingredientes activos con portadores líquidos o con portadores sólidos finamente divididos y en caso de necesidad, se configuran el producto. Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como sin limitación, comprimidos, capsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, y supositorios.

Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden además contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión y que incluyen por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede también contener agentes de estabilización. La suspensión de la invención también puede conjugarse con sustancias fármaco activase, por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano

o un antibiótico y una sustancia fármaco anticáncer. Además, las secuencias de ASO de la invención pueden administrarse en forma de una terapia combinada junto con o por separado en conjunción con, sustancias fármacos útiles para tratar el cáncer, inflamación, dolor, infecciones bacterianas, fúngica es y/o parasitarias, alcoholismo, abuso de sustancias, diabetes, como también con sustancias fármaco útiles para tratar otras infecciones virales tales como VIH, HCV y similares.

Hay dos tipos generales de infecciones virales por hepatitis B; agudo y crónico. Los sujetos que han experimentado una inspección por HBV pueden también recuperarse y transformarse en portadores no sintomáticos. La hepatitis B aguda se presenta cuando una persona predispuesta al virus de hepatitis B empieza a desarrollar los signos y síntomas de la hepatitis viral. Este período de tiempo, denominado período de incubación, es de un promedio de 90 días, pero puede ser más corto, por ejemplo de 45 días, o durar hasta seis meses. Para la mayoría de las personas esta infección causará una incomodidad de suave a moderada pero se curará por sí misma por cuanto la inmunorrespuesta del cuerpo tiene éxito al combatir el virus. Sin embargo, algunas personas, particularmente aquellas con inmune sistemas comprometidos, tales como las personas que sufren de SIDA, sometidos a quimioterapia, que consumen fármacos inmunosupresores, o que tomen esteroides, tienen problemas muy serios como resultado de la infección aguda de HBV y pasan a una o más condiciones más severas tales como insuficiencia hepática fulminante.

La hepatitis B crónica se presenta cuando una persona inicialmente sufre de una infección aguda pero es seguidamente incapaz de rechazar la infección. El que la enfermedad llegue a ser crónica o se resuelva por completo depende principalmente de la edad de la persona infectada. Aproximadamente el 90% de los infantes infectados durante su nacimiento progresará a la enfermedad crónica. Sin embargo, a medida que una persona envejece, el riesgo de una infección crónica disminuye de manera tal que entre el 0 y el 50% de los niños y menos del 10% de niños de edad avanzada progresarán de una infección aguda a una infección crónica. Las infecciones crónicas por HBV son el objetivo de tratamiento primario de la presente invención, si bien las composiciones de ASO de la presente invención son también capaces de tratar condiciones relacionados con el HBV, tales como inflamación, fibrosis, cirrosis, cáncer de hígado, hepatitis sérica, y más.

Como se indica en la **Figura 1**, un resumen de la historia natural de la infección por HBV, si un paciente contrae el HBV ya durante la primera infancia, hay un 95% de probabilidad de que el niño desarrollará un inmune tolerancia y que la condición progresará a hepatitis crónica; mientras que si el paciente contrae el HBV como adulto, hay solamente un 5% de probabilidad de que la condición se haga crónica.

Hay cuatro fases de infección crónica por HBV. La primera fase es la fase inmune tolerante, en la que se presenta una mínima fibrosis e inflamación del hígado, acoplado con un elevado ADN de HBV y niveles normales de alanina aminotransferasa (ALT). La segunda fase es una fase de inmune eliminación, en la que una inflamación activa del hígado puede observarse en la histología, que también incluye niveles fluctuantes de actividad de ALT y niveles fluctuantes de ADN de HBV. Puede seguir una tercera fase de portador inactivo, en la que los sujetos infectados pueden presentar una hepatitis suave y una fibrosis mínima en el examen histológico. También se ha informado sobre una cuarta fase, denominada “reactivación del HBV”. Esta última fase se caracteriza por la inflamación activa del hígado, observada en la biopsia, a pesar de la negatividad de la hepatitis B y del antígeno (HBeAg) y de la positividad anti–HBeAg.

La enfermedad crónica del HBV es de varios tipos. El primero, conocido como infección de HBV HBeAg positiva, o infección de HBV “de tipo salvaje” se caracteriza como anti–HBeAg negativo y presenta cantidades de ADN de HBV > 20.000 UI/mL (> 10^5 copias/mL). Una segunda infección, conocida como infección HBeAg negativa o de “núcleo mutante”, se caracteriza como anti–HBeAg positiva y presenta ADN de HBV >2.000 UI/mL (> 10^4 copias/mL). Estos dos tipos de infección crónica de HBV y que históricamente recomendaban enfoques terapéuticos, se muestran en las Figuras 2 y 3.

La **Figura 2** muestra las categorías de pacientes que presentan una infección por HBV HBeAg positivo o “de tipo positivo” y los tratamientos históricamente recomendados. A la izquierda están aquellos que tienen niveles de ADN viral de HBV inferiores a 20.000 UI/mL (<10^5 copias por mL), donde no se recomienda ningún tratamiento, salvo supervisar que los niveles de ADN del HBV no aumenten. A la derecha están aquellos que tienen niveles de ADN viral de HBV > 20.000 UI/mL. Para estos pacientes aquellos con una actividad normal de alanina transferasa (ALT) son supervisados cada 3–12 meses para detectar cualquier cambio en la actividad de ALT y considerados para biopsia, en función de la edad. Los que presentan una elevada actividad de ALT son tratados para la seroconversión, si bien en realidad, menos del 20–30% de los pacientes lograron una seroconversión con la terapia actual para HBV, La terapia actualmente recomendada para el HBV incluye entecavir (ETV) y tenofovir disoproxil fumarato (TDF) y peg–interferón, como opciones primarias.

La **Figura 3** muestra categorías de pacientes que presentan alguna infección de HBV de tipo HBeAg negativo o de “núcleo mutante”, y los tratamientos históricamente recomendados. A la izquierda se encuentran aquellos que tienen niveles de ADN viral de HBV inferiores a 2.000 UI/mL (<10^4 copias por mL), no recomendándose ningún tratamiento, sobre supervisar para asegurarse que no aumentan los niveles del ADN del HBV. Ala derecha están aquellos que tienen niveles de ADN viral de HBV > 2.000 UI/mL. Para estos pacientes, aquellos con una actividad normal de ALT (anine transferase) se supervisan para detectar cualquier cambio en la actividad de la ALT, y se los tiene en cuenta

para la biopsia. Aquellos que tienen una elevada actividad de ALT se tratan para la seroconversión de HBsAg, si es posible, utilizándose la terapia actualmente recomendada para el HBV, lo que incluye entecavir (ETV) y tenofovir disoproxil fumarato (TDF) y peg–interferón, como opciones primarias.

Los pacientes que sufren de una infección aguda de HBV producen una respuesta vigorosa, policlonal, de linfocitos T citotóxico multiespecíficos a los antígenos virales, mientras que los pacientes crónicamente infectados tienen una respuesta CTL débil o indetectable. La hepatitis se presenta cuando se activa una débil inmune respuesta HBV–específica que es lo suficientemente fuerte para destruir los hepatocitos infectados por el HBV. Poco es lo que se sabe en cuanto al mecanismo responsable de la grado de hiperrespuesta o tolerancia de las células T, pero se piensa que podría implicar los siguientes mecanismos: selección negativa (neonatos); ignorancia inmunológica; anergia periférica o falta de moléculas coestimuladoras, por ejemplo de células T reguladoras (Tregs); agotamiento (regulación ascendente de PD–1). Un factor común para todos estos mecanismos sugeridos son los elevados niveles de antígeno persistentes en el paciente.

El HBeAg de antígeno de HBV es una forma secretada, sin partículas, de proteína de núcleo del HBV. Los antígenos HBeAg y HBeAg del HBV comparten secuencias de aminoácidos primarias, por lo que muestran una reactividad cruzada al nivel de las células T. El HBeAg no se requiere para el ensamble o replicación virales, si bien los estudios sugieren que podrían ser necesarios para el establecimiento de la infección crónica.

Las infección neonatal con el mutante HBeAg–negativo resulta frecuentemente en una infección aguda fulminante en lugar de una infección crónica de HBV (Terezawa et al (1991) Pediatr. Res. 29:5), mientras que la infección de jóvenes marmotas con mutante WHeAg–negativo resulta en un coeficiente mucho más bajo de infección crónica por HBV (Cote et al (2000) Hepathology 31:190). El HBeAg puede posiblemente funcionar como un toleragen mediante la desactivación de células T específicas para núcleo por intermedio de deleción o anergia clonal (Milich et al. (1998) J. Immunol. 160:8102). Hay una correlación positiva entre la reducción de la carga viral de HBV y los antígenos y una disminución de la expresión, por las células T, de la muerte–1 programada del receptor inhibidor (PD–1; también conocido como PDCD1), un regulador negativo de células T activadas, al tener lugar la terapia antiviral y la seroconversión de HBeAg (Evans et al (2008) Hepathology 48:759).

El antígeno de superficie de HBV, o HBsAg, es la proteína de envuelta de las partículas virales de HBV pero también es secretado como una partícula no infecciosa con niveles de suero 1.000 veces más elevados que los de las partículas virales de HBV. Los niveles séricos de HBsAg en una persona o animal infectados pueden ser elevados, por ejemplo de 1.000 µg/mL (Kann and Gehrlich (1998) Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed. 745). En infecciones de HBV agudas, la semivida del HBsAg en el suero o suero ti_2, es de 8,3 días (Chulanov et al (2003) J. Med. Virol. 69: 313). La internalización de HBsAg por las células dendríticas mieloides inhibe la regulación ascendente de las moléculas coestimuladoras (es decir, B7) e inhibe la capacidad estimuladora de las células T (den Brouw et al (2008) Immunology 126:280), y las células dendríticas de pacientes crónicamente infectados también muestran déficits en la expresión de las moléculas coestimuladoras, la secreción de IL–12 y la estimulación de las células T en la presencia de HBsAg (Zheng et al (2004) J. Viral Hepatitis 11:217).

Las células CD8 HBsAg específicas de pacientes con CHB muestran una unión alterada de los tetrámeros, Estas células CD8 no son anérgicas pero pueden tener una topología TCR que confiere una tolerancia parcial o ignorancia (Reignat et al (2002) J. Exp. Med. 195:1089). Además, la reducción en el HBsAg de suero g > 1 log a la semana 24 tiene un elevado valor predictivo (92%) para la respuesta virológica prolongada (SVR – definido como ADN de HBV no detectable por PCR 1 año después del tratamiento durante la terapia Peg–IFNa2a (Moucari et al (2009) Hepathology 49:1151).

Debido a la superposición de las vías de transmisión, muchas personas fueron expuestas tanto a virus de hepatitis B (HBV) como a virus de hepatitis C (HCV) y una menor proporción se infectan crónicamente con ambos virus, en especial en regiones tales como Asia, donde HBV es endémico. Las estimaciones sugieren que hasta el 10% de las personas con HCV también pueden tener HBV, mientras que quizás el 20% de las personas con HBV se coinfectan con HCV. Sin embargo, el tratamiento de hepatitis B o hepatitis B en individuos coinfectados con HBV–HCV no se ha estudiado bien.

El tratamiento es complicado por el hecho de que HCV y HBV parecen inhibir cada otra replicación (a pesar de que no todo lo estudiado observó esta interacción). En consecuencia, el tratamiento que suprime por completo el HBV podría permitir potencialmente que HCV vuelva a emerger, o viceversa.

En consecuencia, los compuestos ASO de la presente invención se pueden usar ventajosamente para tratar pacientes infectados tanto con HBV como con HCV. Las opciones de tratamiento de ejemplo para hepatitis C (HCV) incluyen interferones, por ejemplo, interferón alfa–2b, interferón alfa–2a e interferón alfacon–1. La dosis de interferón menos frecuente se puede lograr usando interferón pegilado (interferón unido con un resto de polietilenglicol que mejora significativamente su perfil farmacocinético). La terapia combinada con interferón alfa–2b (pegilado o no pegilado) y ribavirina también mostró ser eficaz para algunas poblaciones de pacientes. Otros agentes que actualmente se están desarrollando incluyen inhibidores de replicación de HCV ARN (por ejemplo, serie VP50406 de ViroPharma), agentes antisentido HCV, vacunas terapéuticas de HCV, inhibidores de HCV proteasa, inhibidores de HCV helicasa y terapia de anticuerpos HCV (monoclonal o policlonal).

Las realizaciones de la presente invención proporcionan un compuesto ASO esencialmente complementario de cualquiera de las SEQ: ID NOs 1–13, para usar en el tratamiento de un sujeto infectado con HBV y HCV, en donde el compuesto ASO se administra en combinación con un agente HCV. El agente HCV se puede administrar en la misma formulación farmacológica que el compuesto ASO, o se puede administrar en una formulación separada. Más aún, el compuesto HCV se puede administrar simultáneamente como el compuesto ASO HBV o se puede administrar por separado, de modo que una dosis de cada uno del compuesto HBV ASO y el agente de HCV se superpongan, en tiempo, dentro del cuerpo del paciente. En realizaciones relacionadas, el agente HCV se puede seleccionar de interferón alfa–2b, interferón alfa–2a e interferón alfacon–1 (pegilado o no pegilado); ribavirina; un inhibidor de replicación de HCV ARN (por ejemplo, serie VP50406 de ViroPharma); un agente antisentido HCV; una vacuna terapéutica de HCV; un inhibidor de HCV proteasa; un inhibidor de HCV helicasa; y una terapia de anticuerpo HCV (monoclonal o policlonal).

En otra realización, un compuesto HBV ASO de la presente invención se puede administrar a un paciente infectado con HBV, en combinación con un segundo agente terapéutico HBV, en donde el segundo agente terapéutico HBV se puede administrar en la misma formulación farmacológica que el compuesto HBV ASO o se puede administrar en una formulación separada. El segundo agente terapéutico HBV se puede administrar simultáneamente con el compuesto ASO HBV o se puede administrar por separado, de modo que una dosis de cada uno del compuesto HBV ASO y el agente terapéutico HBV se superpongan, en tiempo, dentro del cuerpo del paciente. En realizaciones relacionadas, el agente terapéutico HBV se pueden seleccionar de interferón alfa–2b, interferón alfa–2a e interferón alfacon–1 (pegilado y no pegilado), ribavirina; un inhibidor de replicación de HBV ARN; un segundo compuesto antisentido HBV; una vacuna terapéutica HBV; una vacuna profiláctica HBV; lamivudina (3TC); entecavir; tenofovir; telbivudina (LdT); adefovir; y una terapia de anticuerpos HBV (monoclonal o policlonal).

La **Figura 4** es un esquema de transcripción de HBV, que muestra los principales transcriptos codificados por el genoma HBV, incluyendo el prenúcleo o la proteína de núcleo, la ADN polimerasa dependiente de ARN y ADN (actividad de transcriptasa inversa), la proteína X y las proteínas S grandes, medias y pequeñas, así como las colas de poli–A, largos relativos de los transcriptos, y la superposición de los transcriptos de proteína grandes, medios y pequeños. Las cadenas más y menos de HBV ADN también se indican.

La **Figura 5** muestra un análisis biológico computacional que compara la identidad en porcentaje entre secuencias de ADN genómico de múltiples genotipos de HBV, graficado por región genómica de HBV. Como se puede ver en la **Figura 5**, se identificaron múltiples regiones del 100% de identidad entre las secuencias, en particular para la polimerasa y regiones transcriptas de proteína S grande, media y pequeña.

La **Figura 6** es una tabla de varios genotipos geográficos de HBV. Como puede verse en la tabla, hay ocho diferentes genotipos geográficos de HBV que fueron categorizados, que difieren en aproximadamente el 8% en su ADN genómico. Además de varias en su distribución geográfica, los genotipos de HBV también pueden diferir en la historia clínica y su respuesta a terapia con interferón.

Usando un análisis biológico computacional expandido, similar al ejemplificado en la **Figura 5,** aproximadamente 2300 secuencias se analizaron y sorprendentemente se identificaron 13 secuencias con >95% de identidad a través de los distintos genotipos. Este análisis permitió el diseño de secuencias oligoméricas antisentido individuales que se dirigen cada una a una secuencia conservada con >95% de identidad entre múltiples productos de transcripción y regiones del genoma de HBV, a través de los genotipos. Así, los inventores identificaron de modo sorprendente e inesperado un medio para una secuencia de ASO individual para desactivar múltiples productos de transcripción y el mismo ASO individual también aumentará la actividad a través de todos los genotipos geográficos de HBV. Tal enfoque permite una composición farmacéutica que comprende, como un compuesto activo, una secuencia simple de ASO y la composición tendrá una eficacia muy incrementada respecto de las terapias de HBV existentes, limitará severamente la capacidad de la cepa de HBV para desarrollar la resistencia y dará como resultado una carga viral reducida un 90% o más, como se evidencia por la presencia de HBV ADN y antígenos HBV HBeAg y HBsAg. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención ofrecerá así a los pacientes que sufren de infecciones por HBV crónicas un tratamiento terapéutico mejorado capaz de proporcionar una seroconversión completa y, por último, que lleva a una cura completa de infecciones por HBV crónicas. Tal enfoque también reducirá condiciones hepáticas relacionadas con HBV, tales como cirrosis, carcinoma hepatocelular (HCC) y fibrosis e inflamación, que da como resultado la necesidad de menores trasplantes de hígado y que ayuda a evitar muertes de enfermedad hepática.

Además, más allá de una reducción ampliamente mejorada de la carga viral, ASOs de la presente invención proporcionará otros beneficios. Se cree que HBeAg tiene un papel inmunosupresor y se cree que HBsAg contribuye con el agotamiento de las células T. En consecuencia, el tratamiento con un ASO de la presente invención reforzará la respuesta inmune de un paciente por reducción de niveles de HBeAg y HBsAg, que permite que el sistema inmune controla mejor la infección. También se espera que la reducción de la presentación de antígeno HBV en el hígado ayude a minimizar la extensión de los brotes de infección por HBV, un resultado de restauración del sistema inmune, todo lo cual incrementará las posibilidades de una cura completa de infección por HBV crónica.

Se proporcionan los métodos y las composiciones para reducir las cantidades de genomas virales de hepatitis B en una célula diana. En los métodos objeto, la expresión de cualquier de varias otras proteínas diana de HBV específicas se inhibe de una manera suficiente para reducir la cantidad de genoma viral en la célula diana, por

ejemplo, introduciendo un agente inhibidor de ARN antisentido en la célula diana. También se proporcionan composiciones farmacéuticas para usar en la práctica de los métodos diana. Las realizaciones de la presente invención se usan en una variedad de aplicaciones, incluyendo el tratamiento de sujetos que sufren de una condición patológica mediada por virus, por ejemplo, una condición patológica mediada por HBV. Estas condiciones incluyen, pero sin limitación, fibrosis e inflamación del hígado, cirrosis del hígado y cáncer hepatocelular (cáncer de hígado).

Las realizaciones de la presente invención proporcionan un oligómero antisentido (ASOs) para tratar infecciones por HBV en mamíferos, incluyendo humanos, en donde el ASO es esencialmente complementario de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1–13 y es eficaz en la reducción de la carga viral o niveles de antígeno en al menos el 40%, con mayor preferencia, en al menos el 50%, con mayor preferencia aún, en al menos el 60%, con mayor preferencia aún, en al menos el 70%, con mayor preferencia, el 80% y con máxima preferencia, en el 90%. El ASO puede comprender al menos dos nucleósidos modificados, incluyendo unidades de ácido nucleico bloqueado (LNA), donde la unidad de LNA tiene una ligación de 2'O–alquil–4'C, dando como resultado un azúcar bicíclico en la posición de ASO donde el nucleósido de LNA modificado se incorpora en la secuencia de ASO.

El oligómero antisentido de la invención es un oligonucleótido monocatenario que comprende análogos de nucleósido, tales como LNA o análogos de nucleótido, como fosforotioatos, que forman parte de la secuencia de ácidos nucleicos contigua del oligonucleótido antisentido. La secuencia del oligómero antisentido consiste en una secuencia de nucleótidos o nucleósidos contigua.

El término "antisentido" como se usa en la presente significa que una secuencia de oligonucleótidos de ácido nucleico, cuando se mira desde el término 5' hasta el término 3', comprende una secuencia que es esencialmente complementaria de la cadena con sentido de ADN – es decir, el oligonucleótido antisentido tiene una orientación de secuencia opuesta, de 5' a 3', como la cadena con sentido de ADN, también conocida como la cadena codificante, de modo que el oligómero antisentido sea esencialmente complementario de la cadena con sentido de una región o gen codificante de ADN dados.

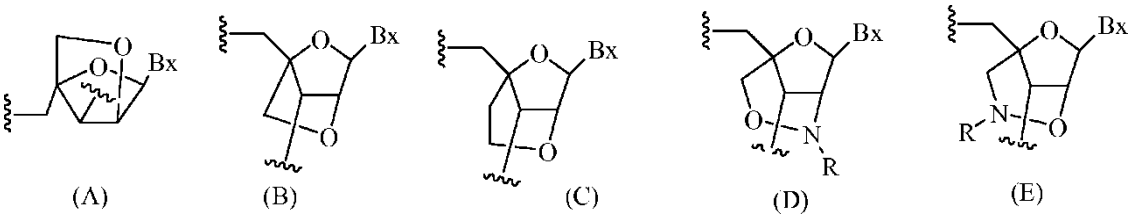
El término "oligonucleótido" (o simplemente "oligo"), que se usa indistintamente con la expresión "oligómero" se refiere, en el contexto de la presente invención, a una molécula formada por ligación covalente de dos o más nucleótidos. Cuando se usa en el contexto del oligonucleótido de la invención (también mencionado como oligonucleótido monocatenario), la expresión "oligonucleótido" puede ser, en una realización, por ejemplo de 10 a 26 nucleótidos, más en particular, un oligonucleótido de la invención puede tener de 12–20 nucleótidos o más en particular, de 14–18 nucleótidos.

El término 'nucleótido' se refiere a una molécula con tres componentes, a saber, una base nitrogenada heterocíclica, a veces mencionada como una nucleobase, incluyendo bases de pirimidina y de purina, un azúcar pentosa (ribosa o desoxirribosa) y un grupo fosoforilo (fosfato, fosforotioato, fosfonato, etc.). Los ejemplos incluyen, pero sin limitación nucleótidos de ADN tales como desoxiadenosina–5'–monofosfato (dAMP), desoxiguanosina–5'–difosfato (dGDP), desoxiltimidina–5'–trifosfato (dTTP) y desoxicitidina–5'– trifosfato (dCTP) y nucleótidos de ARN tales como adenina–5'–monofosfato (AMP), citidina–5'–difosfato (CDP), inosina–5'–monofosfato (IMP), uridina–5'–trifosfato (UTP) y guanosina–5'–trifosfato (GTP).

Como se usa en la presente, el nucleótido incluye análogos de fosfato tales como análogos de fosforotioato, fosforoditioato, fosfonato, H–fosfonato o alquilfosfonato. Si se reconoce que, en algunos aspectos, la expresión nucleobase también se puede usar para referirse a un nucleótido que puede ser natural o no natural —en este sentido, la expresión nucleobase y nucleótido se pueden usar indistintamente en la presente Las nucleobases incluyen, pero sin limitación, guanina, citosina, timina, adenina, uracilo, xantina, hipoxantina, 5,6–dihidrouracilo, 5–fluorouracilo, 5–fluorotimina, N7–metilguanina, N7–metilinosina, 5–metilcitosina y 5–metiluracilo, entre otros.

Los compuestos oligoméricos proporcionados en la presente pueden comprender uno o varios monómeros, incluyendo un nucleósido o nucleótido, que tiene un resto de azúcar modificado. Por ejemplo, el anillo de azúcar furanosilo de un nucleósido se puede modificar en una cantidad de formas incluyendo, pero sin limitación, adición de un grupo sustituyente, en puente de dos átomos de anillo no geminales para formar un Locked Nucleic Acid (LNA).

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden uno o varios monómeros que es un LNA. En tales realizaciones determinadas, LNAs incluyen, pero sin limitación, (A) a–L–Metilenoxi (4'–CH_rO–2') LNA, (B) (3–D–Metilenoxi (4'–CH_rO–2') LNA, (C) Etilenoxi (4'–$(CH_2)_2$–O–2') LNA, (D) Aminooxi (4'–CH_2–O–N(R)–2') LNA y (E) Oxiamino (4'–CH_2–N(R)–O–2') LNA, como se describe a continuación.



En ciertas realizaciones, los compuestos LNA incluyen, pero sin limitación, compuestos que tienen al menos un puente entre la posición 4' y 2' del azúcar, en donde cada uno de los puentes, de modo independiente, comprende 1 o de 2 a 4 grupos ligados de modo independiente seleccionados de $–[C(R_1)(R_2)]_n–$, $–C(R_1)=C(R_2)–$, $–C(R_1)=N–$, $–C(=NR_1)–$, $–C(=O)–$, $– C(=S)–$, $–O–$, $–Si(R_1)_2–$, $–S(=O)_x–$ y $–N(R_1)–$;

en donde:

x es 0, 1 ó 2;

n es 1, 2, 3 ó 4;

cada R_1 y R_2 es, de modo independiente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo $C_1–C_{12}$, alquilo $C_1–C_{12}$ sustituido, alquenilo $C_2–C_{12}$, alquenilo $C_2–C_{12}$ sustituido, alquinilo $C_2–C_{12}$, alquinilo $C_2–C_{12}$ sustituido, arilo $C_5–C_{20}$, arilo $C_5–C_{20}$ sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico $C_5–C_7$, radical alicíclico $C_5–C_7$ sustituido, halógeno, OJ_1, NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $COOJ_1$, acilo (C(=O)–H), acilo sustituido, CN, sulfonil ($S(=O)_2–J_1$), o sulfoxilo ($S(=O)–J_1$); y

cada J_1 y J_2 es, de modo independiente, H, alquilo $C_1–C_{12}$, alquilo $C_1–C_{12}$ sustituido, alquenilo $C_2–C_{12}$, alquenilo $C_2–C_{12}$ sustituido, alquinilo $C_2–C_{12}$, alquinilo $C_2–C_{12}$ sustituido, arilo $C_5–C_{20}$, arilo $C_5–C_{20}$ sustituido, acil (C(=O)–H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, aminoalquilo $C_1–C_{12}$, aminoalquilo $C_1–C_{12}$ sustituido o un grupo protector.

En una realización, cada uno de los puentes de los compuestos de LNA es, de modo independiente, $–[C(R_1)(R_2)]_n–$, $–[C(R_1)(R_2)]_n–O–$, $–C(R_1R_2)–N(R_1)–O–$ o $–C(R_1R_2)–O–N(R_1)–$. En otra realización, cada uno de los puentes es, de modo independiente, 4'–CH_2–2', 4'–$(CH_2)_2$–2', 4'– $(CH_2)_3$–2', 4'–CH_2–O–2', 4'–$(CH_2)_2$–O–2', 4'–CH_2–O–$N(R_1)$–2' y 4'–CH_2–$N(R_1)$–O–2'– en donde cada R_1 es, de modo independiente, H, un grupo protector o alquilo $C_1–C_{12}$.

Ciertos LNA fueron preparados y revelados en la literatura de patente, así como en una bibliografía científica (ver por ejemplo: patentes U. S. emitidas Nros. 7.053.207; 6.268.490; 6.770.748; 6.794.499; 7.034.133; 6.525.191; 7.696.345; 7.569.575; 7.314.923; 7.217.805; y 7.084.125.

También se proporcionan en la presente LNAs en donde el grupo 2'–hidroxilo del anillo de azúcar ribosilo se liga con el átomo de carbono 4' del anillo de azúcar, formando así una ligación de metilenoxi (4'–CH_2–O–2') para formar el resto de azúcar bicíclico (revisado en Elayadi *et al., Curr. Opinion Invens. Drugs,* 2001, 2, 558–561; Braasch *et al., Chem. Biol.,* 2001, *8* 1–7; y Orum *et al., Curr. Opinion Mol. Ther.,* 2001, 3, 239–243; ver también la patente U. S.: 6.670.461). La ligación puede ser un grupo metileno (–CH_2–) en puente con el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', para el que la expresión metilenoxi (4'–CH_2–O–2') LNA se usa para el resto bicíclico; en el caso de un grupo etileno en esta posición, se usa la expresión etilenoxi (4'–CH_2CH_2–O–2') LNA (Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455–456: Morita *etal., Bioorganic Medicinal Chemistry,* 2003, *11,* 2211–2226). Metilenoxi (4'–CH_2–O–2') LNA y otros análogos de azúcar bicíclicos muestran estabilidades térmicas dobles muy altas con ADN y ARN complementarios (T_m = +3 a +10 °C), estabilidad hacia la degradación 3'–exonucleolítica y buenas propiedades de solubilidad. Se describieron oligonucleótidos antisentido potentes y no tóxicos que comprenden LNAs (Wahlestedt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* 2000, 97, 5633–5638).

Un isómero de metilenoxi (4'–CH_2–O–2') LNA que también se analizó es alfa–L– metilenoxi (4'–CH_2–O–2') LNA que mostró tener una estabilidad superior contra una 3'–exonucleasa. Los alfa–L– metilenoxi (4'–CH_2–O–2') LNAs se incorporaron en gapmeros antisentido y quimetas que mostraban una potente actividad antisentido (Frieden *et al., Nucleic Acids Research,* 2003, *21,* 6365–6372).

Se describieron la síntesis y la preparación de los monómeros de metilenoxi (4'–CH_2–O–2') LNA adenina, citosina, guanina, 5–metil–citosina, timina y uracilo, junto con sus propiedades de oligomerización y reconocimiento de ácidos nucleicos (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607–3630). También se describieron los LNAs y su preparación en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

Los análogos de metilenoxi (4'–CH_2–O–2') LNA, fosforotioato–metilenoxi (4'–CH_2–O–2') LNA y 2'–tio–LNAs también fueron preparados (Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219–2222). También se describió la preparación de análogos de nucleósido bloqueados que comprenden dúplez de oligodesoxirribonucleótido como sustratos para polimerasas de ácido nucleico (Wengel et al., documento WO 99/14226). Por otra parte, la síntesis de 2'–amino–LNA, un nuevo análogo de oligonucleótido de alta afinidad restringido conformacionalmente se describió en la técnica (Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035–10039). Además, se prepararon 2'– Amino– y 2'–metilamino–LNAs y previamente se informó de la estabilidad térmica de sus dúplex con cadenas complementarias de ARN y ADN.

En una realización, el oligómero antisentido puede comprender al menos dos monómeros de LNA, más en particular, el oligómero antisentido puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 monómeros de LNA. Como se describe más abajo, la secuencia de nucleótidos contigua puede consistir en unidades de LNA y ADN (incluyendo grupos de ligación, tales como ligaciones de fosforotioato) o puede consistir en LNA y otros análogos de nucleósido y nucleótido. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos contigua puede comprender 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13 ó 14 nucleótidos de ADN, donde el resto de los nucleótidos comprende análogos de nucleósido, tales como unidades de LNA.

Determinadas realizaciones proporcionan ASOs de 10–100 nucleótidos de largo con nucleótidos de LNA incorporados en la secuencia. Determinadas realizaciones proporcionan ASOs que tienen un patrón de 4–8–4, correspondiente a cuatro nucleótidos de LNA, ocho nucleótidos no LNA gap (nt), cuatro nucleótidos de LNA, consecutivamente, de la dirección 5' a 3'. Así, un motivo de 4LNA–8nt–4LNA comprende un segmento de brecha de nucleótido central (nt) con ocho 2'–desoxinucleótidos consecutivamente ligados. El segmento de brecha nt en un ASO 4LNA–8nt–4LNA 16–mero se flanquea en ambos lados (5' y 3') por un segmento con alas. Cada segmento con alas en cada ASO tiene cuatro nucleótidos consecutivamente ligados. Cada nucleótido de cada segmento de alas en cada ASO tiene una modificación de azúcar de ácido nucleico bloqueado (LNA). Cada ligación de internucleótido a través de cada oligonucleótido antisentido de LNA es una ligación de fosforotioato (P=S), a pesar de que se prevé que algunas ligaciones de internucleótido en algunos ASOs de la invención puedan ser ligaciones distintas de un fosforotioato, incluyendo una ligación de fosfodiéster. También está dentro del alcance de la invención que el motivo de LNA de un ASO dado puede variar de 4LNA–8nt–4LNA, en otros motivos incluyendo otras combinaciones de motivos LNA–nt–LNA de una secuencia de nucleótidos totales más cortos o más largos. Determinadas realizaciones proporcionan ASOs de varios otros patrones de "ala–brecha–ala". El patrón de "ala–brecha–ala" se describe con frecuencia como "X–Y–Z", donde "X" representa el largo de la región de ala 5', "Y" representa el largo de la región de brecha y "Z" representa el largo de la región de ala 3'. En algunas realizaciones, X y Z son iguales, en otras realizaciones, son diferentes. En ciertas realizaciones, X y Z son de modo independiente 1 a 5 nucleósidos de largo. En ciertas realizaciones, Y tiene 8 a 12 nucleótidos de largo. ASOs de la invención también pueden ser un 10–mero, 11–mero, 12–mero, 13–mero, 14–mero, 15–mero, 16–mero, 17–mero, 18–mero, 19–mero o 20–mero (es decir un oligómero que tiene 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleótidos, respectivamente) o más, hasta 100 nucleótidos de largo. Otras realizaciones particulares proporcionan ASOs de 10 a 100 nucleótidos de largo, con LNAs incorporados en la secuencia en otros posibles patrones alternantes como se describió con anterioridad. En otras realizaciones particulares, puede haber más de un motivo de LNA–nt–LNA en una secuencia dada, de modo tal que una fórmula general de 5'–LNA_n–P–LNA_p–P–N_m–P–N_l–P–LNA_r–P– LNA_q–3' (fórmula 1), como se describe en la presente, es posible dentro de un ASO particular de 10 a 20 nucleótidos en total de largo.

En una realización particular, las ligaciones de internucleótido en la secuencia antisentido de oligómero se seleccionan de una ligación de fosfodiéster, fosfotriéster, fosforotioato, fosforoditioato, H–fosfonato o alquilfosfonato. En otra realización particular, todas las ligaciones de internucleótido son ligaciones de fosforotioato.

En una realización más particular, las ligaciones de internucleótido en la secuencia antisentido de oligómero se seleccionan de ligaciones de fosfodiéster y fosforotioato.

En una realización más particular, el oligómero antisentido comprende al menos dos nucleótidos modificados, más en particular, al menos dos unidades de ácido nucleico bloqueado (LNA), donde la unidad de LNA tiene una ligación de 2'O–alquil–4'C.

Una realización particular proporciona un oligómero antisentido que comprende al menos dos unidades de LNA ubicadas hacia el término 3' y el término 5' de ASO, más en particular, el ASO comprende al menos tres unidades de LNA ubicadas hacia el término 3' y el término 5' de ASO, más en particular, el ASO comprende al menos 4 unidades de LNA, y más en particular, las al menos 4 unidades de LNA se ubican hacia el término 3' y el término 5' de ASO, de modo tal que el ASO comprende una secuencia descrita por la fórmula 1 siguiente:

5'–LNA_n–P–LNAp–P–N_m–P–N_rP–LNA_r–P–LNA_q–3' (fórmula 1) en donde

LNA es una unidad de ácido nucleico bloqueado que tiene una ligación de 2'–O–Me–4'C;

P se selecciona de una ligación de fosfodiéster, fosfotriéster, fosforotioato, fosforoditioato, H–fosfonato o alquilfosfonato entre un LNA y un N contiguo o entre un N y un N contiguo o entre N y un LNA contiguo, o entre un LNA y un LNA contiguo, de una dirección 5' a 3' de la secuencia de formula (1); y en donde

N se selecciona de una unidad de nucleótido G, C, A, T, U o X;

n y r y p y q son cada uno, de modo independiente, un número entero seleccionado de 1, 2 ó 3;

l y m son cada uno, de modo independiente, un número entero de 1 a 22; y

en donde X se selecciona de una inosina, N^7–metilinosina, N^7–metil guanidina, 5–metil uridina, 5–metil–timidina, 5–fluorouridina, 5–fluorotimidina.

En una realización particular relacionada, el oligómero antisentido comprende al menos 6 ligaciones de fosforotioato. En otra realización particular relacionada, el oligómero antisentido comprende todas las ligaciones de fosforotioato.

En otra realización, se suministra el tratamiento de una infección por HBV en un mamífero, incluyendo un humano, en donde el tratamiento comprende la administración de una dosis eficaz de un oligómero antisentido de la presente

invención, donde dicho oligómero antisentido es esencialmente complementario de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1–13, de modo de tratar la infección por HBV y promover la seroconversión en el mamífero, incluyendo humano. La dosis eficaz puede variar de 0,01 mg/kg de peso corporal, a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, administrada una vez o dos veces por semana, durante 24, 36 ó 48 semanas o más, según se determina por un médico. La eficacia del tratamiento se puede determinar usando la cuantificación de carga viral u otra evidencia de infección, tales como por medición de HBeAg, HBsAg, niveles de HBV ADN, niveles de actividad de ALT, niveles de HBV séricos, y similares, permitiendo así el ajuste de la dosis de tratamiento, la frecuencia de tratamiento y el largo de tratamiento.

Ejemplos

Preparación de oligómeros

La síntesis del monómero y de los oligonucleótidos se prepara como se describe en las solicitudes de patentes publicadas y en la bibliografía especializada, lo que incluye la metodología a la que se hace referencia en el documento WO2007/112754 y la metodología descrita en el documento solicitud de patente de EE. UU. Publicada S20090143326; ambas se incorporan en la presente como referencia. Los LNA ASOs también se pueden adquirir, por ejemplo, de Exigon, como se describe en la presente.

El tratamiento de las células *in vitro* con oligonucleótido antisentido de LNA (Secuencia de dirección: SEQ ID NOs: 1–13 del genoma de HBV humano) puede llevarse a cabo utilizando la metodología expuesta en el documento WO2007/112754, incorporado como referencia en la presente y como se describe en la presente. El análisis de la inhibición de oligonucleótido antisentido de HBV por PCR cuantitativo en tiempo real de ARN tanto en modelo *in vitro* y modelo *in vivo* también puede llevarse a cabo utilizando la metodología expuesta en el documento WO2007/112754, incorporado en la presente como referencia, y como se describe en el presente. Además, es posible llevar a cabo experimentos *in vitro* utilizando oligómeros antisentido de la invención de 10 a 100 nucleótidos de longitud (dirigidos a las SEQ ID NOs 1–13 del genoma de HBV humano) la expresión del HBV y el subsiguiente análisis puede llevarse a cabo utilizando los métodos descritos en por ejemplo en WO2007/112754 o en J. Virol (1998) vol. 71, pp 2630– 2637; o en Yonsei Medical Journal (1995), col. 36, pp. 527–533, todos los cuales se incorporan en la presente como referencia. También se ha desarrollado un modelo de marmota para HBV en donde los marmotas (Marmoto monax) pueden ser infectados con el virus de hepatitis de Marmota (WHV, Woodchucks hepatitus Virus) resultando infecciones agudas o crónicas que modelan muchos aspectos de la infección de HBV humana [Menne S y Cote PJ (2007) World J Gastroenterol 13, 104–124 y Menne S et al. (2002) Intervirology 45, 237–250] incorporado en la presente como referencia. El modelo de marmota, descrito por Menne and Cote and Menne et. al., puede utilizarse para examinar la infección crónica y para medir el ADN viral en el suero utilizando la hibridación por transferencia Southern y se miden los niveles de los antígenos virales mediante ELISA.

Actividad biológica

(A) Resultados de hepatitis B humana

EJEMPLO 1: Inhibición antisentido de la expresión del virus de hepatitis B en células HeoG2 2.2.15 con oligonucleótidos antisentido de LNA

Se compraron en Exiqon oligonucleótidos de ácido nucleico bloqueados. Los oligonucleótidos antisentido de LNA ensayados tienen un total de 16 nucleótidos de longitud, cada uno ellos un motivo 4LNA–8nt–4LNA y comprenden cada uno de ellos un segmento de huelgo de nucleótidos central (nt) que tiene ocho 2'–desoxinucleótidos consecutivamente unidos. El segmento de ntgap en cada ASO de 16 meros está flanqueado en ambos lados (5' y 3') por un segmento de ala. Cada segmento de ala en cada ASO tiene cuatro nucleótidos consecutivamente unidos. Cada nucleótido de cada segmento de ala en cada ASO tiene una modificación de azúcar de ácido nucleico bloqueado (LNA). Cada enlace internucleotídico a través de cada oligonucleótido antisentido de LNA es un enlace fosforotioato (P=S), si bien se prevé que algunos enlaces internucleotídicos en algunos ASOs de la invención puedan ser enlaces distintos de un fosforotioato, lo que incluye un enlace fosfodiéster. También se halla dentro de los alcances de la invención que el motivo de LNA puede variar de 4LNA–8nt–4LNA, a otros motivos descritos en la presente que incluyen otras combinaciones de motivos de LNA–nt–LNA con una secuencia nucleotídica más larga o más corta. Los ASO de LNA 16–mero se evaluaron para establecer su capacidad de inhibir la expresión del virus de la hepatitis B en una línea de células de hepatoblastoma humano, HepG2.2.15, lo que se determinó mediante la medición de los niveles de HBsAg, HBeAg y HBV ADN.

Todos los oligonucleótidos contenían enlaces fosforotioato, tenían 16 nucleótidos de longitud y contenían ácidos nucleicos bloqueados en un motivo 4–8–4, que comprende LNA en las 4 muestras en los extremos 5' y en los 4 nucleótidos en los extremos 3'. Las secuencias de los oligonucleótidos antisentido (incorporadas en la presente como referencia como SEQ ID NOs 14–23), se presentan en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos antisentido

Nombre	Secuencia	Número de acceso de secuencia diana de HBV: U95551	Valores de IC_{50} (nM)			Inhibición de ASDN de HBV a 0,6 nM
			HBsAg	HBeAg	citotox	
RH1 (SEQ ID NO: 14)	GAGAGAAGTCCACCAC	nt 258–273	1,31	1,35	23,6	34%
RH2 (SEQ ID NO: 15)	TGAGAGAAGTCCACCA	nt 259–274	1,06	0,97	8,7	–21%
RH3 (SEQ ID NO: 16)	GAGGCATAGCAGCAGG	nt 414–429	1,10	1,16	39,3	26%
RH4 (SEQ ID NO: 17)	TGAGGCATAGCAGCAG	nt 415–430	1,04	0,97	19,9	34%
RH6 (SEQ ID NO: 18)	GATGAGGCATAGCAGC	nt 417–432	0,92	0,88	9,8	26%
RH6 (SEQ ID NO: 19)	GATGGGATGGGAATAC	nt 602–617	1,46	0,62	14,3	30%
RH7 (SEQ ID NO: 20)	GGCCCACTCCCATAGG	nt 639–654	0,90	0,49	22,4	40%
RH8 (SEQ ID NO: 21)	AGGCCCACTCCCATAG	nt 640–655	1,84	1,27	9,0	–40%
RH9 (SEQ ID NO: 22)	CTGAGGCCCACTCCCA	nt 643–658	1,13	0,91	8,1	22%
Control: (SEQ ID NO: 23)	GTGTAACACGTCTATA		5,04	5,77	17,8	–51%

Se cultivaron monocapas de células HepG2 2.2.15, una línea celular de hepatoblastoma humano, establemente transfectadas con un plásmido que tenía dímeros de cabeza–a–cola del gen de HBV, en RPMI (Invitrogen #22400–089), FBS al 10%, gentamicina (10 µg/ml) a 37 °C, 5% de CO_2 y se dividieron 1:3 cuando eran confluentes 1:3.

Se prepararon soluciones de trabajo de oligonucleótidos antisentido en agua estéril y se diluyeron a una concentración de 4,25 µM para la transfección. 10 µL de oligonucleótido se mezclaron con 130 µL de Opti–Mem (Invitrogen). 100 µL de la mezcla de oligonucleótidos se mezclaron con 100 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se sometieron a incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se prepararon soluciones seriadas diluyendo 70 µL en 140 µL de Opti–Mem. 50 µL de la mezcla diluida se añadieron a una placa de 96 cavidades y se añadieron 100 µL de células HepG2 2.2.15 a una concentración de 2,8 X 10^5/mL. Las células transfectadas se sometieron a incubación a 37 °C, 5% de CO_2 durante cuatro días con un cambio de medio en el día 2. Se retiró el material sobrenadante en el día 4 para evaluar los HBsAg, HBeAg y el ADN de HBV secretados, y se determinó la viabilidad de las células en la monocapa de células restante usando CellTiter–Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midieron los niveles de HBsAg usando el kit Abazyme HBVsAg, catálogo # EL10018, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midieron los niveles de HBeAg utilizando el kit BioChain HBV e Ag, catálogo #K031006096 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para el análisis del ADN del HBV en el material sobrenadante, se extrajo el ADN de 50 µl de material sobrenadante utilizando el kit QiaAmp 96 DNA Blood (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 5 µL de ADN se utilizaron para el análisis TaqMan usando los cebadores y condiciones descritos [Thimme R et al. (2003) J. Virol. 77, 68–76]. Se utilizó una curva estándar en base a cantidades conocidas de un clon de plásmido de ADN de HBV para calcular los equivalentes de genoma de HBV secretados en el medio.

La inhibición de la viabilidad de las células, el ADN de HBV y los antígenos secretados se normalizaron utilizando valores de células que experimentaban el procedimiento de transfección en la ausencia de oligonucleótidos. Los datos se analizaron mediante regresión no lineal y se ajustaron en una curva de log(inhibidor) vs. respuesta usando GraphPad Prism5.

Los resultados del tratamiento de las células HepG2 2.2.15 con oligómeros antisentido se muestran en la Tabla 1. Los oligómeros dirigidos contra las secuencias de HBV inhibieron la producción y la secreción de HBsAg y HBeAg con una potencia superior a la del oligómero de control. El oligómero de control también inhibió la producción y la secreción de antígenos pero esto puede deberse a la citotoxicidad por cuanto había una diferencia de solamente el triple entre los valores de IC_{50} para la inhibición y la citotoxicidad del antígeno. Los oligómeros antisentido dirigidos contra las secuencias del HBV tenían una diferencia muy superior entre los valores de IC_{50} en cuanto a la inhibición y la citotoxicidad del antígeno. Los oligómeros antisentido RH1, RH3, RH4 y RH7 presentaban las mayores diferencias y también mostraron una inhibición constante del ADN del HBV secretado. La inhibición del ADN del HBV no incrementó por arriba del 50% por lo que no se calcularon los valores de IC_{50}. En la Tabla 1 se muestran la inhibición porcentual del ADN del HBV con una concentración de 0,6 nM de oligómero, una concentración en la que no se observó ninguna citotoxicidad para ningún oligómero y cercano a los valores de IC_{50} en cuanto a la inhibición del HBsAg y HBeAg.

EJEMPLO 2: Inhibición antisentido de la expresión del virus de hepatitis B SV40 en células HepAD38 (Tet–HBV) con un oligonucleótido antisentido de LNA

Se diseñó un oligonucleótido antisentido dirigido al HBV con la secuencia GAGGCATAGCAGCAGG (SEQ ID NO: 16), complementaria de la secuencia de ADN mencionada en SEQ ID NO: 4 y el GEN BANK Accession No. U95551.1, incorporada en la presente como SEQ ID NO: 16. El oligonucleótido antisentido de LNA tiene una longitud total de 16 nucleótidos, con un motivo 4–8–4 LNA, en donde el ASO tiene un segmento de huelgo central que tiene ocho 2'–desoxinucleótidos unidos consecutivamente entre sí. El segmento de huelgo está flanqueado en ambos lados (5' y 3') por un segmento de ala. Cada segmento de ala tiene cuatro nucleótidos consecutivamente ligados. Cada nucleótido de cada segmento de ala tiene una modificación de azúcar de ácido nucleico bloqueado (LNA). Cada enlace internucleotídico a través del polinucleótido antisentido de LNA es un enlace fosforotioato (P=S). Cada citosina del oligonucleótido antisentido de LNA es una 5–metilcitosina. El oligonucleótido antisentido de LNA se evaluó en cuanto a su estabilidad para reducir el ARNm de HBV en las células HepAD38.

Se transfectaron células HepAD38 utilizando la electroporación con 741 nM, 2.222 nM, 6.667 nM y 20.000 nM de oligonucleótidos antisentido durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 24 horas. Se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de HBV mediante PCR en tiempo real. Se ajustaron los niveles de ARNm de HBV de acuerdo con el contenido total de ARN medido por RIBOGREEN. El conjunto de sondas de cebador RTS3372 (secuencia directa ATCCTATCAACACTTCCGGAAACT, designada en la presente como SEQ ID NO: 24; la secuencia inversa ACGCGGCGATTGAG, designada en la presente como SEQ ID NO: 25, la secuencia de sonda AAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACG, designada en la presente como SEQ ID NO: 26) se utilizó para medir los niveles de ARNm. Los datos se presentan en la Tabla 2, expresados como inhibición porcentual de los niveles de ARNm en comparación con las células no tratadas. El oligonucleótido antisentido de LNA redujo los niveles de ARNm en función de la dosis.

También se ensayó el oligonucleótido antisentido de LNA en las mismas condiciones que con el conjunto de sonda de cebador RTS3373MGB (secuencia directa) CCGACCTTGAGGCATACTTCA, designada en la presente como SEQ ID NO: 27; secuencia inversa AATTTATGCCTACAGCCTCCTAGTACA, designada en la presente como SEQ ID NO: 28, secuencia de sonda TTAAAGACTGGGAGGAGTTG, designada en la presente como SEQ ID NO: 29). Los resultados se presentan en la Tabla 3 como inhibición porcentual de HBV, referido a las células del control no tratadas. Como se ilustra en la Tabla 3, el oligonucleótido antisentido de LNA redujo los niveles de ARNm de HBV en función de la dosis.

Tabla 2: Inhibición antisentido dependiente de la dosis de ARN de HBV en las células HepAD38, medida con RTS3372

Dosis (nM)	% de inhibición
741	0
2222	30
6667	54
20000	72

Tabla 3: Inhibición antisentido, dependiente de la dosis, ARNm de HBV en células HepAD38, medida con RTS3373MGB

Dosis (nM)	% de inhibición
741	0
6667	9
20000	50

EJEMPLO 3: Inhibición antisentido de la expresión del virus de hepatitis B o SV40 T en células THT1 con un oligonucleótido antisentido de LNA

El oligonucleótido antisentido de LNA descrito en el Ejemplo 3 se evaluó para establecer su capacidad de reducir el ARNm de HBV en las células THT1, también conocidas como células HepG2 2.2.15. Estas células se transfectaron mediante electroporación con 741 nM, 2.222 nM, 6.667 nM y 20.000 nM de oligonucleótidos antisentido durante un periodo de aproximadamente 24 horas. Se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de HBV utilizando PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles de ARNm de HBV se ajustaron de acuerdo con el contenido total de ARN medido mediante RIBOGREEN. Los datos se presentan en la Tabla 4, expresados como inhibición porcentual de los niveles de ARNm en comparación con las células sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 4, el oligonucleótido antisentido de LNA redujo los niveles de ARNm de HBV en función de la dosis.

Tabla 4: inhibición antisentido dependiente de la dosis de ARNm de HBV en células HepG2

Dosis (nM)	% de inhibición
741	34
2222	38
6667	42
20000	57

(B) Evaluación de oligómeros antisentido en modelos animales

EJEMPLO 4: evaluación de la efectividad de ASO para reducir la carga de HBV en ratones transgénicos

Se utiliza un linaje de ratones transgénicos HBV 1.3.32 (designación oficial, genoma de Tg[HBV 1.3]Chi32) para evaluar la efectividad del oligómeros antisentido en la reducción de la carga de HBV en un modelo animal. Los ratones transgénicos replican el HBV en elevados niveles en el hígado y riñones sin ninguna evidencia de fitopatología. El linaje 1.3.32 se expande mediante cruza inversa repetitiva contra la cepa parental C57BL/6 y a continuación se cría una generación contra ratones B10D2 para producir los híbridos F1 que han de utilizarse en todos los ensayos descritos. Los ratones se agrupan de acuerdo con la edad (de 6 a 10 semanas), sexo (macho) y niveles de HBsAg (antígeno de superficie de hepatitis) en el suero (determinado mediante un kit disponible en el comercio ofrecido por Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

A) Los ratones transgénicos de HBV se tratan con oligómeros de ADN de HBV durante 7 – 21 días mediante administración intravenosa o subcutánea y a continuación se los sacrifica. Más tarde se analizan los hígados de ratón para determinar la reducción en los niveles de ADN y ARN de HBV. Se utilizan métodos de transferencia Southern o de QPCR en tiempo real para determinar los niveles de ADN; pueden utilizarse métodos de transferencia Northern o de tiempo real para determinar los niveles de transcriptos de ARN de HBV. También se analiza el suero de ratón para establecer los niveles de producción de HBeAg y HBsAg para lo cual se utilizan kits de ELISA para HBeAg y HBsAg disponibles en el comercio.

Se analiza el ADN mediante transferencias Southern y se sondea con una sonda de ADN de HBV ^{32}P–etiquetada de acuerdo con el siguiente procedimiento. El ADN de los hepatocitos infectados con HBV se extrae, se separa por electroforesis en gel de agarosa y se transfiere a un filtro de nitrocelulosa utilizando metodologías conocidas por los expertos en la técnica. Se utiliza una sonda de ADN de HBV ^{32}P–nick traducida. En el grupo de control viral, se cosechan los hígados los días 2, 6, 8, 10, 14, 18 y 20. En los grupos tratados con fármacos, los hígados se cosechan los días 8, 14 y 20. Las muestras de hígado se muelen en un mortero provisto de cavidades en un tubo de microcentrífuga que contiene tampón de lisis. Después de incubar durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, los tubos se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido para almacenar. Se purifica el ADN utilizando

extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. El ADN de hígado cortado con Hind III, que no se cortó dentro del transgén, se fracciona mediante electroforesis en gel de agarosa y a continuación se procesa para la hibridación por transferencia Southern utilizando el método de transferencia alcalino con nitrocelulosa o con otra membrana adecuada.

Se analiza el ARN mediante transferencias Northern y se sondea con una sonda de ADN de HBV ^{32}P–etiquetada de acuerdo con el siguiente procedimiento. Las muestras de hígado se procesan para la extracción de ARN utilizando reactivo Trizol de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, unas muestras de tejidos se homogeneizan en 1 ml de reactivo TRIZOL por cada 50 a 100 mg utilizando un homogeneizador de vidrio–Teflon o motorizado (por ejemplo Polytron, Tekmar's TISSUEMIZER). Se somete a incubación la muestra homogeneizada durante cinco minutos a temperatura ambiente y a continuación se centrifuga para remover los residuos celulares.

Transferir el material sobrenadante a un tubo nuevo. Añadir 0,2 ml de cloroformo por 1 mL de reactivo TRIZOL. Tapar los tubos de las muestras de manera segura. Someter las muestras a vórtice vigorosamente durante 15 segundos y someterlas a incubación durante 3 minutos a no más de 12.000 rpm durante 8 minutos a una temperatura de 2 a 8 °C. Transferir la capa acuosa superior con cuidado sin perturbar la interfaz en el tubo fresco. Medir el volumen de la fase acuosa (el volumen de la fase acuosa es de aproximadamente el 60% del volumen del reactivo TRIZOL utilizado para la homogeneización). Precipitar el ARN de la fase acuosa mediante mezclado con alcohol isopropílico. Utilizar 0,5 ml de alcohol isopropílico por 1 ml de reactivo TRIZOL utilizado para la homogenización inicial. Incubar las muestras a una temperatura de 15 a 30 °C durante 10 minutos y centrifugar a no más de 12.000 x g durante 10 minutos de 2 a 4 °C. El precipitado de ARN, frecuentemente invisible antes de la centrifugación, forma unas perlas similares a gel en el costado y el fondo del tubo. Remover el material sobrenadante por completo. Lavar las perlas una vez con etanol al 75%, añadir por lo menos 1 ml de etanol al 7% por 1 ml de reactivo TRIZOL utilizado para la homogeneización inicial. Mezclar las muestras mediante vórtice y centrifugar a no más de 7.500 x g durante 5 minutos de 2 a 8 °C. Repetir el procedimiento de lavado anterior una vez. Remover todo el etanol sobrante. Secar al aire o bajo vacío los pellets de ARN durante 5–10 minutos. Disolver el ARN en agua tratada con DEPC haciendo pasar la solución algunas veces a través de la punta de una pipeta. El ARN se resuelve en geles de formaldehído agarosa y se transfiere a nitrocelulosa o a otra membrana adecuada. Se utiliza una sonda de ADN de HBV ^{32}P–nick traducida para detectar los transcritos de HBV.

Los fármacos reciben una evaluación en un escala de 0 (sin actividad) a ++++ (elevada actividad).

EJEMPLO 5: Evaluación de oligómeros mediante marmotas infectadas con HBV.

Se puede infectar marmotas (Marmoto monax) con el virus de hepatitis de marmota (WHV), lo cual da como resultado infecciones crónicas o agudas que modelan muchos aspectos de la infección por HBV humano [Menne S y Cote PJ (2007) World J Gastroenterol 13, 104–124]. La infección crónica puede establecerse mediante infección de neonatos con WHV7P1. El ADN viral en el suero puede medirse mediante hibridación por transferencia Southern y antígenos virales mediante ELISA [Menne S et al. (2002) Intervirology 45, 237–250].

La secuencia del ADN de WHV difiere de la del HBV por lo que es necesario optimizar los oligómeros antisentido para WHV. Para esta finalidad, existe un sistema *in vitro* que ha sido utilizado anteriormente para la evaluación de ARNsi [Meng Z et al (2009) Virology 384, 88–96].

Las marmotas crónicamente infectadas con WHV se tratan con oligómeros antisentido mediante administración intravenosa o subcutánea. El régimen de dosificación dependerá de la determinación precedente de la vida media intrahepática del oligómero antisentido pero será de una a dos veces por semana. La duración del tratamiento será durante más de 6 meses. Los niveles de suero de ADN viral, los antígenos virales y los anticuerpos de los antígenos virales se medirán periódicamente durante el tratamiento y durante al menos 3 meses después del tratamiento. Las reducciones en ADN viral y en los antígenos virales durante el seguimiento son indicativos de un resultado positivo. El tratamiento prolongado de las marmotas crónicamente infectadas con WHV mediante análogos de nucleósidos resulta en una recrudescencia viral dentro de los 1 – 2 meses de la interrupción del tratamiento. Las reducciones en el ADN del WHV y la seroconversión, definidos como pérdida de antígeno viral y ocurrencia de antibiótico del antígeno, son también indicativos de un resultado positivo del tratamiento.

Los compuestos de oligonucleótidos antisentido destinados a ensayos en los pacientes infectados con HBV son esencialmente complementarios a cualquiera de las SEQ: ID NOs: 1–13, mostradas a continuación. Estas secuencias se conservan a través de más del 95% de los genotipos geográficos A y H, de HBV humano, enumerados en la **Figura 6**.

Para los humanos, el régimen de tratamiento es típicamente de 48 semanas, similar al utilizado para Peg–IFN (inyección SC semanal a lo largo de 48 semanas), pero no proveyéndose efectos secundarios sistémicos similares a los del INF, basado en terapias similares llevadas a cabo con oligómeros antisentido de LNA para tratar el virus de hepatitis C (HCV), donde no se observaron efectos secundarios sistémicos (resultados no publicados). Los resultados previstos incluyen la reducción en el ADN del HBV y en los antígenos del suero, una seroconversión de HBeAg mayor que la observada con el tratamiento en el que se utiliza Peg–IFN en pacientes HBeAg positivos, y ADN de HBV indetectable y/o una seroconversión de HBsAg mayor que la observada en el tratamiento en el que se

utiliza Peg–IFN en pacientes HBeAg negativos.

Listado de secuencias

<110> Hamatake, Robert K.

<120> INHIBIDORES ANTISENTIDO DE HBV

<130> PR63959WO

<150> 61/252380
<151> 2009-10-16

<160> 29

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 1
cctgctggtg gctccagttc 20

<210> 2
<211> 42
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 2
agagtctaga ctcgtggtgg acttctctca attttctagg gg 42

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 3
tggatgtgtc tgcggcgttt tatcat 26

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 4
catcctgctg ctatgcctca tcttctt 27

<210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 5
caaggtatgt tgcccgt 17

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 6
tgtattccca tcccatc 17

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 7
cctatgggag tgggcctcag 20

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 8
tggctcagtt tactagtgc 19

<210> 9
<211> 17
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 9
gggctttccc ccactgt 17

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 10
tcctctgccg atccatactg cggaactcct 30

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 11
cgcacctctc tttacgcgg 19

<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 12
ggagtgtgga ttcgcac 17

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 13
gaagaagaac tccctcgcct 20

<210> 14
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 14
gagagaagtc caccac 16

<210> 15
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 15
tgagagaagt ccacca 16

<210> 16
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 16
gaggcatagc agcagg 16

<210> 17
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 17
tgaggcatag cagcag 16

<210> 18
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 18
gatgaggcat agcagc 16

<210> 19
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 19
gatgggatgg gaatac 16

<210> 20
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 20
ggcccactcc catagg 16

<210> 21
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 21
aggcccactc ccatag 16

<210> 22
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 22
ctgaggccca ctccca 16

<210> 23
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 23
gtgtaacacg tctata 16

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 24
atcctatcaa cacttccgga aact 24

<210> 25
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 25
cgacgcggcg attgag 16

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 26
aagaactccc tcgcctcgca gacg 24

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 27
ccgaccttga ggcatacttc a 21

<210> 28
<211> 27
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 28
aatttatgcc tacagcctcc tagtaca 27

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 29
ttaaagactg ggaggagttg 20

REIVINDICACIONES

1. Un oligómero antisentido de virus de hepatitis B para usar en el tratamiento de infección por virus de hepatitis B y condiciones relacionadas con el virus de hepatitis B al reducir la cantidad de un ADN de virus de hepatitis B y antígeno HBV en una célula de mamífero o un organismo, en donde el oligómero antisentido del virus de hepatitis B comprende:

a) esencialmente la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs 14–22, o

b) una secuencia que es esencialmente complementaria de cualquiera de las SEQ ID Nos 1–13; en donde al menos 4 de las unidades de nucleósido en el oligómero antisentido de virus de hepatitis B son unidades de LNA que tienen una ligación de 2'–O–alquil–4'–C en donde el alquilo es un alquilo C_1–6 sustituido o no sustituido y en donde al menos dos de las ligaciones de internucleósido presentes entre las unidades de nucleósido de la secuencia de nucleósidos contiguos son ligaciones de internucleósido de fosforotioato; o una de sus sales, solvatos, hidratos o ésteres.

2. Un oligómero antisentido de virus de hepatitis B para usar según la reivindicación 1, en donde los nucleósidos se ligan, de modo que el oligómero comprende una o varias ligaciones de fosfodiéster, fosfotriéster, fosforoditioato, H–fosfonato o alquilfosfonato.

3. Un oligómero antisentido de virus de hepatitis B para usar según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el antígeno HBV es HBsAg.

4. Un oligómero antisentido de virus de hepatitis B para usar según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el antígeno HBV es HBeAg.

5. Una formulación farmacéutica para usar en el tratamiento de infección por virus de hepatitis B en un mamífero que comprende una cantidad efectiva de un oligómero antisentido de virus de hepatitis B o una de sus sales, solvatos, hidratos o ésteres farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1–4 y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

6. Una formulación farmacéutica para usar en el tratamiento de infección por virus de hepatitis B en un mamífero según la reivindicación 5, que también comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

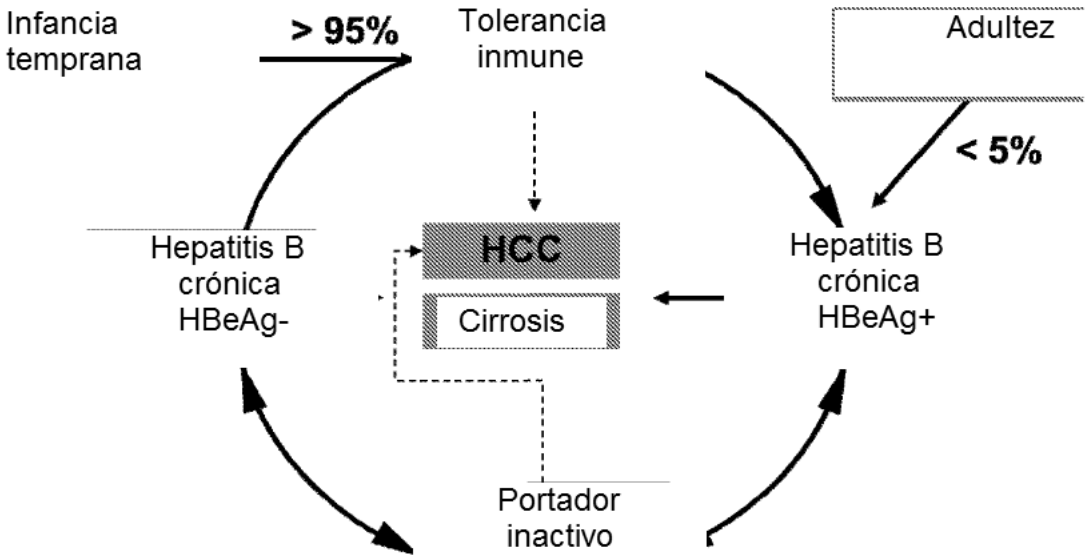
7. Un oligómero antisentido de virus de hepatitis B para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la condición relacionada con el virus de hepatitis B es una condición relacionada con el virus de hepatitis B humano de cualquiera de: ictericia, cáncer de hígado, inflamación hepática, fibrosis hepática, cirrosis hepática, insuficiencia hepática, enfermedad inflamatoria hepatocelular difusa, síndrome hemofagocítico y hepatitis sérica.

8. Un oligómero antisentido de virus de hepatitis B para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en combinación con un agente terapéutico adicional seleccionado de un agente quimioterapéutico, un antibiótico, un analgésico, un agente antiinflamatorio no esteroide (NSAID), un agente antifúngico, un agente antiparasitario, un agente antinauseoso, un agente antidiarreico y un agente inmunosupresor.

9. Un oligómero antisentido de virus de hepatitis B para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en combinación con un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional es un agente HBV seleccionado de interferón alfa–2b, interferón alfa–2a e interferón alfacon–1 (pegilado y no pegilado), ribavirina; un inhibidor de replicación de HBV ARN; un segundo oligómero antisentido; una vacuna terapéutica HBV; una vacuna profilática HBV; lamivudina (3TC); entecavir; tenofovir; telbivudina (LdT); adefovir; y una terapia de anticuerpos HBV (monoclonal o policlonal).

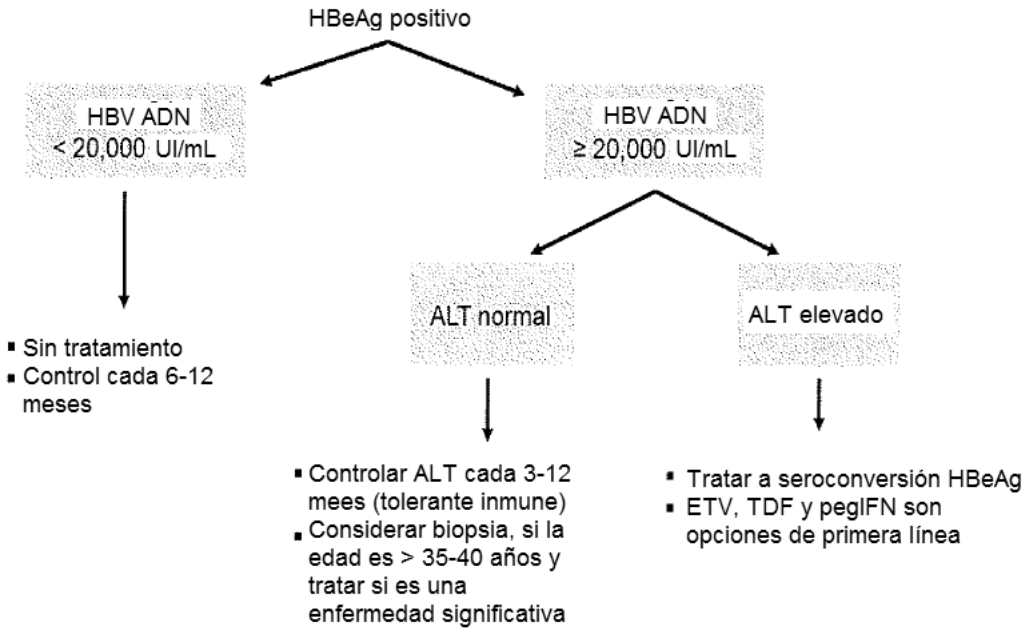
10. Un oligómero antisentido de virus de hepatitis B para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en combinación con un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional es un agente HCV seleccionado de interferón alfa–2b, interferón alfa–2a e interferón alfacon–1 (pegilado y no pegilado); ribavirina; un inhibidor de replicación de HCV ARN; un agente antisentido HCV; una vacuna terapéutica de HCV; un inhibidor de HCV proteasa; un inhibidor de HCV helicasa; y una terapia de anticuerpo monoclonal o policlonal HCV.

Figura 1



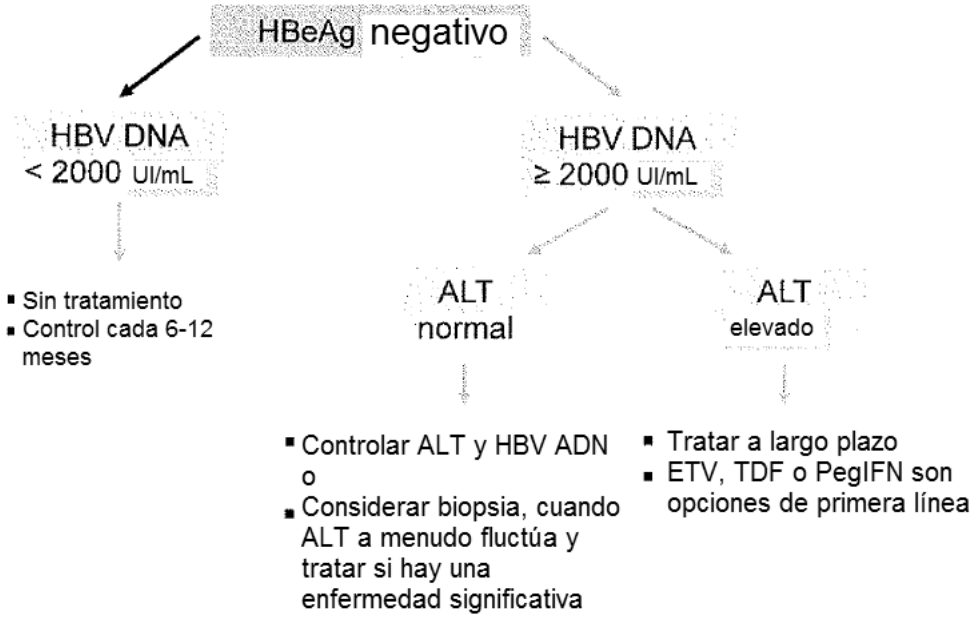
Historia natural de infección por HBV

Figura 2



Pacientes con HBV con enfermedad compensada: HBeAg positivo

Figura 3



Pacientes con HBV con enfermedad compensada: HBeAg negativo

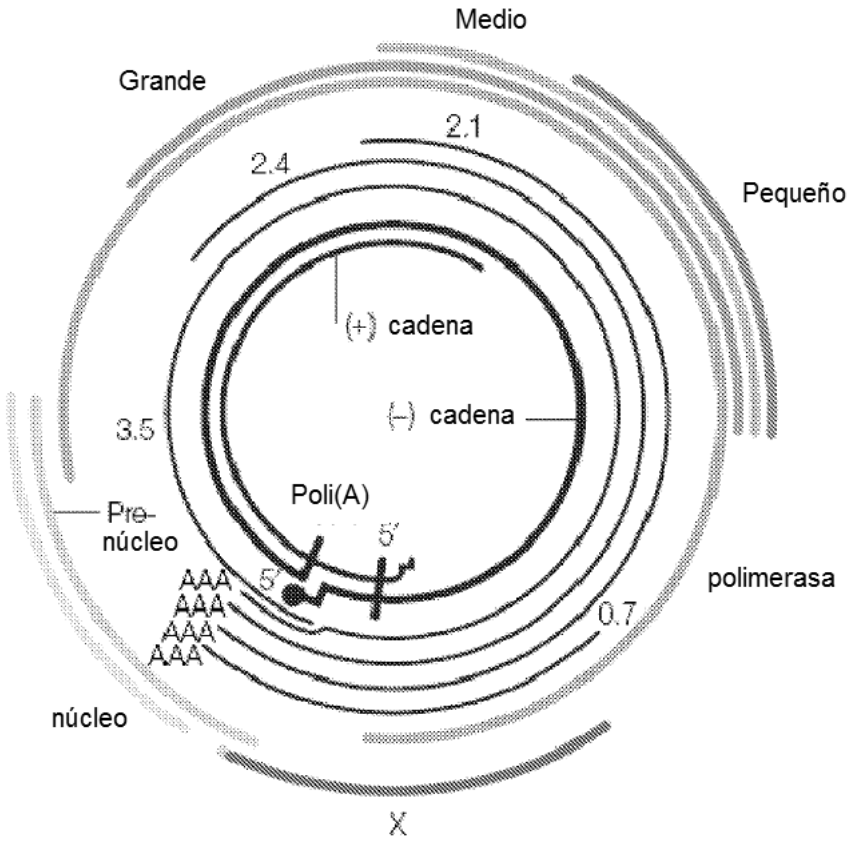

Transcripción de HBV
Medio
Grande
2.1
2.4
Pequeño
(+) cadena
(–) cadena
3.5
Poli(A)
Pre-
núcleo
5'
5'
AAA
AAA
AAA
AAA
polimerasa
0.7
núcleo
X

Figura 4

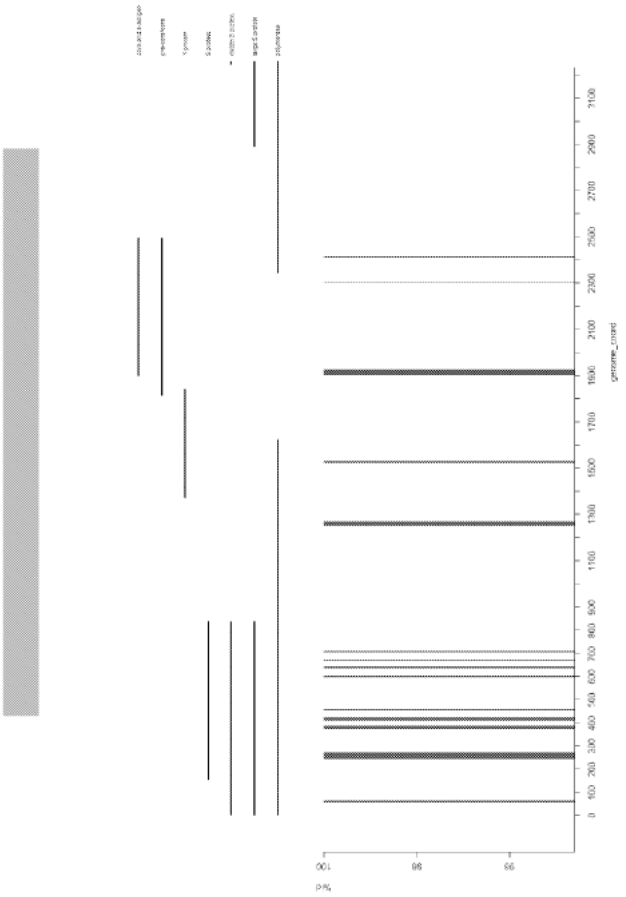


Figura 5

Genotipos geográficos de HBV humanos

Genotipo de HBV	Área geográfica
A	Europa occidental del norte, Norteamérica, América Central
B	Indonesia, China, Vietnam
C	Asia Oriental, Corea, China, Japón, Polinesia, Vietnam
D	área mediterránea, Este Medio, India
E	África
F	Americanos nativos, Polinesia
G	Estados Unidos, Francia
H	América Central

Figura 6