

COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS B

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

La presente solicitud de patente reivindica el beneficio de la prioridad de la solicitud estadounidense con número de serie 62/276,722, presentada el 08 de enero de 2016, de la solicitud estadounidense con número de serie 62/343,514, presentada el 31
10 demayor 2016, de la solicitud estadounidense con número de serie 62/345,476, presentada el 03 de junio de 2016, de la solicitud estadounidense con número de serie 62/409,180, presentada el 17 de octubre de 2016 y de la solicitud estadounidense con número de serie 62/420,969, presentada el 11 de noviembre de 2016, cuyas solicitudes
15 se incorporan a la presente mediante esta referencia.

Antecedentes

El virus de la hepatitis B (abreviado como "VHB") es un miembro de la
20 familia Hepadnavirus. La partícula del virus (a menudo denominada virión) incluye una envoltura externa de lípido y un núcleo de nucleocápside icosaédrica compuesto por proteína. La nucleocápside envuelve el ADN viral y una ADN polimerasa que tiene una actividad de transcriptasa inversa. La envoltura externa contiene proteínas
25 incrustadas que se involucran en la unión viral de células susceptibles, típicamente hepatocitos del hígado, y el ingreso en estas. Además de las partículas virales infecciosas, pueden hallarse cuerpos esféricos y filamentosos que carecen de un núcleo en el suero de individuos infectados. Estas partículas no son infecciosas y están
30 compuestas por el lípido y proteína que forman parte de la superficie del virión, que se denomina antígeno de superficie (HBsAg), y se produce de forma excesiva durante el ciclo vital del virus.

El genoma del VHB está compuesto por ADN circular, pero es inusual debido a que el ADN no es completamente de cadena doble. Un extremo de la cadena de longitud completa se une a la ADN polimerasa viral.

5 El genoma tiene una longitud de 3020-3320 nucleótidos (para la cadena de longitud completa) y 1700-2800 (para la cadena más corta). El sentido negativo (no codificante) es complementario al ARNm viral. El ADN viral se halla en el núcleo poco después de la infección de la célula. Hay cuatro genes conocidos codificados por el genoma,

10 denominados C, X, P y S. El gen C (HBcAg) codifica la proteína nuclear y su codón de inicio se ve antecedido por un codón de iniciación AUG anterior en el marco a partir del cual se produce la proteína prenuclear. El HBeAg se produce mediante procesamiento proteolítico de la proteína prenuclear. El gen P codifica la ADN

15 polimerasa. El gen S es el gen que codifica el antígeno de superficie (HBsAg). El gen HBsAg es un marco de lectura abierto largo pero contiene tres codones de "inicio" (ATG) en el marco que dividen el gen en tres partes, pre-S1, pre-S2 y S. Debido a los múltiples codones de inicio, se producen polipéptidos de tres distintos

20 tamaños, denominados grande, mediano y pequeño. La función de la proteína codificada por el gen X no se comprende completamente, pero se asocia con el desarrollo del cáncer de hígado. La replicación del VHB es un proceso complejo. Si bien la replicación se produce en el hígado, el virus se esparce hacia la sangre, donde se hallan

25 proteínas virales y anticuerpos contra estas, en personas infectadas. La estructura, replicación y biología del VHB se analiza en D. Glebe y C.M. Bremer, *Seminars in Liver Disease*, Vol. 33, n.º 2, páginas 103-112 (2013).

30 La infección de los seres humanos con VHB puede provocar una enfermedad inflamatoria infecciosa del hígado. Los individuos infectados pueden no presentar síntomas durante muchos años. Se

estima que alrededor de un tercio de la población mundial se ha infectado en algún momento de su vida, inclusive 350 millones que son portadores crónicos.

5 El virus se transmite mediante exposición a sangre infecciosa o fluidos corporales. La infección perinatal también puede ser una vía principal de infección. La enfermedad aguda provoca una inflamación del hígado, vómitos, ictericia y posiblemente la muerte. La hepatitis B crónica puede finalmente provocar cirrosis y cáncer de hígado.

10

Si bien la mayoría de las personas infectadas con VHB eliminan la infección mediante la acción de su sistema inmunitario, algunas personas infectadas padecen un curso de infección agresivo (hepatitis fulminante), mientras que otros se ven infectados de forma crónica, lo que aumenta la probabilidad de padecer una enfermedad hepática. Se encuentran aprobados en la actualidad varios medicamentos para el tratamiento de la infección por VHB, pero los individuos infectados responden con diversos grados de éxito a estos medicamentos, y ninguno de estos medicamentos eliminan el virus de la persona infectada.

20

El virus de la hepatitis D (VHD) es un virus de ARN envuelto, pequeño y circular que puede propagarse solamente en presencia del virus de la hepatitis B (VHB). En particular, el VHD requiere la proteína del antígeno de la superficie del VHB para propagarse. La infección con VHB y VHD produce complicaciones más severas en comparación con la infección con VHB solo. Estas complicaciones incluyen una mayor probabilidad de experimentar una insuficiencia renal en infecciones agudas y una rápida evolución a cirrosis hepática, con una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de hígado en infecciones crónicas. Junto con el virus de la hepatitis B, la hepatitis D tiene la mayor tasa de mortalidad de todas las infecciones por hepatitis. Las vías

25

30

de transmisión del VHD son similares a las del VHB. La infección se limita en gran parte a personas con un riesgo elevado de infección por VHB, particularmente usuarios de fármacos inyectables y personas que reciben concentrados de factor de coagulación.

5

Por lo tanto, hay una necesidad continua de composiciones y métodos para el tratamiento de la infección por VHB en animales (por ejemplo, seres humanos), así como para el tratamiento de la infección por VHB/VHD en animales (por ejemplo, seres humanos).

10

Compendio

La presente invención proporciona combinaciones terapéuticas y métodos terapéuticos que son útiles para el tratamiento de
15 infecciones virales tales como VHB.

Los ejemplos presentados en la presente describen los resultados de diversos estudios de combinación (por ejemplo, combinación doble) mediante el uso de agentes que poseen distintos mecanismos de acción
20 contra el VHB. Tal como se describe en la presente, varias combinaciones de agentes demostraron una interacción sinérgica inesperada y las combinaciones en general carecieron de un antagonismo.

25 En una modalidad, la invención proporciona un método para tratar la hepatitis B en un animal, que comprende administrar al animal al menos dos agentes que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) inhibidores de la transcriptasa inversa;
- b) inhibidores de la cápside;
- 30 c) inhibidores de formación de ADNccc;
- d) inhibidores de secreción de sAg;
- e) nucleótidos oligoméricos dirigidos al genoma de la hepatitis B; y

f) inmunoestimuladores.

En otra modalidad, la invención proporciona un kit que comprende al menos dos agentes que se seleccionan del grupo que consiste en:

- 5 a) inhibidores de la transcriptasa inversa;
 - b) inhibidores de la cápside;
 - c) inhibidores de formación de ADNccc;
 - d) inhibidores de secreción de sAg;
 - e) nucleótidos oligoméricos dirigidos al genoma de la hepatitis B; y
 - 10 f) inmunoestimuladores
- para su uso conjunto para el tratamiento o prevención de una infección viral, tal como la hepatitis B.

En otra modalidad, la invención proporciona un kit que comprende al menos tres agentes que se seleccionan del grupo que consiste en:

- 15 a) inhibidores de la transcriptasa inversa;
 - b) inhibidores de la cápside;
 - c) inhibidores de formación de ADNccc;
 - d) inhibidores de secreción de sAg;
 - 20 e) nucleótidos oligoméricos dirigidos al genoma de la hepatitis B; y
 - f) inmunoestimuladores
- para su uso conjunto para el tratamiento o prevención de una infección viral, tal como la hepatitis B.

25 En otra modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y al menos dos agentes que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) inhibidores de la transcriptasa inversa;
- b) inhibidores de la cápside;
- 30 c) inhibidores de formación de ADNccc;
- d) inhibidores de secreción de sAg;
- e) nucleótidos oligoméricos dirigidos al genoma de la hepatitis B; y

f) inmunoestimuladores.

En otra modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y al menos tres agentes que se seleccionan del grupo que consiste en:

a) inhibidores de la transcriptasa inversa;

b) inhibidores de la cápside;

c) inhibidores de formación de ADNccc;

d) inhibidores de secreción de sAg;

10 e) nucleótidos oligoméricos dirigidos al genoma de la hepatitis B; y

f) inmunoestimuladores.

Descripción detallada

15 Puede ser adecuada la administración de un compuesto como una sal de base o ácido farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de adición de ácido orgánicas formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También pueden formarse sales inorgánicas adecuadas, inclusive sales de clorhidrato, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

25 Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse mediante el uso de procedimientos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, al hacer reaccionar un compuesto suficientemente básico, tal como una amina, con un ácido adecuado, lo que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. También pueden confeccionarse sales de un metal alcalino (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o un metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.

30

Inhibidores de la transcriptasa inversa

En determinadas modalidades, el inhibidor de la transcriptasa inversa es un análogo de nucleósido.

5

En determinadas modalidades, el inhibidor de la transcriptasa inversa es un inhibidor de la transcriptasa inversa de un análogo de nucleósido (NARTI o NRTI).

10 En determinadas modalidades, el inhibidor de la transcriptasa inversa es un inhibidor de la transcriptasa inversa de un análogo de nucleótido (NtARTI o NtRTI).

La expresión "inhibidor de la transcriptasa inversa" incluye, de modo
 15 no taxativo: entecavir, clebudina, telbivudina, lamivudina, adefovir y tenofovir, tenofovir disoproxilo, tenofovir alafenamida, adefovir dipovoxilo, (1R,2R,3R,5R)-3-(6-amino-9H-9-purinil)-2-fluoro-5-(hidroximetil)-4-metilenciclopentan-1-ol (descrito en la patente estadounidense n.º 8,816,074), emtricitabina, abacavir, elvucitabina,
 20 ganciclovir, lobucavir, famciclovir, penciclovir y amdoxovir.

La expresión "inhibidor de la transcriptasa inversa" incluye, de modo no taxativo, entecavir, lamivudina y (1R,2R,3R,5R)-3-(6-amino-9H-9-purinil)-2-fluoro-5-(hidroximetil)-4-metilenciclopentan-1-ol.

25

La expresión "inhibidor de la transcriptasa inversa" incluye, de modo no taxativo, un resto fosfonamidato o fosforamidato unido de forma covalente de los inhibidores de transcriptasa inversa antemencionados, o descritos, por ejemplo, en las patentes
 30 estadounidenses n.º 8,816,074, US 2011/0245484 A1 y US 2008/0286230A1.

La expresión "inhibidor de la transcriptasa inversa" incluye, de modo no taxativo, análogos de nucleótidos que comprenden un resto fosforamidato, tales como, (((1R,3R,4R,5R)-3-(6-amino-9H-purin-9-il)-4-fluoro-5-hidroxi-2-metilenciclopentil)metoxi)(fenoxi)fosforil)-(D o L)-alaninato de metilo y (((1R,2R,3R,4R)-3-fluoro-2-hidroxi-5-metilen-4-(6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)ciclopentil)metoxi)(fenoxi)fosforil)-(D o L)-alaninato de metilo. También se incluyen los diastereómeros individuales de estos, que incluyen, por ejemplo, ((R)-(((1R,3R,4R,5R)-3-(6-amino-9H-purin-9-il)-4-fluoro-5-hidroxi-2-metilenciclopentil)metoxi)(fenoxi)fosforil)-(D o L)-alaninato de metilo y ((S)-(((1R,3R,4R,5R)-3-(6-amino-9H-purin-9-il)-4-fluoro-5-hidroxi-2-metilenciclopentil)metoxi)(fenoxi)fosforil)-(D o L)-alaninato de metilo.

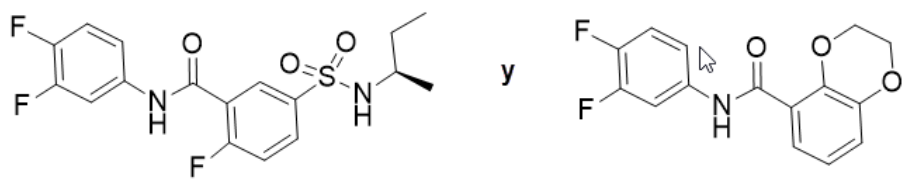
La expresión "inhibidor de la transcriptasa inversa" incluye, de modo no taxativo, un resto fosfonamidato, tal como tenofovir alafenamida, así como los descritos en US 2008/0286230 A1. Los métodos para la preparación de activos que contienen fosfonamidato o fosforamidato estereoselectivos se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 8,816,074, así como US 2011/0245484 A1 y US 2008/0286230 A1.

Inhibidores de cápside

Tal como se describe en la presente, la expresión "inhibidor de cápside" incluye compuestos que pueden inhibir la expresión y/o función de una proteína de cápside ya sea de forma directa o indirecta. Por ejemplo, un inhibidor puede incluir, de modo no taxativo, cualquier compuesto que inhiba el ensamblaje de la cápside, induzca la formación de polímeros que no sean de cápside, promueva un exceso de ensamblaje de la cápside o el ensamblaje de la cápside mal

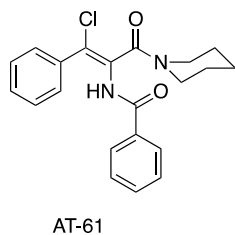
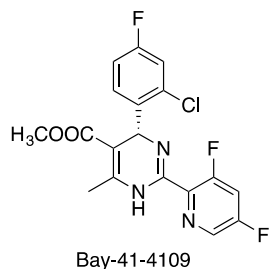
dirigido, afecte la estabilización de la cápside y/o inhiba la encapsidación del ARN. Los inhibidores de la cápside incluyen también cualquier compuesto que inhiba la función de la cápside en uno o más eventos posteriores dentro del proceso de replicación (por ejemplo, síntesis de ADN viral, transporte de ADN circular relajado (ADNcr) hacia el núcleo, formación de ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc), liberación, gemación y/o maduración del virus, y similares). Por ejemplo, en determinadas modalidades, el inhibidor inhibe de forma detectable el nivel de expresión o actividad biológica de la proteína de cápside según se mide, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo descrito en la presente. En determinadas modalidades, el inhibidor inhibe el nivel de ADNcr y productos posteriores del ciclo de vida viral al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 75 % o al menos 90 %.

La expresión "inhibidor de la cápside" incluye compuestos descritos en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO2013006394, WO2014106019 y WO2014089296, que incluyen los siguientes compuestos:

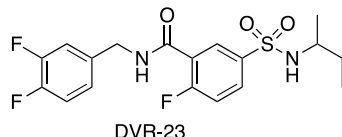
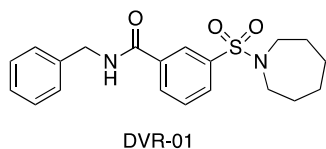


La expresión "inhibidor de la cápside" incluye también los compuestos **Bay-41-4109** (ver publicación de solicitud de patente internacional n.º WO/2013/144129), **AT-61** (ver publicación de solicitud de patente internacional n.º WO/1998/33501 y King, RW, et ál., Antimicrob Agents Chemother., 1998, 42, 12, 3179-3186), **DVR-01** y **DVR-23** (ver publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2013/006394 y Campagna, MR, et ál., J. of Virology, 2013, 87, 12, 6931, y sales farmacéuticamente aceptables de estos:

5



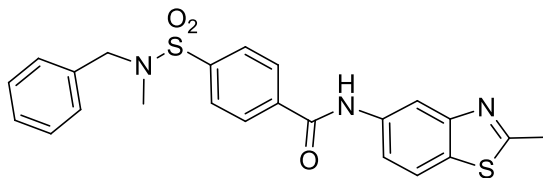
10



Inhibidores de la formación de ADNccc

El ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc) se genera en el núcleo de la célula a partir de ADNcr y funciona como la plantilla de transcripción de ARNm viral. Tal como se describe en la presente, la expresión "inhibidor de la formación de ADNccc" incluye compuestos que pueden inhibir la formación y/o estabilidad del ADNccc ya sea de forma directa o indirecta. Por ejemplo, un inhibidor de la formación de ADNccc puede incluir, de modo no taxativo, cualquier compuesto que inhiba el desensamblaje de la cápside, ingreso del ADNcr al núcleo y/o la conversión de ADNcr en ADNccc. Por ejemplo, en determinadas modalidades, el inhibidor inhibe de forma detectable la formación y/o estabilidad del ADNccc según se mide, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo descrito en la presente. En determinadas modalidades, el inhibidor inhibe la formación y/o estabilidad del ADNccc al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 75 % o al menos 90 %.

La expresión "inhibidor de la formación de ADNccc" incluye compuestos descritos en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2013130703, que incluye el siguiente compuesto:



5 La expresión "inhibidor de la formación de ADNccc" incluye, de modo no taxativo, aquellos descritos de forma general y específica en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2015/0038515 A1. La expresión "inhibidor de la formación de ADNccc" incluye, de modo no taxativo, 1-(fenilsulfonyl)-N-(piridin-4-ilmetil)-1H-indole-2-carboxamida; ácido 1-bencenosulfonyl-pirrolidin-2-carboxílico (piridin-4-ilmetil)-amida; 2-(2-cloro-N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)-4-(trifluorometil)fenilsulfonamido)-N-(piridin-4-ilmetil)acetamida; 2-(4-cloro-N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)fenilsulfonamido)-N-(piridin-4-ilmetil)acetamida; 2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)-4-(trifluorometil)fenilsulfonamido)-N-(piridin-4-ilmetil)acetamida; 2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)-4-metoxifenilsulfonamido)-N-(piridin-4-ilmetil)acetamida; 2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)fenilsulfonamido)-N-((1-metilpiperidin-4-il)metil)acetamida; 2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)fenilsulfonamido)-N-(piperidin-4-ilmetil)acetamida; 2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)fenilsulfonamido)-N-(piridin-4-ilmetil)propanamida; 2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)fenilsulfonamido)-N-(piridin-3-ilmetil)acetamida; 2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)fenilsulfonamido)-N-(pirimidin-5-ilmetil)acetamida; 2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)fenilsulfonamido)-N-(pirimidin-4-ilmetil)acetamida; 2-(N-(5-cloro-2-fluorofenil)fenilsulfonamido)-N-(piridin-4-ilmetil)acetamida; 2-[(2-cloro-5-trifluorometil-fenil)-(4-fluoro-bencenosulfonyl)-amino]-N-piridin-4-ilmetil-acetamida; 2-[(2-

cloro-5-trifluorometil-fenil)-(tolueno-4-sulfonil)-amino]-N-piridin-4-ilmetil-acetamida; 2-[bencenosulfonil-(2-bromo-5-trifluorometil-fenil)-amino]-N-piridin-4-ilmetil-acetamida; 2-[bencenosulfonil-(2-cloro-5-trifluorometil-fenil)-amino]-N-(2-metil-benzotiazol-5-il)-acetamida; 2-[bencenosulfonil-(2-cloro-5-trifluorometil-fenil)-amino]-N-[4-(4-metil-piperazin-1-il)-bencil]-acetamida; 2-[bencenosulfonil-(2-cloro-5-trifluorometil-fenil)-amino]-N-[3-(4-metil-piperazin-1-il)-bencil]-acetamida; 2-[bencenosulfonil-(2-cloro-5-trifluorometil-fenil)-amino]-N-bencil-acetamida; 2-[bencenosulfonil-(2-cloro-5-trifluorometil-fenil)-amino]-N-piridin-4-ilmetil-acetamida; 2-[bencenosulfonil-(2-cloro-5-trifluorometil-fenil)-amino]-N-piridin-4-ilmetil-propionamida; 2-[bencenosulfonil-(2-fluoro-5-trifluorometil-fenil)-amino]-N-piridin-4-ilmetil-acetamida; 4 (N-(2-cloro-5-(trifluorometil) fenil) fenilsulfonamido)-N-(piridin-4-il- metil)butanamida; cloruro de 4-((2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil) fenil) fenilsulfonamido)-acetamido)-metil)-1,1-dimetilpiperidin-1-io; 4-(bencil-metil-sulfamoil)-N-(2-cloro-5-trifluorometil-fenil)-benzamida; 4-(bencil-metil-sulfamoil)-N-(2-metil-1H-indol-5-il)-benzamida; 4-(bencil-metil-sulfamoil)-N-(2-metil-1H-indol-5-il)-benzamida; 4-(bencil-metil-sulfamoil)-N-(2-metil-benzotiazol-5-il)-benzamida; 4-(bencil-metil-sulfamoil)-N-(2-metil-benzotiazol-6-il)-benzamida; 4-(bencil-metil-sulfamoil)-N-(2-metil-benzotiazol-6-il)-benzamida; 4-(bencil-metil-sulfamoil)-N-piridin-4-ilmetil-benzamida; N-(2-aminoetil)-2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil) fenil) fenilsulfonamido)-acetamida; N-(2-cloro-5-(trifluorometil) fenil)-N-(2-(3,4-dihidro-2,6-naftiridin-2(1H)-il)-2-oxoetil)bencenosulfonamida; N-benzotiazol-6-il-4-(bencil-metil-sulfamoil)-benzamida; N-benzotiazol-6-il-4-(bencil-metil-sulfamoil)-benzamida; (2-(2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil) fenil) fenilsulfonamido) acetamido)-etil) carbamato de terc-butilo; y 4-((2-(N-(2-cloro-5-(trifluorometil) fenil) fenilsulfonamido)-acetamido)-metil)piperidina-

1-carboxilato de terc-butilo y, opcionalmente, combinaciones de estos.

Inhibidores de la secreción de sAg

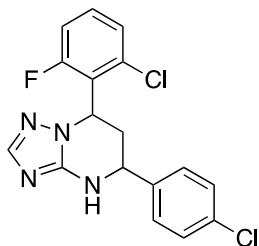
5

Tal como se describe en la presente, la expresión "inhibidor de la secreción de sAg" incluye compuestos que pueden inhibir, ya sea de forma directa o indirecta, la secreción de sAg (antígenos de la superficie S, M y/o L) que porta partículas subvirales y/o ADN que
 10 contiene partículas virales de células infectadas con VHB. Por ejemplo, en determinadas modalidades, el inhibidor inhibe, de forma detectable, la secreción de sAg según se mide, por ejemplo, mediante el uso de ensayos conocidos en la técnica o descritos en la presente, por ejemplo, el ensayo ELISA o mediante transferencia Western. En
 15 determinadas modalidades, el inhibidor inhibe la secreción de sAg al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 75 % o al menos 90 %. En determinadas modalidades, el inhibidor reduce los niveles en suero de sAg en un paciente al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 75 % o al menos 90 %.

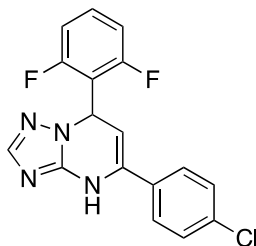
20

La expresión "inhibidor de la secreción de sAg" incluye compuestos descritos en la patente estadounidense n.º 8,921,381, así como compuestos descritos en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.º 2015/0087659 y 2013/0303552. Por ejemplo, la
 25 expresión incluye los compuestos PBHBV-001 y PBHBV-2-15, y sales farmacéuticamente aceptables de estos:

30



PBHBV-001



PBHBV-2-15

Inmunostimuladores

5 El término "inmunostimulador" incluye compuestos que pueden modular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, estimular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, un adyuvante)). El término "inmunostimulador" incluye ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C) e interferones.

10

El término "inmunostimulador" incluye agonistas del estimulador de genes IFN (STING) e interleucinas. El término incluye también inhibidores de la liberación de HBsAg, agonistas de TLR-7 (GS-9620, RG-7795), estimuladores de linfocitos T (GS-4774), inhibidores de RIG-1 (SB-9200) y miméticos de SMAC (Birinapant). El término "inmunostimuladores" incluye también anticuerpos anti-PD-1 y fragmentos de estos.

15

Nucleótidos oligoméricos

20

La expresión nucleótido oligomérico dirigido al genoma de la hepatitis B incluye Arrowhead-ARC-520 (ver patente estadounidense n.º 8,809,293 y Wooddell CI, et ál., *Molecular Therapy*, **2013**, 21, 5, 973-985).

25

Los nucleótidos oligoméricos pueden diseñarse de forma que se dirijan a uno o más genes y/o transcripciones del genoma de VHB. Los ejemplos de dichas moléculas de ARNip son las moléculas de ARNip que se establecen en la Tabla A de la presente.

30

La expresión nucleótido oligomérico dirigido al genoma de la hepatitis B incluye también moléculas aisladas de ARNip de cadena

doble, donde cada una incluye una cadena sentido y una cadena antisentido que se hibrida a la cadena sentido. Los ARNip se dirigen a uno o más genes y/o transcripciones del genoma de VHB. Los ejemplos de moléculas de ARNip son las moléculas de ARNip que se establecen en la Tabla A de la presente.

En otro aspecto, la expresión incluye las cadenas aisladas sentido y antisentido que se establecen en la Tabla B de la presente.

10 La expresión "virus de la hepatitis B" (abreviado VHB) se refiere a una especie de virus del género Orthohepadnavirus, que es una parte de la familia Hepadnaviridae de virus y puede provocar una inflamación del hígado en seres humanos.

15 La expresión "virus de la hepatitis D" (abreviado VHD) se refiere a una especie de virus del género Deltaviridae, que puede provocar una inflamación del hígado en seres humanos.

Tal como se usa en la presente, la expresión "ARN interferente pequeño" o "ARNip" se refiere a ARN de cadena doble (es decir, ARN dúplex) capaz de reducir o inhibir la expresión de una secuencia o gen objetivo (por ejemplo, al mediar la degradación o inhibir la traducción de los ARNm complementarios a la secuencia de ARNip) cuando el ARNip se encuentra en la misma célula que la secuencia o gen objetivo. El ARNip puede tener una identidad completa o sustancial con la secuencia o gen objetivo, o puede comprender una región de malapareamiento (es decir, un motivo de malapareamiento). En determinadas modalidades, los ARNip pueden tener una longitud de alrededor de 19-25 nucleótidos (dúplex), y preferentemente tienen una longitud de alrededor de 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos (dúplex). Los dúplex de ARNip pueden comprender excedentes 3' de alrededor de 1 a alrededor de 4 nucleótidos o de alrededor de 2 a alrededor de 3

nucleótidos y extremos de fosfato 5'. Los ejemplos de ARNip incluyen, de modo no taxativo, una molécula de polinucleótido de cadena doble ensamblada a partir de dos moléculas separadas de cadena doble, donde una cadena es la cadena sentido y la otra es la cadena antisentido complementaria.

Preferentemente, los ARNip se sintetizan químicamente. Los ARNip también pueden generarse mediante escisión de ARNcd más largos (por ejemplo, ARNcd con una longitud mayor que alrededor de 25 nucleótidos) con Dicer o Rnasa III de *E. coli*. Estas enzimas procesan el ARNcd en ARNip biológicamente activos (ver, por ejemplo, Yang et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:9942-9947 (2002); Calegari et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:14236 (2002); Byrom et ál., *Ambion TechNotes*, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki et ál., *Nucleic Acids Res.*, 31:981-987 (2003); Knight et ál., *Science*, 293:2269-2271 (2001); y Robertson et ál., *J. Biol. Chem.*, 243:82 (1968)). Preferentemente, los ARNcd tienen una longitud de al menos 50 nucleótidos a alrededor de 100, 200, 300, 400, o 500 nucleótidos. Un ARNcd puede tener una longitud de hasta 1000, 1500, 2000, 5000 nucleótidos, o más. El ARNcd puede codificar una transcripción de gen completa o una transcripción de gen parcial. En determinados casos, el ARNip puede codificarse mediante un plásmido (por ejemplo, transcrito como secuencias que se pliegan automáticamente en dúplexes con bucles de horquilla).

La frase "que inhibe la expresión de un gen objetivo" se refiere a la capacidad de un ARNip de silenciar, reducir o inhibir la expresión de un gen objetivo (por ejemplo, un gen dentro del genoma de VHB). Para examinar la extensión del silenciamiento génico, se pone en contacto una muestra de prueba (por ejemplo, una muestra biológica de un organismo de interés que expresa el gen objetivo o una muestra de células en cultivo que expresan el gen objetivo) con un ARNip que

silencia, reduce o inhibe la expresión del gen objetivo. La expresión del gen objetivo en la muestra de prueba se compara con la expresión del gen objetivo en una muestra de control (por ejemplo, una muestra biológica de un organismo de interés que expresa el gen objetivo o una muestra de células en cultivo que expresan el gen objetivo) que no se pone en contacto con el ARNip. Puede asignarse un valor de 100 % a las muestras de control (por ejemplo, muestras que expresan el gen objetivo). En modalidades particulares, el silenciamiento, inhibición o reducción de la expresión de un gen objetivo se logra cuando el valor de la muestra objetivo con respecto a la muestra de control (por ejemplo, solo amortiguador, una secuencia de ARNip que se dirige a un gen distinto, una secuencia de ARNip mezclada, etc.) es de alrededor de 100 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o 0 %. Los ensayos adecuados incluyen, de modo no taxativo, la examinación de los niveles de ARNm o proteína mediante el uso de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, transferencia puntiforme, transferencia Northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, así como también ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la técnica. Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un ácido nucleico terapéutico tal como un ARNip es una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, por ejemplo, una inhibición de la expresión de una secuencia objetivo en comparación con el nivel de expresión normal detectado en ausencia de un ARNip. En modalidades particulares, la inhibición de la expresión de un gen objetivo o secuencia objetivo se logra cuando el valor obtenido con un ARNip con respecto al control (por ejemplo, solo amortiguador, una secuencia de ARNip que se dirige a un gen distinto, una secuencia de ARNip mezclada, etc.) es de alrededor de 100 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96

%, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o 0 %. Los ensayos adecuados para medir la expresión de un gen
5 objetivo o secuencia objetivo incluyen, de modo no taxativo, la
examinación de los niveles de ARNm o proteína mediante el uso de
técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por
ejemplo, transferencia puntiforme, transferencia Northern,
hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática,
10 así como también ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la
técnica.

Tal como se usa en la presente, la expresión "ácido nucleico" se
refiere a un polímero que contiene al menos dos nucleótidos (es
15 decir, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos) en formas de cadena
simple como de cadena doble e incluye ADN y ARN. Los "nucleótidos"
contienen una ribosa (ARN) o desoxirribosa (ADN) de azúcar, una base
y un grupo fosfato. Los nucleótidos se unen mediante los grupos
fosfato. Las "bases" incluyen purinas y pirimidinas, que incluyen
20 además los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina,
uracilo, inosina, y análogos naturales y derivados sintéticos de
purinas y pirimidinas, que incluyen, de modo no taxativo,
modificaciones que colocan nuevos grupos reactivos tales como, de
modo no taxativo, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos y
25 alquilhaluros. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos que
contienen análogos de nucleótidos conocidos o ligaduras o residuos
estructurales modificados, que son sintéticos, de origen natural y de
origen no natural, y que poseen propiedades de unión similares a las
del ácido nucleico de referencia. Los ejemplos de dichos análogos y/o
30 residuos modificados incluyen, de modo no taxativo, fosforotioatos,
fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales,
ribonucleótidos de 2'-O-metilo y ácidos peptidonucleicos (PNA, por

sus siglas en inglés). Además, los ácidos nucleicos pueden incluir uno o más restos de UNA.

La expresión "ácido nucleico" incluye cualquier oligonucleótido o polinucleótido, con fragmentos que contienen hasta 60 nucleótidos generalmente denominados oligonucleótidos, y fragmentos más largos denominados polinucleótidos. Un desoxirribooligonucleótido consiste en un azúcar de 5 carbonos denominado desoxirribosa unido de forma covalente al fosfato en los carbonos 5' y 3' de este azúcar para formar un polímero alternante no ramificado. El ADN puede encontrarse, por ejemplo, en forma de moléculas antisentido, ADN de plásmido, ADN precondensado, un producto de PCR, vectores, casetes de expresión, secuencias quiméricas, ADN cromosómico o derivados y combinaciones de estos grupos. Un ribooligonucleótido consiste en una estructura de repetición similar donde el azúcar de 5 carbonos es ribosa. El ARN puede tener forma, por ejemplo, de ARN interferente pequeño (ARNip), ARNcd de sustrato de Dicer, ARN horquilla pequeños (ARNhp), ARN interferente asimétrico (ARNia), micro ARN (miARN), ARNm, ARNt, ARNr, ARNt, ARN viral (ARNv) y combinaciones de estos. Por consiguiente, los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a un polímero u oligómero de nucleótido o monómeros de nucleósido que consisten en bases de origen natural, ligaduras de azúcares y entre azúcares (cadena principal). Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" también incluyen polímeros u oligómeros que comprenden monómeros de origen no natural, o partes de estos, que funcionan de manera similar. Se prefieren a menudo dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos en vez de las formas naturales debido a propiedades tales como, por ejemplo, mayor absorción celular, menor inmunogenicidad y mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico

en particular también abarca de manera implícita las variantes modificadas de manera conservadora de esta (por ejemplo, sustituciones de codones redundantes), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como también la secuencia indicada de
5 manera explícita. Específicamente, las sustituciones de codones redundantes pueden lograrse mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxinosina (Batzer et ál., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et ál., *J.*
10 *Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et ál., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)).

Una molécula de ARN o molécula de ADN "aislada" o "purificada" es una molécula de ADN o molécula de ARN que existe de forma separada de su
15 entorno natural. Una molécula de ARN o molécula de ADN aislada puede existir en una forma purificada o puede existir en un entorno no natural tal como, por ejemplo, una célula hospedadora transgénica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico "aislada" o "purificada", o una parte biológicamente activa de esta, carece sustancialmente de
20 otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o carece sustancialmente de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. En una modalidad, un ácido nucleico "aislado" carece de secuencias que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir, secuencias
25 ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo a partir del cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas modalidades, la molécula de ácido nucleico aislada puede contener una cantidad menor que alrededor de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos
30 que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula a partir de la cual se deriva el ácido nucleico.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende secuencias de codificación de longitud completa o de longitud parcial necesarias para la producción de un polipéptido o un polipéptido precursor.

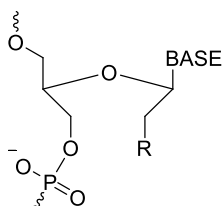
Tal como se usa en la presente, el "producto génico" se refiere a un producto de un gen tal como una transcripción de ARN o un polipéptido.

10

La expresión "análogo de nucleobase desbloqueada" (abreviado "UNA") se refiere a una nucleobase acíclica en la cual los átomos C2' y C3' del anillo de ribosa no se encuentran unidos de forma covalente. La expresión "análogo de nucleobase desbloqueada" incluye análogos de nucleobases que poseen la siguiente estructura, identificada como Estructura A:

Estructura A

20



donde R es hidroxilo y Base es cualquier base natural o no natural tal como, por ejemplo, adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Los UNA incluyen las moléculas identificadas como monómeros de 2'-3'-seco-nucleótidos acíclicos en la patente estadounidense con número de serie 8,314,227.

El término "lípidos" se refiere a un grupo de compuestos orgánicos que incluyen, de modo no taxativo, ésteres de ácidos grasos y se caracterizan por ser insolubles en agua, pero solubles en muchos solventes orgánicos. Normalmente se dividen en al menos tres clases:

30

(1) "lípidos simples", que incluyen grasas y aceites, y también ceras; (2) "lípidos compuestos", que incluyen fosfolípidos y glicolípidos; y (3) "lípidos derivados", tales como esteroides.

5 El término "partícula lipídica" incluye una formulación lipídica que puede utilizarse para administrar un ácido nucleico terapéutico (por ejemplo, ARNip), a un sitio objetivo de interés (por ejemplo, célula, tejido, órgano y similares). En modalidades preferidas, la partícula lipídica se forma típicamente a partir de un lípido catiónico, un
10 lípido no catiónico y, opcionalmente, un lípido conjugado que evita la acumulación de la partícula. Una partícula lipídica que incluye una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ARNip) se denomina una partícula de lípido-ácido nucleico. Típicamente, el ácido nucleico se encapsula completamente dentro de la partícula
15 lipídica, mediante lo cual protege el ácido nucleico de la degradación enzimática.

En determinados casos, las partículas de lípido-ácido nucleico son extremadamente útiles para aplicaciones sistémicas, porque pueden
20 presentar una vida útil de circulación prolongada luego de una inyección intravenosa (i.v.), pueden acumularse en sitios distales (por ejemplo, sitios separados físicamente del sitio de administración) y pueden mediar el silenciamiento de la expresión del gen objetivo en estos sitios distales. El ácido nucleico puede formar
25 complejos con un agente condensante y puede encapsularse dentro de una partícula lipídica tal como se indica en la publicación PCT n.º WO 00/03683, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines.

30 Las partículas lipídicas poseen típicamente un diámetro promedio de alrededor de 30 nm a alrededor de 150 nm, de alrededor de 40 nm a alrededor de 150 nm, de alrededor 50 nm a alrededor de 150 nm, de

alrededor 60 nm a alrededor de 130 nm, de alrededor 70 nm a alrededor de 110 nm, de alrededor 70 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor 80 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor 90 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor 70 a alrededor de 90 nm, de alrededor 80 nm a alrededor de 90 nm, de alrededor 70 nm a alrededor de 80 nm, o alrededor de 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm, y prácticamente no son tóxicas. Además, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las partículas lipídicas, son resistentes a la degradación en soluciones acuosas para degradarse con una nucleasa. Las partículas de lípido-ácido nucleico y sus métodos de preparación se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.º 20040142025 y 20070042031, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad a todos los fines.

Tal como se usa en la presente, "lípido encapsulado" puede referirse a una partícula lipídica que proporciona un ácido nucleico terapéutico, tal como un ácido ARNip, con encapsulación completa, encapsulación parcial, o ambas. En una modalidad preferida, el ácido nucleico (por ejemplo, ARNip) está completamente encapsulado en la partícula lipídica (por ejemplo, para formar una partícula de lípido-ácido nucleico).

La expresión "conjugado lipídico" se refiere a un lípido conjugado que inhibe la acumulación de partículas lipídicas. Dichos conjugados lipídicos incluyen, de modo no taxativo, conjugados de PEG-lípido tales como, por ejemplo, PEG acoplado a dialquiloxipropilos (por ejemplo, conjugados PEG-DAA), PEG acoplado a diacilgliceroles (por ejemplo,, conjugados PEG-DAG), PEG acoplado a colesterol, PEG acoplado a fosfatidiletanolaminas y PEG conjugado con ceramidas (ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,885,613), lípidos PEG

cati6nicos, conjugados de polioxazolina (POZ)-l6pido (por ejemplo, conjugados de POZ-DAA), olig6meros de poliamida (por ejemplo, conjugados de ATTA-l6pido) y mezclas de estos. Se describen ejemplos adicionales de conjugados de POZ-l6pido en la Publicaci6n PCT n.º WO
 5 2010/006282. PEG o POZ se pueden conjugar directamente al l6pido o se pueden unir al l6pido mediante un resto enlazador. Puede utilizarse cualquier resto enlazador adecuado para acoplar el PEG o el POZ a un l6pido, inclusive, por ejemplo, restos enlazadores que no contienen 6ster y restos enlazadores que contienen 6ster. En determinadas
 10 modalidades preferidas, se usan restos enlazadores que no contienen 6ster, tales como amidas o carbamatos.

La expresi6n "l6pido anfip6tico" se refiere parcialmente a cualquier material adecuado donde la parte hidrof6bica del material lip6dico se
 15 orienta en una fase hidrof6bica, mientras que la parte hidrof6lica se orienta hacia la fase acuosa. Las caracter6sticas hidrof6licas se derivan de la presencia de grupos cargados o polares tales como carbohidratos, fosfatos, carbox6licos, sulfatos, amino, sulfhidrilo, nitro, hidroxilo y otros grupos similares. La hidrofobicidad se puede
 20 conferir mediante la inclusi6n de grupos apolares que incluyen, de modo no taxativo, grupos hidrocarburo alif6ticos saturados e insaturados de cadena larga y dichos grupos sustituidos por uno o m6s grupos arom6ticos, cicloalif6ticos o heteroc6clicos. Los ejemplos de compuestos anfip6ticos incluyen, de modo no taxativo, fosfol6pidos,
 25 aminol6pidos y esfingol6pidos.

Los ejemplos representativos de fosfol6pidos incluyen, de modo no taxativo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, 6cido fosfatid6co, palmitoiloleoil
 30 fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, y dilinoleoilfosfatidilcolina. Otros

compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glicoesfingolípidos, diacilglicerole, y β -aciloxiácidos, también se encuentran dentro del grupo de los lípidos anfipáticos. De manera adicional, los lípidos anfipáticos descritos anteriormente se
 5 pueden mezclar con otros lípidos que incluyen triglicéridos y esterole.

La expresión "lípidio neutro" se refiere a cualquiera de una cantidad de especie de lípidos que existen ya sea en forma zwitteriónica
 10 neutral o no cargada a un pH seleccionado. A un pH fisiológico, dichos lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, colesterole, cerebrósidos, y diacilglicerole.

15 La expresión "lípidio no catiónico" se refiere a cualquier lípidio anfipático así como cualquier otro lípidio neutro o lípidio aniónico.

La expresión "lípidio aniónico" se refiere a cualquier lípidio que está cargado negativamente a pH fisiológico. Estos lípidos incluyen, de
 20 modo no taxativo, fosfatidilglicerole, cardiolipinas, diacilfosfatidilserinas, ácidos diacilfosfatídicos, N-dodecanoil fosfatidiletanolaminas, N-succinil fosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, lisilfosfatidilglicerole, palmitoiloleilfosfatidilglicerole (POPG), y otros grupos
 25 modificadore aniónicos unidos a lípidos neutros.

La expresión "lípidio hidrofóbico" se refiere a compuesto que poseen grupo apolare que incluyen, de modo no taxativo, grupo hidrocarburo alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y
 30 dichos grupo opcionalmente sustituidos por uno o más grupo aromáticos, cicloalifáticos o heterocíclicos. Los ejemplo adecuados

incluyen, de modo no taxativo, diacilglicerol, dialquilglicerol, N-N-dialquilamino, 1,2-diaciloxi-3-aminopropano y 1,2-dialquil-3-aminopropano.

5 Las expresiones "lípidos catiónicos" y "aminolípidos" se utilizan de manera intercambiable en la presente para incluir aquellos lípidos y sales de estos que poseen uno, dos, tres o más ácidos grasos o cadenas de alquilo grasos y un grupo principal amino titulable por pH (por ejemplo, un grupo principal alquilamino o dialquilamino). El
 10 lípidos catiónicos está protonado típicamente (es decir, se carga positivamente) a un pH menor que la pK_a del lípidos catiónicos y es sustancialmente neutro a un pH superior a la pK_a . Los lípidos catiónicos también se pueden denominar lípidos catiónicos titulables. En algunas modalidades, los lípidos catiónicos comprenden: un grupo
 15 principal de amina terciaria protonable (por ejemplo, titulable por pH); cadenas alquilo C_{18} , donde cada cadena alquilo posee, de forma independiente, de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3) enlaces dobles; y ligaduras éter, éster o cetel entre el grupo principal y las cadenas alquilo. Dichos lípidos catiónicos incluye, de modo no taxativo,
 20 DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, γ -DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA (también conocidos como DLin-C2K-DMA, XTC2 y C2K), DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA, γ -DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA (también conocido como MC2) y DLin-M-C3-DMA (también conocido como MC3).

25 El término "sales" incluye cualquier complejo catiónico y aniónico, tal como el complejo formado entre un lípidos catiónico y uno o más aniones. Los ejemplos no taxativos de aniones incluyen aniones inorgánicos y orgánicos, por ejemplo, hidruro, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, oxalato (por ejemplo, hemioxalato), fosfato, fosfonato, fosfato de hidrógeno, fosfato de dihidrógeno, óxido,
 30 carbonato, bicarbonato, nitrato, nitrito, nitrato, bisulfito, sulfuro, sulfato, bisulfato, sulfato, tiosulfato, sulfato de

hidrógeno, borato, formato, acetato, benzoato, citrato, tratrato, lactato, acrilato, poliacrilato, fumarato, maleato, itaconato, glicolato, gluconato, malato, mandelato, tiglato, ascorbato, salicilato, polimetacrilato, perclorato, clorato, clorito, hipoclorito, bromato, hipobromito, yodato, un alquilsulfonato, un arilsulfonato, arsenato, arsenita, cromato, dicromato, cianuro, cianato, tiocianato, hidróxido, peróxido, permanganato, y mezclas de estos. En modalidades particulares, las sales de los lípidos catiónicos descritos en la presente son sales cristalinas.

10

El término "alquilo" incluye un hidrocarburo alifático saturado, cíclico o no cíclico, de cadena lineal o ramificada, que contiene de 1 a 24 átomos de carbono. Los alquilos representativos de cadena lineal saturados incluyen, de modo no taxativo, metilo, etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo y similares, mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen, de modo no taxativo, isopropilo, *sec*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, isopentilo y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen, de modo no taxativo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares, mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen, de modo no taxativo, ciclopentenilo y ciclohexenilo, y similares.

15

20

25

30

El término "alquenilo" incluye un alquilo, tal como se definió anteriormente, que contiene al menos un enlace doble entre átomos de carbono adyacentes. Los alquenilos incluyen isómeros tanto *cis* como *trans*. Los alquenilos representativos ramificados de cadena lineal incluyen, de modo no taxativo, etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, y similares.

El término "alquinilo" incluye cualquier alquilo o alquenilo, tal

como se definió anteriormente, que contiene además al menos un enlace triple entre carbonos adyacentes. Los alquínulos representativos ramificados y de cadena lineal incluyen, de modo no taxativo, acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinio, 3-metil-1-butinilo, y similares.

El término "acilo" incluye cualquier alquilo, alqueno, o alquínulo donde el carbono en el punto de unión está sustituido con un grupo oxo, tal como se define más adelante. Los siguientes son ejemplos no taxativos de grupos acilo: $-C(=O)$ alquilo, $-C(=O)$ alqueno, y $-C(=O)$ alquínulo.

El término "heterociclo" incluye un anillo monocíclico de 5 a 7 miembros, o un anillo heterocíclico, bicíclico de 7 a 10 miembros que es aromático, saturado o insaturado, y que contiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, y donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse de forma opcional, y se puede cuaternizar el heteroátomo de nitrógeno, inclusive los anillos bicíclicos donde cualquiera de los heterociclos antemencionados se fusionan a un anillo de benceno. El heterociclo puede acoplarse a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen, de modo no taxativo, heteroarilos tal como se definen más adelante, así como morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidroprimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, y similares.

Los términos "alquilo opcionalmente sustituido", "alqueno opcionalmente sustituido", "alquínulo opcionalmente sustituido",

"acilo opcionalmente sustituido" y "heterociclo opcionalmente sustituido" significan que, cuando está sustituido, al menos un átomo de hidrógeno se reemplaza con un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo (=O), se rempazan dos átomos de hidrógeno. En este
 5 sentido, los sustituyentes incluyen, de modo no taxativo, oxo, halógeno, heterociclo, -CN, -OR^x, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x y -SO_nNR^xR^y, donde n es 0, 1, o 2, R^x y R^y son iguales o diferentes y son independientemente hidrógeno, alquilo o heterociclo, y cada uno de los sustituyentes de
 10 alquilo y heterociclo se puede sustituir además con uno o más de oxo, halógeno, -OH, -CN, alquilo, -OR^x, heterociclo, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x y -SO_nNR^xR^y. Cuando se utiliza antes de una lista de sustituyentes, la expresión "opcionalmente sustituido" significa que cada uno de los
 15 sustituyentes en la lista puede sustituirse opcionalmente tal como se describe en la presente.

El término "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

20 El término "fusogénico" se refiere a la capacidad de una partícula lipídica de fusionarse con las membranas de una célula. Las membranas pueden ser la membrana o membranas plasmáticas que rodean los organelos, por ejemplo, endosoma, núcleo, etc.

25 Tal como se usa en la presente, la expresión "solución acuosa" se refiere a una composición que comprende agua, de forma total o parcial.

30 Tal como se usa en la presente, la expresión "solución de lípido orgánico" se refiere a una composición que comprende, de forma total o parcial, un solvente orgánico que posee un lípido.

Cuando se utiliza para describir una partícula lipídica, la expresión "núcleo electrodenso" se refiere a la apariencia oscura de la parte interior de una partícula lipídica cuando se visualiza mediante el uso de microscopía de electrones de criotransmisión ("ciroTEM").

5 Algunas partículas lipídicas poseen un núcleo electrodenso y carecen de una estructura de bicapa lipídica. Algunas partículas lipídicas poseen un núcleo electrodenso, carecen de una estructura de bicapa lipídica y poseen una estructura de fase cúbica o hexagonal inversa. Si bien no se limita a la teoría, se considera que la envoltura
10 lipídica que no es de doble capa proporciona una red tridimensional de cilindros lipídicos con agua y ácido nucleico en el interior, es decir, esencialmente una microgota de lípido interpenetrada con canales acuosos que contienen el ácido nucleico.

15 Tal como se usa en la presente, "sitio distal" se refiere a un sitio separado físicamente, que no se limita a un lecho capilar adyacente, pero incluye sitios distribuidos ampliamente a través de un organismo.

20 "Estable en suero", con respecto a las partículas de lípido-ácido nucleico, significa que la partícula no se degrada de forma significativa luego de la exposición a un ensayo de nucleasa o suero que degradaría de forma significativa el ARN o el ADN libre. Los ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, un ensayo en suero estándar,
25 un ensayo de ADNasa o un ensayo de ARNasa.

Tal como se usa en la presente, "administración sistémica" se refiere a la administración de partículas lipídicas que lleva a una biodistribución amplia de un agente activo tal como un ARNip dentro
30 de un organismo. Algunas técnicas de administración pueden llevar a la administración sistémica de determinados agentes, pero no de otros. La administración sistémica significa que se expone una

cantidad útil, preferentemente terapéutica de un agente a la mayoría de las partes del cuerpo. Para obtener una biodistribución amplia generalmente se requiere una vida sanguínea, de modo que el agente no se degrade ni elimínese rápidamente (por ejemplo, por los órganos por donde pasa primero (hígado, pulmón, etc.) o por unión celular rápida no específica) antes de alcanzar un sitio de enfermedad distal al sitio de administración. La administración sistémica de partículas lipídicas puede realizarse a través de cualquier medio conocido en la técnica que incluye, por ejemplo, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal. En una modalidad preferida, la administración sistémica de partículas de lípidos es mediante administración intravenosa.

Tal como se usa en la presente, "administración local" se refiere a la administración de un agente activo tal como un ARNip directamente a un sitio objetivo dentro de un organismo. Por ejemplo, se puede administrar un agente de forma local mediante inyección directa en un sitio de enfermedad, otro sitio objetivo o un órgano objetivo tal como el hígado, corazón, páncreas, riñón y similares.

Tal como se usa en la presente, la expresión "carga de partículas de virus" se refiere a una medición de la cantidad de partículas del virus (por ejemplo, VHB y/o VHD) presente en un fluido corporal, tal como sangre. Por ejemplo, la carga de partículas puede expresarse como la cantidad de partículas de virus por mililitro de sangre. La evaluación de carga de partículas puede llevarse a cabo mediante el uso de evaluaciones a base de amplificación de ácido nucleico, así como evaluaciones que no son a base de ácido nucleico (ver, por ejemplo, Puren et ál., *The Journal of Infectious Diseases*, 201:S27-36 (2010)).

El término "mamífero" se refiere a cualquier especie de mamífero tal

como ser humano, ratón, rata, perro, gato, hámster, conejillo de indias, conejo, ganado y similares.

Tabla A

5

No mb re	Secuencias dúplex	IC 50 (nM)
1m	5' <u>A</u> g G u A U g u U G C C C g U u U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:1) 3' <u>U</u> <u>U</u> U C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:2)	1,43
2m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:3) 3' U U C g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:4)	0,37
3m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u u C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:5) 3' <u>U</u> <u>U</u> G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:6)	0,06
4m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:7) 3' <u>U</u> <u>U</u> C g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:8)	0,31
5m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:9) 3' U U G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:10)	0,06
6m	5' <u>C</u> u g g C U C A G U U U A C u A g U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:11) 3' U U G A C C g A g U C A A A U g A U C A C 5' (SEQ ID NO:12)	0,05
7m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:13) 3' <u>U</u> <u>U</u> G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:14)	0,06

5	8m	5' <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:15)	0,24
		3' <u>U</u> <u>U</u> C G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:16)	
	9m	5' <u>A</u> g G u A U G u U G C C C g U u U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:17)	0,13
		3' <u>U</u> <u>U</u> u C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:18)	
	10	10m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:19)
3' <u>U</u> <u>U</u> C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:20)			
11m		5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:21)	0,31
		3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:22)	
15		12m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:23)
	3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:24)		
	13m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:25)	0,2
		3' <u>U</u> <u>U</u> C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:26)	
	20	14m	5' <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:27)
3' U U C G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:28)			
15m		5' <u>C</u> u g G C u C A G U U u A C U A G U G <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:29)	0,17
		3' <u>U</u> <u>U</u> G A C C g A G U C A A A U G A U C A C 5' (SEQ ID NO:30)	
Minúscula = modificación 2'-O-metilo			
Subrayado = resto UNA			

Los oligonucleótidos (tales como las cadenas de ARN sentido y antisentido que se indican en la Tabla B) se hibridan de forma específica o son complementarios a una secuencia de polinucleótidos objetivo. Tal como se utilizan en la presente, las expresiones "específicamente hibridable" y "complementario" indican un grado suficiente de complementariedad, de modo que se produzca una unión específica y estable entre el ADN o ARN objetivo y el

oligonucleótido. Se entiende que un oligonucleótido no precisa ser 100 % complementario con su secuencia de ácido nucleico objetivo para ser específicamente hibridable. En modalidades preferidas, un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la secuencia objetivo interfiere con la función normal de la secuencia objetivo para provocar una pérdida de utilidad o expresión de esta, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias no objetivo en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se llevan a cabo los ensayos. Por lo tanto, el oligonucleótido puede incluir 1, 2, 3 o más sustituciones de bases en comparación con la región de una secuencia génica o ARNm a la que se dirige o a la que se hibrida de forma específica.

Tabla B.

Nombre	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5' - 3')
1m	<u>Ag</u> GuAUguUGCCCgUuUGUUU (SEQ ID NO:1)	ACAAACgGGCAACuACC <u>UU</u> (SEQ ID NO:2)
2m	<u>GC</u> uAgUUUACUAGUGCcAUU (SEQ ID NO:3)	UGGCACUAGuAAACUGAgCUU (SEQ ID NO:4)
3m	<u>CCG</u> UguGCACUuCGCuCAUU (SEQ ID NO:5)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (SEQ ID NO:6)
4m	<u>GC</u> uAgUUUACUAGUGCcAUU (SEQ ID NO:7)	UGGCACUAGuAAACUGAgCUU (SEQ ID NO:8)
5m	<u>CCG</u> UguGCACUuCGCuCAUU (SEQ ID NO:9)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (SEQ ID NO:10)
6m	<u>Cug</u> gCUCAGUUUACuAgUGUU (SEQ ID NO:11)	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU (SEQ ID NO:12)
7m	<u>CCG</u> UguGCACUuCGCuCAUU (SEQ ID NO:13)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (SEQ ID NO:14)
8m	<u>GC</u> uAgUUUACuAgUGCCA <u>UU</u> (SEQ ID NO:15)	UGGCACUAGUAAACuGAGCUU (SEQ ID NO:16)
9m	<u>Ag</u> GuAUGuUGCCCgUuUGUUU (SEQ ID NO:17)	ACAAACgGGCAACuACC <u>UU</u> (SEQ ID NO:18)
10m	<u>GCC</u> gAuCCAUA <u>Cug</u> CggAAUU (SEQ ID NO:19)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:20)
11m	<u>GCC</u> gAuCCAUA <u>Cug</u> CggAAUU (SEQ ID NO:21)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:22)
12m	<u>GCC</u> gAuCCAUA <u>Cug</u> CGgAAUU (SEQ ID NO:23)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:24)
13m	<u>GCC</u> gAuCCAUA <u>Cug</u> CGgAAUU (SEQ ID NO:25)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:26)
14m	<u>GC</u> uAgUUUACuAgUGCCA <u>UU</u> (SEQ ID NO:27)	UGGCACUAGUAAACuGAGCUU (SEQ ID NO:28)
15m	<u>Cug</u> GCuCAGUUuACUAGUGUU (SEQ ID NO:29)	CACUAGUAAACUGAgCCAGUU (SEQ ID NO:30)
Minúscula = modificación 2'-O-metilo		
Subrayado = resto UNA		

Generación de moléculas ARNip

Se puede proporcionar ARNip en varias formas que incluyen, por ejemplo, uno o más dúplex de ARN interferente pequeño (ARNip) aislados, ARN de cadena doble (ARNcd) con mayor longitud, o como ARNip o ARNcd transcritos a partir de un casete de transcripción en un plásmido de ADN. En algunas modalidades, el ARNip se puede producir de forma enzimática o mediante síntesis orgánica parcial/total, y los ribonucleótidos modificados pueden introducirse mediante síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. En determinados casos, cada cadena se prepara de forma química. Los métodos para sintetizar las moléculas de ARN son conocidas en la técnica, por

ejemplo, los métodos de síntesis química como se describe en Verma y Eckstein (1998) o como se describe en la presente.

Se conocen en la técnica métodos para aislar ARN, sintetizar ARN,
5 hibridar ácidos nucleicos, elaborar y analizar bibliotecas de ADNc, y realizar PCR (ver, por ejemplo, Gubler y Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook et ál., *supra*; Ausubel et ál., *supra*), así como los métodos PCR (ver las patentes estadounidenses n.º 4,683,195 y 4,683,202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis
10 et ál., ed, 1990)). Las bibliotecas de expresión también son conocidas por los expertos en la técnica. Los textos básicos adicionales que describen los métodos generales incluyen Sambrook et ál., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current*
15 *Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et ál., ed., 1994). Las descripciones de estas referencias se incorporan a la presente en su totalidad a todos los efectos mediante esta referencia.

Típicamente, los ARNip se sintetizan de forma química. Los
20 oligonucleótidos que comprenden las moléculas de ARNip pueden sintetizarse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como las descritas en Usman et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe et ál., *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott et ál., *Nucl. Acids Res.*,
25 23:2677-2684 (1995); y Wincott et ál., *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997). La síntesis de oligonucleótidos utiliza grupos de acoplamiento y protección de ácidos nucleicos comunes, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosforamiditas en el extremo 3'. A modo de ejemplo no taxativo, se pueden llevar a cabo síntesis a
30 pequeña escala en un sintetizador Applied Biosystems mediante el uso de un protocolo a escala de 0,2 μ mol. De manera alternativa, las

síntesis en la escala de 0,2 μ mol se pueden realizar en un sintetizador de placa de 96 pocillos de Protogene (Palo Alto, CA). No obstante, también se encuentra dentro del alcance una escala de síntesis mayor o menor. Los expertos en la técnica conocen los reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos, métodos para la desprotección de ARN y métodos para la purificación de ARN.

Las moléculas ARNip pueden ensamblarse a partir de dos oligonucleótidos distintos, donde un oligonucleótido comprende la cadena sentido y el otro comprende la cadena antisentido del ARNip. Por ejemplo, cada cadena puede sintetizarse de por separado y unirse mediante hibridación o ligación luego de la síntesis y/o desprotección.

Sistemas portadores que contienen ácidos nucleicos terapéuticos

Partículas lipídicas

Las partículas lipídicas pueden comprender uno o más ARNip (por ejemplo, una molécula de ARNip descrita en la Tabla A), un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un lípido no conjugado que inhibe la acumulación de partículas. En algunas modalidades, la molécula de ARNip se encuentra completamente envuelta dentro de la parte lipídica de la partícula lipídica de forma tal que la molécula de ARNip de la partícula lipídica sea resistente en una solución acuosa a la degradación de nucleasa. En otras modalidades, las partículas lipídicas descritas en la presente son sustancialmente no tóxicas para mamíferos tales como seres humanos. Las partículas lipídicas poseen típicamente un diámetro promedio de alrededor de 30 nm a alrededor de 150 nm, de alrededor de 40 nm a alrededor de 150 nm, de alrededor de 50 nm a alrededor de 150 nm, de alrededor de 60 nm a

alrededor de 130 nm, de alrededor de 70 nm a alrededor de 110 nm o de alrededor de 70 nm a alrededor de 90 nm. En algunas modalidades, las partículas lipídicas poseen un diámetro promedio de alrededor de 30 μ m a alrededor de 150 nm. Las partículas lipídicas también poseen típicamente una relación de lípido:ácido nucleico (por ejemplo, relación lípido:ARNip) (relación de masa/masa) de alrededor de 1:1 a alrededor de 100:1, de alrededor de 1:1 a alrededor de 50:1, de alrededor de 2:1 a alrededor de 25:1, de alrededor de 3:1 a alrededor de 20:1, de alrededor de 5:1 a alrededor de 15:1, o de alrededor de 5:1 a alrededor de 10:1. En determinadas modalidades, la partícula de lípido-ácido nucleico posee una relación de masa de lípido:ARNip de alrededor de 5:1 a alrededor de 15:1.

Las partículas lipídicas incluyen partículas de lípido-ácido nucleico estables en suero que comprenden una o más moléculas de ARNip (por ejemplo, una molécula de ARNip descrita en la Tabla A), un lípido catiónico (por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos de la Fórmula I-III o sales de estos, tal como se establece en la presente), un lípido no catiónico (por ejemplo, mezclas de uno o más fosfolípidos y colesterol) y un lípido conjugado que inhibe la acumulación de las partículas (por ejemplo, uno o más conjugados de PEG-lípido). La partícula lipídica puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más moléculas de ARNip (por ejemplo, moléculas de ARNip descritas en la Tabla A) que se dirigen a uno o más de los genes descritos en la presente. Las partículas de lípido-ácido nucleico y su método de preparación se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 5,753,613; 5,785,992; 5,705,385; 5,976,567; 5,981,501; 6,110,745; y 6,320,017; y la publicación PCT n.º WO 96/40964, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad a todos los fines.

En las partículas de lípido-ácido nucleico, la una o más moléculas de

ARNip (por ejemplo, una molécula de ARNip descrita en la Tabla A) puede encapsularse completamente dentro de la parte lipídica de la partícula, mediante lo cual se protege al ARNip de la degradación de nucleasa. En determinados casos, el ARNip en la partícula de lípido-ácido nucleico no se degrada sustancialmente luego de la exposición de la partícula a una nucleasa a 37 °C durante al menos alrededor de 20, 30, 45 o 60 minutos. En otros casos determinados, el ARNip de la partícula de lípido-ácido nucleico no se degrada sustancialmente luego de la incubación de la partícula en suero a 37 °C durante al menos alrededor de 30, 45 o 60 minutos, o al menos alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 o 36 horas. En otras modalidades, el ARNip forma complejos con la parte lipídica de la partícula. Uno de los beneficios de las formulaciones es que las composiciones de la partícula de lípido-ácido nucleico son sustancialmente no tóxicas para mamíferos tales como seres humanos.

La expresión "completamente encapsulado" indica que el ARNip (por ejemplo, una molécula de ARNip descrita en la Tabla A) de la partícula de lípido-ácido nucleico no se degrada de forma significativa luego de la exposición al suero o a un ensayo de nucleasa que degradaría de forma significativa el ADN o ARN libre. En un sistema completamente encapsulado, preferentemente menos de alrededor de 25 % del ARNip de la partícula se degrada en un tratamiento que normalmente degradaría el 100 % del ARNip libre, más preferentemente menos de alrededor de 10 %, y más preferentemente menos de alrededor de 5 % del ARNip en la partícula se degrada. "Completamente encapsulado" también indica que las partículas de lípido-ácido nucleico son estables en suero, es decir, que no se descomponen rápidamente en sus componentes luego de la administración *in vivo*.

En el contexto de los ácidos nucleicos, puede determinarse una encapsulación completa al realizar un ensayo de exclusión con tinta fluorescente impermeable a la membrana, que utiliza una tinta que posee una mayor fluorescencia cuando se asocia con un ácido nucleico.

5 Se encuentran disponibles tintas específicas tales como OliGreen® y RiboGreen® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA) para la determinación cuantitativa de ADN de plásmido, desoxirribonucleótidos de cadena simple y/o ribonucleótidos de cadena simple o doble. La encapsulación se determina al agregar la tinta a una formulación liposomal, medir
10 la fluorescencia resultante y compararla con la fluorescencia observada luego de la adición de una pequeña cantidad de detergente no iónico. La interrupción mediada por el detergente de la bicapa liposomal libera el ácido nucleico encapsulado y le permite interactuar con la tinta impermeable a la membrana. La encapsulación
15 de ácido nucleico se puede calcular como $E = (I_o - I)/I_o$, donde I e I_o se refieren a las intensidades de fluorescencia antes y después de la adición de detergente (ver Wheeler et ál., *Gene Ther.*, 6:271-281 (1999)).

20 En algunas instancias, la composición de partícula de lípido-ácido nucleico comprende una molécula de ARNip completamente encapsulada dentro de la parte lipídica de las partículas, de modo que de alrededor de 30 % a alrededor de 100 %, de alrededor de 40 % a
alrededor de 100 %, de alrededor de 50 % a alrededor de 100 %, de
25 alrededor de 60 % a alrededor de 100 %, de alrededor de 70 % a
alrededor de 100 %, de alrededor de 80 % a alrededor de 100 %, de
alrededor de 90 % a alrededor de 100 %, de alrededor de 30 % a
alrededor de 95 %, de alrededor de 40 % a alrededor de 95 %, de
alrededor de 50 % a alrededor de 95 %, de alrededor de 60 % a
30 alrededor de 95 %, de alrededor de 70 % a alrededor de 95 %, de
alrededor de 80 % a alrededor de 95 %, de alrededor de 85 % a
alrededor de 95 %, de alrededor de 90 % a alrededor de 95 %, de

alrededor de 30 % a alrededor de 90 %, de alrededor de 40 % a
 alrededor de 90 %, de alrededor de 50 % a alrededor de 90 %, de
 alrededor de 60 % a alrededor de 90 %, de alrededor de 70 % a
 alrededor de 90 %, de alrededor de 80 % a alrededor de 90 %, o al
 5 menos alrededor de 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70
 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97%,
 98%, o 99 % (o cualquier fracción de esta o intervalo de este) de las
 partículas poseen el ARNip encapsulado en estas.

10 En otras instancias, la composición de partícula de lípido-ácido
 nucleico comprende ARNip completamente encapsulado dentro de la parte
 lipídica de las partículas, de modo que de alrededor de 30 % a
 alrededor de 100 %, de alrededor de 40 % a alrededor de 100 %, de
 alrededor de 50 % a alrededor de 100 %, de alrededor de 60 % a
 15 alrededor de 100 %, de alrededor de 70 % a alrededor de 100 %, de
 alrededor de 80 % a alrededor de 100 %, de alrededor de 90 % a
 alrededor de 100 %, de alrededor de 30 % a alrededor de 95 %, de
 alrededor de 40 % a alrededor de 95 %, de alrededor de 50 % a
 alrededor de 95 %, de alrededor de 60 % a alrededor de 95 %, de
 20 alrededor de 70 % a alrededor de 95 %, de alrededor de 80 % a
 alrededor de 95 %, de alrededor de 85 % a alrededor de 95 %, de
 alrededor de 90 % a alrededor de 95 %, de alrededor de 30 % a
 alrededor de 90 %, de alrededor de 40 % a alrededor de 90 %, de
 alrededor de 50 % a alrededor de 90 %, de alrededor de 60 % a
 25 alrededor de 90 %, de alrededor de 70 % a alrededor de 90 %, de
 alrededor de 80 % a alrededor de 90 %, o al menos alrededor de 30 %,
 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90
 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97%, 98%, o 99% (o cualquier
 fracción de esta o intervalo de este) del ARNip ingresado se
 30 encuentra encapsulado en las partículas.

Dependiendo del uso que se le pretende dar a las partículas

lipídicas, pueden variarse las proporciones de los componentes y la eficacia de administración de una formulación en particular puede medirse, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de parámetros de liberación endosomal (ERP, por sus siglas en inglés).

5

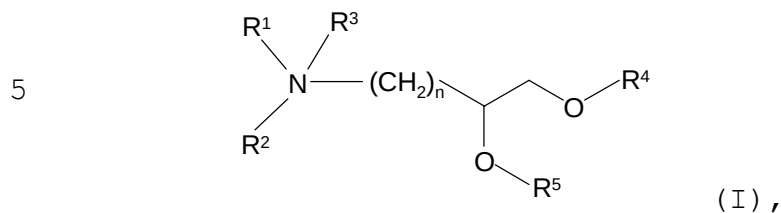
Lípidos catiónicos

Puede utilizarse cualquiera de una variedad de lípidos catiónicos o sales de estos en las partículas lipídicas, ya sea por sí solos o
10 junto con una o más especies de lípidos catiónicos o especies de lípidos no catiónicos. Los lípidos catiónicos incluyen los enantiómeros (R) y/o (S) de estos.

En un aspecto, el lípido catiónico es un lípido de dialquilo. Por
15 ejemplo, los lípidos de dialquilo pueden incluir lípidos que comprenden dos cadenas alquilo saturadas o insaturadas, donde cada una de las cadenas alquilo puede estar sustituida o no sustituida. En determinadas modalidades, cada una de las dos cadenas de alquilo comprende al menos, por ejemplo, 8 átomos de carbono, 10 átomos de
20 carbono, 12 átomos de carbono, 14 átomos de carbono, 16 átomos de carbono, 18 átomos de carbono, 20 átomos de carbono, 22 átomos de carbono o 24 átomos de carbono.

En un aspecto, el lípido catiónico es un lípido de trialquilo. Por
25 ejemplo, los lípidos de trialquilo pueden incluir lípidos que comprenden tres cadenas alquilo saturadas o insaturadas, donde cada una de las cadenas alquilo puede estar sustituida o no sustituida. En determinadas modalidades, cada una de las tres cadenas de alquilo comprende al menos, por ejemplo, 8 átomos de carbono, 10 átomos de
30 carbono, 12 átomos de carbono, 14 átomos de carbono, 16 átomos de carbono, 18 átomos de carbono, 20 átomos de carbono, 22 átomos de carbono o 24 átomos de carbono.

En un aspecto, son útiles los lípidos catiónicos de la Fórmula I que poseen la siguiente estructura:



o sales de este, donde:

10 R^1 y R^2 son iguales o distintos y son, independientemente, hidrógeno (H) o un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_6$ o alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente sustituido, o R^1 y R^2 pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1
15 nitrógeno (N), oxígeno (O) y mezclas de estos;

R^3 está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ para proporcionar una amina cuaternaria;

R^4 y R^5 son iguales o distintos y son, independientemente, un alquilo $\text{C}_{10}\text{-C}_{24}$, alquenilo $\text{C}_{10}\text{-C}_{24}$, alquinilo $\text{C}_{10}\text{-C}_{24}$ o acilo $\text{C}_{10}\text{-C}_{24}$ opcionalmente
20 sustituido, donde al menos uno de R^4 y R^5 comprende al menos dos sitios de insaturación; y
 n es 0, 1, 2, 3 o 4.

En algunas modalidades, R^1 y R^2 son independientemente un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_4$ o alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_4$ opcionalmente sustituido. En una
25 modalidad preferida, R^1 y R^2 son ambos grupos metilo. En otras modalidades preferidas, n es 1 o 2. En otras modalidades, R^3 está ausente cuando el pH se encuentra por encima de la pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo de la
30 pK_a del lípido catiónico, de forma tal que el grupo principal amino esté protonado. En una modalidad alternativa, R^3 es un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En

modalidades adicionales, R^4 y R^5 son, independientemente, un alquilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, alquenilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, alquinilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, o acilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ opcionalmente sustituido, donde al menos uno de R^4 y R^5 comprende al menos dos sitios de insaturación.

5

En determinadas modalidades, R^4 y R^5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un resto de dodecadienilo, un resto de tetradecadienilo, un resto de hexadecadienilo, un resto de octadecadienilo, un resto de icosadienilo, un resto de dodecatrienilo, un resto de tetradectrienilo, un resto de hexadecatrienilo, un resto de octadecatrienilo, un resto de icosatrienilo, un resto de araquidonilo y un resto de docosaheptaenoilo, así como derivados de acilo de estos (por ejemplo, linoleoilo, linolenilo, γ -linolenilo, etc.). En algunas instancias, uno de R^4 y R^5 comprende un grupo alquilo ramificado (por ejemplo, un resto de fitanilo) o un derivado de acilo de este (por ejemplo, un resto de fitanoilo). En determinadas instancias, el resto de octadecadienilo es un resto de linoleilo. En otras instancias determinadas, el resto de octadecatrienilo es un resto de linolenilo o un resto de γ -linolenilo. En determinadas modalidades, R^4 y R^5 son ambos restos de linoleilo, restos de linolenilo o restos de γ -linolenilo. En modalidades particulares, el lípido catiónico de la Fórmula I es 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-dilinoileiloxi-(N,N-dimetil)-butil-4-amina (C2-DLinDMA), 1,2-dilinoileoiloxi-(N,N-dimetil)-butil-4-amina (C2-DLinDAP) o mezclas de estos.

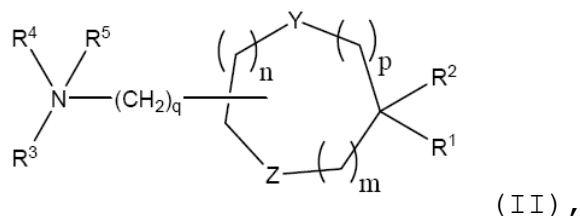
En algunas modalidades, el lípido catiónico de la Fórmula I forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una modalidad en particular, el lípido catiónico de la Fórmula I es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) de este, que es

30

preferentemente una sal cristalina.

La síntesis de los lípidos catiónicos tales como DLinDMA y DLenDMA, así como lípidos catiónicos adicionales, se describe en la publicación de patente estadounidense n.º 20060083780, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines. La síntesis de los lípidos catiónicos tales como C2-DLinDMA y C2-DLinDAP, así como lípidos catiónicos adicionales, se describe en la solicitud de patente internacional n.º WO2011/000106, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines.

En otro aspecto, son útiles los lípidos catiónicos de la Fórmula II que poseen la siguiente estructura (o sales de estos):



donde R¹ y R² son iguales o distintos y son, independientemente, un alquilo C₁₂-C₂₄, alquenido C₁₂-C₂₄, alquinilo C₁₂-C₂₄ o acilo C₁₂-C₂₄ opcionalmente sustituido; R³ y R⁴ son iguales o distintos y son, independientemente, un alquilo C₁-C₆, alquenido C₂-C₆ o alquinilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido, o R³ y R⁴ pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados de nitrógeno y oxígeno; R⁵ se encuentra ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C₁-C₆ para proporcionar una amina cuaternaria; m, n y p son iguales o distintos y son, independientemente, 0, 1 o 2, siempre y cuando m, n y p no sean 0 de forma simultánea; q es 0, 1, 2, 3 o 4; e Y y Z son iguales o distintos y son, independientemente, O, S o NH. En una modalidad preferida, q es 2.

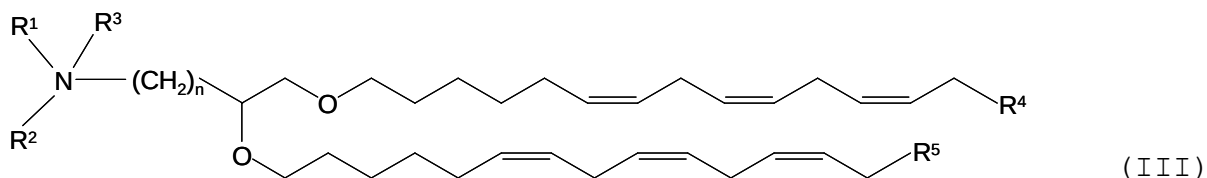
En algunas modalidades, el lípido catiónico de la Fórmula II es 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA; "XTC2" o "C2K"), 2,2-dilinoleil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C3-DMA; "C3K"), 2,2-dilinoleil-4-(4-dimetilaminobutil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C4-DMA; "C4K"), 2,2-dilinoleil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (DLin-K6-DMA), 2,2-dilinoleil-4-N-metilpepiazino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MPZ), 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dioleoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DO-K-DMA), 2,2-distearoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DS-K-DMA), 2,2-dilinoleil-4-N-morfolino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MA), cloruro de 2,2-dilinoleil-4-trimetilamino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-TMA.Cl), 2,2-dilinoleil-4,5-bis(dimetilaminometil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K²-DMA), 2,2-dilinoleol-4-metilpiperzina-[1,3]-dioxolano (D-Lin-K-N-metilpiperzina) o mezclas de estos. En una modalidad, el lípido catiónico de la Fórmula II es DLin-K-C2-DMA.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la Fórmula II forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una modalidad en particular, el lípido catiónico de la Fórmula II es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) de este, que es preferentemente una sal cristalina.

Se describe la síntesis de los lípidos catiónicos tales como DLin-K-DMA, así como lípidos catiónicos adicionales, en la publicación PCT n.º WO 09/086558, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines. Se describe la síntesis de los lípidos catiónicos tales como DLin-K-C2-DMA, DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLin-K6-DMA, DLin-K-MPZ, DO-K-DMA, DS-K-DMA, DLin-K-MA, DLin-K-TMA.Cl, DLin-K²-DMA, D-Lin-K-N-metilpiperzina, así como lípidos catiónicos adicionales, en la publicación PCT n.º

PCT/US2009/060251, denominada "Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids" ["Aminolípidos mejorados y métodos para la administración de ácidos nucleicos"], presentada el 9 de octubre de 2009, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines.

En un aspecto adicional, son útiles los lípidos catiónicos de la Fórmula III que poseen la siguiente estructura:



o sales de este, donde: R^1 y R^2 son iguales o distintos y son, independientemente, un alquilo C_1-C_6 , alquenido C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 opcionalmente sustituido, o R^1 y R^2 pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos que se seleccionan del grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O) y mezclas de estos; R^3 se encuentra ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C_1-C_6 para proporcionar una amina cuaternaria; R^4 y R^5 se encuentran ausentes o presentes y son iguales o distintos, y son, independientemente, un alquilo C_1-C_{10} o alquenido C_2-C_{10} opcionalmente sustituido; y n es 0, 1, 2, 3 o 4.

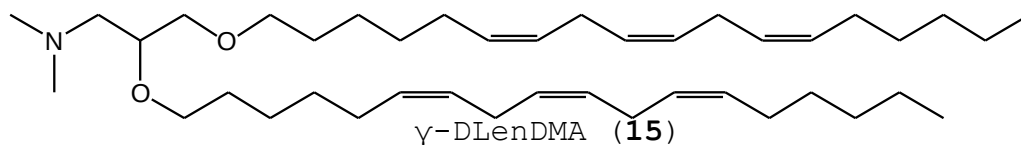
En algunas modalidades, R^1 y R^2 son independientemente un alquilo C_1-C_4 , alquenido C_2-C_4 o alquinilo C_2-C_4 opcionalmente sustituido. En una modalidad preferida, R^1 y R^2 son ambos grupos metilo. En otra modalidad preferida, R^4 y R^5 son ambos grupos butilo. En aun otra modalidad preferida, n es 1. En otras modalidades, R^3 está ausente cuando el pH se encuentra por encima de la pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo de la pK_a del

lípidos catiónicos, de forma tal que el grupo principal amino esté protonado. En una modalidad alternativa, R^3 es un alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En modalidades adicionales, R^4 y R^5 son, independientemente, un alquilo C_2-C_6 o C_2-C_4 , o alquenilo C_2-C_6 o C_2-C_4 opcionalmente sustituido.

En una modalidad alternativa, el lípido catiónico de la Fórmula III comprende ligaduras de éster entre el grupo principal amino y una o ambas cadenas alquilo. En algunas modalidades, el lípido catiónico de la Fórmula III forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una modalidad en particular, el lípido catiónico de la Fórmula III es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) de este, que es preferentemente una sal cristalina.

Si bien cada una de las cadenas alquilo de la Fórmula III contiene enlaces dobles *cis* en las posiciones 6, 9 y 12 (es decir, *cis,cis,cis*- $\Delta^6,\Delta^9,\Delta^{12}$), en una modalidad alternativa, uno, dos o tres de estos enlaces dobles en una o ambas cadenas alquilo puede encontrarse en la configuración *trans*.

En una modalidad en particular, el lípido catiónico de la Fórmula III tiene la estructura:



Se describe la síntesis de los lípidos catiónicos tales como γ -DLenDMA (**15**), así como lípidos catiónicos adicionales, en la solicitud provisional estadounidense n.º 61/222,462, denominada "Improved Cationic Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids" ["Lípidos catiónicos mejorados y métodos para la administración de ácidos nucleicos"], presentada el 1ro de julio de

2009, cuya descripción se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad a todos los fines.

Se describe la síntesis de lípidos catiónicos tales como DLin-M-C3-DMA ("MC3"), así como lípidos catiónicos adicionales (por ejemplo, determinados análogos de MC3), en la solicitud provisional estadounidense n.º 61/185,800, denominada "Novel Lipids and Compositions for the Delivery of Therapeutics" [Lípidos y composiciones novedosos para la administración de agentes terapéuticos], presentada el 10 de junio de 2009, y la solicitud provisional estadounidense n.º 61/287,995, denominada "Methods and Compositions for Delivery of Nucleic Acids" [Métodos y composiciones para la administración de ácidos nucleicos], presentada el 18 de diciembre de 2009, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad a todos los fines.

Los ejemplos de otros lípidos catiónicos o sales de estos que pueden incluirse en las partículas lipídicas incluyen, de modo no taxativo, lípidos catiónicos tales como los descritos en WO2011/000106, cuya descripción se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad a todos los fines, así como lípidos catiónicos tales como cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), 1,2-disteariloxi-N,N-dimetilaminopropano (DSDMA), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Col), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DMRIE), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermin-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminiotrifluoroacetato (DOSPA), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), 2-[5'-

(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi)-3-dimeti-1-(cis,cis-9',1-2'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-dilinoleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLincarbDAP), 1,2-dilinoleilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoyleyoxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoleioxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-dilinoleoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoleiltio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoleoil-2-linoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), sal de cloruro de 1,2-dilinoleiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloruro de 1,2-dilinoleoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoleiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), 3-(N,N-dilinoleilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodio (DOAP), 1,2-dilinoleiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-dioeilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DO-C-DAP), 1,2-dimiristoleoil-3-dimetilaminopropano (DMDAP), cloruro de 1,2-dioleoil-3-trimetilaminopropano (DOTAP.Cl), dilinoleilmetil-3-dimetilaminopropionato (DLin-M-C2-DMA; también denominado DLin-M-K-DMA o DLin-M-DMA), y mezclas de estos. Los lípidos catiónicos adicionales o sales de estos que pueden incluirse en las partículas lipídicas se describen en la publicación de patente estadounidense n.º 20090023673, cuya descripción se incorpora mediante esta referencia en su totalidad a todos los fines.

Se describe síntesis de los lípidos catiónicos tales como CLinDMA, así como lípidos catiónicos adicionales, en la publicación de patente estadounidense n.º 20060240554, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines. Se describe la síntesis de los lípidos catiónicos tales como DLin-C-DAP, DLinDAC, DLinMA, DLinDAP, DLin-S-DMA, DLin-2-DMAP, DLinTMA.Cl,

DLinTAP.Cl, DLinMPZ, DLinAP, DOAP y DLin-EG-DMA, así como lípidos catiónicos adicionales, en la publicación PCT n.º WO 09/086558, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines. La síntesis de lípidos catiónicos tales como DO-C-DAP, DMDAP, DOTAP.Cl, DLin-M-C2-DMA, así como lípidos catiónicos adicionales, se describe en la solicitud PCT n.º PCT/US2009/060251, denominada "Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids" ["Aminolípidos mejorados y métodos para la administración de ácidos nucleicos"], presentada el 9 de octubre de 2009, cuya descripción se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad a todos los fines. Se describió la síntesis de una cantidad de otros lípidos catiónicos y análogos relacionados en la patente estadounidense n.º 5,208,036; 5,264,618; 5,279,833; 5,283,185; 5,753,613; y 5,785,992; y en la publicación PCT n.º WO 96/10390, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad a todos los fines. Además, puede utilizarse una cantidad de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos, tales como, por ejemplo, LIPOFECTIN® (inclusive DOTMA y DOPE, disponibles de Invitrogen); LIPOFECTAMINE® (inclusive DOSPA y DOPE, disponible de Invitrogen); y TRANSFECTAM® (inclusive DOGS, disponible de Promega Corp.).

En algunas modalidades, el lípido catiónico comprende de alrededor de 50 % molar a alrededor de 90 % molar, de alrededor de 50 % molar a alrededor de 85 % molar, de alrededor de 50 % molar a alrededor de 80 % molar, de alrededor de 50 % molar a alrededor de 75 % molar, de alrededor de 50 % molar a alrededor de 70 % molar, de alrededor de 50 % molar a alrededor de 65 % molar, de alrededor de 50 % molar a alrededor de 60 % molar, de alrededor de 55 % molar a alrededor de 65 % molar, o de alrededor de 55 % molar a alrededor de 70 % molar (o cualquier fracción o intervalo de estos) del lípido total presente en la partícula. En modalidades particulares, el lípido catiónico

comprende alrededor de 50 % molar, 51 % molar, 52 % molar, 53 % molar, 54 % molar, 55 % molar, 56 % molar, 57 % molar, 58 % molar, 59 % molar, 60 % molar, 61 % molar, 62 % molar, 63 % molar, 64 % molar, o 65 % molar (o cualquier fracción de estos) del lípido total presente en la partícula.

En otras modalidades, el lípido catiónico comprende de alrededor de 2 % molar a alrededor de 60 % molar, de alrededor de 5 % molar a alrededor de 50 % molar, de alrededor de 10 % molar a alrededor de 50 % molar, de alrededor de 20 % molar a alrededor de 50 % molar, de alrededor de 20 % molar a alrededor de 40 % molar, de alrededor de 30 % molar a alrededor de 40 % molar, o de alrededor de 40 % molar (o cualquier fracción o intervalo de estos) del lípido total presente en la partícula.

15

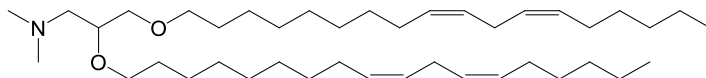
Se describen intervalos y porcentajes adicionales de lípidos catiónicos adecuados para su uso en las partículas lipídicas en la publicación PCT n.º WO 09/127060, solicitud estadounidense publicada n.º US 2011/0071208, publicación PCT n.º WO2011/000106 y solicitud estadounidense publicada n.º US 2011/0076335, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad a todos los fines.

Debe entenderse que el porcentaje de lípido catiónico presente en las partículas lipídicas es una cantidad objetivo, y que la cantidad real del lípido catiónico presente en la formulación puede variar, por ejemplo, en ± 5 % molar. Por ejemplo, en un ejemplo de formulación de partícula lipídica, la cantidad objetivo de lípido catiónico es 57,1 % molar, pero la cantidad real de lípido catiónico puede ser ± 5 % molar, ± 4 % molar, ± 3 % molar, ± 2 % molar, ± 1 % molar, $\pm 0,75$ % molar, $\pm 0,5$ % molar, $\pm 0,25$ % molar, o $\pm 0,1$ % molar de la cantidad objetivo, donde el resto de la formulación se compone por otros

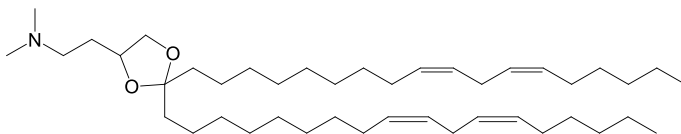
componentes lípidos (hasta llegar a 100 % molar del total de lípidos presentes en la partícula); no obstante, el experto en la técnica comprenderá que el % molar total puede diferir ligeramente de 100 % debido al redondeo, por ejemplo, 99,9 % molar o 100,1 % molar.

5

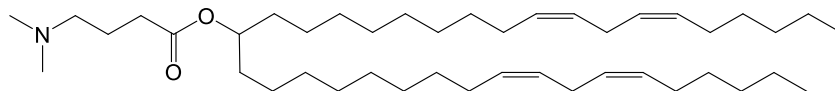
Se muestran a continuación otros ejemplos de lípidos catiónicos útiles para su inclusión en partículas lipídicas:



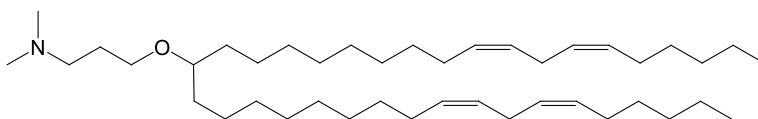
10 N,N-dimetil-2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)propan-1-amina
(5)



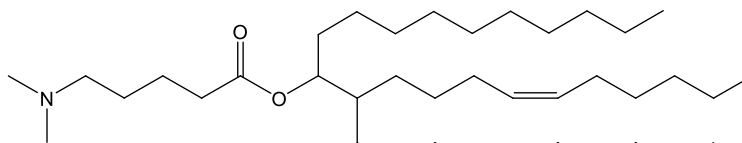
15 2-(2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)-1,3-dioxolan-4-yl)-N,N-
dimetiletanamina (6)



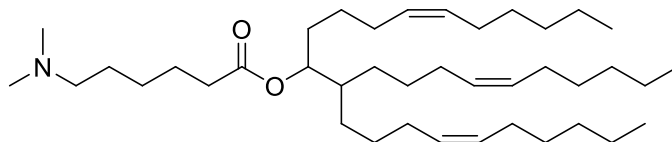
(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il
4-
20 (dimetilamino)butanoato (7)



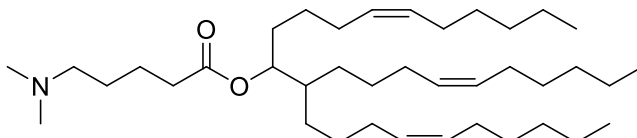
3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-iloxi)-N,N-
25 dimetilpropan-1-amina (8)



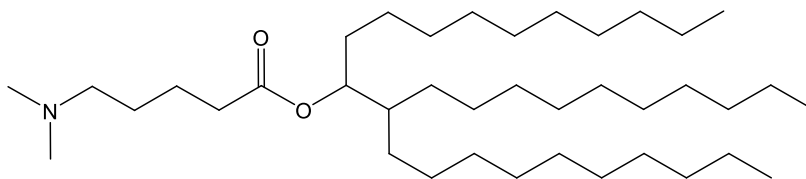
5-(dimetilamino)pentanoato de (Z)-12-((Z)-dec-4-en-1-ilo) docos-16-en-11-
30 ilo (53)



6-(dimetilamino)hexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-
 5 dien-11-ilo (**11**)



5-(dimetilamino)pentanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-
 10 6,16-dien-11-ilo (**13**)



15 5-(dimetilamino)pentanoato de 12-decildocosan-11-ilo (**14**).

Lípidos no catiónicos

Los lípidos no catiónicos utilizados en las partículas lipídicas
 20 pueden ser cualquiera de una variedad de lípidos zwitteriónicos,
 aniónicos o no cargados neutros capaces de producir un complejo
 estable.

Los ejemplos no taxativos de lípidos no catiónicos incluyen
 25 fosfolípidos tales como lecitina, fosfatidiletanolamina,
 lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina,
 fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingomielina de huevo (ESM),
 cefalina, cardiolipina, ácido fosfatídico, cerebrósidos,
 dicetilfosfato, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC),
 30 dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC),
 dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol
 (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-

fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleiol-fosfatidilglicerol (POPG), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE),
 5 dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), lisofosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina y mezclas de estos.
 10 También se pueden utilizar otros fosfolípidos de diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina. Los grupos acilo en estos lípidos son preferentemente grupos acilo derivados de ácidos grasos que poseen cadenas de carbono C₁₀-C₂₄, por ejemplo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo u oleoilo.

15

Otros ejemplos de lípidos no catiónicos incluyen esteroides tales como colesterol y derivados de estos. Los ejemplos no taxativos de derivados de colesterol incluyen análogos polares tales como 5 α -colestanol, éter de 5 β -coprostanol, colesteril-(2'-hidroxi)-etil,
 20 éter de colesteril-(4'-hidroxi)-butilo, y 6-quetocolestanol; análogos no polares tales como 5 α -colestano, colesteno, 5 α -colestano, 5 β -colestano, y decanoato de colesterilo; y mezclas de estos. En modalidades preferidas, el derivado de colesterol es un análogo polar tal como éter de colesteril-(4'-hidroxi)-butilo. La síntesis de éter
 25 de colesteril-(2'-hidroxi)-etilo se describe en la publicación PCT n.º WO 09/127060, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines.

30

En algunas modalidades, el lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas comprende o consiste en una mezcla de uno o más fosfolípidos y colesterol o un derivado de estos. En otras modalidades, el lípido no catiónico presente en las partículas

lipídicas comprende o consiste en uno o más fosfolípidos, por ejemplo, una formulación de partículas lipídicas sin colesterol. En aun otras modalidades, el lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas comprende o consiste en colesterol o un derivado de este, por ejemplo, una formulación de partículas lipídicas sin fosfolípidos.

Otros ejemplos de lípidos no catiónicos adecuados para su uso incluyen lípidos que no contienen fósforo, tales como, por ejemplo, estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, acetyl palmitato, glicerolricinoleato, hexadecil estereato, isopropil miristato, polímeros acrílicos anfotéricos, lauril sulfato de trietanolamina, sulfato de alquil-arilo, amidas de ácidos grasos polietiloxilados, bromuro de dioctadecildimetilamonio, ceramida, esfingomielina y similares.

En algunas modalidades, el lípido no catiónico comprende de alrededor de 10 % molar a alrededor de 60 % molar, de alrededor de 20 % molar a alrededor de 55 % molar, de alrededor de 20 % molar a alrededor de 45 % molar, de alrededor de 20 % molar a alrededor de 40 % molar, de alrededor de 25 % molar a alrededor de 50 % molar, de alrededor de 25 % molar a alrededor de 45 % molar, de alrededor de 30 % molar a alrededor de 50 % molar, de alrededor de 30 % molar a alrededor de 45 % molar, de alrededor de 30 % molar a alrededor de 40 % molar, de alrededor de 35 % molar a alrededor de 45 % molar, de alrededor de 37 % molar a alrededor de 45 % molar, o alrededor de 35 % molar, 36 % molar, 37 % molar, 38 % molar, 39 % molar, 40 % molar, 41 % molar, 42 % molar, 43 % molar, 44 % molar, o 45 % molar (o cualquier fracción o intervalo de estos) del lípido total presente en la partícula.

En modalidades donde las partículas lipídicas contienen una mezcla de fosfolípidos y colesterol o un derivado de colesterol, la mezcla

puede comprender hasta alrededor de 40 % molar, 45 % molar, 50 % molar, 55 % molar o 60 % molar del lípido total presente en la partícula.

5 En algunas modalidades, el componente fosfolípido en la mezcla puede comprender de alrededor de 2 % molar a alrededor de 20 % molar, de alrededor de 2 % molar a alrededor de 15 % molar, de alrededor de 2 % molar a alrededor de 12 % molar, de alrededor de 4 % molar a alrededor de 15 % molar, o de alrededor de 4 % molar a alrededor de 10 % molar, (o cualquier fracción o intervalo de estos) del lípido total presente en la partícula. En determinadas modalidades, el componente fosfolípido de la mezcla comprende de alrededor de 5 % molar a alrededor de 17 % molar, de alrededor de 7 % molar a alrededor de 17 % molar, de alrededor de 7 % molar a alrededor de 15 % molar, de alrededor de 8 % molar a alrededor de 15 % molar, o alrededor de 8 % molar, 9 % molar, 10 % molar, 11 % molar, 12 % molar, 13 % molar, 14 % molar o 15 % molar (o cualquier fracción de estos o intervalo de estos) del lípido total presente en la partícula. A modo de ejemplo no taxativo, una formulación de partículas lipídicas que comprende una mezcla de fosfolípidos y colesterol puede comprender un fosfolípido tal como DPPC o DSPC a alrededor de 7 % molar (o cualquier fracción de estos), por ejemplo, en una mezcla con colesterol o un derivado de colesterol a alrededor de 34 % molar (o cualquier fracción de estos) del lípido total presente en la partícula. A modo de otro ejemplo no taxativo, una formulación de partículas lipídicas que comprende una mezcla de fosfolípidos y colesterol puede comprender un fosfolípido tal como DPPC o DSPC a alrededor de 7 % molar (o cualquier fracción de estos), por ejemplo, en una mezcla con colesterol o un derivado de colesterol a alrededor de 32 % molar (o cualquier fracción de estos) del lípido total presente en la partícula.

A modo de ejemplo adicional, una formulación de lípidos útil posee una relación de lípido con respecto al fármaco (por ejemplo, ARNip) de alrededor de 10:1 (por ejemplo, una relación de lípido:fármaco de 9,5:1 a 11:1, de 9,9:1 a 11:1, o de 10:1 a 10,9:1). En determinadas modalidades adicionales, una formulación de lípidos útil posee una relación de lípidos con respecto al fármaco (por ejemplo, ARNip) de alrededor de 9:1 (por ejemplo, una relación de lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, inclusive 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

En otras modalidades, el componente de colesterol de la mezcla puede comprender de alrededor de 25 % molar a alrededor de 45 % molar, de alrededor de 25 % molar a alrededor de 40 % molar, de alrededor de 30 % molar a alrededor de 45 % molar, de alrededor de 30 % molar a alrededor de 40 % molar, de alrededor de 27 % molar a alrededor de 37 % molar, de alrededor de 25 % molar a alrededor de 30 % molar, o de alrededor de 35 % a alrededor de 40 % molar (o cualquier fracción o intervalo de estos) del lípido total presente en la partícula. En determinadas modalidades preferidas, el componente de colesterol de la mezcla comprende de alrededor de 25 % molar a alrededor de 35 % molar, de alrededor de 27 % molar a alrededor de 35 % molar, de alrededor de 29 % molar a alrededor de 35 % molar, de alrededor de 30 % molar a alrededor de 35 % molar, de alrededor de 30 % molar a alrededor de 34 % molar, de alrededor de 31 % molar a alrededor de 33 % molar, o alrededor de 30 % molar, 31 % molar, 32 % molar, 33 % molar, 34 % molar, o 35 % molar (o cualquier fracción o intervalo de estos) del lípido total presente en la partícula.

En modalidades en las que las partículas lipídicas no poseen fosfolípidos, el colesterol o un derivado de este puede comprender hasta alrededor de 25 % molar, 30 % molar, 35 % molar, 40 % molar, 45 % molar, 50 % molar, 55 % molar, o 60 % molar del lípido total

presente en la partícula.

En algunas modalidades, el colesterol o derivado de este en la formulación de la partícula lipídica sin fosfolípidos puede comprender de alrededor de 25 % molar a alrededor de 45 % molar, de alrededor de 25 % molar a alrededor de 40 % molar, de alrededor de 30 % molar a alrededor de 45 % molar, de alrededor de 30 % molar a alrededor de 40 % molar, de alrededor de 31 % molar a alrededor de 39 % molar, de alrededor de 32 % molar a alrededor de 38 % molar, de alrededor de 33 % molar a alrededor de 37 % molar, de alrededor de 35 % molar a alrededor de 45 % molar, de alrededor de 30 % molar a alrededor de 35 % molar, de alrededor de 35 % molar a alrededor de 40 % molar, o alrededor de 30 % molar, 31 % molar, 32 % molar, 33 % molar, 34 % molar, 35 % molar, 36 % molar, 37 % molar, 38 % molar, 39 % molar, o 40 % molar (o cualquier fracción o intervalo de estos) del lípido total presente en la partícula. A modo de ejemplo no taxativo, una formulación de partícula lipídica puede comprender colesterol a alrededor de 37 % molar (o cualquier fracción de este) del lípido total presente en la partícula. A modo de otro ejemplo no taxativo, una formulación de partícula lipídica puede comprender colesterol a alrededor de 35 % molar (o cualquier fracción de este) del lípido total presente en la partícula.

En otras modalidades, el lípido no catiónico comprende de alrededor de 5 % molar a alrededor de 90 % molar, de alrededor de 10 % molar a alrededor de 85 % molar, de alrededor de 20 % molar a alrededor de 80 % molar, de alrededor de 10 % molar (por ejemplo, fosfolípido solo), o alrededor de 60 % molar (por ejemplo, fosfolípidos y colesterol o derivados de estos) (o cualquier fracción o intervalo de estos) del lípido total presente en la partícula.

Se describen intervalos y porcentajes adicionales de lípidos no

catiónicos adecuados para su uso en las partículas lipídicas en la publicación PCT n.º WO 09/127060, solicitud estadounidense publicada n.º US 2011/0071208, publicación PCT n.º WO2011/000106 y solicitud estadounidense publicada n.º US 2011/0076335, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad a todos los fines.

Debe entenderse que el porcentaje del lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas es una cantidad objetivo, y que la cantidad real de lípido no catiónico presente en la formulación puede variar, por ejemplo, en ± 5 % molar, ± 4 % molar, ± 3 % molar, ± 2 % molar, ± 1 % molar, $\pm 0,75$ % molar, $\pm 0,5$ % molar, $\pm 0,25$ % molar o $\pm 0,1$ % molar.

Conjugados lipídicos

Además de los lípidos catiónicos y no catiónicos, las partículas lipídicas pueden comprender además un conjugado de lípidos. El lípido conjugado es útil dado que previene la acumulación de partículas. Los lípidos conjugados adecuados incluyen, de modo no taxativo, conjugados de PEG-lípido, conjugados de POZ-lípido, conjugados de ATTA-lípido, conjugados de catiónicos-polímeros-lípidos (CPL) y mezclas de estos. En determinadas modalidades, las partículas comprenden ya sea un conjugado PEG-lípido o un conjugado de ATTA-lípido junto con un CPL.

En una modalidad preferida, el conjugado lipídico es un PEG-lípido. Los ejemplos de PEG-lípidos incluyen, de modo no taxativo, PEG acoplado a dialquiloxypropilos (PEG-DAA) tal como se describe, por ejemplo, en la publicación PCT n.º WO 05/026372, PEG acoplado a diacilglicerol (PEG-DAG) tal como se describe, por ejemplo, en las publicaciones de patente estadounidense n.º 20030077829 y 2005008689,

PEG acoplado a fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina (PEG-PE), PEG conjugado a ceramidas tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5,885,613, PEG conjugado a colesterol o un derivado de este, y mezclas de estos. Las descripciones de estos documentos de patente se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad a todos los fines.

Otros PEG-lípidos adecuados para su uso incluyen, de modo no taxativo, mPEG2000-1,2-di-O-alkyl-sn3-carbomoilglicérido (PEG-C-DOMG). Se describe la síntesis de PEG-C-DOMG en la publicación PCT n.º WO 09/086558, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines. Otros conjugados adecuados de PEG-lípido incluyen, de modo no taxativo, 1-[8'-(1,2-dimiristoil-3-propanoxi)-carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil- ω -metil-poli(etilenglicol) (2KPEG-DMG). Se describe la síntesis de 2KPEG-DMG en la patente estadounidense n.º WO 7,404,969, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines.

El PEG es un polímero lineal soluble en agua de unidades de repetición de PEG etileno con dos grupos de extremo hidroxilo. Los PEG se clasifican según su peso molecular; por ejemplo, el PEG 2000 tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2000 daltons, y el PEG 5000 tiene un peso molecular promedio de alrededor de 5000 daltons. Los PEG se encuentran disponibles en el mercado de Sigma Chemical Co. y otras empresas e incluyen, de modo no taxativo, los siguientes:

monometoxipolietilenglicol	(MePEG-OH),
monometoxipolietilenglicol-succinato	(MePEG-S),
monometoxipolietilenglicol-succinimidil succinato	(MePEG-S-NHS),
monometoxipolietilenglicol-amina	(MePEG-NH ₂),
monometoxipolietilenglicol-tresilato	(MePEG-TRES),
monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo	(MePEG-IM), así como

los compuestos que contienen un grupo de extremo hidroxilo en vez de un grupo de extremo metoxi (por ejemplo, HO-PEG-S, HO-PEG-S-NHS, HO-PEG-NH₂, etc.). Son útiles también otros PEG tales como los descritos en las patentes estadounidenses n.º 6,774,180 y 7,053,150 (por
5 ejemplo, mPEG (20 KDa) amina) para la preparación de los conjugados de PEG-lípido. Las descripciones de estas patentes se incorporan a la presente en su totalidad a todos los efectos mediante esta referencia. Además, el monometoxipolietilenglicol-ácido acético (MePEG-CH₂COOH) es particularmente útil para preparar conjugados de
10 PEG-lípido que incluyen, por ejemplo, conjugados PEG-DAA.

El resto PEG de los conjugados de PEG-lípido descritos en la presente puede comprender un peso molecular promedio dentro del intervalo de alrededor de 550 daltons a alrededor de 10.000 daltons. En
15 determinados casos, el resto PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 750 daltons a alrededor de 5000 daltons (por ejemplo, de alrededor de 1000 daltons a alrededor de 5000 daltons, de alrededor de 1500 daltons a alrededor de 3000 daltons, de alrededor de 750 daltons a alrededor de 3000 daltons, de alrededor de 750 daltons a
20 alrededor de 2000 daltons, etc.). En modalidades preferidas, el resto PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2.000 daltons a alrededor de 750 daltons.

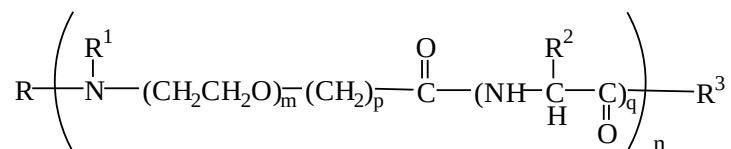
En determinados casos, el PEG puede estar opcionalmente sustituido
25 por un grupo alquilo, alcoxi, acilo o arilo. El PEG se puede conjugar directamente al lípido o se puede unir al lípido mediante un resto enlazador. Puede utilizarse cualquier resto enlazador adecuado para acoplar el PEG a un lípido, inclusive, por ejemplo, restos enlazadores que no contienen éster y restos enlazadores que contienen
30 éster. En una modalidad preferida, el resto enlazador es un resto enlazador que no contiene éster. Tal como se usa en la presente, la expresión "resto enlazador que no contiene éster" se refiere a un

resto enlazador que no contiene un enlace de éster carboxílico ($-\text{OC}(\text{O})-$). Los restos enlazadores adecuados que no contienen éster incluyen, de modo no taxativo, amido ($-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$), amino ($-\text{NR}-$), carbonilo ($-\text{C}(\text{O})-$), carbamato ($-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$), urea ($-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$),
 5 disulfuro ($-\text{S}-\text{S}-$), éter ($-\text{O}-$), succinilo ($-(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$), succinamidilo ($-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$), éter, disulfuro, así como combinaciones de estos (tales como un enlazador que contiene tanto un resto enlazador carbamato como un resto enlazador amido). En una
 10 modalidad preferida, se utiliza un enlazador carbamato para acoplar el PEG al lípido.

En otras modalidades, se utiliza un resto enlazador que contiene éster para acoplar el PEG al lípido. Los restos enlazadores adecuados que contienen éster incluyen, por ejemplo, carbonato ($-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$),
 15 succinoilo, fosfato ésteres ($-\text{O}-\text{O}-\text{POH}-\text{O}-$), ésteres de sulfonato, y combinaciones de estos.

Las fosfatidiletanolaminas que poseen una variedad de grupos de cadena de acilo de diversas longitudes de cadena y grados de saturación se pueden conjugar al PEG para formar el conjugado
 20 lipídico. Dichas fosfatidiletanolaminas se encuentran disponibles en el mercado, o pueden aislarse o sintetizarse mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Se prefieren las fosfatidiletanolaminas que contienen ácidos grasos saturados o insaturados con longitudes de cadena de carbono dentro
 25 del intervalo de C_{10} a C_{20} . También pueden utilizarse fosfatidiletanolaminas con ácidos grasos monoinsaturados o diinsaturados, y mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados. Las fosfatidiletanolaminas adecuadas incluyen, de modo no taxativo,
 30 dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), y diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE).

El término "ATTA" o "poliamida" incluye, de modo no taxativo, compuestos descritos en las patentes estadounidenses n.º 6,320,017 y 6,586,559, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines. Estos compuestos incluyen un compuesto que posee la fórmula:

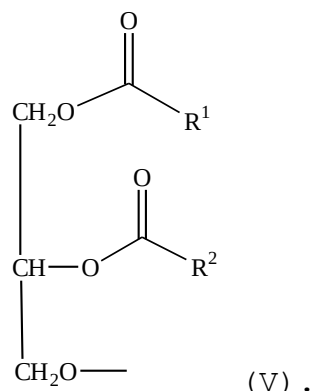


(IV)

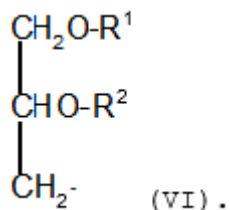
donde R es un miembro que se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y acilo; R¹ es un miembro que se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo; u opcionalmente, R y R¹, y el nitrógeno al que están unidos, forman un resto azido; R² es un miembro del grupo que se selecciona de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y una cadena lateral de un aminoácido; R³ es un miembro que se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, mercapto, hidrazino, amino y NR⁴R⁵, donde R⁴ y R⁵ son independientemente hidrógeno o alquilo; n es de 4 a 80; m es de 2 a 6; p es de 1 a 4; y q es 0 o 1. Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden utilizar otras poliamidas.

El término "diacilglicerol" o "DAG" incluye un compuesto que posee 2 cadenas de acilos grasos, R¹ y R², donde ambos poseen independientemente de 2 a 30 carbonos unidos a la posición 1 y 2 del glicerol mediante ligaduras de éster. Los grupos acilo pueden estar saturados o pueden tener varios grados de insaturación. Los grupos acilo adecuados incluyen, de modo no taxativo, lauroilo (C₁₂), miristoilo (C₁₄), palmitoilo (C₁₆), estearoilo (C₁₈) e icosoilo (C₂₀). En modalidades preferidas, R¹ y R² son iguales, es decir, R¹ y R² son

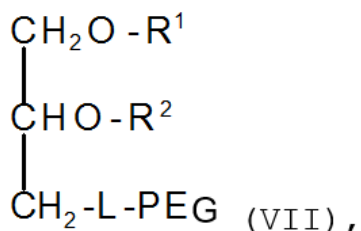
ambos miristoilo (es decir, dimiristoilo), R^1 y R^2 son ambos estearoilo (es decir, diestearoilo), etc. Los diacilgliceroles poseen la siguiente fórmula general:



El término "dialquiloxipropilo" o "DAA" incluye un compuesto que posee 2 cadenas alquilo, R^1 y R^2 , donde ambas poseen independientemente de 2 a 30 carbonos. Los grupos alquilo pueden estar saturados o pueden tener varios grados de insaturación. Los dialquiloxipropilos poseen la siguiente fórmula general:



En una modalidad preferida, el PEG-lípido es un conjugado PEG-DAA que posee la siguiente fórmula:



donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente y son grupos alquilo de cadena larga que poseen de alrededor de 10 a alrededor de 22 átomos de carbono; el PEG es un polietilenglicol; y L es un resto enlazador que no contiene éster o un resto enlazador que contiene

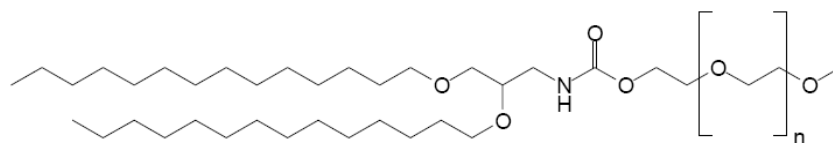
éster, tal como se describió anteriormente. Los grupos alquilo de cadena larga pueden ser saturados o insaturados. Los grupos alquilo adecuados incluyen, de modo no taxativo, decilo (C₁₀), laurilo (C₁₂), miristilo (C₁₄), palmitilo (C₁₆), estearilo (C₁₈) e icosilo (C₂₀). En 5 modalidades preferidas, R¹ y R² son iguales, es decir, R¹ y R² son ambos miristilo (es decir, dimiristilo), R¹ y R² son ambos estearilo (es decir, diestearilo), etc.

En la Fórmula VII que antecede, el PEG tiene un peso molecular promedio que se encuentra en el intervalo de alrededor de 550 daltons a alrededor de 10.000 daltons. En determinados casos, el PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 750 daltons a alrededor de 5000 daltons (por ejemplo, de alrededor de 1000 daltons a alrededor de 5000 daltons, de alrededor de 1500 daltons a alrededor de 3000 15 daltons, de alrededor de 750 daltons a alrededor de 3000 daltons, de alrededor de 750 daltons a alrededor de 2000 daltons, etc.). En modalidades preferidas, el PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2.000 daltons o alrededor de 750 daltons. El PEG puede sustituirse opcionalmente con grupos alquilo, alcoxi, acilo o arilo. 20 En determinadas modalidades, el grupo de extremo hidroxilo se sustituye con un grupo metoxi o metilo.

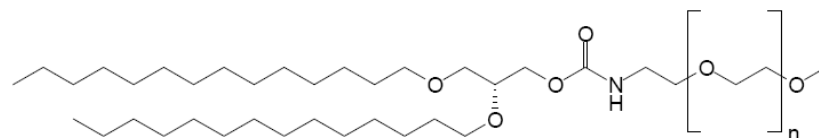
En una modalidad preferida, "L" es un resto enlazador que no contiene éster. Los enlazadores adecuados que no contienen éster incluyen, de 25 modo no taxativo, un resto enlazador amido, un resto enlazador amino, un resto enlazador carbonilo, un resto enlazador carbamato, un resto enlazador urea, un resto enlazador éter, un resto enlazador disulfuro, un resto enlazador succinamidilo y combinaciones de estos. En una modalidad preferida, el resto enlazador que no contiene éster 30 es un resto enlazador carbamato (es decir, un conjugado PEG-C-DAA). En otra modalidad preferida, el resto enlazador que no contiene éster es un resto enlazador amido (es decir, un conjugado PEG-A-DAA). En

aun otra modalidad preferida, el resto enlazador que no contiene éster es un resto enlazador succinamidilo (es decir, un conjugado PEG-S-DAA).

- 5 En modalidades particulares, el conjugado de PEG-lípido se selecciona de:



(66) (PEG-C-DMA); y



(67) (PEG-C-DOMG).

Los conjugados PEG-DAA se sintetizan mediante el uso de técnicas y reactivos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Se reconoce que los conjugados PEG-DAA contienen varios enlaces amida, amina, éter, tio, carbamato y urea. Los expertos en la técnica reconocerán que los métodos y reactivos para formar estos enlaces son conocidos y están fácilmente disponibles. Ver, por ejemplo, March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); y Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 5.^a edición. (Longman 1989). También se observa que cualquier grupo funcional presente puede necesitar una protección y desprotección en distintos puntos de la síntesis de los conjugados PEG-DAA. Los expertos en la técnica reconocerán que dichas técnicas bien conocidas. Ver, por ejemplo Green y Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991).

Preferentemente, el conjugado de PEG-DAA es un conjugado de PEG-

dideciloxypropilo (C_{10}), un conjugado de PEG-dilauryloxypropilo (C_{12}), un conjugado de PEG-dimiristiloxypropilo (C_{14}), un conjugado de PEG-dipalmitiloxypropilo (C_{16}) o un conjugado de PEG-diesteariloxypropilo (C_{18}). En estas modalidades, el PEG posee preferentemente un peso molecular promedio de alrededor de 750 o de alrededor de 2.000 daltons. En una modalidad particularmente preferida, el conjugado de PEG-lípido comprende PEG2000-C-DMA, donde el "2000" denota el peso molecular promedio del PEG, la "C" denota el resto enlazador carbamato, y "DMA" denota dimiristiloxypropilo. En otra modalidad particularmente preferida, el conjugado de PEG-lípido comprende PEG750-C-DMA, donde el "750" denota el peso molecular promedio del PEG, la "C" denota el resto enlazador carbamato, y "DMA" denota dimiristiloxypropilo. En modalidades particulares, el grupo de extremo hidroxilo del PEG se sustituye con un grupo metilo. Los expertos en la técnica comprenderán fácilmente que pueden utilizarse otros dialquiloxypropilos en los conjugados de PEG-DAA.

Además de lo que antecede, los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que pueden utilizarse otros polímeros hidrofílicos en lugar de PEG. Los ejemplos de polímeros adecuados que pueden utilizarse en lugar del PEG incluyen, de modo no taxativo, polivinilpirrolidona, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, metacrilamida de polihidroxipropilo, polimetacrilamida y polidimetilacrilamida, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y celulosas derivadas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

Además de los componentes anteriores, las partículas lipídicas pueden comprender además lípidos de poli(etilenglicol) (PEG) catiónicos o CPL (ver, por ejemplo, Chen et ál., *Bioconj. Chem.*, 11:433-437 (2000); patente estadounidense n.º 6,852,334; Publicación PCT n.º WO 00/62813, las cuales se incorporan a la presente en su totalidad

mediante esta referencia a todos los efectos).

Los CPL adecuados incluyen compuestos de la Fórmula VIII:

A-W-Y (VIII),

5 donde A, W e Y se describen más adelante.

Con respecto a la Fórmula VIII, "A" es un resto lípido tal como un lípido anfipático, un lípido neutro o un lípido hidrofóbico que actúa como un anclaje de lípidos. Los ejemplos de lípidos adecuados
10 incluyen, de modo no taxativo, diacilglicerolilos, dialquilglicerolilos, N-N-dialquilaminos, 1,2-diaciloxi-3-aminopropanos y 1,2-dialquil-3-aminopropanos.

"W" es un polímero o un oligómero tal como un oligómero o polímero
15 hidrofílico. Preferentemente, el polímero hidrofílico es un polímero biocompatible que no es inmunogénico o tiene una inmunogenicidad inherente baja. De manera alternativa, el polímero hidrofílico puede ser antigénico débil si se usa con adyuvantes adecuados. Los polímeros no inmunogénicos adecuados incluyen, de modo no taxativo,
20 PEG, poliamidas, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliglicólico/ácido poliláctico y combinaciones de estos. En una modalidad preferida, el polímero tiene un peso molecular de alrededor de 250 a alrededor de 7000 daltons.

25 "Y" es un resto policationico. La expresión "resto policationico" se refiere a un grupo funcional, compuesto o derivado que posee una carga positiva, preferentemente al menos 2 cargas positivas a un pH seleccionado, preferentemente pH fisiológico. Los restos policationicos adecuados incluyen aminoácidos básicos y sus derivados
30 tales como arginina, asparagina, glutamina, lisina e histidina; espermina; espermidina; dendrímeros cationicos; poliaminas; azúcares de poliamina y polisacáridos de amino. Los restos policationicos

pueden ser lineales, tales como tetralisina lineal, con una estructura ramificada o dendrímica. Los restos policatiónicos tienen de alrededor de 2 a alrededor de 15 cargas positivas, preferentemente de alrededor de 2 a alrededor de 12 cargas positivas y más preferentemente de alrededor de 2 a alrededor de 8 cargas positivas a valores de pH seleccionados. La selección de resto policatiónico a utilizar puede determinarse mediante el tipo de aplicación de partícula que se desea.

10 Las cargas en los restos policatiónicos pueden distribuirse alrededor del resto de partícula completo o, de manera alternativa, pueden ser una concentración diferente de densidad de carga en un área particular de resto de partícula, por ejemplo, un pico de carga. Si la densidad de carga se distribuye en la partícula, la densidad de carga puede distribuirse de forma equitativa o no equitativa. Se abarcan todas las variaciones de la distribución de carga del resto policatiónico.

El lípido "A" y el polímero no inmunogénico "W" pueden acoplarse mediante diversos métodos y preferentemente mediante un enlace covalente. Se pueden usar métodos conocidos por los expertos en la técnica para el enlace covalente de "A" y "W". Las uniones adecuadas incluyen, de modo no taxativo, uniones amida, amina, carboxilo, carbonato, carbamato, éster e hidrazona. Será evidente para los expertos en la técnica que "A" y "W" deben tener grupos funcionales complementarios para efectuar la unión. La reacción de estos dos grupos, uno en el lípido y el otro en el polímero, proporcionará la unión deseada. Por ejemplo, cuando el lípido es un diacilglicerol y se activa el hidroxilo terminal, por ejemplo con NHS y DCC, para formar un éster activo, y después se hace reaccionar con un polímero que contiene un grupo amino, tal como con una poliamida (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,320,017 y 6,586,559,

cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad a todos los efectos), se formará un enlace de amida entre los dos grupos.

5 En determinados casos, el resto policatiónico puede tener un ligando acoplado, tal como un ligando de direccionamiento o un resto quelante para formar complejos de calcio. Preferentemente, luego de acoplar el ligando, el resto catiónico conserva una carga positiva. En determinados casos, el ligando que se acopla posee una carga
10 positiva. Los ligandos adecuados incluyen, de modo no taxativo, un compuesto o dispositivo con un grupo funcional reactivo e incluye lípidos, lípidos anfipáticos, compuestos de portador, compuestos de bioafinidad, biomateriales, biopolímeros, dispositivos biomédicos, compuestos detectables analíticamente, compuestos activos
15 terapéuticamente, enzimas, péptidos, proteínas, anticuerpos, estimuladores inmunitarios, radioetiquetas, fluorógenos, biotina, fármacos, haptenos, ADN, ARN, polisacáridos, liposomas, virosomas, micelas, inmunoglobulinas, grupos funcionales, otros restos de direccionamiento o toxinas.

20

En algunas modalidades, el conjugado lipídico (por ejemplo, PEG-lípido) comprende de alrededor de 0,1 % molar a alrededor de 3 % molar, de alrededor de 0,5 % molar a alrededor de 3 % molar, o
25 alrededor de 0,6 % molar, 0,7 % molar, 0,8 % molar, 0,9 % molar, 1,0 % molar, 1,1 % molar, 1,2 % molar, 1,3 % molar, 1,4 % molar, 1,5 % molar, 1,6 % molar, 1,7 % molar, 1,8 % molar, 1,9 % molar, 2,0 % molar, 2,1 % molar, 2,2 % molar, 2,3 % molar, 2,4 % molar, 2,5 % molar, 2,6 % molar, 2,7 % molar, 2,8 % molar, 2,9 % molar o 3 % molar (o cualquier fracción o intervalo de estos) del lípido total presente
30 en la partícula.

En otras modalidades, el conjugado lipídico (por ejemplo, PEG-lípido)

comprende de alrededor de 0 % molar a alrededor de 20 % molar, de alrededor de 0,5 % molar a alrededor de 20 % molar, de alrededor de 2 % molar a alrededor de 20 % molar, de alrededor de 1,5 % molar a alrededor de 18 % molar, de alrededor de 2 % molar a alrededor de 15 % molar, de alrededor de 4 % molar a alrededor de 15 % molar, de alrededor de 2 % molar a alrededor de 12 % molar, de alrededor de 5 % molar a alrededor de 12 % molar o de a alrededor de 2 % molar (o cualquier fracción o intervalo de estos) del lípido total presente en la partícula.

10

En modalidades adicionales, el conjugado lipídico (por ejemplo, PEG-lípido) comprende de alrededor de 4 % molar a alrededor de 10 % molar, de alrededor de 5 % molar a alrededor de 10 % molar, de alrededor de 5 % molar a alrededor de 9 % molar, de alrededor de 5 % molar a alrededor de 8 % molar, de alrededor de 6 % molar a alrededor de 9 % molar, de alrededor de 6 % molar a alrededor de 8 % molar, o alrededor de 5 mol %, 6 mol %, 7 % molar, 8 % molar, 9 % molar o 10 % molar (o cualquier fracción o intervalo de estos) del lípido total presente en la partícula.

20

Debe entenderse que el porcentaje del conjugado lipídico presente en las partículas lipídicas es una cantidad objetivo, y que la cantidad real de conjugado lipídico presente en la formulación puede variar, por ejemplo, en ± 5 % molar, ± 4 % molar, ± 3 % molar, ± 2 % molar, ± 1 % molar, $\pm 0,75$ % molar, $\pm 0,5$ % molar, $\pm 0,25$ % molar o $\pm 0,1$ % molar.

25

Se describen intervalos y porcentajes adicionales de conjugados lipídicos adecuados para su uso en las partículas lipídicas en la publicación PCT n.º WO 09/127060, solicitud estadounidense publicada n.º US 2011/0071208, publicación PCT n.º WO2011/000106 y solicitud estadounidense publicada n.º US 2011/0076335, cuyas descripciones se

30

incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad a todos los fines.

Un experto en la técnica observará que puede variar la concentración
5 del conjugado lipídico en función del conjugado lipídico utilizado y la velocidad a la que la partícula lipídica se vuelve fusogénica.

Mediante el control de la composición y concentración del conjugado lipídico, se puede controlar la velocidad a la que se elimina el
10 conjugado lipídico de la partícula de lípido y, a su vez, la velocidad a la que la partícula lipídica se vuelve fusogénica. Por ejemplo, cuando se usa un conjugado de PEG-DAA como el conjugado lipídico, puede variar la velocidad a la que la partícula lipídica se vuelve fusogénica, por ejemplo, al variar la concentración del
15 conjugado lipídico, al variar el peso molecular del PEG o al variar la longitud de la cadena y grado de saturación de los grupos alquilo en el conjugado de PEG-DAA. Además, se pueden usar otras variables que incluyen, por ejemplo, pH, temperatura, fuerza iónica, etc. para variar y/o controlar la velocidad a la cual se vuelve fusogénica la
20 partícula lipídica. Serán evidentes para los expertos en la técnica luego de la lectura de esta descripción otros métodos que pueden utilizarse para controlar la velocidad a la que la partícula lipídica se vuelve fusogénica. A su vez, al controlar la composición y concentración del conjugado lipídico, se puede controlar el tamaño de
25 la partícula lipídica.

Sistemas portadores adicionales

Los ejemplos no taxativos de sistemas portadores adicionales a base
30 de lípidos adecuados para su uso incluyen lipoplejos (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20030203865 y Zhang et ál., *J. Control Release*, 100:165-180 (2004)), lipoplejos

sensibles al pH (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20020192275), lipoplejos enmascarados de forma reversible (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20030180950), composiciones catiónicas a base de lípidos (ver, por ejemplo, patente estadounidense n.º 6,756,054 y publicación de patente estadounidense n.º 20050234232), liposomas catiónicos (ver, por ejemplo, publicaciones de patente estadounidense n.º 20030229040, 20020160038 y 20020012998; patente estadounidense n.º 5,908,635; y publicación PCT n.º WO 01/72283), liposomas aniónicos (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20030026831), liposomas sensibles al pH (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20020192274 y AU 2003210303), liposomas recubiertos con anticuerpos (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20030108597; y publicación PCT n.º WO 00/50008), liposomas específicos para tipos celulares (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20030198664), liposomas que contienen ácido nucleico y péptidos (ver, por ejemplo, patente estadounidense n.º 6,207,456), liposomas que contienen lípidos derivados con polímeros hidrofílicos pasibles de liberación (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20030031704), ácido nucleico atrapado en lípido (ver, por ejemplo, publicaciones PCT n.º WO 03/057190 y WO 03/059322), ácido nucleico encapsulado en lípido (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20030129221 y patente estadounidense n.º 5,756,122), otras composiciones liposomales (ver, por ejemplo, publicaciones de patente estadounidense n.º 20030035829 y 20030072794; y patente estadounidense n.º 6,200,599), mezclas estabilizadas de liposomas y emulsiones (ver, por ejemplo, EP1304160), composiciones de emulsión (ver, por ejemplo, patente estadounidense n.º 6,747,014) y microemulsiones de ácido nucleico (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20050037086).

Los ejemplos de sistemas portadores a base de polímeros adecuados para su uso incluyen, de modo no taxativo, complejos de ácido nucleico-polímero catiónico (es decir, poliplejos). Para formar un poliplejo, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNip, tal como una molécula de ARNip descrita en la Tabla A) forma un complejo típicamente con un polímero catiónico que posee una estructura polimérica lineal, ramificada, en forma de estrella o dendrítica que condensa el ácido nucleico en partículas cargadas de forma positiva capaces de interactuar con proteoglicanos aniónicos en la superficie celular y de ingresar a las células mediante endocitosis. En algunas modalidades, el poliplejo comprende ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNip, tal como una molécula de ARNip descrita en la Tabla A) que forma un complejo con un polímero catiónico tal como polietilenimina (PEI) (ver, por ejemplo, patente estadounidense n.º 6,013,240; disponible en el mercado de Qbiogene, Inc. (Carlsbad, CA) como *In vivo* jetPEI™, una forma lineal de PEI), polipropilenimina (PPI), polivinilpirrolidona (PVP), poli-L-lisina (PLL), dietilaminoetil (DEAE)-dextrano, polímeros poli(β-aminoéster) (PAE) (ver, por ejemplo, Lynn et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 123:8155-8156 (2001)), quitosano, dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) (ver, por ejemplo, Kukowska-Latallo et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:4897-4902 (1996)), porfirina (ver, por ejemplo, patente estadounidense n.º 6,620,805), poliviniléter (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20040156909), amidinio policíclico (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20030220289), otros polímeros que comprenden grupos imidazol, imina, guanidina y/o amina primaria (ver, por ejemplo, patente estadounidense n.º 6,013,240; publicación PCT n.º WO/9602655; publicación PCT n.º WO95/21931; Zhang et ál., *J. Control Release*, 100:165-180 (2004); y Tiera et ál., *Curr. Gene Ther.*, 6:59-71 (2006)) y una mezcla de estos. En otras modalidades, el poliplejo comprende

complejos de ácido nucleico-polímero catiónico descritos en las publicaciones de patente estadounidense n.º 20060211643, 20050222064, 20030125281 y 20030185890, y publicación PCT n.º WO 03/066069; complejos biodegradables de polímero poli(β -aminoéster)-ácido nucleico descritos en la publicación de patente estadounidense n.º 20040071654; micropartículas que contienen matrices poliméricas descritas en la publicación de patente estadounidense n.º 20040142475; otras composiciones de micropartículas descritas en la publicación de patente estadounidense n.º 20030157030; complejos de ácido nucleico condensados descritos en la publicación de patente estadounidense n.º 20050123600; y composiciones de microcápsula y nanocápsula descritas en AU 2002358514 y publicación PCT n.º WO 02/096551.

En determinadas instancias, el ARNip puede formar complejos con ciclodextrina o un polímero de esta. Los ejemplos no taxativos de sistemas portadores a base de ciclodextrina incluyen los complejos de ácido nucleico-polímero modificados con ciclodextrina descritos en la publicación de patente estadounidense n.º 20040087024; los complejos de ácido nucleico-copolímero de ciclodextrina lineales descritos en las patentes estadounidenses n.º 6,509,323, 6,884,789 y 7,091,192; y los complejos de ácido nucleico-agente de formación de complejos-polímero de ciclodextrina descritos en la patente estadounidense n.º 7,018,609. En determinadas instancias distintas, el ARNip puede formar complejos con un péptido o polipéptido. Un ejemplo de un sistema portador a base de proteína incluye, de modo no taxativo, el complejo de ácido nucleico-oligopéptido catiónico descrito en la publicación PCT n.º WO95/21931.

Preparación de las partículas lipídicas

Las partículas de lípido-ácido nucleico, en las cuales un ácido nucleico (por ejemplo, un ARNip descrito en la Tabla A) se encierra dentro de la parte lipídica de la partícula y se protege de la degradación, pueden formarse mediante cualquier método conocido en la técnica inclusive, de modo no taxativo, un método de mezcla continua, un proceso de dilución directa y un proceso de dilución en línea.

En modalidades particulares, los lípidos catiónicos pueden comprender lípidos de las Fórmulas I-III o sales de estos, por sí solos o junto con otros lípidos catiónicos. En otras modalidades, los lípidos no catiónicos son esfingomielina del huevo (ESM), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, 14:0 PE (1,2-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE)), 16:0 PE (1,2-dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE)), 18:0 PE (1,2-diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE)), 18:1 PE (1,2-dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE)), 18:1 trans PE (1,2-dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE)), 18:0-18:1 PE (1-stearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE)), 16:0-18:1 PE (1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (POPE)), polímeros basados en polietilenglicol (por ejemplo, PEG 2000, PEG 5000, diacilgliceroles modificados con PEG, o dialquiloxypropilos modificados con PEG), colesterol, derivados de estos o combinaciones de estos.

En determinadas modalidades, las partículas de lípido-ácido nucleico producidas mediante un método de mezcla continua, por ejemplo, un proceso que incluye proporcionar una solución acuosa que comprende un ácido ARNip en un primer depósito, proporcionar una solución lipídica orgánica en un segundo depósito (donde los lípidos presentes en la solución lipídica orgánica se solubilizan en un solvente orgánico, por ejemplo, un alcohol inferior, tal como etanol) y mezclar la

solución acuosa con la solución lipídica orgánica, de manera que la solución lipídica orgánica se mezcle con la solución acuosa para producir de forma prácticamente instantánea una vesícula lipídica (por ejemplo, liposoma) que encapsula el ARNip dentro de la vesícula lipídica. Este proceso y el aparato para llevar a cabo este proceso se describen en detalle en la publicación de patente estadounidense n.º 20040142025, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines.

10 La acción de introducir de forma continua soluciones de lípido y amortiguadores en un entorno de mezclado, tal como una cámara de mezclado, provoca una dilución continua de la solución lipídica con la solución amortiguadora, lo que produce una vesícula lipídica de forma prácticamente instantánea luego de la mezcla. Tal como se usa
15 en la presente, la frase "diluir de forma continua una solución lipídica con la solución amortiguadora" (y sus variaciones) significa generalmente que la solución lipídica se diluye lo suficientemente rápido en un proceso de hidratación con potencia suficiente para producir la generación de vesículas. Al mezclar la solución acuosa
20 que comprende un ácido nucleico con la solución lipídica orgánica, la solución lipídica orgánica se somete a una dilución continua en etapas en presencia de la solución amortiguadora (es decir, solución acuosa) para producir una partícula de lípido-ácido nucleico.

25 Las partículas de lípido-ácido nucleico formadas mediante el uso del método de mezcla continua poseen típicamente un tamaño de alrededor de 30 nm a alrededor de 150 nm, de alrededor de 40 nm a alrededor de 150 nm, de alrededor de 50 nm a alrededor de 150 nm, de alrededor de 60 nm a alrededor de 130 nm, de alrededor de 70 nm a alrededor de 110
30 nm, de alrededor de 70 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor de 80 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor de 90 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor de 70 a alrededor de 90 nm, de alrededor de 80 nm a

alrededor de 90 nm, de alrededor de 70 nm a alrededor de 80 nm, menos de alrededor de 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm, o 80 nm, o alrededor de 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm (o cualquier fracción o intervalo de estos). Las partículas formadas de esa manera no se acumulan y opcionalmente se ajusta su tamaño para lograr un tamaño de partícula uniforme.

10 En otra modalidad, las partículas de lípido-ácido nucleico producidas mediante un proceso de dilución directa que incluye formar una solución de vesícula lipídica (por ejemplo, liposoma) e introducir de forma inmediata y directa la solución de vesícula lipídica en un recipiente recolector que contiene una cantidad controlada de
15 amortiguador de dilución. En aspectos preferidos, el recipiente recolector incluye uno o más elementos configurados para agitar el contenido del recipiente de recolección para facilitar la dilución. En un aspecto, la cantidad de amortiguador de dilución presente en el
20 solución de vesícula lipídica introducida en este. A modo de un ejemplo no taxativo, la introducción de una solución de vesícula lipídica en etanol al 45 % en el recipiente recolector que contiene un volumen igual de amortiguador de dilución proporciona de manera favorable partículas más pequeñas.

25

En aun otra modalidad, las partículas de lípido-ácido nucleico producidas mediante un proceso de dilución en línea en el cual se acopla de manera fluida un tercer depósito que contiene amortiguador de dilución, se acoplan de manera fluida a una segunda región de
30 mezcla. En esta modalidad, la solución de vesícula lipídica (por ejemplo, liposoma) formada en una primera región de mezcla se mezcla de forma inmediata y directa con el amortiguador de dilución en la

segunda región de mezcla. En aspectos preferidos, la segunda región de mezcla incluye un conector en T ubicado de forma tal que los flujos de la solución de vesícula lipídica y del amortiguador de dilución se encuentren como flujos opuestos a 180° ; no obstante, pueden utilizarse conectores que proporcionen ángulos más llanos, por ejemplo, de alrededor de 27° a alrededor de 180° (por ejemplo, alrededor de 90°). Un mecanismo de bombeo proporciona un flujo controlable de amortiguador a la segunda región de mezcla. En un aspecto, la velocidad de flujo del amortiguador de dilución proporcionado a la segunda región de mezcla se controla de forma que sea sustancialmente igual a la velocidad de flujo de la solución de vesícula lipídica introducida en esta desde la primera región de mezcla. Esta modalidad permite de manera favorable un mayor control del flujo del amortiguador de dilución que se mezcla con la solución de vesícula lipídica en la segunda región de mezcla y, por lo tanto, la concentración de la solución de vesícula lipídica en el amortiguador en el segundo proceso de mezcla. Dicho control de la velocidad de flujo del amortiguador de dilución permite de manera favorable la formación de partículas de tamaño pequeño en concentraciones reducidas.

Estos procesos y los aparatos para llevar a cabo estos procesos de dilución directa y en línea se describen en detalle en la publicación de patente estadounidense n.º 20070042031, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines.

Las partículas de lípido-ácido nucleico formadas mediante el uso de los procesos de dilución directa y en línea poseen típicamente un tamaño de alrededor de 30 nm a alrededor de 150 nm, de alrededor de 40 nm a alrededor de 150 nm, de alrededor de 50 nm a alrededor de 150 nm, de alrededor de 60 nm a alrededor de 130 nm, de alrededor de 70

nm a alrededor de 110 nm, de alrededor de 70 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor de 80 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor de 90 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor de 70 a alrededor de 90 nm, de alrededor de 80 nm a alrededor de 90 nm, de alrededor de 70 nm a
5 alrededor de 80 nm, menos de alrededor de 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm, o 80 nm, o alrededor de 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm (o cualquier fracción o intervalo de estos). Las partículas
10 formadas de esa manera no se acumulan y opcionalmente se ajusta su tamaño para lograr un tamaño de partícula uniforme.

Puede cambiarse el tamaño de las partículas lipídicas mediante cualquiera de los métodos disponibles para el ajuste de liposomas. El
15 cambio de tamaño se puede llevar a cabo para lograr un intervalo de tamaño deseado y una distribución relativamente estrecha de los tamaños de partícula.

Existen varias técnicas para ajustar el tamaño de las partículas a un
20 tamaño deseado. Se describe un método para ajustar el tamaño usado para liposomas e igualmente aplicable a las presentes partículas en la patente estadounidense n.º 4,737,323, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines. La sonicación de una suspensión de partícula ya sea
25 mediante sonda o baño de ultrasonido produce una reducción de tamaño progresiva hasta conseguir partículas con un tamaño menor que alrededor de 50 nm. La homogeneización es otro método que depende de la energía de corte para fragmentar partículas más grandes en partículas más pequeñas. En un procedimiento típico de
30 homogeneización, las partículas se vuelven a hacer circular a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan los tamaños de partículas seleccionados, típicamente de alrededor de 60 a

alrededor de 80 nm. En ambos métodos, se puede monitorear la distribución del tamaño de partícula mediante la discriminación de tamaño de partícula de rayo láser convencional o QELS.

5 La extrusión de las partículas mediante una membrana de policarbonato con poros pequeños o una membrana de cerámica asimétrica también es un método eficaz para la distribución de tamaño relativamente bien definido. Típicamente, la suspensión se hace pasar por la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución de tamaño de
10 partícula deseada. Las partículas se pueden extruir a través de membranas con poros sucesivamente más pequeños, para lograr una reducción gradual del tamaño.

En algunas modalidades, se condensan previamente los ácidos nucleicos
15 presentes en las partículas (por ejemplo, las moléculas de ARNip) tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense n.º 09/774,103, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los fines.

20 En otras modalidades, los métodos pueden comprender además agregar policationes no lipídicos que son útiles efectuar la lipofección de células mediante el uso de las presentes composiciones. Los ejemplos de policationes no lipídicos adecuados incluyen bromuro de hexadimetrina (comercializado con el nombre comercial POLYBRENE®, de
25 Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos) u otras sales de hexadimetrina. Otros policationes adecuados incluyen, por ejemplo, sales de poli-L-ornitina, poli-L-arginina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, polialilamina y polietilenamina. Preferentemente, la adición de estas sales se realiza luego la formación de las
30 partículas.

En algunas modalidades, las relaciones de ácido nucleico (por

ejemplo, ARNip) con respecto a lípido (relación de masa/masa) en una partícula de lípido-ácido nucleico se encuentra en el intervalo de alrededor de 0,01 a alrededor de 0,2, de alrededor de 0,05 a alrededor de 0,2, de alrededor de 0,02 a alrededor de 0,1, de
 5 alrededor de 0,03 a alrededor de 0,1 o de alrededor de 0,01 a alrededor de 0,08. La relación de los materiales de partida (entrada) también se encuentra dentro de este intervalo. En otras modalidades, la preparación de partículas utiliza alrededor de 400 µg de ácido nucleico cada 10 mg de lípidos totales o una relación de masa de
 10 ácido nucleico con respecto a lípido de alrededor de 0,01 a alrededor de 0,08 y, más preferentemente, alrededor de 0,04, que corresponde a 1,25 mg del lípido total cada 50 µg de ácido nucleico. En otras modalidades preferidas, la partícula posee una relación de masa de ácido nucleico:lípido de alrededor de 0,08.

15

En otras modalidades, las relaciones de lípido con respecto a ácido nucleico (por ejemplo, ARNip) (relaciones de masa/masa) se encuentran en el intervalo de alrededor de 1 (1:1) a alrededor de 100 (100:1), de alrededor de 5 (5:1) a alrededor de 100 (100:1), de alrededor de 1
 20 (1:1) a alrededor de 50 (50:1), de alrededor de 2 (2:1) a alrededor de 50 (50:1), de alrededor de 3 (3:1) a alrededor de 50 (50:1), de alrededor de 4 (4:1) a alrededor de 50 (50:1), de alrededor de 5 (5:1) a alrededor de 50 (50:1), de alrededor de 1 (1:1) a alrededor de 25 (25:1), de alrededor de 2 (2:1) a alrededor de 25 (25:1), de
 25 alrededor de 3 (3:1) a alrededor de 25 (25:1), de alrededor de 4 (4:1) a alrededor de 25 (25:1), de alrededor de 5 (5:1) a alrededor de 25 (25:1), de alrededor de 5 (5:1) a alrededor de 20 (20:1), de alrededor de 5 (5:1) a alrededor de 15 (15:1), de alrededor de 5 (5:1) a alrededor de 10 (10:1), o alrededor de 5 (5:1), 6 (6:1), 7
 30 (7:1), 8 (8:1), 9 (9:1), 10 (10:1), 11 (11:1), 12 (12:1), 13 (13:1), 14 (14:1), 15 (15:1), 16 (16:1), 17 (17:1), 18 (18:1), 19 (19:1), 20 (20:1), 21 (21:1), 22 (22:1), 23 (23:1), 24 (24:1), o 25 (25:1), o

cualquier fracción de estos o intervalo de estos. La relación de los materiales de partida (entrada) también se encuentra dentro de este intervalo.

5 Tal como se mencionó anteriormente, el lípido conjugado puede incluir además un CPL. En la presente se menciona una variedad de métodos generales para elaborar partículas lipídicas-CPL (partículas lipídicas que contienen CPL). Dos técnicas generales incluyen la técnica de "posinserción", es decir, la inserción de un CPL, por
10 ejemplo, en una partícula lipídica preformada, y la técnica "estándar", donde el CPL se incluye en la mezcla de lípidos, por ejemplo, durante las etapas de formación de la partícula lipídica. La técnica de posinserción tiene como resultado partículas lipídicas que poseen CPL principalmente en la cara externa de la membrana bicapa de
15 la partícula lipídica, mientras que las técnicas estándar proporcionan partículas lipídicas que poseen CPL en las caras externa e interna. El método es especialmente útil para las vesículas elaboradas a partir de fosfolípidos (que pueden contener colesterol) y también para vesículas que contienen PEG-lípidos (tales como PEG-DAA y PEG-DAG). Se describen métodos para confeccionar partículas lipídicas-CPL, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º
20 5,705,385; 6,586,410; 5,981,501; 6,534,484; y 6,852,334; publicación de patente estadounidense n.º 20020072121; y publicación PCT n.º WO 00/62813, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante
25 esta referencia en su totalidad a todos los fines.

Administración de las partículas lipídicas

Las partículas lipídicas (por ejemplo, una partícula de lípido-ácido
30 nucleico) pueden adsorberse en casi cualquier tipo de célula con las que se mezclan o ponen en contacto. Una vez adsorbidas, las partículas pueden ingerirse mediante endocitosis a través de una

parte de las células, intercambiar lípidos con las membranas celulares o fusionar con las células. La transferencia o incorporación de la parte de ARNip de la partícula puede suceder a través de cualquiera de estas vías. En particular, cuando se produce la fusión, la membrana de la partícula se integra en la membrana celular y el contenido de la partícula se combina con el fluido intracelular.

Las partículas lipídicas (por ejemplo, partículas de lípido-ácido nucleico) pueden administrarse por sí solas o en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, suero fisiológico o amortiguador de fosfato) seleccionado de acuerdo con la vía de administración y la práctica farmacéutica estándar. Generalmente, se utiliza solución salina amortiguada normal (por ejemplo, NaCl 135-150 mM) como portador farmacéuticamente aceptable. Otros portadores adecuados incluyen, por ejemplo, agua, agua amortiguada, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 % y similares, inclusive glicoproteínas para una mayor estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. Se describen otros portadores adecuados, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed. (1985). Tal como se usa en la presente, "portador" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, amortiguadores, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano.

El portador farmacéuticamente aceptable se agrega generalmente después de la formación de las partículas lipídicas. Por lo tanto,

luego de la formación de la partícula lipídica, la partícula puede diluirse en portadores farmacéuticamente aceptables tales como soluciones salinas amortiguadas normales.

5 La concentración de partículas en las formulaciones farmacéuticas pueden variar ampliamente, es decir, de menos de alrededor de 0,05 %, usualmente a, o al menos alrededor de 2 a 5 %, hasta alrededor de 10 a 90 % en peso, y se seleccionan principalmente según los volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con la vía particular de
10 administración seleccionada. Por ejemplo, puede aumentarse la concentración para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes que poseen hipertensión grave o insuficiencia cardíaca congestiva asociada con la aterosclerosis. De manera alternativa, las partículas
15 compuestas por lípidos irritantes se pueden diluir para disminuir las concentraciones para reducir la inflamación en el sitio de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse mediante
20 técnicas de esterilización convencionales y conocidas. Las soluciones acuosas pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, donde la preparación liofilizada se combina con una solución acuosa estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente
25 aceptables, según sea necesario, para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes amortiguadores y de ajuste del pH, agentes para ajustar la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio. De manera adicional, la suspensión de partículas
30 puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen los lípidos contra daños peroxidativos de los lípidos y radicales libres en el almacenamiento. Son adecuados los inactivadores de radicales libres

lipofílicos, tales como alfatocoferol y quelantes específicos de hierro solubles en agua, tales como ferrioxamina.

Administración in vivo

5

Se ha logrado la administración sistémica para la terapia *in vivo*, por ejemplo, administración de una molécula de ARNip descrita en la presente, tal como un ARNip descrito en la Tabla A, a una célula objetivo distal mediante sistemas corporales tales como la circulación mediante el uso de partículas de lípido-ácido nucleico tales como las descritas en las publicaciones PCT n.º WO 05/007196, WO 05/121348, WO 05/120152 y WO 04/002453, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad a todos los efectos.

15

Para la administración *in vivo*, la administración puede llevarse a cabo de cualquier manera conocida en la técnica, por ejemplo, mediante inyección, administración oral, inhalación (por ejemplo, intranasal o intratraqueal), aplicación transdérmica o administración rectal. La administración se puede lograr mediante dosis divididas o únicas. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de forma parenteral, es decir, intraarticular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas se administran de manera intravenosa o intraperitoneal mediante una inyección en bolo (ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,286,634). También se mencionó la administración de ácido nucleico intracelular en Straubinger et ál., *Methods Enzymol.*, 101:512 (1983); Mannino et ál., *Biotechniques*, 6:682 (1988); Nicolau et ál., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989); y Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:274 (1993). Otros métodos adicionales para administrar productos terapéuticos a base de lípidos se describen en por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º

25
30

3,993,754; 4,145,410; 4,235,871; 4,224,179; 4,522,803; y 4,588,578. Las partículas lipídicas pueden administrarse mediante inyección directa al sitio de la enfermedad o mediante inyección en un sitio distal del sitio de la enfermedad (ver, por ejemplo, Culver, HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, Nueva York. pp.70-71(1994)). Las descripciones de las referencias antemencionadas se incorporan a la presente en su totalidad a todos los efectos mediante esta referencia.

10 En modalidades donde las partículas lipídicas se administran por vía intravenosa, al menos alrededor de 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la dosis total inyectada de las partículas está presente en plasma alrededor de 8, 12, 24, 36, o 48 horas después de la inyección. En otras modalidades, más de alrededor del 20 %, 30 %, 40 % y hasta
15 alrededor de 60 %, 70 % u 80 % de la dosis total inyectada de las partículas lipídicas se encuentra presente en plasma alrededor de 8, 12, 24, 36 o 48 horas después de la inyección. En determinados casos, más de alrededor de 10 % de múltiples partículas se encuentra presente en el plasma de un mamífero alrededor de 1 hora después de
20 la administración. En otros casos determinados, la presencia de las partículas lipídicas es detectable al menos alrededor de 1 hora después de la administración de la partícula. En algunas modalidades, la presencia de una molécula de ARNip es detectable en células alrededor de 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la
25 administración. En otras modalidades, la regulación por disminución de una secuencia objetivo, tal como una secuencia hospedadora o viral, a través de una molécula de ARNip es detectable alrededor de 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la administración. En aun otras modalidades, la regulación por disminución de la expresión
30 de una secuencia objetivo, tal como una secuencia hospedadora o viral, a través de una molécula de ARNip, se produce preferentemente en células infectadas y/o células capaces de infectarse. En

modalidades adicionales, la presencia o efecto de una molécula de ARNip en un sitio proximal o distal al sitio de administración es detectable alrededor de 12, 24, 48, 72, o 96 horas, o alrededor de 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26 o 28 días después de la
5 administración. En modalidades adicionales, las partículas lipídicas se administran por vía parenteral o intraperitoneal.

Las composiciones, ya sea por sí mismas o junto con otros componentes adecuados, pueden confeccionarse como formulaciones en aerosol (es
10 decir, pueden "nebulizarse") para administrarse mediante inhalación (por ejemplo, por vía intranasal o intratraqueal) (ver Brigham et ál., *Am. J. Sci.*, 298:278 (1989)). Las formulaciones en aerosol pueden colocarse en propelentes presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

15 En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante atomizadores intranasales, inhalación y/u otros vehículos de administración en aerosol. Se han descrito métodos para administrar composiciones de ácido nucleico directamente en los
20 pulmones mediante atomizadores en aerosol nasales, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5,756,353 y 5,804,212. Asimismo, también se conoce en la técnica farmacéutica la administración de fármacos mediante el uso de resinas de micropartículas intranasales y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (patente estadounidense
25 5,725,871). De manera similar, se describe en la patente estadounidense n.º 5,780,045 la administración de fármacos por vía trasmucosa en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno. Las descripciones de las patentes antemencionadas se incorporan a la presente en su totalidad a todos
30 los efectos mediante esta referencia.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral, tales

como, por ejemplo, mediante vía intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas acuosas y no acuosas que pueden contener
5 antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes.

10

Generalmente, cuando se administran de manera intravenosa, las formulaciones de partículas lipídicas se formulan con un portador farmacéuticamente adecuado. Las formulaciones adecuadas se hallan, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing
15 Company, Filadelfia, PA, 17^a ed. (1985). Se puede utilizar una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua, agua amortiguada, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 % y similares, y pueden incluir glicoproteínas para una mayor estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. Generalmente se utiliza una
20 solución salina amortiguada normal (135-150 mM NaCl) como portador farmacéuticamente aceptable, pero son suficientes otros portadores adecuados. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización de liposomas convencionales, tales como la filtración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares
25 farmacéuticamente aceptables que sean necesarias para acercarse a las condiciones fisiológicas, tales como el ajuste de pH y agentes amortiguadores, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de
30 sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante el uso de las técnicas a las que se hizo referencia anteriormente o, de manera alternativa, pueden producirse

en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, donde la preparación liofilizada se combina con una solución acuosa estéril antes de la administración.

5

En determinadas aplicaciones, las partículas lipídicas descritas en la presente se pueden administrar mediante administración oral al individuo. Las partículas pueden incorporarse con excipientes y pueden utilizarse en forma de comprimidos comestibles, comprimidos
10 bucales, pastillas, cápsulas, píldoras, grageas, elíxires, enjuagues bucales, suspensiones, atomizadores orales, jarabes, obleas y similares (ver, por ejemplo, patentes estadounidenses n.º 5,641,515, 5,580,579 y 5,792,451, las cuales se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los efectos). Estas formas
15 de dosificación orales también pueden contener los siguientes: aglutinantes, gelatina; excipientes, lubricantes y/o agentes saborizantes. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales descritos anteriormente, un portador líquido. Pueden estar presentes varios
20 materiales adicionales como recubrimientos o para modificar de otra manera la forma física de la unidad de dosificación. Desde luego, cualquier material utilizado para la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas.

25

Típicamente, estas formulaciones orales pueden contener al menos alrededor de 0,1 % de las partículas lipídicas o más, aunque el porcentaje de las partículas, desde luego, puede variar y puede tener convenientemente alrededor de 1 % o 2 % y alrededor de 60 % 70 % o
30 más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de partículas en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de manera tal que se obtenga una dosificación

adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Los factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas serán contemplados por el experto en la técnica para preparar dichas formulaciones farmacéuticas, y como tal, pueden ser deseables una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden consistir en: (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz de una molécula de ARNip envuelta (por ejemplo, una molécula de ARNip descrita en la Tabla A) suspendidas en diluyentes tales como agua, solución salina o PEG 400; (b) cápsulas, sachets o comprimidos, donde cada uno contiene una cantidad predeterminada de una molécula de ARNip, como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido adecuado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas en comprimidos incluyen uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfato de calcio, almidón de maíz, almidón de papa, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, agentes de relleno, aglutinantes, diluyentes, agentes amortiguadores, agentes humectantes, conservantes, agentes saborizantes, tintas, agentes desintegrantes y portadores farmacéuticamente compatibles. Las formas de grageas pueden comprender una molécula de ARNip en un sabor, por ejemplo, sacarosa, así como pastillas que comprenden el ácido nucleico terapéutico en una base inerte, tal como emulsiones de acacia y sacarosa o gelatina y glicerina, geles y similares que contienen, además de la molécula de ARNip, portadores conocidos en la técnica.

En otro ejemplo de su uso, las partículas lipídicas pueden incorporarse en una amplia variedad de formas de dosificación

tópicas. Por ejemplo, una suspensión que contiene partículas de lípido-ácido nucleico puede formularse y administrarse como geles, aceites, emulsiones, cremas para uso tópico, pastas, ungüentos, lociones, espumas, mousses y similares.

5

La cantidad de partículas administradas depende de la relación de las moléculas de ARNip con respecto al lípido, el ARNip particular utilizado, la cepa de VHB que se trata, la edad, peso, y estado del paciente, y el criterio del médico, pero generalmente es de alrededor de 0,01 a alrededor de 50 mg por kilogramo de peso corporal, preferentemente de alrededor de 0,1 a alrededor de 5 mg/kg de peso corporal, o alrededor de 10^8 - 10^{10} partículas por administración (por ejemplo, inyección).

15 A continuación se describen todas las combinaciones "dobles" posibles de dos ARNip distintos seleccionados del grupo de ARNip denominado 1m a 15m (ver Tabla A). El término "combinación" significa que las moléculas de ARNip combinadas están presentes juntas en la misma composición de materia (por ejemplo, disueltas juntas dentro de la misma solución, presentes juntas dentro de la misma partícula lipídica o presentes juntas en la misma formulación farmacéutica de partículas lipídicas, aunque cada partícula lipídica dentro de la formulación farmacéutica puede incluir o no cada ARNip distinto de la combinación de ARNip). Las moléculas de ARNip combinadas normalmente
25 no se enlazan de forma covalente.

Cada uno de los ARNip individuales se identifica con un nombre, de 1m a 15m, tal como se muestra en la Tabla A. Cada número de ARNip dentro de una combinación se separa con un guion (-); por ejemplo, la notación "1m-2m" representa la combinación del número de ARNip 1m y el número de ARNip 2m. El guion no significa que las moléculas de ARNip distintas dentro de la combinación se enlazan entre sí de forma

30

covalente. Las combinaciones de ARNip distintas se separan mediante un punto y coma. El orden de los números de ARNip en una combinación no es significativo. Por ejemplo, la combinación 1m-2m es equivalente a la combinación 2m-1m porque ambas de estas notaciones describen la misma combinación del número de ARNip 1m con el número de ARNip 2m.

Las combinaciones de ARNip dobles y triples son útiles, por ejemplo, para tratar la infección por VHB y/o VHD en seres humanos, y para aliviar al menos un síntoma asociado con la infección por VHB y/o VHD.

En determinadas modalidades, el ARNip se administra a través de una partícula lipídica de ácido nucleico.

En determinadas modalidades, con respecto a los métodos que incluyen el uso de un cóctel de ARNip encapsulados dentro de partículas lipídicas, las moléculas de ARNip distintas se encapsulan de manera conjunta en la misma partícula lipídica.

En determinadas modalidades, con respecto a los métodos que incluyen el uso de un cóctel de ARNip encapsulados dentro de partículas lipídicas, cada tipo de especie de ARNip presente en el cóctel se encapsula en su propia partícula.

En determinadas modalidades, con respecto a los métodos que incluyen el uso de un cóctel de ARNip encapsulados dentro de partículas lipídicas, algunas especies de ARNip se encapsulan de manera conjunta en la misma partícula, mientras que otras especies de ARNip se encapsulan en partículas distintas.

Formulación y administración de dos o más agentes

Se entiende que los agentes pueden formularse juntos en una única preparación o pueden formularse por separado y, por lo tanto, administrarse por separado, ya sea de forma simultánea o secuencial. En una modalidad, cuando los agentes se administran de forma
5 secuencia (por ejemplo, en momentos distintos), los agentes pueden administrarse de forma tal que sus efectos biológicos se superpongan (es decir, cada agente produce un efecto biológico en un momento individual dado).

10 Los agentes pueden formularse y administrarse mediante el uso de cualquier vía de administración aceptable, en función del agente seleccionado. Por ejemplo, las vías adecuadas incluyen, de modo no taxativo, oral, sublingual, bucal, tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, de ser
15 deseado para un tratamiento local, administración intralesional. En una modalidad, los agentes de molécula pequeña identificados en la presente pueden administrarse por vía oral. En otra modalidad, los nucleótidos oligoméricos pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, en un vaso sanguíneo, tal como una vena) o por vía
20 subcutánea. En algunas modalidades, se administra a un sujeto que lo necesite uno o más agentes por vía oral (por ejemplo, en forma de píldora) y también uno o más nucleótidos oligoméricos mediante inyección o por vía subcutánea.

25 Típicamente, los nucleótidos oligoméricos dirigidos al genoma de la Hepatitis B se administran por vía intravenosa, por ejemplo, in en una formulación de nanopartícula lipídica; no obstante, la presente invención no se limita a formulaciones intravenosas que comprenden los nucleótidos oligoméricos ni a métodos de tratamiento en los que
30 se administran nucleótidos oligoméricos por vía intravenosa.

Los agentes pueden formularse de forma individual al mezclar a

temperatura ambiente al pH adecuado, y con el grado de pureza deseado, con portadores fisiológicamente aceptables, es decir, portadores no tóxicos para quienes los reciben a las dosificaciones y concentraciones utilizadas. El pH de la formulación depende principalmente del uso y la concentración particulares del compuesto, pero típicamente se encuentra en el intervalo de alrededor de 3 a alrededor de 8. Normalmente, los agentes se almacenan como una composición sólida, aunque son aceptables formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

10

Las composiciones que comprenden los agentes pueden formularse, dosificarse y administrarse de una forma congruente con una buena práctica médica. Los factores a consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la condición médica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración, el método de administración, el cronograma de administración y otros factores conocidos por los médicos tratantes.

20 Los agentes pueden administrarse en cualquier forma de administración conveniente, por ejemplo, comprimidos, polvos, cápsulas, soluciones, dispersiones, suspensiones, jarabes, aerosoles, supositorios, geles, emulsiones, parches, etc. Dichas composiciones pueden contener componentes convencionales en preparaciones farmacéuticas, por ejemplo, diluyentes, portadores, modificadores del pH, endulzantes, agentes espesantes y otros agentes activos. De desearse una administración parenteral, las composiciones serán estériles y en forma de solución o suspensión adecuada para su inyección o infusión.

30 Los expertos en la técnica conocen portadores y excipientes adecuados y estos se describen detalladamente en, por ejemplo, Ansel, Howard C., et ál., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery

Systems. Filadelfia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004; Gennaro, Alfonso R., et ál. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Filadelfia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; y Rowe, Raymond C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Chicago, Pharmaceutical Press,

5 2005. Las formulaciones también pueden incluir uno o más amortiguadores, agentes estabilizantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, antioxidantes, agentes opacantes, deslizantes, auxiliares de procesamiento, colorantes, endulzantes,
10 agentes perfumantes, agentes saborizantes, diluyentes y otros aditivos conocidos para proporcionar una presentación elegante del fármaco o para colaborar en la fabricación del producto farmacéutico (es decir, medicamento).

15 Los agentes se dosifican típicamente al menos a un nivel para alcanzar el efecto biológico deseado. Por lo tanto, un régimen de dosificación eficaz dosifica al menos una cantidad mínima que logra el efecto biológico deseado, o dosis biológicamente eficaz; no obstante, la dosis no debería ser tan elevada que supere el beneficio
20 del efecto biológico con efectos secundarios inaceptables. Por lo tanto, un régimen de dosificación eficaz no dosifica más que la dosis máxima tolerada ("MTD", por sus siglas en inglés"). La dosis máxima tolerada se define como la dosis más elevada que produce una aparición aceptable de toxicidades que limitan la dosis ("DLT", por
25 sus siglas en inglés). Las dosis que provocan una tasa inaceptable de DLT se consideran no toleradas. Típicamente, la MTD para un cronograma en particular se establece en ensayos clínicos de fase 1. Estos normalmente se llevan a cabo en pacientes al iniciar con una dosis inicial segura de 1/10 de la dosis tóxica severa ("STD10") en
30 roedores (en una base de mg/m^2) y acumular pacientes en cohortes de tres, aumentar la dosis de acuerdo con una secuencia Fibonacci

modificada en la cual los escalones de aumento mayores tienen incrementos relativos menores (por ejemplo, aumentos de dosis de 100 %, 65 %, 50 %, 40 % y 30 % a 35 % después de esto). El aumento de la dosis se continúa en cohortes de tres pacientes hasta alcanzar una
 5 dosis no tolerada. Se considera que el nivel de dosis menor siguiente que produce una tasa aceptable de DLT es el MTD.

La cantidad de los agentes administrados depende del agente particular utilizado, la cepa de VHB que se trata, la edad, peso y
 10 estado del paciente, y el criterio del médico, pero generalmente se encuentra de alrededor de 0,2 a 2,0 gramos por día.

Kits

15 Una modalidad proporciona un kit. El kit puede comprender un recipiente que comprende la combinación. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, blísteres, etc. El recipiente puede estar formado de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente puede contener la combinación
 20 eficaz para el tratamiento de la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o un frasco de solución intravenosa con un tapón que pueda perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica).

25 El kit puede comprender adicionalmente una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado a este. Se utiliza el término "prospecto" para hacer referencia a las instrucciones normalmente incluidas en los envases comerciales de agentes terapéuticos, los cuales contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación,
 30 administración, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos agentes terapéuticos. En una modalidad, la etiqueta o prospecto indica que los agentes terapéuticos pueden utilizarse para

tratar una infección viral, tal como Hepatitis B.

En determinadas modalidades, los kits son adecuados para la administración formas sólidas orales de los agentes terapéuticos, tales como comprimidos o cápsulas. Preferentemente, dicho kit incluye una cantidad de dosis unitarias. Dichos kits pueden incluir una tarjeta con las dosificaciones que orientan en el orden de uso deseado. Un ejemplo de dicho kit es un blíster. Los blísteres son conocidos en la industria de envasado y se emplean para envasar formas de dosificación farmacéutica unitarias. De desearse, se puede proporcionar un ayuda memoria, por ejemplo, en forma de números, letras u otras marcas, o como un calendario que indique los días del cronograma de tratamiento en los que deben administrarse las dosificaciones.

De acuerdo con otra modalidad, un kit puede comprender (a) un primer recipiente con un agente contenido en este; y (b) un segundo recipiente con un segundo agente contenido en este. De manera alternativa o adicional, el kit también puede comprender un tercer recipiente que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario que incluyen otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

El kit puede comprender también instrucciones para la administración de los agentes terapéuticos. Por ejemplo, el kit puede comprender además instrucciones para la administración simultánea, secuencial o por separado de los agentes terapéuticos a un paciente que lo necesite.

En determinadas modalidades distintas, el kit puede comprender un recipiente que puede contener las composiciones individuales tales como una botella con divisiones o un paquete de papel aluminio con divisiones; no obstante, las composiciones individuales también
5 pueden estar contenidas en un único recipiente sin divisiones. En determinadas modalidades, el kit comprende instrucciones para la administración de los agentes terapéuticos individuales. La forma de kit es particularmente favorable cuando los agentes terapéuticos individuales se administran preferentemente en distintas formas de
10 dosificación (por ejemplo, oral y parenteral) se administran en intervalos de dosificación diferentes, o cuando el médico tratante desea la titulación de los agentes terapéuticos individuales de la combinación.

15 En una modalidad, la invención proporciona un método para el tratamiento de la hepatitis B en un animal que comprende administrar al animal al menos dos agentes que se seleccionan del grupo que consiste en el Compuesto **3**, Compuesto **4**, entecavir, lamivudina y **SIRNA-NP**.

20 En una modalidad, los métodos de la invención excluyen un método para el tratar de la hepatitis B en un animal que comprende administrar al animal una cantidad sinérgicamente eficaz de i) un inhibidor de la formación de ADN circular covalentemente cerrado y ii) un análogo de
25 nucleótido o nucleósido.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención excluyen composiciones que comprenden i) un inhibidor de la formación de ADN circular covalentemente cerrado y ii) un análogo de nucleótido
30 o nucleósido como el único agente terapéutico activo de la hepatitis B.

En una modalidad, los kits de la invención excluyen kits que comprenden i) un inhibidor de la formación de ADN circular covalentemente cerrado y ii) un análogo de nucleótido o nucleósido como el único agente de la hepatitis B.

5

En una modalidad, los métodos de la invención excluyen un método para el tratamiento de la hepatitis B en un animal que comprende administrar al animal i) uno o más ARNip que se dirigen a un virus de la hepatitis B y ii) un inhibidor de la transcriptasa inversa.

10

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención excluyen composiciones que comprenden i) uno o más ARNip que se dirigen a un virus de la hepatitis B y ii) un inhibidor de la transcriptasa inversa como el único agente terapéutico activo de la hepatitis B.

15

En una modalidad, los kits de la invención excluyen kits que comprenden i) uno o más ARNip que se dirigen a un virus de la hepatitis B y ii) un inhibidor de la transcriptasa inversa como el único agente de la hepatitis B.

20

En una modalidad, la invención proporciona un método para tratar la hepatitis B en un animal, que comprende administrar al animal al menos dos agentes que se seleccionan del grupo que consiste en:

25

- a) inhibidores de la transcriptasa inversa;
- b) inhibidores de la cápside;
- c) inhibidores de formación de ADNccc;
- d) inhibidores de secreción de sAg; y
- e) inmunoestimuladores.

30

En una modalidad, la invención proporciona un kit que comprende al menos dos agentes que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) inhibidores de la transcriptasa inversa;
- b) inhibidores de la cápside;
- c) inhibidores de formación de ADNccc;
- d) inhibidores de secreción de sAg; y
- 5 e) inmunoestimuladores.

En una modalidad, la invención proporciona un método para el tratamiento de la hepatitis B en un animal que comprende administrar al animal un nucleótido oligomérico dirigido al genoma de la

10 Hepatitis B y al menos un agente adicional que se selecciona del grupo que consiste en:

- a) inhibidores de la transcriptasa inversa;
- b) inhibidores de la cápside;
- c) inhibidores de formación de ADNccc;
- 15 d) inhibidores de secreción de sAg; y
- e) inmunoestimuladores.

En una modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un nucleótido oligomérico dirigido al

20 genoma de la Hepatitis B y al menos un agente adicional que se selecciona del grupo que consiste en:

- a) inhibidores de la transcriptasa inversa;
- b) inhibidores de la cápside;
- c) inhibidores de formación de ADNccc;
- 25 d) inhibidores de secreción de sAg; y
- e) inmunoestimuladores.

En una modalidad, la invención proporciona un kit que comprende un nucleótido oligomérico dirigido al genoma de la Hepatitis B y al

30 menos un agente adicional que se selecciona del grupo que consiste en:

- a) inhibidores de la transcriptasa inversa;

- b) inhibidores de la cápside;
- c) inhibidores de formación de ADNccc;
- d) inhibidores de secreción de sAg; y
- e) inmunoestimuladores.

5

La capacidad de una combinación de agentes terapéuticos para tratar la Hepatitis B puede determinarse mediante el uso de modelos farmacológicos que son conocidos en la técnica.

- 10 A continuación se ilustra la invención mediante los siguientes Ejemplos no taxativos.

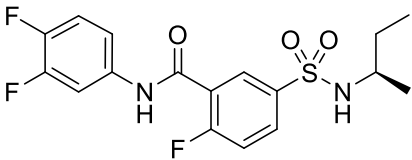
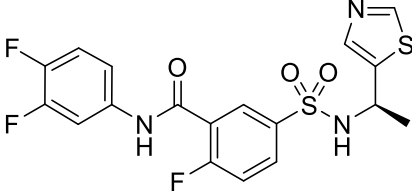
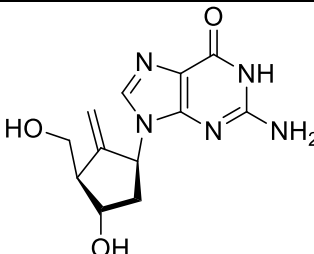
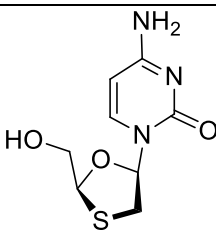
Ejemplos

- 15 Se hace referencia a los siguientes compuestos en los Ejemplos. Los Compuestos **3-4** pueden prepararse mediante el uso de procedimientos conocidos. Las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO2014/106019 y WO2013/006394 también describen métodos sintéticos que pueden utilizarse para preparar los Compuestos **3-4**.

20

25

30

Nombre o número de compuesto	Estructura
3	
4	
Entecavir	
Lamivudina	

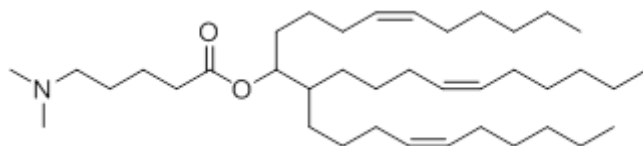
Ejemplo 1

Se utilizó un modelo de ratón del virus de la hepatitis B (VHB) para evaluar los efectos anti-VHB de un estimulante inmunitario y ARNip dirigidos a VHB, como tratamientos independientes y de forma combinada.

Se utilizó la siguiente formulación de nanopartícula lipídica (LNP) para administrar los ARNip de VHB. Los valores que se muestran en la tabla son porcentajes molares. La sigla DSPC significa diestearoilfosfatidilcolina.

PEG(2000)-C-DMA	Lípido catiónico	Colesterol	DSPC
1,1	55,0	33,0	11,0

El lípido catiónico tuvo la siguiente estructura **(13)**:



Se utilizó una mezcla de los tres ARNip dirigidos al genoma del VHB. Se muestran a continuación las secuencias de los tres ARNip.

Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5' - 3')
<u>C</u> CGUguGCACUuCGCuuCA <u>U</u>	UGAAGCGAAGUgCACACgGU <u>U</u>
<u>C</u> uggCUCAGUUUACuAgUG <u>U</u>	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU
<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>C</u> ugCGgAA <u>U</u>	UUCCGCAGUAUGgAUCGgCUU
Minúscula = modificación 2'-O-metilo	
Subrayado = resto de análogo de nucleobase desbloqueada (UNA)	

El Día -27, se administraron 10 microgramos del plásmido pAAV/HBV1.2 (obtenido de Dr. Pei-Jer Chen, descrito originalmente en Huang, LR et ál., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(47): 17862-17867)) a ratones C3H/HeN a través de inyección hidrodinámica (HDI; inyección rápida de 1,3 mL en la vena de la cola). El plásmido porta una copia de longitud excedente 1,2 veces de un genoma de VHB y expresa el antígeno de superficie del VHB (HBsAg) entre otros productos de VHB. Se monitoreó la expresión en suero de HBsAg en ratones mediante el uso de un inmunoensayo de enzimas. Los animales se asignaron (aleatorizaron) en grupos en función de sus niveles de HBsAg en suero, de forma tal que a) se confirmara que todos los animales expresaran HBsAg y b) los promedios del grupo HBsAg fueron similares entre sí antes del inicio de los tratamientos.

Los animales se trataron con estimulante inmunitario de la siguiente manera: Al Día 0, se administraron 20 microgramos de ácido poliinosínico:policitidílico (poli(I:C)) de alto peso molecular a través de HDI. Los animales se trataron con ARNip dirigidos a VHB encapsulados con la nanopartícula lipídica (LNP) de la siguiente manera: En cada uno de los días 0, 7 y 14, se administró por vía intravenosa una cantidad del artículo de prueba equivalente a 1 mg/kg de ARNip. Se incluyó un grupo de control negativo, dado que el nivel de expresión de HBsAg no es completamente estable en este modelo de ratón de VHB; la concentración absoluta de HBsAg en suero generalmente disminuye en el tiempo en animales individuales. Para demostrar los efectos específicos del tratamiento, los grupos tratados se compararon con animales de control negativo.

El efecto de los tratamientos se determinó al recopilar una pequeña cantidad de sangre los Días 0 (antes del tratamiento), 3, 7, 14 y 21 y analizarla para determinar el contenido de HBsAg en suero. Cuando fue posible, las muestras se diluyeron según fue necesario para

generar valores dentro del intervalo de ensayo de cuantificación. Los valores individuales por debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ) se establecieron como la mitad del LLOQ. La Tabla 1 muestra la concentración promedio de HBsAg en suero del grupo de tratamiento (n=4 o 5; $\pm$ error estándar del promedio) como un porcentaje del valor de referencia antes del tratamiento del animal individual al Día 0.

Los datos demuestran el grado de la reducción de HBsAg como respuesta a la combinación de ARNip del VHB y poli(I:C), así como la duración del efecto de reducción. La combinación de los dos tratamientos produjo un mayor efecto que cualquier tratamiento por sí solo.

Tabla 1. Efecto del tratamiento individual y combinado de tres ARNip de VHB y poli(I:C) estimulante inmunitario sobre el HBsAg en suero en un modelo de ratón de la infección por VHB

	Día 0	Día 3	Día 7	Día 14	Día 21
Control negativo	100 $\pm$ 0	82 $\pm$ 4	65 $\pm$ 9	50 $\pm$ 10	36 $\pm$ 11
ARNip de VHB	100 $\pm$ 0	0,2 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 1,3	1,6 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6
ARNip de VHB + Poli(I:C)	100 $\pm$ 0	0,5 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
Poli(I:C)	100 $\pm$ 0	6,1 $\pm$ 1,1	3,5 $\pm$ 1,1	3,9 $\pm$ 1,4	4,7 $\pm$ 2,3

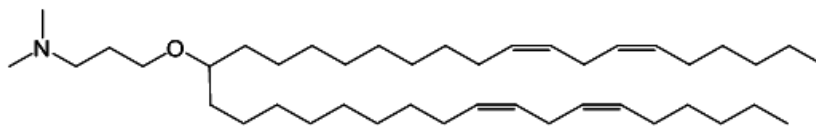
Ejemplo 2

Se utilizó un modelo de ratón del virus de la hepatitis (VHB) para evaluar los efectos anti-VHB de un inhibidor de molécula pequeña de la encapsulación de VHB (Compuesto **3**) y ARNip dirigidos al VHB, como

Se utilizó la siguiente formulación de nanopartícula lipídica (LNP) para administrar los ARNip de VHB. Los valores que se muestran en la tabla son porcentajes molares. La sigla DSPC significa diestearoilfosfatidilcolina.

PEG(2000)-C-DMA	Lípido catiónico	Colesterol	DSPC
1,6	54,6	32,8	10,9

El lípido catiónico tuvo la siguiente estructura (**7**):



Se utilizó una mezcla de los tres ARNip dirigidos al genoma del VHB. Se muestran a continuación las secuencias de los tres ARNip.

Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5' - 3')
<u>C</u> CGUguGCACUuCGCuuCA <u>U</u>	UGAAGCGAAGUgCACACgGU <u>U</u>
<u>C</u> uggCUCAGUUUACuAgUG <u>U</u>	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU
<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>C</u> ugCGgAA <u>U</u>	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU
Minúscula = modificación 2'-O-metilo	
Subrayado = resto de análogo de nucleobase desbloqueada (UNA)	

Al Día -7, se administraron 10 microgramos del plásmido pHBV1.3

(según Guidotti, L., et ál., *Journal of Virology*, 1995, 69(10): 6158-6169) a ratones NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J a través de inyección hidrodinámica (HDI; inyección rápida de 1,6 mL en la vena de la cola). El plásmido porta una copia de longitud excedente 1,3 veces de un genoma de VHB, la cual, al expresarse, genera partículas virales de la hepatitis B, inclusive ADN de VHB, entre otros productos de VHB. Como lectura del efecto anti-VHB de diversos tratamientos, se midió la concentración de ADN de VHB en suero en ratones a partir del ADN total extraído mediante el uso de un ensayo de PCR cuantitativa (secuencias de cebador/sonda de Tanaka, Y., et ál., *Journal of Medical Virology*, 2004, 72: 223-229).

Los animales se trataron con el Compuesto **3** de la siguiente manera: Al comenzar el Día 0, se administró por vía oral una dosificación de 50 mg/kg o 100 mg/kg del Compuesto **3** a animales con una frecuencia de dos veces al día durante un total de catorce dosis entre los Días 0 y 7. El Compuesto **3** se disolvió en una formulación de cosolvente para su administración. A los animales de control negativo se les administró la formulación de cosolvente por sí sola o solución salina. Los animales se trataron con ARNip dirigidos a VHB encapsulados con la nanopartícula lipídica (LNP) de la siguiente manera: Al Día 0, se administró por vía intravenosa una cantidad del artículo de prueba equivalente a 0,1 mg/kg de ARNip. El nivel de expresión del VHB no es completamente estable en este modelo de ratón de VHB; para demostrar los efectos específicos del tratamiento, los grupos tratados se compararon contra animales de control negativo.

El efecto de estos tratamientos se determinó al recopilar sangre los Días 0 (antes del tratamiento), 4 y 7 y analizarla para determinar el contenido de ADN de VHB en suero. La Tabla 2 muestra la concentración promedio de ADN de VHB en suero del grupo de tratamiento (n=7 o 8; $\pm$ error estándar del promedio) como un porcentaje del valor de

referencia antes del tratamiento del animal individual al Día 0.

Los datos demuestran el grado de la reducción de ADN de VHB en suero como respuesta a la combinación del Compuesto **3** y ARNip del VHB, así como la duración del efecto de reducción. La combinación de los dos tratamientos produjo un mayor efecto que cualquier tratamiento por sí solo.

Tabla 2. Efecto del tratamiento sencillo y de combinación del Compuesto 3 y tres ARNip de VHB sobre el ADN de VHB en suero en un modelo de ratón de la infección por VHB

Tratamiento 1 (Oral)	Tratamiento 2 (IV)	Día 0	Día 4	Día 7
Solución salina	(ninguno)	100 ± 0	69 ± 16	70 ± 14
Formulación de vehículo	(ninguno)	100 ± 0	56 ± 15	47 ± 9
Compuesto 3 , 50 mg/kg	(ninguno)	100 ± 0	13 ± 4	33 ± 9
Compuesto 3 , 100 mg/kg	(ninguno)	100 ± 0	8,6 ± 1,5	12 ± 5
(ninguno)	ARNip de VHB, 0,1 mg/kg	100 ± 0	9,4 ± 5,3	5,6 ± 1,2
Compuesto 3 , 50 mg/kg	ARNip de VHB, 0,1 mg/kg	100 ± 0	1,9 ± 0,5	1,9 ± 0,4
Compuesto 3 , 100 mg/kg	ARNip de VHB, 0,1 mg/kg	100 ± 0	0,77 ± 0,15	0,88 ± 0,28

Ejemplo 3

Se utilizó un modelo de ratón del virus de la hepatitis B virus (VHB) para evaluar los efectos anti-VHB de un inhibidor de molécula pequeña de la encapsulación de VHB (Compuesto **3**), como un tratamiento independiente y de forma conjunta con el compuesto entecavir (ETV).

5

Al Día -7, se administraron 10 microgramos del plásmido pHBV1.3 (según Guidotti, L., et ál., *Journal of Virology*, 1995, 69(10): 6158-6169) a ratones NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J a través de inyección hidrodinámica (HDI; inyección rápida de 1,6 mL en la vena de la cola). El plásmido porta una copia de longitud excedente 1,3 veces de un genoma de VHB, la cual, al expresarse, genera partículas virales de la hepatitis B, inclusive ADN de VHB, entre otros productos de VHB. Como lectura del efecto anti-VHB de diversos tratamientos, se midió la concentración de ADN de VHB en suero en ratones a partir del ADN total extraído mediante el uso de un ensayo de PCR cuantitativa (secuencias de cebador/sonda de Tanaka, Y., et ál., *Journal of Medical Virology*, 2004, 72: 223-229).

Los animales se trataron con el Compuesto **3** de la siguiente manera: Al comenzar el Día 0, se administró por vía oral una dosificación de 100 mg/kg del Compuesto **3** a animales con una frecuencia de dos veces al día durante un total de catorce dosis entre los Días 0 y 7. El Compuesto **3** se disolvió en una formulación de cosolvente para su administración. A los animales de control negativo se les administró la formulación de cosolvente por sí sola o solución salina. Los animales se trataron con ETV de la siguiente manera: Al comenzar el Día 0, se administró por vía oral una dosificación de 100 ng/kg o 300 mg/kg de ETV a animales con una frecuencia diaria durante un total de siete dosis entre los Días 0 y 6. El ETV se disolvió en DMSO hasta 2 mg/mL y luego se diluyó en solución salina para su administración. El nivel de expresión del VHB no es completamente estable en este modelo de ratón de VHB; para demostrar los efectos específicos del

tratamiento, los grupos tratados se compararon contra animales de control negativo.

El efecto de estos tratamientos se determinó al recopilar sangre los
5 Días 0 (antes del tratamiento), 4 y 7 y analizarla para determinar el
contenido de ADN de VHB en suero. Las muestras con valores Ct por
debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ) se establecieron
a la mitad del LLOQ para el cálculo de los promedios grupales. La
Tabla 3 muestra la concentración promedio de ADN de VHB en suero del
10 grupo de tratamiento (n=5-8; $\pm$ error estándar del promedio) como un
porcentaje del valor de referencia antes del tratamiento del animal
individual al Día 0.

Los datos demuestran el grado de la reducción de ADN de VHB en suero
15 como respuesta a la combinación del Compuesto **3** y ETV, así como la
duración del efecto de reducción. La combinación de los dos
tratamientos produjo un mayor efecto que cualquier tratamiento por sí
solo.

20 **Tabla 3. Efecto del tratamiento sencillo y de combinación del
Compuesto 3 y ETV sobre el ADN de VHB en suero en un modelo de ratón
de la infección por VHB**

25

30

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Día 0	Día 4	Día 7
Solución salina	(ninguno)	100 ± 0	67 ± 18	22 ± 8
Formulación de vehículo	(ninguno)	100 ± 0	41 ± 7	14 ± 3
Compuesto 3 , 100 mg/kg	(ninguno)	100 ± 0	9,3 ± 2,5	1,2 ± 0,3
(ninguno)	ETV, 100 ng/kg	100 ± 0	21 ± 5	3,5 ± 0,7
(ninguno)	ETV, 300 ng/kg	100 ± 0	1,6 ± 0,3	0,88 ± 0,31
Compuesto 3 , 100 mg/kg	ETV, 100 ng/kg	100 ± 0	1,4 ± 0,4	0,48 ± 0,18
Compuesto 3 , 100 mg/kg	ETV, 300 ng/kg	100 ± 0	0,70 ± 0,16	0,32 ± 0,07

Ejemplos 4-6

Meta del estudio de combinación *in vitro*:

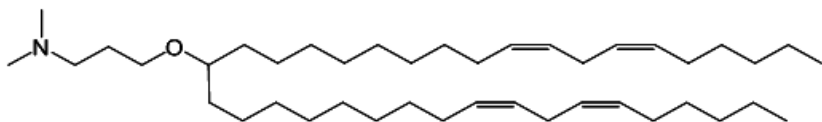
Determinar si dos combinaciones de fármacos de un inhibidor de molécula pequeña de encapsulación de VHB (Compuesto **3**), Entecavir (ETV), un inhibidor de transcriptasa inversa de la polimerasa de VHB y **SIRNA-NP**, un ARNip destinado a facilitar la inactivación potente de todas las transcripciones de ARNm viral y antígenos virales, es aditivo, sinérgico o antagonista *in vitro* mediante el uso de un sistema de modelo de cultivo celular de VHB.

Composición de SIRNA-NP:

SIRNA-NP es una formulación de nanopartícula lipídica de una mezcla de tres ARNip dirigidos al genoma del VHB. Se utilizó la siguiente formulación de nanopartícula lipídica (LNP) para administrar los ARNip de VHB en los experimentos informados en la presente. Los valores que se muestran en la tabla son porcentajes molares. La sigla DSPC significa diestearoilfosfatidilcolina.

PEG (20000) -C-DMA	Lípido catiónico	Colesterol	DSPC
1,6	54,6	32,8	10,9

5 El lípido catiónico tuvo la siguiente estructura (7):



Se muestran a continuación las secuencias de los tres ARNip.

10	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5' - 3')
	rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGrUr U
	rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGrUr U
15	rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUrUr U
rN = ARN de base N		
mN = modificación de 2'O-metilo de la base N		

20

Protocolo experimental de combinación *in vitro*:

Se llevaron a cabo estudios de combinación *in vitro* mediante el uso del método de Prichard y Shipman (Prichard MN y Shipman C Jr., *Antiviral Research*, 1990, 14(4-5), 181-205; y Prichard MN, et. ál., *MacSynergy II*). Se desarrolló la línea celular AML12-HBV10 tal como se describe en Campagna et ál. (Campagna et. ál., *J. Virology*, **2013**, 87(12), 6931-6942). Es una línea celular de hepatocitos de ratón transfectada de forma estable con el genoma de VHB, y que puede expresar ARN pregenómico de VHB y brindar soporte a la síntesis de

25

30

ADNcr de VHB (ADN circular relajado) de una forma regulada por tetraciclina. Se colocaron células AML12-HBV10 en placas de 96 pocillos de microtítulo tratadas con cultivo de tejido en medio

DMEM/F12 suplementado con suero bovino fetal al 10 % + penicilina-estreptomomicina al 1 % sin tetraciclina y se incubaron en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se cambiaron las células a medio nuevo y se trataron con el inhibidor A y el inhibidor B, a un intervalo de concentración cerca de sus valores EC₅₀ respectivos, y se incubaron durante 48 horas en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 %. Los inhibidores se diluyeron en DMSO al 100 % (ETV y Compuesto **3**) o medio de cultivo (**SIRNA-NP**) y la concentración final de DMSO en el ensayo fue ≥0,5 %.

Los dos inhibidores se evaluaron de forma individual y de forma combinada en forma de tablero de ajedrez, de forma tal que cada concentración del inhibidor A se combinara con cada concentración del inhibidor B para determinar los efectos de su combinación sobre la inhibición de la producción de ADNcr. Luego de una incubación de 48 horas, se midió el nivel de ADNcr presente en los pocillos tratados con inhibidor mediante el uso de un ensayo de ADNb (Affymetrix) con un conjunto de sonda específico de VHB y las instrucciones del fabricante. Los datos de RLU generados a partir de cada pocillo se calcularon como % de inhibición de los pocillos de control sin tratar y se analizaron mediante el uso del programa MacSynergy II para determinar si las combinaciones eran sinérgicas, aditivas o antagónicas mediante el uso de las guías de interpretación establecidas por Prichard y Shipman de la siguiente forma: volúmenes de sinergia <25 µM² % (volumen log <2) a 95 % CI= probablemente insignificante; 25-50 µM² % (volumen log >2 y <5) = menor pero significativo 50-100 µM² % (volumen log >5 y <9) = moderado, puede ser importante *in vivo*; mayor que 100 µM² % (volumen log >9) = sinergia potente, probablemente importante *in vivo*; volúmenes cercanos a 1000 µM² % (volumen log >90) = inusualmente elevado, revisar datos. Al mismo tiempo, se evaluó el efecto de las combinaciones inhibidoras sobre la viabilidad celular mediante el uso de placas de replicación que se utilizaron para determinar el contenido de ATP como medición

de la viabilidad celular mediante el uso del reactivo cell-titer glo (Promega) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 4: Combinación *in vitro* del Compuesto 3 y Entecavir:

5 El Compuesto **3** (intervalo de concentración de 2,5 μM a 0,01 μM en una dilución en serie de 2 veces y titulación en 9 puntos) se evaluó junto con Entecavir (intervalo de concentración de 0,075 μM a 0,001 μM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). La inhibición % promedio de ADNcr y desviaciones estándar de 4
10 replicados observadas con los tratamientos de Compuesto **3** o Entecavir solos o de forma combinada se muestra en la Tabla 1. Los valores EC_{50} del Compuesto **3** y Entecavir se muestran en la Tabla 4. Cuando los valores observados de la combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva (Tabla 1) para el
15 intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran aditivas (Tabla 4) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992).

20 **Ejemplo 5: Combinación *in vitro* del Compuesto 3 y SIRNA-NP:**

El Compuesto **3** (intervalo de concentración de 2,5 μM a 0,01 μM en una dilución en serie de 2 veces y titulación en 9 puntos) se evaluó junto con **SIRNA-NP** (intervalo de concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ a 0,006 $\mu\text{g/mL}$ en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos).
25 La inhibición % promedio de ADNcr y desviaciones estándar de 4 replicados observadas con los tratamientos del Compuesto **3** o **SIRNA-NP** por sí solos o de forma combinada se muestra en la Tabla 2. Los valores de EC_{50} del Compuesto **3** y **SIRNA-NP** se muestran en la Tabla 4. Cuando los valores observados de la combinación de dos inhibidores se
30 compararon con lo que se espera de la interacción aditiva (Tabla 2) para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran aditivas (Tabla 4) según el análisis MacSynergy II

y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992).

Ejemplo 6: Combinación *in vitro* de Entecavir y SIRNA-NP:

5 El Entecavir (intervalo de concentración de 0,075 μM a 0,001 μM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con **SIRNA-NP** (intervalo de concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ a 0,002 $\mu\text{g/mL}$ en una dilución en serie de 2 veces y titulación en 9 puntos). La inhibición % promedio de ADNcr y desviaciones estándar de 4
10 replicados observadas con los tratamientos de Entecavir o **SIRNA-NP** por sí solos o de forma combinada se muestra en la Tabla 3. Los valores de EC_{50} de Entecavir y **SIRNA-NP** se muestran en la Tabla 4. Cuando los valores observados de la combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva (Tabla 3)
15 para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran aditivas (Tabla 4) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992).

20 **Tabla 1: Combinación *in vitro* de Entecavir (ETV) y Compuesto 3**

10

1520

[FÁRMACO]	0	0,010	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5
ETV (µM)										
0,075	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,008	0	0	0	0	0	0	0	0	-1,28519	
0,003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)

Bonferroni Adj. 96 %

SINERGIA 0

volumen log 0

ANTAGONISMO -1,29

volumen log -0,19

Tabla 2: Combinación *in vitro* del Compuesto 3 y SIRNA-NP

[FÁRMACO]	0	0,010	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,250	2,5	INHIBICIÓN % PROMEDIO de ADNcr Compuesto 3 µM
SIRNA-NP											
µg/mL											
0,5	96,25	95,01	95,45	96,35	95,83	96,38	96,15	97,02	96,88	96,9	
0,167	92,38	90,74	91,26	92,35	90,9	94,41	95,28	95,7	96,58	96,63	
0,056	68,59	66,89	75,99	72,21	81,66	83,57	90,29	92,61	94,84	95,99	
0,019	29,18	30,74	29,09	33,68	43,8	68,05	83,12	87,88	93,48	94,35	—
0,006	14,92	0,31	-4,48	6,12	19,44	49,81	78,77	85,37	90,66	92,09	
0	0	-1,98	-20,54	-16,95	20,07	37,11	59,39	79,86	88,12	89,67	

[FÁRMACO]	0	0,010	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%) Compuesto 3 µM
SIRNA-NP											
µg/mL											
0,5	1,42	1,64	1,15	0,66	0,89	1,23	1,26	1,22	1,07	0,87	
0,167	3,23	3,02	1,2	3,25	1,88	1,47	1,05	0,87	0,9	1,16	
0,056	9,74	8,53	3,59	6,15	5,55	3,84	2,37	2,44	1,82	1,48	
0,019	31,44	16,24	17,69	9,21	14,48	11,22	6,35	5,11	1,1	1,48	—
0,006	25,79	18,47	16,92	29,8	15,19	13,5	4,32	0,73	3,01	3,58	
0	0	16,14	29,67	32,34	27,28	28,62	12,94	5,47	5,83	2,5	

[FÁRMACO]	0	0,010	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	INHIBICIÓN ADITIVA Compuesto 3 µM
SIRNA-NP											
µg/mL											
0,5	96,25	96,18	95,48	95,61	97	97,64	98,48	99,24	99,55	99,61	
0,167	92,38	92,23	90,81	91,09	93,91	95,21	96,91	98,47	99,09	99,21	
0,056	68,59	67,97	62,14	63,27	74,89	80,25	87,24	93,67	96,27	96,76	
0,019	29,18	27,78	14,63	17,18	43,39	55,46	71,24	85,74	91,59	92,68	—
0,006	14,92	13,24	-2,56	0,5	32	46,49	65,45	82,86	89,89	91,21	
0	0	-1,98	-20,54	-16,95	20,07	37,11	59,39	79,86	88,12	89,67	

[FÁRMACO]	0	0,010	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
SIRNA-NP											Bonferroni Adj. 96 %
<i>µg/mL</i>											SINERGIA 2,14
0,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	volumen log 0,31
0,167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,056	0	0	2,03531	0	0	0	0	0	0	0	
0,019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO 0
0,006	0	0	0	0	0	0	0	0,10757	0	0	volumen log 0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabla 3: Combinación *in vitro* de Entecavir y SIRNA-NP

[FÁRMACO]	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,063	0,125	0,250	0,500	INHIBICIÓN % PROMEDIO de ADNcr
<i>ETV</i> <i>µM</i>											SIRNA-NP <i>µg/mL</i>
0,075	74,9	77,52	75,42	79,02	85,16	86,59	92,73	95,09	96,6	96,66	—
0,025	64,1	64,59	65,95	68,92	75,31	80,87	90,12	93,84	95,54	96,72	
0,008	37,88	42,67	48,08	54,27	70,87	75,26	85,26	92,63	95,6	96,12	
0,003	37,81	25,05	31,15	33,55	48,32	68,45	81,86	91	94,63	96,08	
0,001	9,06	11,49	1,57	22,41	33,41	61,88	77,03	90,37	93,93	95,14	
0	0	-8,95	-7,86	20,89	32,43	46,05	72,94	87,4	93,31	95,02	
[FÁRMACO]	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
<i>ETV</i> <i>µM</i>											SIRNA-NP <i>µg/mL</i>
0,075	5,4	2,5	2,4	3,43	3,56	4,59	1,42	0,92	1,29	1,35	—
0,025	8,24	8,69	2,67	5,28	1,81	3,19	0,79	1,39	1,72	1,28	
0,008	5,43	9,21	4,64	3,19	7,48	2,52	0,29	2,33	0,59	0,95	
0,003	8,11	11,06	14,06	2,97	7,32	2,97	1,89	1,3	0,73	0,7	
0,001	9,35	11,3	8,13	9,32	7,82	3,96	3,32	1,43	0,81	1,16	
0	0	17,52	8,77	13,87	26,87	5,59	5,05	1,56	1,06	1,33	

5

10

15

[FÁRMACO]	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	INHIBICIÓN ADITIVA
ETV											SIRNA-NP
µM											µg/mL
0,075	74,9	72,65	72,93	80,14	83,04	86,46	93,21	96,84	98,32	98,75	
0,025	64,1	60,89	61,28	71,6	75,74	80,63	90,29	95,48	97,6	98,21	
0,008	37,88	32,32	33	50,86	58,03	66,49	83,19	92,17	95,84	96,91	
0,003	37,81	32,24	32,92	50,8	57,98	66,45	83,17	92,16	95,84	96,9	—
0,001	9,06	0,92	1,91	28,06	38,55	50,94	75,39	88,54	93,92	95,47	
0	0	-8,95	-7,86	20,89	32,43	46,05	72,94	87,4	93,31	95,02	
[FÁRMACO]	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	GRÁFICA DE
ETV											SINERGIA (99,9 %)
µM											Bonferroni Adj. 96 %
0,075	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SINERGIA 1,59
0,025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	volumen log 0,23
0,008	0	0	0	0	0	0,47668	1,11561	0	0	0	
0,003	0	0	0	-7,47573	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO -7,48
0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	volumen log -1,07
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabla 4: Resumen de resultados de los estudios de combinación in vitro en el sistema de cultivo celular AML12-HBV10 con cuantificación de ADNcr mediante el uso del ensayo ADNb:

25

Inhibidor A	Inhibidor B	Inhibidor A EC ₅₀ (µM)	Inhibidor B EC ₅₀ (µM o µg/mL)	Volumen de sinergia (µM ² %)*	Volumen log de sinergia	Volumen de antagonismo (µM ² %)*	Volumen log de antagonismo	Conclusión
Compuesto 3	Entecavir (ETV)	0,231	0,012	0	0	-1,29	-0,19	Aditivo
Compuesto 3	SIRNA-NP**	0,250	0,032	2,14	0,31	0	0	Aditivo
Entecavir (ETV)	SIRNA-NP**	0,012	0,031	1,59	0,23	-7,48	-1,07	Aditivo

*con un intervalo de confianza de 99,9 %

** µg/mL

30

Ejemplos 7-9

Meta del estudio de combinación in vitro:

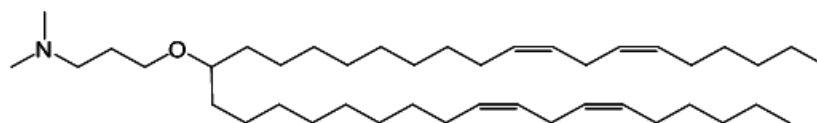
Determinar los efectos del tratamiento de combinación con las combinaciones de dos compuestos sobre el proceso de la repliación de ADN de VHB, formación de ADNccc y estabilidad y expresión de ADNccc. Se investigaron los Compuestos **3** y **4**, dos inhibidores de molécula pequeña de encapsulación de VHB; entecavir (ETV) y lamivudina (3TC), dos inhibidores de transcriptasa inversa aprobados por la FDA de la polimerasa de VHB; y **SIRNA-NP**, un inhibidor de ARNip formulado por la nanopartícula lipídica (LNP) de expresión del antígeno viral y ARNm. Los estudios tuvieron el fin de determinar si las combinaciones son aditivas, sinérgicas o antagonistas *in vitro* mediante el uso de un sistema de modelo de cultivo celular de VHB.

Formulación de LNP:

SIRNA-NP es una formulación de nanopartícula lipídica de una mezcla de tres ARNip dirigidos al genoma del VHB. Se utilizó la siguiente formulación de nanopartícula lipídica (LNP) para administrar los ARNip de VHB en los experimentos informados en la presente. Los valores que se muestran en la tabla son porcentajes molares. La sigla DSPC significa diestearoilfosfatidilcolina.

PEG(2000)-C-DMA	Lípido catiónico	Colesterol	DSPC
1,6	54,6	32,8	10,9

El lípido catiónico tuvo la siguiente estructura (**7**):



ARNip

Se muestran a continuación las secuencias de los tres ARNip.

5

Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5' - 3')
rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGrUrU
rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUrUrU
rN = ARN de base N	
mN = modificación de 2'O-metilo de la base N	

Protocolo experimental de combinación *in vitro*:

Se llevaron a cabo estudios de combinación *in vitro* mediante el uso
 10 de una modificación del sistema de ensayo descrito en Cai et ál.
 (Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2012. Vol 56(8):4277-88). Un
 sistema de cultivo celular HepDE19 desarrollado anteriormente (Guo et
 ál. J. Virology (2007) 81(22): 12472-12484) brinda soporte a la
 replicación de ADN de VHB y formación de ADNccc de forma regulada
 15 mediante tetraciclina (Tet), y produce una molécula indicadora
 detectable que depende de la producción y mantenimiento del ADNccc.

En el sistema de cultivo celular HepDE19, los indicadores son el ARN
 anterior al núcleo y su producto proteínico cognado, el "antígeno e"
 20 de VHB (HBeAg) secretado. En las células HepDE19, solamente se
 produce el ARN anterior al núcleo y HBeAg a partir de la plantilla de
 ADNccc circular, debido a que el ORF de HBeAg y su líder de ARN 5' se
 separan entre los extremos opuestos del genoma viral integrado, y
 solo se tornan contiguos con la formación del ADNccc. Si bien un
 25 ensayo basado en el sistema de cultivo celular HepDE19 es eficaz para
 la determinación de la actividad, los resultados de la detección de
 alto rendimiento pueden complicarse debido a que el ELISA de HBeAg
 reacciona de forma cruzada con un homólogo de HBeAg viral, que es el
 antígeno nuclear (HBcAg) expresado en gran medida de forma
 30 independiente del ADNccc en células HepDE19. Para sobreponerse a esta
 complicación, se desarrolló un sistema de cultivo celular alternativo
 (denominado en la presente sistema de cultivo celular DESHAe82 y

descrito en PCT/EP/2015/06838), el cual incluye un marcador de epítipo de HA dentro del marco en la secuencia codificante del extremo N de HBeAg en el transgen de las células DESHAe82, sin alterar ningún elemento cis fundamental para la replicación del VHB, transcripción de ADNccc y secreción de HBeAg.

Se desarrolló un ensayo ELISA de quimioluminiscencia (CLIA) para la detección de HBeAg marcado con HA donde el anticuerpo HA funciona como un anticuerpo de captura y HBeAg funciona como un anticuerpo de detección, lo que elimina la señal contaminante de HBcAg. La línea celular DESHAe82 acoplada con el ensayo CLIA de HA-HBeAg presenta niveles elevados de síntesis de ADNccc y producción y secreción de HA-HBeAg, y señales de lectura específica elevadas con ruido bajo. Además, se desarrolló un protocolo para la transcripción inversa cuantitativa y reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR) que es específico para la detección de ARN anterior al núcleo en células DE19 o DESHAe82, y también se utiliza para la detección del ARNm dependiente de ADNccc (ARN anterior al núcleo) que se traduce para producir HBeAg o HA-HBeAg.

Para evaluar las combinaciones de compuestos, se colocaron células DESHAe82 o DE19 (tal como se indica en los ejemplos) en placas de 96 pocillos de microtítulo tratadas con cultivo de tejido en medio DMEM/F12 suplementado con suero bovino fetal al 10 % + penicilina-estreptomicina al 1 % con Tet, y se incubaron en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se transfirieron las células a medio nuevo y se trataron con el inhibidor A y el inhibidor B, a un intervalo de concentración cerca de sus valores EC₅₀ respectivos, y se incubaron durante 48 horas en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 %. Los inhibidores se diluyeron en DMSO al 100 % (ETV, 3TC, Compuesto **3** y Compuesto **4**) o medio de cultivo (**SIRNA-NP**) y la concentración final de DMSO en el ensayo fue de 0,5 %. Los dos inhibidores se evaluaron de forma

individual y de forma combinada en forma de tablero de ajedrez, de forma tal que cada concentración del inhibidor A se combinara con cada concentración del inhibidor B para determinar los efectos de su combinación sobre la inhibición de la formación y expresión de ADNccc. Se incluyeron muestras de control negativo no tratadas (DMSO al 0,5 % o solo medio) en cada placa, en múltiples pocillos. Luego de 9 días de incubación, se extrajo el medio y las células se sometieron a una extracción de ARN para medir el nivel de ARNm anterior al núcleo dependiente de ADNccc. Los ARN celulares totales se extrajeron mediante el uso de kit de aislación de ARN total de un formato de 96 pocillos (MACHEREY-NAGEL, n.º cat. 740466.4) siguiendo las instrucciones del fabricante (procesamiento al vacío, los lavados adicionales más de amortiguador RA4). Las muestras de ARN se eluyeron en agua sin ARNasa. Se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa en tiempo real con Roche LightCycler480 y una sonda de hidrólisis RNA Master (número de catálogo 04991885001, Roche) mediante el uso de cebadores y condiciones para la detección específica de ARN anterior al núcleo dependiente de ADNccc. Los niveles de ARNm de GAPDH también se detectaron mediante métodos estándar y se utilizaron para normalizar los niveles de ARN anteriores al núcleo. La inhibición de los niveles de ARN anteriores al núcleo y, por lo tanto, la expresión de ADNccc, se calculó como inhibición % de los pozos de control sin tratar y se analizó mediante el uso del modelo de combinación Prichard-Shipman a través del programa MacSynergyII (Prichard MN, Shipman C Jr. Antiviral Research, 1990. Vol 14(4-5):181-205; Prichard MN, Aseltine KR y Shipman, C. MacSynergy II. University of Michigan 1992) para determinar si las combinaciones eran sinérgicas, aditivas o antagónicas mediante el uso de las guías de interpretación establecidas por Prichard y Shipman de la siguiente forma: volúmenes de sinergia <25 μM^2 % (volumen log <2) a 95 % CI= probablemente insignificante; 25-50 (volumen log >2 y <5) = menor pero significativo 50-100 (volumen log >5 y <9) = moderado, puede ser

importante *in vivo*; mayor que 100 (volumen log >9) = sinergia potente, probablemente importante *in vivo*; volúmenes cercanos a 1000 (volumen log >90) = inusualmente elevado, revisar datos.

5 Al mismo tiempo, se evaluó el efecto de la combinaciones de inhibidor sobre la viabilidad y proliferación celular de dos formas: 1) Observación microscópica directa de los pocillos de prueba y 2) uso de las placas de replicación colocadas a una densidad celular de 10-20 % que, luego de 4 días, se evaluaron para determinar el contenido
10 de ATP intracelular mediante el uso del reactivo Cell-Titer Glo (Promega) según las instrucciones del fabricante. Se calculó la viabilidad y densidad celular como porcentaje de los pocillos de control negativo sin tratar.

15 **Ejemplo 7: Combinación *in vitro* del Compuesto 3 y entecavir:**

El Compuesto 3 (intervalo de concentración de 10 μM a 0,0316 μM en una dilución semilogarítmica en serie y titulación en 6 puntos) se evaluó junto con Entecavir (intervalo de concentración de 0,010 μM a 0,00003 μM en una dilución semilogarítmica en serie de 3,16 veces y
20 titulación en 6 puntos). La actividad antiviral de esta combinación se muestra en la Tabla 7a; los volúmenes de antagonismo y sinergia se muestran en la Tabla 7b. Se muestran en la Tabla 9d los resultados de la combinación de 2 replicaciones de mediciones de volúmenes de antagonismo y sinergia de acuerdo con Prichard y Shipman, y su
25 interpretación. En este sistema de ensayos, esta combinación produce la inhibición sinérgica de la expresión de ARN anterior al núcleo. No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía.

30 **Tabla 7a. Actividad antiviral de la combinación del Compuesto 3 y Entecavir:**

Inhibición porcentual promedio en función del control negativo (n=2

muestras por punto de datos)

ETV, μM	0,01	86,940	97,010	97,490	95,900	97,120	98,240	99,220
	0,0032	81,510	61,730	69,510	62,570	98,550	97,820	97,690
	0,001	73,320	77,600	86,990	66,700	94,490	89,590	91,710
	0,0003	69,090	78,290	58,730	55,160	92,360	91,290	93,110
	0,0001	-8,990	39,460	55,700	44,430	45,680	73,420	91,580
	3E-05	- 133,220	- 313,960	20,870	49,930	8,740	68,590	72,590
	0	0,000	-26,280	- 86,920	36,240	67,120	90,600	84,340
		0	0,032	0,100	0,317	1,001	3,165	10
Compuestos	Compuesto 3, μM							

15 **Tabla 7b. Cálculos de volumen de MacSynergy de la combinación del Compuesto 3 y Entecavir:**

Nivel de inhibición "mayor que el aditivo" a un nivel de confianza de 99,99 %

ETV, μM	0,01	0	3,75864	13,8041	1,86048	0	0	0,74344
	0,0032	0	0	0	0	0,87826	0	0
	0,001	0	9,05212	27,6452	0	0	0	0
	0,0003	0	0,40426	6,01171	0	0	0	0
	0,0001	0	75,9052	125,983	0	0	0	0
	3E-05	0	0	322,705	90,4025	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0,032	0,100	0,317	1,001	3,165	10
Compuestos	Compuesto 3, μM							

Ejemplo 8: Combinación in vitro del Compuesto 4 y Entecavir:

El Compuesto 4 (intervalo de concentración de 10 μM a 0,0316 μM en

una dilución semilogarítmica en serie y titulación en 6 puntos) se evaluó junto con Entecavir (intervalo de concentración de 0,010 μM a 0,00003 μM en una dilución semilogarítmica en serie de 3,16 veces y titulación en 6 puntos). La actividad antiviral de esta combinación se muestra en la Tabla 8a; los volúmenes de antagonismo y sinergia se muestran en la Tabla 8b. Se muestran en la Tabla 9d los resultados de la combinación de 2 replicaciones de mediciones de volúmenes de antagonismo y sinergia de acuerdo con Prichard y Shipman, y su interpretación. En este sistema de ensayos, esta combinación produce la inhibición sinérgica de la expresión de ARN anterior al núcleo. No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía.

Tabla 8a. Actividad antiviral de la combinación del Compuesto 4 y Entecavir:

Inhibición porcentual promedio en función del control negativo (n=2 muestras por punto de datos)

ETV, μM	0,01	96	92,03	89,04	98,02	97,16	97,18	96,46
	0,0032	95,31	93,96	93,11	89,34	91,81	97,7	97,74
	0,001	80,83	94,74	94,25	95,49	98,64	98,14	98,7
	0,0003	39,01	95,61	92,25	97,73	97,85	97,68	95,26
	0,0001	64,23	78,08	98,62	96,63	89,34	98,87	95,3
	3E-05	-32,56	-53,69	58,53	97,04	97,7	96,9	95,1
	0	0	-49,48	66,78	94,67	93,92	97,88	97,53
		0	0,032	0,100	0,317	1,001	3,165	10
Compuestos	Compuesto 4, μM							

Tabla 8b. Cálculos de volumen de MacSynergy de la combinación del Compuesto 4 y Entecavir:

Nivel de inhibición "mayor que el aditivo" a un intervalo de confianza de 99,99 %

5	ETV, μM	0,01	0	-1,99	-9,63	-1,77	-2,6	-2,74	-3,44
		0,0032	0	0,97	-5,33	-10,41	-7,9	-2,2	-2,14
		0,001	0	23,4	0,62	-3,49	-0,19	-1,45	-0,83
		0,0003	0	86,78	12,51	0,98	1,56	-1,03	-3,23
		0,0001	0	31,55	10,5	-1,46	-8,49	-0,37	-3,82
		3E-05	0	44,46	2,57	4,11	5,76	-0,29	-1,63
		0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0,032	0,100	0,317	1,001	3,165	10
10	Compuestos	Compuesto 4, μM							

Ejemplo 9: Combinación in vitro del Compuesto 3 y SIRNA-NP:

El Compuesto 3 (intervalo de concentración de 10 μM a 0,0316 μM en una dilución semilogarítmica en serie y titulación en 6 puntos) se evaluó junto con **SIRNA-NP** (intervalo de concentración de 0,10 μM a 0,000 $\mu\text{g/mL}$ en una dilución semilogarítmica en serie de 3,16 veces) y titulación en 6 puntos. La actividad antiviral de esta combinación se muestra en la Tabla 9a; los volúmenes de antagonismo y sinergia se muestran en la Tabla 9b. Se muestran en la Tabla 9d los resultados de la combinación de 4 replicaciones de mediciones de volúmenes de antagonismo y sinergia de acuerdo con Prichard y Shipman, y su interpretación. En este sistema de ensayos, esta combinación produce la inhibición sinérgica de la expresión de ARN anterior al núcleo. No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo Cell-Titer Glo (Tabla 9c).

Tabla 9a. Actividad antiviral de la combinación del Compuesto 3 y SIRNA-NP:

Inhibición porcentual promedio en función del control negativo (n=4 muestras por punto de datos)

Compuesto 3, μM	10,000	76,180	76,580	93,330	97,170	94,670	97,120	98,640
	3,165	73,120	93,950	95,500	97,730	98,120	99,160	98,620
	1,001	88,510	95,740	97,340	97,880	98,620	99,410	98,150
	0,317	77,070	96,440	93,720	98,340	98,390	99,260	97,820
	0,100	71,330	87,960	91,490	87,110	97,700	97,790	95,920
	0,032	35,570	- 56,280	64,870	86,080	90,920	86,330	89,560
	0	0,000	3,930	- 46,460	35,730	87,370	72,720	99,230
		0	0,0003	0,001	0,003	0,010	0,032	0,100
Compuestos	SIRNA-NP ($\mu\text{g/mL}$)							

Tabla 9b. Cálculos de volumen de MacSynergy de la combinación del Compuesto 3 y SIRNA-NP:

Nivel de inhibición "mayor que el aditivo" a un nivel de confianza de 99,99 %

Compuesto 3, μM	10,000	0,000	0,000	13,805	4,977	0,000	0,000	- 0,061
	3,165	0,000	2,558	28,321	9,580	0,000	4,779	0,000
	1,001	0,000	1,416	10,254	1,969	0,000	0,697	0,000
	0,317	0,000	11,954	12,984	9,921	0,000	3,677	0,000
	0,100	0,000	0,000	1,985	0,000	0,000	3,438	0,000
	0,032	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		0	0,0003	0,001	0,003	0,010	0,032	0,100
Compuestos	SIRNA-NP ($\mu\text{g/mL}$)							

Tabla 9c. Citotoxicidad de la combinación del Compuesto 3 y SIRNA-NP: Porcentaje promedio de la viabilidad celular en función del control

Compuesto 3, μM	10,000	110,5	112,6	120,6	124,0	115,0	89,1
	3,165	105,9	116,1	119,5	120,6	117,3	95,1
	1,001	109,0	118,6	115,9	114,9	116,3	91,5
	0,317	110,0	111,8	119,7	117,2	109,7	90,3
	0,100	99,3	107,2	115,1	119,5	119,9	93,5
	0,032	99,3	107,7	122,6	127,1	123,0	85,9
Compuestos		0,0003	0,001	0,003	0,010	0,032	0,100

Tabla 9d. Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* en el sistema de cultivo celular DESHAe82 con cuantificación de ARN anterior al núcleo derivado de ADNccc mediante qRT-PCR

Inhibidor A (N.º de compuesto)	Inhibidor B	Volumen de sinergia (μM^2 %)	Volumen log de sinergia	Antagonismo (μM^2 %)	Volumen log de antagonismo	Interpretación
3	Entecavir (ETV)	679,15	169,58	0	0	Sinergia
4	Entecavir (ETV)	225,77	56,44	-76,43	-19,11	Sinergia
3	SIRNA-NP	122,31	30,54	-0,06	-0,01	Sinergia

Ejemplo 10

El objetivo de este ejemplo fue la comparación de la actividad anti-VHB de diversos tratamientos de combinación que incluyeron el Compuesto 3, un inhibidor de molécula pequeña de la encapsulación de VHB y SIRNA-NP, una formulación de nanopartícula lipídica que encapsul ARNip dirigidos a VHB, así como tratamientos del estándar de cluidado de VHB establecidos: Entecavir (ETV), un análogo de nucleós(t)ido que inhibe la actividad de polimerasa de ADN de VHB (de

Man RA et ál., *Hepatology*, 34(3), 578-82 (2001)) e interferón pegilado alfa-2a (pegINF α -2a), que limita la diseminación viral a través de una activación del receptor de interferón de tipo 1 (Marcellin et ál., *N Engl J Med.*, 51(12), 1206-17 (2004)). La potencia de estas combinaciones se comparó con tratamientos de monoterapia con el Compuesto 3, SIRNA-NP y ETV por sí solos, así como con un tratamiento de control negativo con vehículo para el Compuesto 3.

Este trabajo se llevó a cabo en un modelo de ratón establecido quimérico de hígado humanizado de infección crónica del virus de la hepatitis B (VHB) (Tsuge et ál., *Hepatology*, 42(5), 1046-54 (2005)). Se estableció un nivel persistente de infección por VHB en los animales antes de la fase de tratamiento que comenzó el Día 0. Las dosificaciones de los artículos de prueba fueron las siguientes: El Compuesto 3, 100 mg/kg orales dos veces al día; SIRNA-NP, 3 mg/kg intravenosos cada 2 semanas; ETV, 1,2 μ g/kg orales al día; pegINF α -2a, 30 μ g/kg subcutáneos dos veces por semana.

Se evaluaron los efectos anti-VHB en función de los niveles de HBsAg en suero mediante el uso del kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de GS HBsAg EIA 3.0 de Bio-Rad Laboratories según las instrucciones del fabricante; y los niveles de ADN de VHB en suero se midieron a partir del ADN total extraído mediante el uso de un ensayo de PCR cuantitativa (secuencias de cebador/sonda de Tanaka et ál., *Journal of Medical Virology*, 72, 223-229 (2004)).

Los tratamientos de combinación doble y triple produjeron una mayor actividad antiviral según se ejemplifica mediante reducciones más potentes de los niveles de ADN de VHB en suero con respecto a los tratamientos de monoterapia investigados. Particularmente, al Día 28, los niveles de ADN de VHB en suero se redujeron en log₁₀ de 2,5 luego

del tratamiento con una combinación del Compuesto 3 y SIRNA-LNP o Compuesto 3 y pegIFN α -2a, y 2 log₁₀ luego del tratamiento con una combinación del Compuesto 3 y ETV, en comparación con las reducciones de log₁₀ de 1,0 a 1,5 observadas con los tratamientos de monoterapia de ETV, Compuesto 3 o SIRNA-LNP. El tratamiento de combinación triple con el Compuesto 3, SIRNA-NP y ETV o el Compuesto 3, SIRNA-NP y pegINF α -2a demostraron un efecto levemente mayor sobre los niveles de ADN de VHB con respecto a los tratamientos de combinación doble hasta el Día 28. Se mantuvo la capacidad de SIRNA-NP de inhibir la producción de la proteína (antígeno) de la hepatitis B, tal como se ejemplifica según los niveles de HBsAg en suero (cuando se administra en conjunto con los otros tratamientos antivirales).

Tabla 10a: Efecto de los tratamientos de monoterapia y combinados sobre los niveles de ADN de VHB en suero

5

10

15

20

25

N.º de grupo	Tratamiento	ADN de VHB en suero				
		(Copias/mL ± SEM)				
		Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
1	Control de vehículo para el Compuesto 3	1,50E+08 ± 1,82E+07	1,65E+08 ± 2,78E+07	1,45E+08 ± 1,50E+07	2,13E+08 ± 3,01E+07	2,13E+08 ± 2,63E+07
2	Compuesto 3	1,70E+08 ± 2,16E+07	1,33E+07 ± 1,85E+06	1,28E+07 ± 1,78E+06	1,02E+07 ± 4,24E+06	1,17E+07 ± 5,20E+06
3	SIRNA-NP	1,88E+08 ± 4,52E+07	5,18E+06 ± 1,50E+06	6,40E+06 ± 9,67E+05	2,24E+06 ± 5,51E+05	6,86E+06 ± 2,26E+06
4	Compuesto 3 + SIRNA-NP	1,56E+08 ± 2,25E+07	8,64E+06 ± 2,48E+06	2,02E+06 ± 5,08E+05	4,36E+05 ± 1,18E+05	3,64E+05 ± 1,00E+05
5	Compuesto 3 + SIRNA-NP + ETV	1,66E+08 ± 1,33E+07	6,82E+06 ± 1,64E+06	1,57E+06 ± 2,19E+05	3,70E+05 ± 8,96E+04	1,68E+05 ± 4,00E+04
6	Compuesto 3 + SIRNA-NP + pegIFN α-2a	2,42E+08 ± 5,70E+07	7,75E+06 ± 2,03E+06	1,79E+06 ± 4,53E+05	5,48E+05 ± 1,12E+05	2,90E+05 ± 2,52E+04
7	Compuesto 3 + ETV	1,96E+08 ± 2,46E+07	1,70E+07 ± 4,13E+06	5,22E+06 ± 1,06E+06	2,34E+06 ± 4,06E+05	1,80E+06 ± 3,67E+05
8	Compuesto 3 + pegIFN α-2a	1,67E+08 ± 2,54E+07	8,50E+06 ± 1,64E+06	1,39E+06 ± 3,71E+05	4,98E+05 ± 1,25E+05	3,01E+05 ± 8,11E+04
9	ETV	1,48E+08 ± 1,18E+07	2,35E+07 ± 2,47E+06	1,38E+07 ± 1,65E+06	1,35E+07 ± 6,45E+05	9,33E+06 ± 3,20E+05

Tabla 10b: Efecto de los tratamientos de monoterapia y combinados sobre los niveles de HBsAg en suero

30

N.º de grupo	Tratamiento	HBsAg en suero (IU/mL $\pm$ SEM)	
		Día 0	Día 21
5	1 Control de vehículo para el Compuesto 3	2761 $\pm$ 388	4065 $\pm$ 338
	2 Compuesto 3	2965 $\pm$ 616	4158 $\pm$ 355
	3 SIRNA-NP	3352 $\pm$ 812	44 $\pm$ 11
10	4 Compuesto 3 + SIRNA-NP	3436 $\pm$ 498	58 $\pm$ 8
	5 Compuesto 3 + SIRNA-NP + ETV	2795 $\pm$ 309	96 $\pm$ 24
	6 Compuesto 3 + SIRNA-NP + pegIFN α -2a	3965 $\pm$ 734	37 $\pm$ 4
15	7 Compuesto 3 + ETV	3965 $\pm$ 779	5822 $\pm$ 1490
	8 Compuesto 3 + pegIFN α -2a	3154 $\pm$ 521	3621 $\pm$ 683
	9 ETV	2649 $\pm$ 282	2975 $\pm$ 629

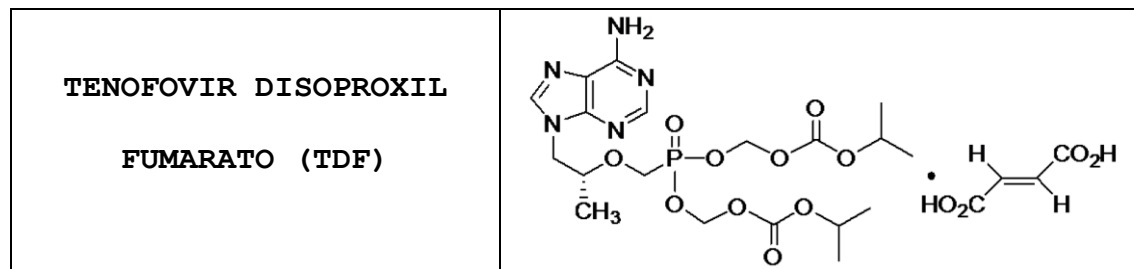
Ejemplo 11

Meta del estudio de combinación *in vitro*:

Determinar si dos combinaciones de fármacos de un inhibidor de molécula pequeña de encapsulación de VHB (Compuesto 3) y tenofovir (TDF), un inhibidor de análogo de nucleósido de polimerasa de VHB es aditivo, sinérgico o antagonista *in vitro* mediante el uso de un

sistema de modelo de cultivo celular de VHB.

5



Protocolo experimental de combinación *in vitro*:

Se llevaron a cabo estudios de combinación *in vitro* mediante el uso del método de Prichard y Shipman (Prichard MN y Shipman C Jr., *Antiviral Research*, 1990, 14(4-5), 181-205; y Prichard MN, et. ál., *MacSynergy II*). El sistema de cultivo celular HepDE19 es una línea celular derivada de HepG2 (hepatocarcinoma humano) que brinda soporte a la replicación de ADN de VHB y formación de ADNccc de una forma regulada mediante tetraciclina (Tet) y produce ADNcr de VHB y una molécula indicadora detectable que depende de la producción y mantenimiento del ADNccc (Guo et ál. 2007. *J. Virol* 81:12472-12484). Se colocaron células HepDE19 (50,000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos de microtítulo tratadas con cultivo de tejido y recubiertas con colágeno en medio DMEM/F12 suplementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina-estreptomicina al 1 % y 1 µg/ml de tetraciclina y se incubaron en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, las células se transfirieron a medio nuevo sin tetraciclina y se incubaron durante 4 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Las células se transfirieron luego a medio nuevo sin tetraciclina y se trataron con el inhibidor A y el inhibidor B, a un intervalo de concentración cerca de sus valores EC₅₀ respectivos, y se incubaron durante 7 horas en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 %. Los inhibidores tenofovir (TDF) y el Compuesto 3 se diluyeron en DMSO al 100 % y la concentración final de DMSO en el ensayo fue ≥0,5 %. Los dos inhibidores se evaluaron de forma individual y de forma combinada en forma de tablero de ajedrez, de forma tal que cada concentración

del inhibidor A se combinara con cada concentración del inhibidor B para determinar los efectos de su combinación sobre la inhibición de la producción de ADNcr. Luego de una incubación de 7 días de las células con las combinaciones compuestas, se midió el nivel de ADNcr presente en los pocillos tratados con inhibidor mediante el uso de un kit de ensayo de ADNb Quantigene 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) con un conjunto de sonda específico de VHB y las instrucciones del fabricante. Las placas se analizaron mediante el uso de un lector de placas de luminiscencia Victor (contador de múltiples marcas PerkinElmer modelo 1420) y los datos de unidades de luminiscencia relativa (RLU) generados a partir de cada pocillo se calcularon como % de inhibición de los pocillos de control sin tratar y se analizaron mediante el uso del programa MacSynergy II para determinar si las combinaciones eran sinérgicas, aditivas o antagónicas mediante el uso de las guías de interpretación establecidas por Prichard y Shipman de la siguiente forma: volúmenes de sinergia $<25 \mu\text{M}^2$ % (volumen log <2) a 95 % CI= probablemente insignificante; $25\text{--}50 \mu\text{M}^2$ % (volumen log >2 y <5) = menor pero significativo $50\text{--}100 \mu\text{M}^2$ % (volumen log >5 y <9) = moderado, puede ser importante *in vivo*; mayor que $100 \mu\text{M}^2$ % (volumen log >9) = sinergia potente, probablemente importante *in vivo*; volúmenes cercanos a $1000 \mu\text{M}^2$ % (volumen log >90) = inusualmente elevado, revisar datos. Los datos de RLU de las células tratadas con un solo compuesto se analizaron mediante el uso del módulo XL-Fit en Microsoft Excel para determinar los valores de EC_{50} a través de un algoritmo de ajuste de curva de 4 parámetros. Al mismo tiempo, se evaluó el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular mediante el uso de placas de replicación, colocadas a una densidad de 5000 células/pocillo e incubadas durante 4 días, para determinar el contenido de ATP como medición de la viabilidad celular mediante el uso del reactivo cell-titer glo (CTG; Promega Corporation, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante.

Combinación *in vitro* del Compuesto 3 y tenofovir (TDF):

El Compuesto 3 (intervalo de concentración de 3 μM a 0,037 μM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con tenofovir (intervalo de concentración de 1 μM a 0,004 μM en una dilución en serie de 2 veces y titulación en 9 puntos). La inhibición % promedio de ADNcr y desviaciones estándar de 4 replicados observadas con los tratamientos de Compuesto 3 o TDF solos o de forma combinada se muestra en la Tabla 11a. Los valores de EC_{50} del Compuesto 3 y TDF determinados en este experimento se muestran en la Tabla 11b. Cuando los valores observados de la combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva (Tabla 11b) para el intervalo de concentración que antecede en función de las contribuciones individuales de cada compuesto, se halló que las combinaciones eran aditivas (Tablas 11a y b) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de interpretación de Prichard y Shipman (1992) descritos anteriormente.

Tabla 11a. Actividad antiviral de la combinación del Compuesto 3 y TDF en el modelo de cultivo celular HepDE19 con cuantificación de ADNcr mediante el uso del ensayo de ADNb: Inhibición porcentual promedio en función del control negativo (n=4 muestras por punto de datos)

10

15

20

25

30

[FÁRMACO]											INHIBICIÓN ADITIVA	TDF
												MM
0	0,004	0,008	0,016	0,031	0,063	0,125	0,250	0,500	1,000			
COMPUESTO 3												
MM												
3	92,69	89,25	89,78	90,82	95,38	95,4	97,44	98,85	99,36	99,67		
1	83,1	75,15	76,38	78,78	89,31	89,36	94,09	97,33	98,51	99,24		
0,333	34,59	3,82	8,58	17,85	58,62	58,82	77,13	89,67	94,25	97,06		
0,111	-50,41	-121,16	-110,23	-88,9	4,85	5,32	47,4	76,24	86,78	93,25		
0,037	-63,72	-140,73	-128,83	-105,62	-3,57	-3,06	42,75	74,13	85,61	92,65		
0	0	-47,04	-39,77	-25,59	36,74	37,05	65,03	84,2	91,21	95,51		
[FÁRMACO]											GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	TDF
												MM
0	0,004	0,008	0,016	0,031	0,063	0,125	0,250	0,500	1,000			
COMPUESTO 3											BONFERRONI ADJ.	96 %
MM												
3	0	0	0,20747	0	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	12,07
1	0	0	5,08557	6,78128	0	0	0	0	0	0	VOLUMEN LOG	1,73
0,333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0,111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO	0
0,037	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	VOLUMEN LOG	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Tabla 11b: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* en el sistema de cultivo celular HepDE19 con cuantificación de ADNcr mediante el uso del ensayo ADNb:

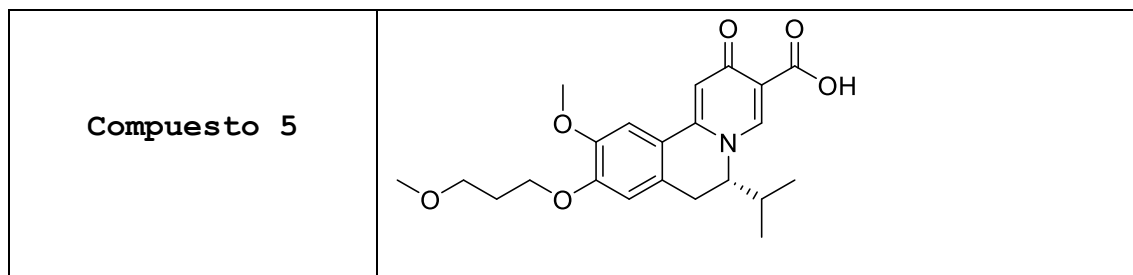
INHIB. A	INHIB. B	INHIBIDOR		VOLUMEN DE SINERGIA		VOLUMEN DE ANTAGONISMO		VOLUMEN DE LOG DE ANTAGONISMO		CONCLUSIÓN
		A EC ₅₀ (MM)	B EC ₅₀ (MM)	DE (μM ² %)*	LOG DE SINERGIA O	ANTAGONISM (μM ² %)*	ANTAGONISM O	ANTAGONISM O		
COMP. 3	TDF	0,454	0,088	12,07	1,73	0	0			ADITIVO

*CON UN INTERVALO DE CONFIANZA DE 99,9 %

Ejemplo 12

Meta del estudio de combinación *in vitro*:

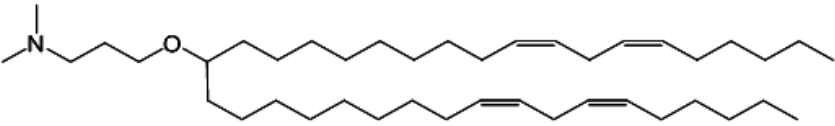
Determinar si dos compuestos en un tratamiento de combinación producirían un efecto sinérgico, antagonista o aditivo en un cultivo celular transfectado con el virus de la hepatitis B (VHB). El compuesto, Compuesto 5, es un inhibidor de molécula pequeña de la secreción del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y SIRNA-NP es un inhibidor de ARNi encapsulado por una nanopartícula lipídica (LNP), que se dirige a la expresión del antígeno viral y ARNm viral. Se utilizó un sistema de cultivo celular de VHB para determinar el efecto del tratamiento de combinación en este estudio *in vitro*.

Estructura química de molécula pequeña:**Formulación de LNP:**

SIRNA-NP es una formulación de nanopartícula lipídica de una mezcla de tres ARNip dirigidos al genoma del VHB. Se utilizó el siguiente producto de nanopartícula lipídica (LNP) para administrar los ARNip de VHB en los experimentos informados en la presente. Los valores que se muestran en la tabla son porcentajes molares. Diestearyl fosfatidilcolina se abrevia como DSPC.

PEG(2000)-C-DMA	Lípido catiónico	Colesterol	DSPC
1,6	54,6	32,8	10,9

El lípido catiónico tuvo la siguiente estructura:



ARNip

Se muestran a continuación las secuencias de los tres ARNip.

	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5' - 3')
	rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrAr UrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGr UrU
	rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGr UrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGr UrU
	rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCr UrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUr UrU
rN = ARN de base N		
mN = modificación de 2'O-metilo de la base N		

Protocolo experimental de combinación *in vitro*:

Se llevaron a cabo estudios de combinación *in vitro* mediante el uso del método de Prichard y Shipman (Prichard MN y Shipman C Jr., Antiviral Research, 1990, 14(4-5), 181-205; y Prichard MN, et. ál., MacSynergy II). El sistema de cultivo celular HepG2.2.15 es una línea celular derivada de células HepG2 de hepatoblastoma humano que se transfectaron de manera estable con el genoma de VHB de subtipo adw2-tal como se explicó anteriormente en Sells et ál. (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 1987. Vol 84:1005-1009). Las células HepG2.2.15 secretan partículas virales similares a Dane, producen ADN de VHB y también producen las proteínas virales, el antígeno e de la hepatitis

B (HBeAg) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).

Para evaluar las combinaciones deseadas, se colocaron HepG2.2.15 (30.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos de microtitulación
5 tratadas con cultivo de tejido en medio de RPMI + L-Glutamina suplementado con penicilina-estreptomicina al 1 %, 20 µg/mL de geneticina (G418), suero bovino fetal al 10 % y se incubaron en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, las células se repusieron con medio nuevo y luego se
10 agregó el Compuesto 5, se disolvió en DMSO al 100 %, a un intervalo de concentración de 0,1 µM a 0,000015 µM. Se disolvió SIRNA-NP en medio RPMI al 100 % y se agregó a células a un intervalo de concentración de 2,5 nM a 0,025 nM. Las placas de células de microtítulo se incubaron durante 6 días en una incubadora humedecida
15 a 37 °C y CO₂ al 5 %. Las diluciones en serie abarcaron intervalos de concentración respectivos al valor de EC₅₀ de cada compuesto, donde la concentración final de DMSO del ensayo es de 0,5 %. Además de la evaluación en combinación de los compuestos en forma de tablero de ajedrez, el Compuesto 5 y SIRNA-NP también se evaluaron por sí solos.

20

Se incluyeron muestras de control positivo no tratadas (DMSO al 0,5 % en medio) en cada placa, en múltiples pocillos. Luego de una incubación durante 6 días, se extrajo el medio de las células tratadas para su uso en un inmunoensayo de quimioluminiscencia de
25 HBsAg (CLIA) (Autobio Diagnostics, n.º cat. CL0310-2). Se generó una curva estándar de HBsAg para verificar que los niveles de cuantificación de HBsAg se encontraran dentro de los límites de detección del ensayo. El resto de las células tratadas con inhibidores se evaluaron para determinar la citotoxicidad mediante la
30 determinación de la adenosina trifosfato (ATP) intracelular mediante el uso de un reactivo Cell-Titer Glo (Promega) según las instrucciones del fabricante y mediante análisis microscópico de las

células a lo largo del tratamiento con el inhibidor. Se calculó la viabilidad celular como porcentaje de los pocillos de control positivo sin tratar.

5 Las placas se leyeron mediante el uso de una lectora de placas EnVision multimodo (PerkinElmer Modelo 2104). Los datos de unidades de luminiscencia relativa (RLU) generados de cada pozo se utilizaron para calcular los niveles de HBsAg como inhibición porcentual de los pocillos de control positivo sin tratar y se analizaron mediante el
10 uso del modelo de combinación Prichard-Shipman con el programa MacSynergyII (Prichard MN, Shipman C Jr. Antiviral Research, 1990. Vol 14(4-5):181-205; Prichard MN, Aseltine KR y Shipman, C. MacSynergy II. University of Michigan 1992) para determinar si las combinaciones eran sinérgicas, aditivas o antagónicas mediante el uso
15 de las guías de interpretación establecidas por Prichard y Shipman de la siguiente forma: volúmenes de sinergia <25 μM^2 % (volumen log <2) a 95 % CI= probablemente insignificante; 25-50 (volumen log >2 y <5) = menor pero significativo 50-100 (volumen log >5 y <9) = moderado, puede ser importante in vivo; mayor que 100 (volumen log >9) =
20 sinergia potente, probablemente importante in vivo; volúmenes cercanos a 1000 (volumen log >90) = inusualmente elevado, revisar datos. Los datos de RLU de las células tratadas con un solo compuesto se analizaron mediante el uso del módulo XL-Fit en Microsoft Excel para determinar los valores de EC_{50} a través de un algoritmo de ajuste
25 de curva de 4 parámetros.

El Compuesto 5 (intervalo de concentración de 0,1 μM a 0,000015 μM en una dilución semilogarítmica en serie de 3,16 veces y titulación en 8 puntos) se evaluó junto con SIRNA-NP (intervalo de concentración de
30 2,5 nM a 0,025 nM en una dilución semilogarítmica en serie de 3,16 veces y titulación en 6 puntos). Los resultados de combinación se completaron por triplicado y cada ensayo consistió en 4 repeticiones

Prueba 1

Inhibición porcentual promedio en función del control negativo (n=4 muestras por punto de datos)

SIRNA- NP, μM Inhibición % promedio	0,0025	86,52	85,69	87,32	88,31	89,63	90,42	90,86	89,67	91,42	86,52
	0,0007 9	77,54	77,93	78,77	80,65	85,38	87,61	88,97	89,29	90,33	77,54
	0,0002 5	58,33	51,65	58,01	66,99	71,54	78,68	82,99	85,31	85,23	58,33
	7,9E- 05	32,28	31,08	41,8	56,24	67,66	74,98	81,22	85,88	85	32,28
	2,5E- 05	23,11	23,81	29,3	46,54	60,92	70,18	78,45	80,94	82,53	23,11
	0	10,26	15,09	25,37	37,06	55,53	66,43	75,94	80,86	79,69	10,26
		0	1,00E- 06	3,16E- 06	1,0E- 05	3,17E- 05	0,0001	0,0003 16	0,001	0,0031 6	0,1
Compuest o	Compuesto 5, μ M										

Tabla 12b1. Cálculos de volumen de MacSynergy de la combinación del Compuesto 5 y SIRNA-NP: intervalo de confianza de 99,99 % (aj. Bonferroni 96 %)

5	SIRNA-NP, μM SINERGIA 0 Volumen log 0 Antagonismo -3,69 Volumen log -0,92	0,0025	0	0	0	0	0	0	-0,47	-0,92	0	0
		0,0007	0	0	0	0	0	0	-1,51	0	0	-0,79
		0,0002	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7,9E-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2,5E-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	1,00E-	3,16E-	1,0E-	3,17E-	0,000	0,00031	0,001	0,0031	0,1
15			0	06	06	05	05	1	6		6	
		Compuesto	Compuesto 5, μ M									

Tabla 12c1. Citotoxicidad de la combinación del Compuesto 5 y SIRNA-NP:

Porcentaje promedio de la viabilidad celular en función del control

10

15

20

25

30

SIRNA- NP, μ M	0,00 25	83, 86	85,52	86,3	87,95	89,84	92,8 2	94,58	96, 12	96,9 1	96, 72
	0,00 079	73, 95	76,62	77,88	80,56	83,6	88,4 2	91,26	93, 73	95,0 1	94, 71
	0,00 025	49, 38	54,57	57,02	62,22	68,14	77,4 9	83,01	87, 82	90,3 1	89, 72
	7,9E -05	23, 95	31,75	35,43	43,24	52,13	66,1 8	74,47	81, 7	85,4 4	84, 55
	2,5E -05	12, 12	21,14	25,38	34,42	44,69	60,9 2	70,5	78, 86	83,1 8	82, 15
	0	0	10,26	15,09	25,37	37,06	55,5 3	66,43	75, 94	80,8 6	79, 69
		0	1,00E -06	3,16E -06	1,0E- 05	3,17E -05	0,00 01	0,000 316	0,0 01	0,00 316	0,1
Compue sto	Compuesto 5, μ M										

Prueba 2

Tabla 12a2. Actividad antiviral de la combinación del Compuesto 5 y SIRNA-NP:

Inhibición porcentual promedio en función del control negativo (n=4 muestras por punto de datos)

5	SIRNA-NP, μM Inhibición % promedio	0,0025	77, 7	81,95	80,51	81,58	84,83	83,9 7	84,26	87, 08	86,0 3	84, 01
		0,00079	69, 06	70,21	58,33	75,38	79,52	83,6 6	85,31	87, 4	86,1 2	86, 83
		0,00025	43, 84	47,41	58,38	58,03	67,92	76,4	79,69	82, 57	84,3 9	86, 46
		7,9E-05	25, 14	44,78	40,61	46,87	58,4	70,5 7	73,31	84, 9	88,2 9	87, 05
		2,5E-05	14, 38	27,11	38,49	45,73	55,88	65,5	77,37	78, 71	83,6 2	86, 14
		0	0	6,2	22,15	31,5	43,61	50,1 9	69,21	79, 59	83,3 2	82, 36
			0	1,00E-06	3,16E-06	1,0E-05	3,17E-05	0,0001	0,000316	0,0001	0,000316	0,1
15	Compuesto	Compuesto 5, μM										

Tabla 12b2. Cálculos de volumen de MacSynergy de la combinación del Compuesto 5 y SIRNA-NP: intervalo de confianza de 99,9% (aj. Bonferroni 96 %)

20	SIRNA-NP, μM SINERGIA 0 Volumen log 0 Antagonismo -3,62 Volumen log -0,9	0,0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0,00079	0	0	0	0	0	0	0	0	-3,6	0
		0,00025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7,9E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2,5E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	1,00E-06	3,16E-06	1,0E-05	3,17E-05	0,0001	0,000316	0,0001	0,000316	0,1
25	Compuesto	Compuesto 5, μM										

Tabla 12c2. Citotoxicidad de la combinación del Compuesto 5 y SIRNA-NP:

Porcentaje promedio de la viabilidad celular en función del control

SIRNA-NP, μM Viabilidad celular % promedio	0,0025	88	90	74	76	82	77	74	75	90	108
	0,00079	77	72	67	68	65	67	68	65	71	110
	0,00025	79	75	66	73	71	67	64	63	74	114
	7,9E-05	88	75	73	76	55	68	68	64	79	116
	2,5E-05	90	84	68	74	69	71	66	66	80	110
	0	100	94	92	113	90	98	109	108	112	133
		0	1,00E-06	3,16E-06	1,0E-05	3,17E-05	0,0001	0,000316	0,001	0,00316	0,1
Compuesto	Compuesto 5, μM										

Tabla 12d2. Actividad antiviral de la combinación del Compuesto 5 y SIRNA-NP:

Inhibición porcentual aditiva en función del control negativo (n=4 muestras por punto de datos)

5	SIRNA -NP, μM Inhibición % aditi va	0,0025	77,7	79,08	82,64	84,72	87,43	88,89	93,13	95, 45	96,2 8	96, 07
		0,00079	69,06	70,98	75,91	78,81	82,55	84,59	90,47	93, 69	94,8 4	94, 54
		0,00025	43,84	47,32	56,28	61,53	68,33	72,03	82,71	88, 54	90,6 3	90, 09
		7,9E-05	9,82	15,41	29,79	38,23	49,15	55,08	72,23	81, 59	84,9 6	84, 09
		2,5E-05	23,02	27,79	40,07	47,27	56,59	61,66	76,3	84, 29	87,1 6	86, 42
		0	0	6,2	22,15	31,5	43,61	50,19	69,21	79, 59	83,3 2	82, 36
			0	1,00E-06	3,16E-06	1,0E-05	3,17E-05	0,0001	0,000316	0,001	0,00316	0,1
15	Compuesto	Compuesto 5, μM										

Prueba 3

Tabla 12a3. Actividad antiviral de la combinación del Compuesto 5 y SIRNA-NP:

Inhibición porcentual promedio en función del control negativo (n=4 muestras por punto de datos)

10

15

25

30

Tabla 12c3. Citotoxicidad de la combinación del Compuesto 5 y SIRNA-NP:

Porcentaje promedio de la viabilidad celular en función del control

SIRNA-NP, μM	0,0025	97	116	112	124	112	126	124	122	122	95
	0,00079	103	115	112	123	109	118	125	127	126	124
	0,00025	115	135	129	140	119	135	129	148	136	122
	7,9E-05	113	129	131	133	130	139	131	138	146	130
	2,5E-05	113	153	140	140	131	134	137	147	143	124
	0	100	131	127	140	131	128	131	141	127	99
	0	1,00E-06	3,16E-06	1,0E-05	3,17E-05	0,0001	0,000316	0,001	0,00316	0,01	0,1
Compuesto	Compuesto 5, μM										

Tabla 12d3. Actividad antiviral de la combinación del Compuesto 5 y SIRNA-NP:

Inhibición porcentual aditiva en función del control negativo (n=4 muestras por punto de datos)

SIRNA- NP, μM Inhibi- ción % aditiv a	0,00 25	89, 74	92,07	93,25	94,5	95,52	96,9 2	98,19	98, 87	99	98,59
	0,00 079	76, 48	81,81	84,52	87,38	89,73	92,9 4	95,86	97, 42	97,7 1	96,77
	0,00 025	52, 46	63,24	68,71	74,5	79,24	85,7 3	91,63	94, 78	95,3 7	93,47
	7,9E -05	33, 52	48,6	56,24	64,34	70,97	80,0 5	88,29	92, 69	93,5 2	90,87
	2,5E -05	19, 26	37,57	46,86	56,69	64,75	75,7 7	85,78	91, 13	92,1 4	88,91
	0	0	22,68	34,18	46,36	56,34	69,9 9	82,39	89, 01	90,2 6	86,26
		0	1,00E -06	3,16E -06	1,0E- 05	3,17E -05	0,00 01	0,000 316	0,0 01	0,00 316	0,1
Compue sto	Compuesto 5, μM										

Tabla 12e. Resumen de resultados de los estudios de combinación in vitro en el sistema de cultivo celular HepG2.2.15 con cuantificación de HBsAg mediante CLIA

Prueba 1	Compuesto 5	SIRNA-NP EC ₅₀ (nM)	Volumen de sinergia		Antagonismo (μM^2 %)	Volumen de antagonismo	Interpretación
			EC ₅₀ (μM)	sinergia (%)		log de antagonismo	
1	0,002	0,00026	0	0	-3,69	-0,92	Aditivo
2	0,005	0,00035	0	0	-3,62	-0,9	Aditivo
3	0,002	0,00020	0	0	0	0	Aditivo

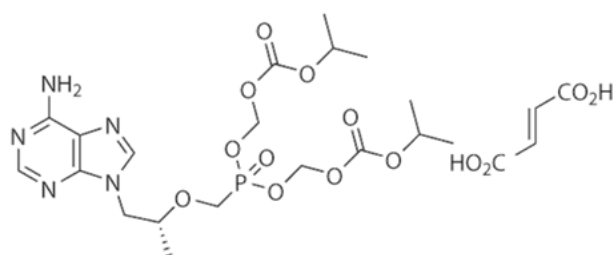
*con un intervalo de confianza de 99,9 %

Ejemplo 13

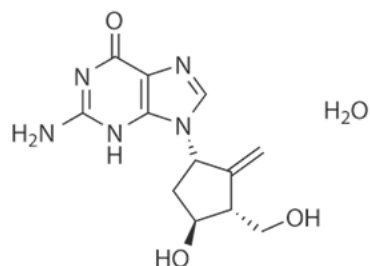
Meta del estudio de combinación *in vitro*

5 Una meta de esta estudio fue determinar si dos combinaciones de fármacos de tenofovir (en forma del profármaco tenofovir disoproxil fumarato, o TDF, un inhibidor análogo del nucleótido de la polimerasa del VHB) o entecavir (en forma de hidrato de entecavir, o ETV, un inhibidor de análogo de nucleósido de la polimerasa de VHB) y SIRNA-NP, un ARNip destinado a facilitar la inactivación potente de todas las transcripciones de ARNm viral y antígenos virales, es aditiva, sinérgica o antagonista *in vitro* mediante el uso de un sistema de modelo de cultivo celular de VHB.

15 Estructuras químicas de tenofovir y entecavir:



Tenofovir Disoproxil Fumarato (TDF)



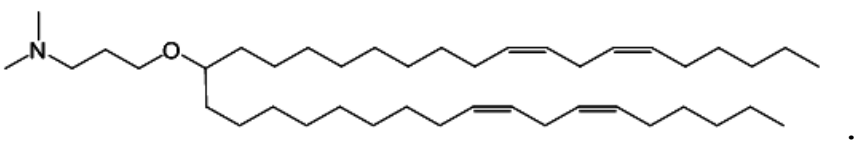
Hidrato de Entecavir (ETV)

Composición de SIRNA-NP:

25 SIRNA-NP es una formulación de nanopartícula lipídica de una mezcla de tres ARNip dirigidos al genoma del VHB. Se utilizó la siguiente formulación de nanopartícula lipídica (LNP) para administrar los ARNip de VHB. Los valores que se muestran en la tabla son porcentajes molares. La sigla DSPC significa diestearoilfosfatidilcolina, y el
30 PEG fue PEG 2000.

PEG(2000)-C-DMA	Lípido catiónico	Colesterol	DSPC
1,6	54,6	32,8	10,9

5 El lípido catiónico tuvo la siguiente estructura:



10

Se muestran a continuación las secuencias de los tres ARNip.

Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5' - 3')
rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUr U	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGr UrU
rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUr U	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGr UrU
rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUr U	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUr UrU
rN = ARN de base N	
mN = modificación de 2'O-metilo de la base N	

15

20

Protocolo experimental de combinación *in vitro*:

25 Se llevaron a cabo estudios de combinación *in vitro* mediante el uso del método de Prichard y Shipman (Prichard MN, Shipman C, Jr., *Antiviral Res*, 14, 181-205 (1990)). Se desarrolló la línea celular HepDE19 tal como se describe en Guo et ál. (Guo et ál., *J Virol*, 81, 12472-12484 (2007)). Es una línea celular de hepatoma humano

30 transfectada de forma estable con el genoma de VHB, y que puede expresar ARN pregenómico de VHB y brindar soporte a la síntesis de ADNcr de VHB (ADN circular relajado) de una forma regulada por

tetraciclina. Se colocaron células HepDE19 en placas de 96 pocillos de microtítulo tratadas con cultivo de tejido en medio DMEM/F12 suplementado con suero bovino fetal al 10 % + penicilina-estreptomicina al 1 % sin tetraciclina y se incubaron en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se cambiaron las células a medio nuevo y se trataron con el inhibidor A y el inhibidor B, a un intervalo de concentración cerca de sus valores EC₅₀ respectivos, y se incubaron durante 7 días en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 %. Los inhibidores se diluyeron en DMSO al 100 % (ETV y TDF) o medio de cultivo (SIRNA-NP) y la concentración final de DMSO en el ensayo fue ≥0,5 %. Los dos inhibidores se evaluaron de forma individual y de forma combinada en forma de tablero de ajedrez, de forma tal que cada concentración del inhibidor A se combinara con cada concentración del inhibidor B para determinar los efectos de su combinación sobre la inhibición de la producción de ADNcr. Luego de una incubación de 48 horas, se midió el nivel de ADNcr presente en los pocillos tratados con inhibidor mediante el uso de un ensayo de ADNb (Affymetrix) con un conjunto de sonda específico de VHB y las instrucciones del fabricante. Los datos de RLU generados a partir de cada pocillo se calcularon como % de inhibición de los pocillos de control sin tratar y se analizaron mediante el uso del programa MacSynergy II para determinar si las combinaciones eran sinérgicas, aditivas o antagónicas mediante el uso de las guías de interpretación establecidas por Prichard y Shipman de la siguiente forma: volúmenes de sinergia <25 μM^2 % (volumen log <2) a 95 % CI= probablemente insignificante; 25-50 μM^2 % (volumen log >2 y <5) = menor pero significativo 50-100 μM^2 % (volumen log >5 y <9) = moderado, puede ser importante *in vivo*; mayor que 100 μM^2 % (volumen log >9) = sinergia potente, probablemente importante *in vivo*; volúmenes cercanos a 1000 μM^2 % (volumen log >90) = inusualmente elevado, revisar datos. Al mismo tiempo, se evaluó el efecto de las combinaciones inhibidoras sobre la viabilidad celular mediante el uso

de placas de replicación que se utilizaron para determinar el contenido de ATP como medición de la viabilidad celular mediante el uso del reactivo Cell-TiterGlo (Promega) según las instrucciones del fabricante.

5

Resultados y conclusión:

Combinación *in vitro* de TDF y SIRNA-NP:

El TDF (intervalo de concentración de 1,0 μM a 0,004 μM en una dilución en serie de 2 veces y titulación en 10 puntos) se evaluó
10 junto con SIRNA-NP (intervalo de concentración de 25 ng/mL a 0,309 ng/mL en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). La inhibición % promedio de ADNcr y desviaciones estándar de 4 replicados observadas con los tratamientos de TDF o SIRNA-NP por sí solos o de forma combinada se muestra en la Tabla 13a. Se muestran en
15 la Tabla 13c los valores de EC_{50} de TDF y SIRNA-NP. Cuando los valores observados de la combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva (Tabla 13a) para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran
aditivas (Tabla 13c) según el análisis MacSynergy II y mediante el
20 uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (Prichard MN. 1992. MacSynergy II, University of Michigan).

Combinación *in vitro* de Entecavir y SIRNA-NP:

25 El Entecavir (intervalo de concentración de 4,0 nM a 0,004 μM en una dilución en serie de 2 veces y titulación en 10 puntos) se evaluó junto con SIRNA-NP (intervalo de concentración de 25 ng/mL a 0,309 $\mu\text{g/mL}$ en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). La inhibición % promedio de ADNcr y desviaciones estándar de 4
30 replicados observadas con los tratamientos de ETV o SIRNA-NP por sí solos o de forma combinada se muestra en la Tabla 13b. Se muestran en la Tabla 13c los valores de EC_{50} de ETV y SIRNA-NP. Cuando los dos

10

15

20

25

30

10

15

20

Tabla 13b: Combinación *in vitro* de Entecavir y SIRNA-NP

25

30

10

15

20

25

30

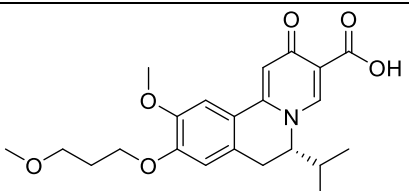
[FÁRMACO 1]	0	0,01562	0,0312	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	INHIBICIÓN ADITIVA ETV (nM)
	5	5	5								
SIRNA-NP ng/mL											
25	94,3	91,82	91,46	92,59	92,97	93,1	93,73	96,6	97,6	98,2	
1								8	3	9	
8,333	90,4	86,22	85,61	87,51	88,16	88,37	89,43	94,4	96,0	97,1	
1								1	1	2	
2,778	76,7	66,57	65,09	69,7	71,28	71,8	74,36	86,4	90,3	93,0	
4								4	1	2	
0,926	46,8	23,6	20,22	30,75	34,36	35,54	41,4	69,0	77,8	84,0	
4								1	6	5	
0,309	28,6	-2,5	-7,03	7,1	11,94	13,52	21,38	58,4	70,3	78,6	
8								3			
0	0	-43,72	-50,07	-	-	-	-	41,7	58,3	69,9	
				30,26	23,47	21,25	10,24	1	5	9	
[FÁRMACO 1]	0	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1	2	4	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %) Bonferroni Adj. 96 %
SIRNA-NP ng/mL											
25,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SINERGIA 0
8,333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	volumen log 0
2,778	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,926	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO 0
0,309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	volumen log 0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabla 13c: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* en el sistema de cultivo celular AML12-HBV10 con cuantificación de ADNcr mediante el uso del ensayo ADNb:

Inhibido	Inhibidor B	Inhibido	Inhibido	Volumen	Volumen	Volumen	Volumen	Conclusió
r A		r A EC ₅₀	r B EC ₅₀	de	log de	de	log de	n
		(ng/mL)		sinergi	sinergi	antagonis	antagonis	
				a (μM ²	a	mo (μM ²	mo	
				%) *		%) *		
Tenofovir								
SIRNA-NP		0,947	0,089	0	0	0	0	Aditivo
(TDF, μM)								
SIRNA-NP	Entecavir (ETV, nM)	0,906	1,780	5,37	0,77	0	0	Aditivo
*con un intervalo de confianza de 99,9 %								

Ejemplo 14

Se hace referencia al siguiente compuesto en los Ejemplos. El Compuesto **20** puede prepararse mediante el uso de procedimientos conocidos. Por ejemplo, el Compuesto **20** puede prepararse tal como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2015113990.

Nombre o número de compuesto	Estructura
20	

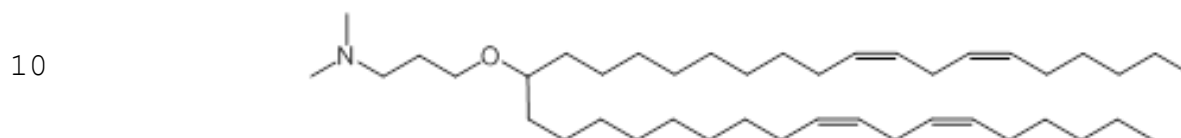
Se utilizó un modelo de ratón del virus de la hepatitis (VHB) para evaluar los efectos anti-VHB de un inhibidor de molécula pequeña de la producción de sAg y ARNip dirigidos al VHB (**SIRNA-NP**), como tratamientos independientes y combinados entre sí.

Se utilizó la siguiente formulación de nanopartícula lipídica (LNP)

para administrar los ARNip de VHB. Los valores que se muestran en la tabla son porcentajes molares. La sigla DSPC significa diestearoilfosfatidilcolina.

5	PEG(2000)-C-DMA	Lípido catiónico	Colesterol	DSPC
	1,6	54,6	32,8	9

El lípido catiónico tuvo la siguiente estructura:



Se administraron 1E11 de AAV1.2 (descritos en Huang, LR et ál. *Gastroenterology*, 2012, 142(7):1447-50) a ratones C57/Bl6 mediante inyección en la vena de la cola. Este vector viral contiene una copia de longitud excedente 1,2 veces del genoma de VHB y expresa el antígeno de superficie del VHB (HBsAg) entre otros productos de VHB. Se monitoreó la expresión en suero de HBsAg en ratones mediante el uso de un inmunoensayo de enzimas. Los animales se asignaron (aleatorizaron) en grupos en función de sus niveles de HBsAg en suero, de forma tal que a) se confirmara que todos los animales expresaran HBsAg y b) los promedios del grupo HBsAg fueron similares entre sí antes del inicio de los tratamientos.

Los animales se trataron con el Compuesto **20** de la siguiente manera: Al comenzar el Día 0, se administró por vía oral una dosificación de 3,0 mg/kg del Compuesto **20** a animales con una frecuencia de dos veces al día durante un total de 56 dosis entre los Días 0 y 28. El Compuesto **20** se disolvió en una formulación de cosolvente para su administración. A los animales de control negativo se les administró la formulación de cosolvente por sí sola o no se trataron con ningún artículo de prueba. Los animales se trataron con ARNip dirigidos a VHB encapsulados con la nanopartícula lipídica (LNP) de la siguiente

manera: Al Día 0, se administró por vía intravenosa una cantidad del artículo de prueba equivalente a 0,3 mg/kg de ARNip. Los niveles de expresión de HBsAg para cada tratamiento se compararon con los valores del Día 0 (antes de la dosis) para dicho grupo.

5

El efecto de estos tratamientos se determinó al recopilar sangre los Días 0 (antes del tratamiento), 7, 14 y 28 y analizarla para determinar el contenido de HBsAg en suero. La Tabla 14 muestra la concentración promedio de HBsAg en suero del grupo de tratamiento (n=5 (n=4 para el tratamiento de combinación de VHBip y vehículo); $\pm$ error estándar del promedio) como un porcentaje del valor de referencia antes del tratamiento del animal individual al Día 0.

Los datos demuestran el grado de la reducción de HBsAg en suero como respuesta a la combinación del Compuesto **20** y ARNip del VHB, tanto por sí solos como en conjunto. En cada punto temporal evaluado, la combinación de los tratamientos del Compuesto **20** y ARNip de VHB proporcionó una reducción de HBsAg en suero que fue buena o mejor que cualquiera de los tratamientos de monoterapia individuales.

20

Tabla 14. Efecto del tratamiento sencillo y de combinación del Compuesto 20 y tres ARNip de VHB sobre sAg de VHB en suero en un modelo de ratón de la infección por VHB

25

30

Tratamiento 1 (Oral)	Tratamiento 2 (IV)	D0	D7	D14	D21	D28
Ninguno	Ninguno	100 ± 0	80 ± 12	100 ± 18	72 ± 15	72 ± 16
Vehículo	Ninguno	100 ± 0	37 ± 8	62 ± 9	112 ± 66	127 ± 67
Compuesto 20	Ninguno	100 ± 0	7 ± 1	8 ± 2	7 ± 2	8 ± 2
Vehículo	ARNip de VHB	100 ± 0	1 ± 0	3 ± 2	19 ± 9	45 ± 25
Compuesto 20	ARNip de VHB	100 ± 0	1 ± 0	2 ± 1	5 ± 2	8 ± 2

Ejemplos 15-24

Materiales y métodos para los estudios en hepatocitos humanos primarios

Animales

Se adquirieron ratones FRG de Yecuris (Tualatin, OR, EUA). Se muestra información detallada de los ratones en la tabla que figura a continuación. El estudio fue aprobado por el WuXi IACUC (Comité institucional de cuidado y uso de animales, protocolo de IACUC R20160314-Mouse). Se dejó que los ratones se aclimataran al nuevo entorno durante 7 días. Se monitoreó a los ratones diariamente para detectar la salud general y cualquier indicio de anomalía fisiológica y del comportamiento.

Datos técnicos de los ratones FRG

ID de Jaula	ID de ratón	ID del donante	Fecha de nacimiento	Fecha de trasplante	Albúmina (µg/ml) antes del envío	Sexo	Peso corporal (g) antes del envío
1	37094	HHM30017	12/15/2015	01/28/2016	4887	Macho	24,9
2	37211	HHM27018	01/03/2016	02/24/2016	4284	Macho	23,5
3	37258	HHM27018	01/06/2016	02/24/2016	4282	Macho	29,4
4	37611	HHM30017	02/22/2016	04/06/2016	6627	Macho	25,3
5	37955	HHM27018	03/31/2016	05/19/2016	5990	Macho	25,5
6	37900	HHM27018	03/23/2016	05/04/2016	4802	Macho	27,1
7	37976	HHM27018	03/20/2016	05/04/2016	4520	Macho	24,7

Artículos de prueba

Los compuestos **3, 22, 23, 24 y 25** fueron suministrados por Arbutus Biopharma. El Peg-interferón alfa-2a (Roche, 180 µg/0,5ml) fue suministrado por WuXi. TAF, Entecavir, Tenofovir, Lamivudina y TDF fueron suministrados en solución de DMSO por WuXi. Se muestra información de los compuestos en la tabla que figura a continuación.

Información de los artículos de prueba

Nombre del compuesto	ID del vial	M.Wt.	Tamaño	Proveedor
25	031NH	401,19	3,1 mg	Arbutus
3	031NR	386,4	3,8 mg	Arbutus
22	031NP	398,4	2,9 mg	Arbutus
23	031NT	379,3	2,9 mg	Arbutus
24	031NV	396,8	2,6 mg	Arbutus
Nombre del compuesto	Proveedor	N.º de catálogo	Conc. madre	
Peginterferón alfa-2a	Roche		180 µg/0,5ml (5040000 IU/ml)	Proporcionado por WuXi
TAF	SelleckChem		10 mM	Proporcionado por WuXi
TDF	Shanghai Sphchem Co., Ltd.		20 mM	Proporcionado por WuXi

Virus

Se concentró VHB tipo D a partir de sobrenadantes de cultivo HepG2.2.15. Se muestra la información de los virus en la tabla que figura a continuación.

Información del VHB

ID del virus	N.º de lote	Título de VHB en suero (GE*/ml)	Genotipo	Fuente
HBV_2.2.15	HBV20160407	2,00E+09 GE/ml	D (ID de Genebank: U95551)	Sobrenadantes HepG2.2.15
HBV_2.2.15	B161011	1,9E+09 GE/ml	D (ID de Genebank: U95551)	Sobrenadantes HepG2.2.15
HBV_2.2.15	B161129	1,5E+09 GE/ml	D (ID de Genebank: U95551)	Sobrenadantes HepG2.2.15

*GE, equivalente al genoma de VHB.

Reactivos

Los reactivos principales utilizados en el estudio fueron QIAamp 96 ADN Blood Kit (QIAGEN # 51161), FastStart Universal Probe Master (Roche # 04914058001), Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Biolite # 35004),

kit de ELISA de HBeAg (Antu # CL 0312) y kit de ELISA de HBsAg (Antu # CL 0310).

Instrumentos

5

Los instrumentos principales utilizados en el estudio fueron BioTek Synergy 2, SpectraMax (Molecular Devices), 7900HT Fast Real-Time PCR System (ABI) y Quantistudio 6 Real-Time PCR System (ABI).

10 **Cultivo de hepatocitos humanos primarios (PHH)**

Se aplicó la perfusión renal de los ratones a PHH aislados. Los hepatocitos aislados se purificaron adicionalmente mediante Percoll. Las células se volvieron a suspender con medio de cultivo y se
15 colocaron en las placas de 96 pocillos (6×10^4 células/pocillo) o placas de 48 pocillos ($1,2 \times 10^5$ células/pocillo). Los PHH se infectaron con un VHB tipo D un día después de la colocación (día 1).

Cultivo y tratamiento de los PHH.

20

Al día 2, los compuestos de prueba se diluyeron y se agregaron a las placas de cultivo celular. El medio de cultivo que contenía los compuestos se cambió día de por medio. Se recolectaron los sobrenadantes del cultivo celular al día 8 para las determinaciones
25 de antígeno y ADN de VHB.

Determinación de los valores de EC_{50} .

Los compuestos se evaluaron a 7 concentraciones, con dilución de 3
30 veces y por triplicado.

Estudio de combinación doble.

Se evaluaron dos compuestos en una matriz de 5×5, en placas por triplicado.

5 Ensayo de citotoxicidad mediante Cell Counting Kit-8 al día 8

Se extrajo el medio de cultivo de la placa de cultivo celular y luego se agregó la solución de trabajo CCK8 (Biolite # 35004) a las células. La placa se incubó a 37 °C y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450nm, y la absorbancia de referencia se midió a una longitud de onda de 650nm mediante SpectraMax.

Cuantificación del ADN de VHB en los sobrenadantes del cultivo mediante qPCR

El ADN de los sobrenadantes de cultivo cosechados al día 8 se aisló mediante QIAamp 96 ADN Blood Kit (Qiagen-51161). Para cada muestra se utilizaron 100 µl de los sobrenadantes de cultivo para extraer ADN. El ADN se eluyó con 100µl, 150µl o 180 µl de AE. Se cuantificó el ADN de VHB de los sobrenadantes de cultivo mediante qPCR. Se analizó el efecto de combinación mediante el software MacSynergy. Se describen a continuación los cebadores.

Información del cebador

Cebador R	GACAAACGGGCAACATACCTT
Cebador F	GTGTCTGCGGCGTTTATCA
Sonda	5' FAM CCTCTKCATCCTGCTGCTATGCCTCATC 3' TAMRA

Medición de HBsAg y HBeAg en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA

Los HBsAg/HBeAg de los sobrenadantes de cultivo cosechados al día 8 se midieron mediante el kit de ELISA de HBsAg/HBeAg (Autobio) de acuerdo con el manual. Las muestras se diluyeron con PBS para obtener la señal en el intervalo de la curva estándar. Se calcularon las tasas de inhibición con la fórmula que figura a continuación. Se analizó el efecto de combinación mediante el software MacSynergy.

% de inhibición HBsAg = $\left[1 - \frac{\text{cantidad de HBsAg de la muestra}}{\text{cantidad de VHB de control de DMSO}} \right] \times 100$.

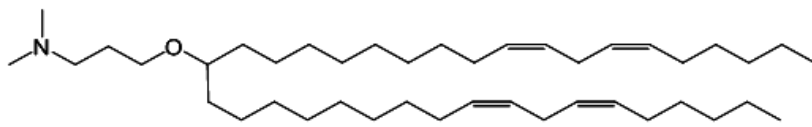
% de inhibición HBeAg = $\left[1 - \frac{\text{cantidad de HBeAg de la muestra}}{\text{cantidad de VHB de control de DMSO}} \right] \times 100$.

SIRNA-NP

SIRNA-NP es una formulación de nanopartícula lipídica de una mezcla de tres ARNip dirigidos al genoma del VHB. Se utilizó la siguiente formulación de nanopartícula lipídica (LNP) para administrar los ARNip de VHB. Los valores que se muestran en la tabla son porcentajes molares. La sigla DSPC significa diestearoilfosfatidilcolina.

PEG-C-DMA	Lípido catiónico	Colesterol	DSPC
1,6	54,6	32,8	10,9

El lípido catiónico tuvo la siguiente estructura:



Se muestran a continuación las secuencias de los tres ARNip.

5

Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5' - 3')
rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGrUrU
rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUrUrU
rN = ARN de base N	
mN = modificación de 2'O-metilo de la base N	

Composición de Interferón Alfa 2a pegilado (IFNα2a):

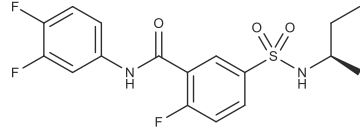
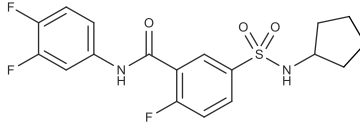
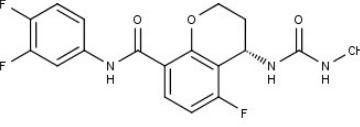
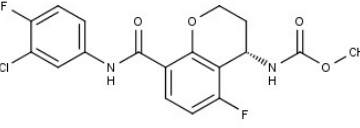
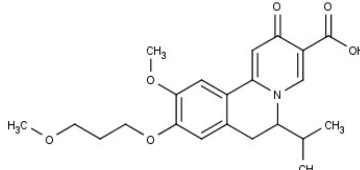
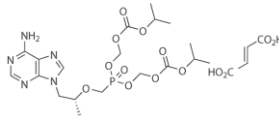
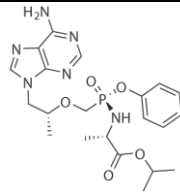
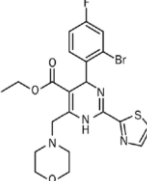
10 Este agente se adquirió de una fuente comercial:

15

ID de muestra	Proveed r	Tamaño	N.º de lote	Conc. madre
Peginterferón alfa-2a	Roche	180 ug/0,5 ml	B1370	5040000 IU/mL

También se utilizaron los siguientes compuestos.

20

Número de ID o nombre del compuesto	Estructura
3	
22	
23	
24	
25	
Tenofovir disoproxil fumarato (TDF)	
Tenofovir Alafenamida (TAF)	
GLS4 (HAP)	

*Ejemplo 15***Combinación *in vitro* del Compuesto 24 y TDF****5 Meta del estudio**

Determinar si una combinación de dos fármacos del compuesto **24** (un inhibidor de molécula pequeña de encapsulación de VHB que pertenece a la clase química de amino cromano) y tenofovir (en la forma del profármaco tenofovir disoproxil fumarato, o TDF, análogo de nucleótido inhibidor de la polimerasa de VHB) es aditiva, sinérgica o antagonista *in vitro* mediante el uso de hepatocitos primarios humanos infectados con VHB en un sistema de modelo de cultivo celular.

15 Resultados y conclusión

El TDF (intervalo de concentración de 10,0 nM a 0,12 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con **24** (intervalo de concentración de 1000 nM a 12,36 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). Se muestra la inhibición % promedio en ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, y la desviación estándar de 3 replicados observadas con los tratamientos de **24** o TDF por sí solos o de forma combinada en las Tablas 15a, 15b y 15c tal como se indica más adelante. Se determinaron los valores EC₅₀ de TDF y **24** en un experimento anterior y se muestran en la Tabla 15d; se observó un grado de varianza de lotes distintos de células de PHH.

Cuando los valores observados de una combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran sinérgicas o aditivas, sin antagonismo (Tabla 15d) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de

interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992). No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo CCK8.

Tabla 15a: Efecto sobre el ADN de VHB en la Combinación *in vitro* del Compuesto 24 y TDF

5	[FÁRMACO]	0,00	12,35	37,04	111,11	333,33	1000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO	
	TDF (nM)							COMPUESTO 24 (nM)	
	10,00	-15,4	16,23	29,76	33,41	71,99	82,62		
	3,33	3,15	24,17	30,1	39,55	71,87	87,48		
	1,11	2,49	24,8	24,74	33,45	73,25	86,58		
	0,37	-6,24	17,61	35,35	37,05	68,52	87,29		
	0,12	-1,16	25,72	25,72	33,54	75,06	86,83		
	0,00	0	-37,82	-31,86	-4,54	59,29	81,07		
10	[FÁRMACO]	0,00	12,35	37,04	111,11	333,33	1000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)	
	TDF (nM)							COMPUESTO 24 (nM)	
	10,00	20,95	6,25	5,54	19,51	4,45	1,41		
	3,33	2,99	2,31	4,58	5,73	2,67	0,32		
	1,11	16,52	2,03	9,07	11,11	3,67	1,02		
	0,37	19,46	1,06	13,17	2,12	3,62	0,7		
	0,12	21,38	7,78	1,65	6,37	1,38	1,46		
	0,00	15,8	17,16	15,42	5,85	4,36	3,8		
15	[FÁRMACO]	0,00	12,35	37,04	111,11	333,33	1000,00	INHIBICIÓN ADITIVA	
	TDF (nM)							Compuesto 24 (nM)	
	10,00	-15,4	-59,04	-52,17	-20,64	53,02	78,15		
	3,33	3,15	-33,48	-27,71	-1,25	60,57	81,67		
	1,11	2,49	-34,39	-28,58	-1,94	60,3	81,54		
	0,37	-6,24	-46,42	-40,09	-11,06	56,75	79,89		
	0,12	-1,16	-39,42	-33,39	-5,75	58,82	80,85		
	0,00	0	-37,82	-31,86	-4,54	59,29	81,07		
20	[FÁRMACO]	0	12,346	37,037	111,11	333,33	1000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
	TDF (nM)							Bonferroni Adj. 98%	
	10,00	0	54,7013	63,6979	0	4,32505	0	SINERGIA	586,54
	3,33	0	50,0478	42,7372	21,9426	2,51303	4,75688	volumen log	133,52
	1,11	0	52,5093	23,4706	0	0,87203	1,68318		
	0,37	0	60,5415	32,0975	41,1331	0	5,0963	ANTAGONISMO	0
	0,12	0	39,536	53,6799	18,3263	11,6984	1,17514	volumen log	0
	0,00	0	0	0	0	0	0		

10

15

20

Tabla 15c: Efecto sobre el HBeAg en la Combinación *in vitro* del Compuesto 24 y TDF

5	[FÁRMACO]	0,00	12,35	37,04	111,11	333,33	1000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO	
	TDF (nM)							COMPUESTO 24 (nM)	
	10,00	6,07	-1,44	0,13	0,82	-2,83	22,98		
	3,33	11,61	19,99	11,19	11,4	7,62	30,62		
	1,11	12,04	7,84	11,45	7,21	14,03	29,45		
	0,37	6,23	1,33	7,42	10,84	16,24	27,43		
	0,12	7,02	7,72	1,74	10,06	7,19	22,39		
	0,00	0	-2,71	-12,8	-12,74	-14,74	13,04		
10	[FÁRMACO]	0,00	12,35	37,04	111,11	333,33	1000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)	
	TDF (nM)							COMPUESTO 24 (nM)	
	10,00	9,14	8,12	21,17	12,08	22,45	15,84		
	3,33	23,08	21,21	19,61	18,06	17,88	17,08		
	1,11	15,35	5,04	7,68	10,99	16,1	14,46		
	0,37	14,75	11,05	13,95	12,33	18,21	15,12		
	0,12	19,96	7,42	4,94	17,01	19,91	14,21		
	0,00	19,34	6,37	3,32	18,69	25,64	18,52		
15	[FÁRMACO]	0,00	12,35	37,04	111,11	333,33	1000,00	INHIBICIÓN ADITIVA	
	TDF (nM)							COMPUESTO 24 (nM)	
	10,00	6,07	3,52	-5,95	-5,9	-7,78	18,32		
	3,33	11,61	9,21	0,3	0,35	-1,42	23,14		
	1,11	12,04	9,66	0,78	0,83	-0,93	23,51		
	0,37	6,23	3,69	-5,77	-5,72	-7,59	18,46		
	0,12	7,02	4,5	-4,88	-4,83	-6,69	19,14		
	0,00	0	-2,71	-12,8	-12,74	-14,74	13,04		
20	[FÁRMACO]	0	12,346	37,037	111,11	333,33	1000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
	TDF (nM)							Bonferroni Adj.	98%
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	0
	3,33	0	0	0	0	0	0	volumen log	0
	1,11	0	0	0	0	0	0		
	0,37	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO	0
	0,12	0	0	0	0	0	0	volumen log	0
	0,00	0	0	0	0	0	0		

Tabla 15d: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* del Compuesto 24 y TDF en el sistema de cultivo celular de PHH:

Criterio									
de	Inhibid	Inhibid	Inhibid	Inhibid	Volume	Volume	Volumen	Volumen	Conclusi
valoraci	Inhibid	Inhibid	or A	or B	n de	n log	de	log de	ón
ón del	or A	or	EC ₅₀	EC ₅₀	sinerg	de	antagonis	antagonis	ón
ensayo		B	(nM) #	(nM) #	ia (μM ²	sinerg	mo (μM ²	mo	
de VHB					%) *	ia	%) *		
ADN de	TDF	24	5,16	181,6	586,54	133,52	0	0	Sinergia
HBV									
HBsAg	TDF	24	>100	~1104	166,48	37,9	0	0	Sinergia
HBeAg	TDF	24	>100	1087	0	0	0	0	Aditivo

*con un intervalo de confianza de 99,9 %

#determinado en un experimento separado anterior

Ejemplo 16

Combinación *in vitro* del Compuesto 23 y TDF

Meta del estudio

Determinar si una combinación de dos fármacos del compuesto **23** (un inhibidor de molécula pequeña de encapsulación de VHB que pertenece a la clase química de amino cromano) y tenofovir (en la forma del profármaco tenofovir disoproxil fumarato, o TDF, análogo de nucleótido inhibidor de la polimerasa de VHB) es aditiva, sinérgica o antagonista *in vitro* mediante el uso de hepatocitos primarios humanos infectados con VHB en un sistema de modelo de cultivo celular.

Resultados y conclusión

El TDF (intervalo de concentración de 10,0 nM a 0,12 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con el compuesto **23** (intervalo de concentración de 2000 nM a

24,69 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). Se muestra la inhibición % promedio en ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, y la desviación estándar de 3 replicados observadas con los tratamientos del compuesto **23** o TDF por sí solos o de forma combinada en las Tablas 16a, 16b y 16c tal como se indica más adelante. Se determinaron los valores EC₅₀ de TDF y compuesto **23** en un experimento anterior y se muestran en la Tabla 16d; se observó un grado de varianza de lotes distintos de células de PHH.

10 Cuando los valores observados de una combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran sinérgicas o aditivas, sin antagonismo (Tabla 16d) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de
15 interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992). No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo CCK8.

Tabla 16a: Efecto sobre el ADN de VHB en la Combinación *in vitro* del Compuesto 23 y TDF

5	[FÁRMACO]	0,00	24,69	74,07	222,22	666,67	2000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO	
	TDF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)	
	10,00	22,03	15,63	21,53	50,31	68,1	83,45		
	3,33	24,89	11,9	25,62	42,03	71,16	83,1		
	1,11	24,36	27,41	25,29	49,82	71,34	85,27		
	0,37	-4,64	15,87	10,9	25,68	66,73	79,5		
	0,12	-19,34	14,57	16,57	17,02	55,55	74,8		
	0,00	0	-15,33	-36,58	0,78	30,45	69,97		
10	[FÁRMACO]	0,00	24,69	74,07	222,22	666,67	2000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)	
	TDF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)	
	10,00	19,88	12,93	22,36	13,69	10,17	4,55		
	3,33	25,42	13,82	12,76	20,92	9,9	3,38		
	1,11	26,88	5,72	8,4	18,61	10,85	1		
	0,37	22,45	24,04	16,71	27,51	6,72	2,89		
	0,12	30,56	14,7	14,28	32,63	13,67	7,16		
	0,00	28,21	25,59	43,45	19,95	15,55	7,23		
15	[FÁRMACO]	0,00	24,69	74,07	222,22	666,67	2000,00	INHIBICIÓN ADITIVA	
	TDF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)	
	10,00	22,03	10,08	-6,49	22,64	45,77	76,59		
	3,33	24,89	13,38	-2,59	25,48	47,76	77,44		
	1,11	24,36	12,76	-3,31	24,95	47,39	77,29		
	0,37	-4,64	-20,68	-42,92	-3,82	27,22	68,58		
	0,12	-19,34	-37,63	-62,99	-18,41	17	64,16		
	0,00	0	-15,33	-36,58	0,78	30,45	69,97		
20	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
	TDF (nM)							Bonferroni Adj.	98%
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	60,83
	3,33	0	0	0	0	0	0	volumen log	13,85
	1,11	0	0	0,9556	0	0	4,689	ANTAGONISMO	0
	0,37	0	0	0	0	17,3945	1,40901	volumen log	0
	0,12	0	3,8223	32,5645	0	0	0		
	0,00	0	0	0	0	0	0		
25	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
	TDF (nM)							Bonferroni Adj.	98%
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	60,83
	3,33	0	0	0	0	0	0	volumen log	13,85
	1,11	0	0	0,9556	0	0	4,689	ANTAGONISMO	0
	0,37	0	0	0	0	17,3945	1,40901	volumen log	0
	0,12	0	3,8223	32,5645	0	0	0		
	0,00	0	0	0	0	0	0		
30	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
	TDF (nM)							Bonferroni Adj.	98%
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	60,83
	3,33	0	0	0	0	0	0	volumen log	13,85
	1,11	0	0	0,9556	0	0	4,689	ANTAGONISMO	0
	0,37	0	0	0	0	17,3945	1,40901	volumen log	0
	0,12	0	3,8223	32,5645	0	0	0		
	0,00	0	0	0	0	0	0		

Tabla 16b: Efecto sobre el HBsAg en la Combinación *in vitro* del Compuesto 23 y TDF

5	[FÁRMACO]	0,00	24,69	74,07	222,22	666,67	2000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO	
	TDF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)	
	10,00	-5,9	-11,76	-17,98	-10,56	-12,07	-5,13		
	3,33	-0,9	-8,32	2,74	5,75	3,08	8,14		
	1,11	0,79	6,63	9,86	9,96	9,87	13,55		
	0,37	-0,3	10,94	6,53	9,48	6,86	12,89		
	0,12	3,39	8,13	3,59	3,99	1,92	13,78		
	0,00	0	-13,89	-10,9	-11,64	-4,45	0,48		
10	[FÁRMACO]	0,00	24,69	74,07	222,22	666,67	2000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)	
	TDF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)	
	10,00	11,44	13,32	9,26	9,99	12,92	6,2		
	3,33	16,11	12,81	5,08	1,71	3,38	5,79		
	1,11	19,99	5,11	10,31	10,32	3,11	4,85		
	0,37	21,73	2,38	8,21	5,77	9,18	7,38		
	0,12	9,05	3,32	4,82	11,75	7,08	9,54		
	0,00	14,56	6,27	5,47	14,27	11,74	9,35		
15	[FÁRMACO]	0,00	24,69	74,07	222,22	666,67	2000,00	INHIBICIÓN ADITIVA	
	TDF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)	
	10,00	-5,9	-20,61	-17,44	-18,23	-10,61	-5,39		
	3,33	-0,9	-14,92	-11,9	-12,64	-5,39	-0,42		
	1,11	0,79	-12,99	-10,02	-10,76	-3,62	1,27		
	0,37	-0,3	-14,23	-11,23	-11,97	-4,76	0,18		
	0,12	3,39	-10,03	-7,14	-7,86	-0,91	3,85		
	0,00	0	-13,89	-10,9	-11,64	-4,45	0,48		
20	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
	TDF (nM)							Bonferroni Adj.	98%
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	45,85
	3,33	0	0	0	12,7624	0	0	volumen log	10,44
	1,11	0	2,80299	0	0	3,25499	0	ANTAGONISMO	0
	0,37	0	17,3374	0	2,46093	0	0	volumen log	0
	0,12	0	7,23388	0	0	0	0		
	0,00	0	0	0	0	0	0		
25	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
	TDF (nM)							Bonferroni Adj.	98%
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	45,85
	3,33	0	0	0	12,7624	0	0	volumen log	10,44
	1,11	0	2,80299	0	0	3,25499	0	ANTAGONISMO	0
	0,37	0	17,3374	0	2,46093	0	0	volumen log	0
	0,12	0	7,23388	0	0	0	0		
	0,00	0	0	0	0	0	0		
30	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
	TDF (nM)							Bonferroni Adj.	98%
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	45,85
	3,33	0	0	0	12,7624	0	0	volumen log	10,44
	1,11	0	2,80299	0	0	3,25499	0	ANTAGONISMO	0
	0,37	0	17,3374	0	2,46093	0	0	volumen log	0
	0,12	0	7,23388	0	0	0	0		
	0,00	0	0	0	0	0	0		

Tabla 16c: Efecto sobre el HBeAg en la Combinación *in vitro* del Compuesto 23 y TDF

5	[FÁRMACO]	0,00	24,69	74,07	222,22	666,67	2000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO	
	TDF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)	
	10,00	0,72	-10,51	-5,28	-10,54	-11,8	-5,49		
	3,33	9,05	-5,09	3,12	2,98	4,06	4,28		
	1,11	12,78	7,59	9,52	0,77	7	7,24		
	0,37	6,74	4,37	2,31	6,35	6,4	10,51		
	0,12	4,4	8,09	5,22	-0,68	6,5	7,62		
10	0,00	0	-8,82	-6,36	-12,71	-7,94	-1,09		
									-
	[FÁRMACO]	0,00	24,69	74,07	222,22	666,67	2000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)	
	TDF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)	
	10,00	10,78	17,81	6,61	8,4	11,1	15,98		
	3,33	9,99	19,89	13,21	11,51	7,78	17,13		
	1,11	8,33	4,36	8,23	7,06	4,64	6,33		
15	0,37	12,35	9,41	8,19	15,07	13,35	17,74		
	0,12	5,94	2,55	2,72	11,85	7,25	9,82		
	0,00	16,27	1,94	6,49	8,83	9,47	7,31		
									-
	[FÁRMACO]	0,00	24,69	74,07	222,22	666,67	2000,00	INHIBICIÓN ADITIVA	
	TDF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)	
	10,00	0,72	-8,04	-5,59	-11,9	-7,16	-0,36		
20	3,33	9,05	1,03	3,27	-2,51	1,83	8,06		
	1,11	12,78	5,09	7,23	1,69	5,85	11,83		
	0,37	6,74	-1,49	0,81	-5,11	-0,66	5,72		
	0,12	4,4	-4,03	-1,68	-7,75	-3,19	3,36		
	0,00	0	-8,82	-6,36	-12,71	-7,94	-1,09		
									-
	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
25	TDF (nM)							Bonferroni Adj.	
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	
	3,33	0	0	0	0	0	0	volumen log	
	1,11	0	0	0	0	0	0		
	0,37	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO	
	0,12	0	3,72795	0	0	0	0	volumen log	
	0,00	0	0	0	0	0	0		

Tabla 16d: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* del Compuesto 23 y TDF en el sistema de cultivo celular de PHH:

Criterio	de	Inhibidor	Inhibid	Inhibid	Volume	Volume	Volumen	Volumen	
valoraci	Inhibid		or A	or B	n de	n log	de	Volumen	Conclusi
ón del	or A	B	EC ₅₀	EC ₅₀	sinerg	de	antagonis	log de	ón
ensayo			(nM) #	(nM) #	ia (μM ²	sinerg	mo (μM ²	antagonis	
de VHB					%) *	ia	%) *	mo	
ADN de	TDF	COMPUESTO	5,62	229,6	60,83	13,85	0	0	Sinergia
HBV		23							
HBsAg	TDF	COMPUESTO	>100	4,36	45,85	10,44	0	0	Sinergia
		23							
HBeAg	TDF	COMPUESTO	>100	4,53	3,73	0,85	0	0	Aditivo
		23							
*con un intervalo de confianza de 99,9 %									
#determinado en un experimento separado anterior									

Ejemplo 17

Combinación *in vitro* del Compuesto 23 y TAF

Meta del estudio de combinación *in vitro*

Determinar si una combinación de dos fármacos del compuesto **23** (un inhibidor de molécula pequeña de encapsulación de VHB que pertenece a la clase química de amino cromano) y tenofovir (en la forma del profármaco tenofovir alafenamida, o TAF, análogo de nucleótido inhibidor de la polimerasa de VHB) es aditiva, sinérgica o antagonista *in vitro* mediante el uso de hepatocitos primarios humanos infectados con VHB en un sistema de modelo de cultivo celular.

Resultados y conclusión

El TAF (intervalo de concentración de 10,0 nM a 0,12 nM en una

dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con el compuesto **23** (intervalo de concentración de 2000 nM a 24,69 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). Se muestra la inhibición % promedio en ADN de VHB y HBsAg, y la desviación estándar de 3 replicados observadas con los tratamientos del compuesto **23** o TAF por sí solos o de forma combinada en las Tablas 17a y 17b tal como se indica más adelante. Se determinaron los valores EC₅₀ de TAF y compuesto **23** en un experimento anterior y se muestran en la Tabla 17c; se observó un grado de varianza de lotes distintos de células de PHH.

Cuando los valores observados de una combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran aditivas, sin antagonismo (Tabla 17c) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992). No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo CCK8.

Tabla 17a: Efecto sobre el ADN de VHB en la Combinación *in vitro* del Compuesto 23 y TAF

5	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	INHIBICIÓN % PROMEDIO
	TAF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)
	0,00							
	10,00	43,33	52,66	53,67	61,85	59,03	65,33	
	3,33	42,6	41,59	42,58	42,01	55,87	53,47	
	1,11	2,73	26	24,84	30,46	45,15	52,57	
	0,37	11,59	10,66	15,11	15,55	38,82	64,27	-
	0,12	6,36	12,62	-10,64	15,2	36,81	52,56	
	0,00	0	-4,57	-2,49	11,13	30,46	58,13	
10	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
	TAF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)
	10,00	19,23	6,09	16,14	6,57	11,43	9,3	
	3,33	5,15	11,48	8,01	13,55	8,93	4,21	
	1,11	16,85	19,39	8,78	4,56	12,22	8,28	
	0,37	14,07	2,95	9,65	20,83	4,73	0,79	-
	0,12	4,65	9,48	19,93	6,28	0,72	12,12	
	0,00	0,02	8,18	25,79	14,9	9,52	3,29	
15	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	INHIBICIÓN ADITIVA
	TAF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)
	10,00	43,33	40,74	41,92	49,64	60,59	76,27	
	3,33	42,6	39,98	41,17	48,99	60,08	75,97	
	1,11	2,73	-1,72	0,31	13,56	32,36	59,27	
	0,37	11,59	7,55	9,39	21,43	38,52	62,98	-
	0,12	6,36	2,08	4,03	16,78	34,88	60,79	
	0,00	0	-4,57	-2,49	11,13	30,46	58,13	
20	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	TAF (nM)							Bonferroni Adj. 98%
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA 1,89
	3,33	0	0	0	0	0	-8,6449	volumen log 0,43
	1,11	0	0	0	1,89304	0	0	ANTAGONISMO -8,64
	0,37	0	0	0	0	0	0	volumen log -1,97
	0,12	0	0	0	0	0	0	
	0,00	0	0	0	0	0	0	
25	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	
	TAF (nM)							
	10,00	0	0	0	0	0	0	
	3,33	0	0	0	0	0	-8,6449	
	1,11	0	0	0	1,89304	0	0	
	0,37	0	0	0	0	0	0	
	0,12	0	0	0	0	0	0	
	0,00	0	0	0	0	0	0	
30	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	
	TAF (nM)							
	10,00	0	0	0	0	0	0	
	3,33	0	0	0	0	0	-8,6449	
	1,11	0	0	0	1,89304	0	0	
	0,37	0	0	0	0	0	0	
	0,12	0	0	0	0	0	0	
	0,00	0	0	0	0	0	0	

Tabla 17b: Efecto sobre el HBsAg en la Combinación *in vitro* del Compuesto 23 y TAF

5	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	INHIBICIÓN % PROMEDIO
	TAF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)
	0,00							
	10,00	6,38	6,2	3,4	-8,69	5,26	23,51	
	3,33	16,12	9,58	9,56	0,37	11,57	28,58	
	1,11	29,66	18,05	20,47	9,86	18,31	33,24	
	0,37	7,04	11,13	3,66	-2,3	-2,92	22,22	-
	0,12	22,99	21,29	19,81	16,79	8,85	28,41	
10	0,00	0	0,77	-5,27	4,83	1,95	22,77	
	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
	TAF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)
	10,00	3,03	12,27	11,65	6,93	7,08	10,25	
	3,33	3,66	2,28	2,6	17,49	9,97	8,2	
	1,11	9,01	17,67	8,37	8,64	8,88	5,26	
	0,37	9,67	9,77	10,47	17,15	5,76	1,93	-
	0,12	3,68	9,92	15,76	11,59	9,9	13,42	
15	0,00	1,83	21,63	8,58	26,08	6,99	7,12	
	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	INHIBICIÓN ADITIVA
	TAF (nM)							COMPUESTO 23 (nM)
	10,00	6,38	7,1	1,45	10,9	8,21	27,7	
	3,33	16,12	16,77	11,7	20,17	17,76	35,22	
	1,11	29,66	30,2	25,95	33,06	31,03	45,68	
	0,37	7,04	7,76	2,14	11,53	8,85	28,21	-
	0,12	22,99	23,58	18,93	26,71	24,49	40,53	
20	0,00	0	0,77	-5,27	4,83	1,95	22,77	
	[FÁRMACO]	0	24,691	74,074	222,22	666,67	2000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	TAF (nM)							Bonferroni Adj. 98%
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA 0
	3,33	0	0	0	0	0	0	volumen log 0
	1,11	0	0	0	0	0	0	
	0,37	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	0	0	0	0	0	volumen log 0
	0,00	0	0	0	0	0	0	

Tabla 17c: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* del Compuesto 23 y TAF en el sistema de cultivo celular de PHH:

Criterio									
de	Inhibid	Inhibidor	Inhibid	Inhibid	Volume	Volume	Volumen	Volumen	Conclusi
valoraci	Inhibid		or A	or B	n de	n log	de	log de	ón
ón del	or A	B	EC ₅₀	EC ₅₀	sinerg	de	antagonis	antagonis	ón
ensayo			(nM) #	(nM) #	ia (μM ²	sinerg	mo (μM ²	mo	
de VHB					%) *	ia	%) *		
ADN de	TAF	COMPUESTO	0,405	229,6	1,89	0,43	-8,64	-1,97	Aditivo
HBV		23							
HBsAg	TAF	COMPUESTO	>100	4,36	0	0	0	0	Aditivo
		23							

*con un intervalo de confianza de 99,9 %

#determinado en un experimento separado anterior

Ejemplo 18

Combinación *in vitro* de IFNα2a y Compuesto 25

Meta del estudio

Determinar si una combinación de dos fármacos del compuesto **25** (un inhibidor de molécula pequeña del ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, que pertenece a la clase química de la dihidroquinolizina) y el interferón alfa 2a pegilado (IFNα2a, citocina antiviral que activa las vías inmunitarias innatas en los hepatocitos) es aditiva, sinérgica o antagonista *in vitro* mediante el uso de hepatocitos primarios humanos infectados con VHB en un sistema de modelo de cultivo celular.

Resultados y conclusión

El IFN α 2a (intervalo de concentración de 10,0 IU/mL a 0,123 IU/mL en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con el compuesto **25** (intervalo de concentración de 10,0 nM a 0,12 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). Se muestra la inhibición % promedio en ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, y la desviación estándar de 3 replicados observadas con los tratamientos de IFN α 2a o compuesto **25** por sí solos o de forma combinada en las Tablas 18a, 18b y 18c tal como se indica más adelante. Se determinaron los valores EC₅₀ de IFN α 2a y compuesto **25** en un experimento anterior y se muestran en la Tabla 18d; se observó un grado de varianza de lotes distintos de células de PHH.

Cuando los valores observados de una combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran sinérgicas, sin antagonismo (Tabla 18d) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992). No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo CCK8.

Tabla 18a: Efecto sobre el ADN de VHB en la Combinación *in vitro* de IFN α 2a y Compuesto 25

5	[FÁRMACO]	0,00	0,12	0,37	1,11	3,33	10,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO
	IFN α 2a							COMPUESTO 25 (μ M)
	IU/mL							
	10,00	58,66	72,01	77,55	74,4	74,57	75,72	
	3,33	46,92	70,84	75,67	71,52	79,37	81,47	
	1,11	32,66	60,24	64,08	65,29	76,55	76,76	
	0,37	22,81	48,83	55,68	55,85	71,09	75,44	
	0,12	-19,84	40,19	39,08	36,54	65,34	64,9	-
	0,00	0	-14,4	-9,87	4,3	32,64	53,78	
10	[FÁRMACO]	0,00	0,12	0,37	1,11	3,33	10,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
	IFN α 2a							COMPUESTO 25 (μ M)
	IU/mL							
	10,00	8,37	0,96	1,44	5,16	6,13	9,02	
	3,33	6,8	2,16	3,21	1,91	3,01	4,5	
	1,11	7,03	10,58	6,34	2,57	2,47	2,79	
	0,37	6,72	4,66	7,04	12,83	7,17	1,6	
	0,12	15,09	10,34	11,46	15,82	5,84	3,79	-
15	[FÁRMACO]	0,00	0,12	0,37	1,11	3,33	10,00	INHIBICIÓN ADITIVA
	IFN α 2a							COMPUESTO 25 (μ M)
	IU/mL							
	10,00	58,66	52,71	54,58	60,44	72,15	80,89	
	3,33	46,92	39,28	41,68	49,2	64,25	75,47	
	1,11	32,66	22,96	26,01	35,56	54,64	68,88	
	0,37	22,81	11,69	15,19	26,13	48	64,32	
	0,12	-19,84	-37,1	-31,67	-14,69	19,28	44,61	-
20	[FÁRMACO]	0	0,1235	0,3704	1,1111	3,3333	10	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	IFN α 2a							Bonferroni Adj. 98%
	IU/mL							
	10,00	0	16,1406	18,231	0	0	0	SINERGIA 314,15
	3,33	0	24,4514	23,4259	16,0342	5,21409	0	volumen log 71,51
	1,11	0	2,46122	17,2051	21,2721	13,7812	0	
	0,37	0	21,8039	17,3214	0	0	5,8544	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	43,2611	33,0351	0	26,8406	7,81711	volumen log 0
25	[FÁRMACO]	0	0,1235	0,3704	1,1111	3,3333	10	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	IFN α 2a							Bonferroni Adj. 98%
	IU/mL							
	10,00	0	16,1406	18,231	0	0	0	SINERGIA 314,15
	3,33	0	24,4514	23,4259	16,0342	5,21409	0	volumen log 71,51
	1,11	0	2,46122	17,2051	21,2721	13,7812	0	
	0,37	0	21,8039	17,3214	0	0	5,8544	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	43,2611	33,0351	0	26,8406	7,81711	volumen log 0
30	[FÁRMACO]	0	0,1235	0,3704	1,1111	3,3333	10	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	IFN α 2a							Bonferroni Adj. 98%
	IU/mL							
	10,00	0	16,1406	18,231	0	0	0	SINERGIA 314,15
	3,33	0	24,4514	23,4259	16,0342	5,21409	0	volumen log 71,51
	1,11	0	2,46122	17,2051	21,2721	13,7812	0	
	0,37	0	21,8039	17,3214	0	0	5,8544	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	43,2611	33,0351	0	26,8406	7,81711	volumen log 0

Tabla 18b: Efecto sobre el HBsAg en la Combinación *in vitro* de IFN α 2a y Compuesto 25

[FÁRMACO]	0,00	0,12	0,37	1,11	3,33	10,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO
IFNα2a							COMPUESTO 25 (μM)
IU/mL							
10,00	22,77	27,23	22,41	30,25	37,23	63,56	
3,33	18,32	28,86	27,09	35,53	43,71	66,88	
1,11	10,57	27	31,57	31,22	38,7	66,37	
0,37	2,74	18,78	15,98	25,14	34,24	60,44	-
0,12	-4,08	11,87	10,92	14,5	34,52	56,65	
0,00	0	-5,64	-7,52	-7,33	8,81	42,49	
[FÁRMACO]	0,00	0,12	0,37	1,11	3,33	10,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
IFNα2a							COMPUESTO 25 (μM)
IU/mL							
10,00	8,68	6,97	2,29	4,73	7,98	4,01	
3,33	9,52	6,19	6,14	6,04	6,94	4,47	
1,11	2,72	4,07	4,71	1,23	4,72	0,28	
0,37	8,08	2,56	1,27	2,26	2,05	4,7	-
0,12	6,17	2,65	2,53	0,54	1,95	2,99	
0,00	7	8,29	12,25	8,62	8,49	4,98	
[FÁRMACO]	0,00	0,12	0,37	1,11	3,33	10,00	INHIBICIÓN ADITIVA
IFNα2a							COMPUESTO 25 (μM)
IU/mL							
10,00	22,77	18,41	16,96	17,11	29,57	55,59	
3,33	18,32	13,71	12,18	12,33	25,52	53,03	
1,11	10,57	5,53	3,84	4,01	18,45	48,57	
0,37	2,74	-2,75	-4,57	-4,39	11,31	44,07	-
0,12	-4,08	-9,95	-11,91	-11,71	5,09	40,14	
0,00	0	-5,64	-7,52	-7,33	8,81	42,49	
[FÁRMACO]	0	0,1235	0,3704	1,1111	3,3333	10	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
IFNα2a							Bonferroni Adj. 98%
IU/mL							
10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA 218,76
3,33	0	0	0	3,32236	0	0	volumen log 49,8
1,11	0	8,07563	12,2294	23,1621	4,71648	16,8785	ANTAGONISMO 0
0,37	0	13,105	16,3704	22,0923	16,1835	0,9023	volumen log 0
0,12	0	13,0989	14,5038	24,4329	23,0126	6,66991	
0,00	0	0	0	0	0	0	

Tabla 18c: Efecto sobre el HBeAg en la Combinación *in vitro* de IFN α 2a y Compuesto 25

5	[FÁRMACO]	0,00	0,12	0,37	1,11	3,33	10,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO
								COMPUESTO 25 (μ M)
	10,00	17,32	33,64	22,73	25,58	32,72	51,97	
	3,33	6,47	24,71	20,71	19,06	27,19	49	
	1,11	-1,13	21,52	18,25	15,99	19,2	47,55	
	0,37	-12,17	10,2	8,56	12,48	14,45	40,46	-
	0,12	-21,05	1,9	3,84	0,95	15,57	36,99	
10	0,00	0	-11,25	-13,81	-16,8	-7,31	22,04	
	[FÁRMACO]	0,00	0,12	0,37	1,11	3,33	10,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
	IFN α 2a							COMPUESTO 25 (μ M)
	IU/mL							
	10,00	11,74	4,4	2,35	5,73	3,68	4,09	
	3,33	19,07	8,01	1,6	5,75	14,7	8,73	
	1,11	17,14	4,93	2,29	7,45	9,68	6,75	
15	0,37	26,1	2,4	6,51	8,28	5,47	9	-
	0,12	25,35	7,46	12,09	14,46	9,05	10,23	
	0,00	19,06	11,33	16,27	24	19,27	14,29	
20	[FÁRMACO]	0,00	0,12	0,37	1,11	3,33	10,00	INHIBICIÓN ADITIVA
	IFN α 2a							COMPUESTO 25 (μ M)
	IU/mL							
	10,00	17,32	8,02	5,9	3,43	11,28	35,54	
	3,33	6,47	-4,05	-6,45	-9,24	-0,37	27,08	
	1,11	-1,13	-12,51	-15,1	-18,12	-8,52	21,16	
	0,37	-12,17	-24,79	-27,66	-31,01	-20,37	12,55	-
	0,12	-21,05	-34,67	-37,77	-41,39	-29,9	5,63	
	0,00	0	-11,25	-13,81	-16,8	-7,31	22,04	
	[FÁRMACO]	0	0,1235	0,3704	1,1111	3,3333	10	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	IFN α 2a							Bonferroni Adj. 98%
	IU/mL							
	10,00	0	11,1396	9,09615	3,29257	9,32912	2,96981	SINERGIA 231,36
	3,33	0	2,39909	21,8944	9,37675	0	0	volumen log 52,67
	1,11	0	17,8054	25,8136	9,59205	0	4,17575	
	0,37	0	27,0916	14,7956	16,2405	16,8182	0	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	12,0191	1,82181	0	15,6865	0	volumen log 0
	0,00	0	0	0	0	0	0	

Tabla 18d: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* de IFN α 2a y Compuesto 25 en el sistema de cultivo celular de PHH:

Criterio de valoración del ensayo de VHB	Inhibidor or A	Inhibidor B	Inhibidor or A EC ₅₀ (IU/mL) #	Inhibidor or B EC ₅₀ (nM) #	Volume n de sinergia (μ M ² %)*	Volume n log de sinergia	Volumen de antagonismo (μ M ² %)*	Volumen log de antagonismo	Conclusión
ADN de HBV	IFN α 2a	COMPUESTO 25	2,154	0,654	314,15	71,51	0	0	Sinergia
HBsAg	IFN α 2a	COMPUESTO 25	13,8	4,503	218,76	49,8	0	0	Sinergia
HBeAg	IFN α 2a	COMPUESTO 25	10,24	5,75	231,36	52,67	0	0	Sinergia
*con un intervalo de confianza de 99,9 %									
#determinado en un experimento separado anterior									

Ejemplo 19

Combinación *in vitro* de Compuesto 25 y Compuesto 3

Meta del estudio

Determinar si una combinación de dos fármacos del compuesto **3** (un inhibidor de molécula pequeña de encapsulación de VHB que pertenece a la clase química de benzamida de sulfamoilo) y compuesto **25** (un inhibidor de molécula pequeña de ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, que pertenece a la clase química de dihidroquinolizina) es aditivo, sinérgico o antagonista *in vitro* mediante el uso de hepatocitos primarios humanos infectados con VHB en un sistema de modelo de cultivo celular.

Resultados y conclusión

El Compuesto **25** (intervalo de concentración de 10,0 nM a 0,12 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó
5 junto con el compuesto **3** (intervalo de concentración de 5000 nM a 61,73 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). Se muestra la inhibición % promedio en ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, y la desviación estándar de 3 replicados observadas con los
10 tratamientos del compuesto **25** o compuesto **3** por sí solos o de forma combinada en las Tablas 19a, 19b y 19c tal como se indica más adelante. Se determinaron los valores EC_{50} del compuesto **25** y compuesto **3** en un experimento anterior y se muestran en la Tabla 19d; se observó un grado de varianza de lotes distintos de células de PHH.

15 Cuando los valores observados de una combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran sinérgicas, sin antagonismo (Tabla 19d) según el
análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de
20 interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992). No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo CCK8 en las muestras analizadas.

Tabla 19a: Efecto sobre el ADN de VHB en la Combinación *in vitro* del Compuesto 25 y Compuesto 3

[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO	
COMPUESTO 25							COMPUESTO 3 (nM)	
nM								
10,00	28	53,83	59,64	61,48	75,31	83,32		
3,33	15,24	52,77	48,78	55,49	77,84	86,19		
1,11	5,69	32,55	40,25	48,87	68,73	85,52		
0,37	-51,8	21,47	28,54	33,37	64,04	83,77		
0,12	-20,98	17,18	18,75	27,78	58,12	84,2		
0,00	0	-28,13	-25,93	-3,32	25,94	74,78		

[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)	
COMPUESTO 25							COMPUESTO 3 (nM)	
nM								
10,00	13,66	6,65	4,22	12,05	4,52	3,89		
3,33	15,64	6,92	3,55	5,98	2,73	2,62		
1,11	2,13	7,36	12,67	3,75	8,6	1,07		
0,37	7,11	11,02	11,57	16,68	4,9	3,83		
0,12	6,37	6,92	8,03	5,44	6,89	1,72		
0,00	37,96	6,82	12,75	12,54	6,98	2,18		

[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN ADITIVA	
COMPUESTO 25							COMPUESTO 3 (nM)	
nM								
10,00	28	7,75	9,33	25,61	46,68	81,84		
3,33	15,24	-8,6	-6,74	12,43	37,23	78,62		
1,11	5,69	-20,84	-18,76	2,56	30,15	76,22		
0,37	-51,8	-94,5	-91,16	-56,84	-12,42	61,72		
0,12	-20,98	-55,01	-52,35	-25	10,4	69,49		
0,00	0	-28,13	-25,93	-3,32	25,94	74,78		

[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
COMPUESTO 25							Bonferroni Adj. 98%	
nM								
10,00	0	24,1949	36,422	0	13,7547	0	SINERGIA	737,8
3,33	0	38,5963	43,837	23,3798	31,6256	0	volumen log	167,96
1,11	0	29,1682	17,313	33,9688	10,2774	5,77863		
0,37	0	79,7032	81,6231	35,3161	60,3341	9,44547	ANTAGONISMO	0
0,12	0	49,4163	44,6733	34,877	25,045	9,04948	volumen log	0
0,00	0	0	0	0	0	0		

Tabla 19b: Efecto sobre el HBsAg en la Combinación *in vitro* del Compuesto 25 y Compuesto 3

5	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO
	COMPUESTO 25							COMPUESTO 3 (nM)
	nM							
	10,00	32,99	40,09	41,48	45,13	52,34	64,84	
	3,33	13,12	26,32	28,85	30,97	34,56	54,59	
	1,11	-3,18	21,32	20,73	21,99	32,47	56,21	
	0,37	-5,09	13,81	9,92	8,14	27,4	51,59	
	0,12	3,68	7,53	8,59	12,88	22,46	48,46	-
	0,00	0	-20,02	-17,32	-13,99	1,44	28,25	
10	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
	COMPUESTO 25							COMPUESTO 3 (nM)
	nM							
	10,00	11,76	5,21	4,72	1,8	3,51	4,34	
	3,33	6,7	5	8,24	5,49	2,08	2,72	
	1,11	2,66	0,74	5,4	3,5	4,64	4,3	
	0,37	3,17	7,51	16,06	12,02	5,09	4,62	
	0,12	2,76	6,34	8,52	9,71	4,5	5,28	-
	0,00	26,63	3,49	15,37	12,95	14,94	14,17	
15	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN ADITIVA
	COMPUESTO 25							COMPUESTO 3 (nM)
	nM							
	10,00	32,99	19,57	21,38	23,62	33,95	51,92	
	3,33	13,12	-4,27	-1,93	0,97	14,37	37,66	
	1,11	-3,18	-23,84	-21,05	-17,61	-1,69	25,97	
	0,37	-5,09	-26,13	-23,29	-19,79	-3,58	24,6	
	0,12	3,68	-15,6	-13	-9,8	5,07	30,89	-
	0,00	0	-20,02	-17,32	-13,99	1,44	28,25	
20	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	COMPUESTO 25							Bonferroni Adj. 98%
	nM							
	10,00	0	3,37389	4,56648	15,5862	6,83859	0	SINERGIA 257,49
	3,33	0	14,135	3,66216	11,9324	13,3447	7,97848	volumen log 58,62
	1,11	0	42,7247	24,0086	28,0815	18,8898	16,0887	
	0,37	0	15,2246	0	0	14,2288	11,7856	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	2,26506	0	0	2,5805	0,19352	volumen log 0
	0,00	0	0	0	0	0	0	
25	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	COMPUESTO 25							Bonferroni Adj. 98%
	nM							
	10,00	0	3,37389	4,56648	15,5862	6,83859	0	SINERGIA 257,49
	3,33	0	14,135	3,66216	11,9324	13,3447	7,97848	volumen log 58,62
	1,11	0	42,7247	24,0086	28,0815	18,8898	16,0887	
	0,37	0	15,2246	0	0	14,2288	11,7856	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	2,26506	0	0	2,5805	0,19352	volumen log 0
	0,00	0	0	0	0	0	0	
30	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	COMPUESTO 25							Bonferroni Adj. 98%
	nM							
	10,00	0	3,37389	4,56648	15,5862	6,83859	0	SINERGIA 257,49
	3,33	0	14,135	3,66216	11,9324	13,3447	7,97848	volumen log 58,62
	1,11	0	42,7247	24,0086	28,0815	18,8898	16,0887	
	0,37	0	15,2246	0	0	14,2288	11,7856	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	2,26506	0	0	2,5805	0,19352	volumen log 0
	0,00	0	0	0	0	0	0	

Tabla 19c: Efecto sobre el HBeAg en la Combinación *in vitro* del Compuesto 25 y Compuesto 3

[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO	
COMPUESTO 25							COMPUESTO 3 (nM)	
nM								
10,00	33,17	29,55	32,13	35,12	45,53	56,72		
3,33	8,74	17,06	14,55	17,58	28,19	41,81		
1,11	4,51	14,84	10,85	17,54	27,32	48,49		
0,37	-0,51	7,18	2,63	7,03	20,64	40,75		
0,12	5,33	4,76	-1,23	8,26	17,34	42,34		
0,00	0	-11,35	-16	-5,39	2,34	27,3		

[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)	
COMPUESTO 25							COMPUESTO 3 (nM)	
nM								
10,00	19,04	7,64	7,38	3,04	5,15	8,44		
3,33	17,53	4,42	4,02	3,71	1,17	3,68		
1,11	11,69	1,61	6,69	4,6	2,82	2,79		
0,37	17,52	6,16	9,21	11,25	2,17	4,33		
0,12	17,42	6,48	8,81	8,1	1,87	4,94		
0,00	27,36	3,5	5,88	8,38	7,46	13,79		

[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN ADITIVA	
COMPUESTO 25							COMPUESTO 3 (nM)	
nM								
10,00	33,17	25,58	22,48	29,57	34,73	51,41		
3,33	8,74	-1,62	-5,86	3,82	10,88	33,65		
1,11	4,51	-6,33	-10,77	-0,64	6,74	30,58		
0,37	-0,51	-11,92	-16,59	-5,93	1,84	26,93		
0,12	5,33	-5,42	-9,82	0,23	7,55	31,17		
0,00	0	-11,35	-16	-5,39	2,34	27,3		

[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
COMPUESTO 25							Bonferroni Adj. 98%	
nM								
10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	80,56
3,33	0	4,13378	7,18018	1,55039	13,4595	0	volumen log	18,34
1,11	0	15,8715	0	3,0414	11,2994	8,72811		
0,37	0	0	0	0	11,6585	0	ANTAGONISMO	0
0,12	0	0	0	0	3,63583	0	volumen log	0
0,00	0	0	0	0	0	0		

Tabla 19d: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* del Compuesto 25 y Compuesto 3 en el sistema de cultivo celular de PHH:

Criterio	Inhibidor A	Inhibidor B	Inhibidor A EC ₅₀ (nM) #	Inhibidor B EC ₅₀ (nM) #	Volume sinergia (μM ² %)*	Volume sinergia (μM ² %)*	Volumen antagonismo (μM ² %)*	Volumen antagonismo (μM ² %)*	Conclusión
ADN de HBV	COMPUESTO 25	COMPUESTO 3	0,654	876,5	737,8	167,96	0	0	Sinergia
HBsAg	COMPUESTO 25	COMPUESTO 3	4,503	7793	257,49	58,62	0	0	Sinergia
HBeAg	COMPUESTO 25	COMPUESTO 3	5,75	8850	80,56	18,34	0	0	Sinergia

*con un intervalo de confianza de 99,9 %

#determinado en un experimento separado anterior

Ejemplo 20

Combinación *in vitro* del Compuesto 3 y TAF

Meta del estudio

Determinar si una combinación de dos fármacos del compuesto **3** (un inhibidor de molécula pequeña de encapsulación de VHB que pertenece a la clase química de benzamida de sulfamóilo) y tenofovir (en la forma del profármaco tenofovir alafenamida, o TAF, análogo de nucleótido inhibidor de la polimerasa de VHB) es aditiva, sinérgica o antagonista *in vitro* mediante el uso de hepatocitos primarios humanos infectados con VHB en un sistema de modelo de cultivo celular.

Resultados y conclusión

El TAF (intervalo de concentración de 10,0 nM a 0,12 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con el compuesto **3** (intervalo de concentración de 5560 nM a 68,64 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). Se muestra la inhibición % promedio en ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, y la desviación estándar de 3 replicados observadas con los tratamientos de TAF o compuesto **3** por sí solos o de forma combinada en las Tablas 20a, 20b y 20c tal como se indica más adelante. Se determinaron los valores EC₅₀ de TAF y compuesto **3** en un experimento anterior y se muestran en la Tabla 20d; se observó un grado de varianza de lotes distintos de células de PHH.

Cuando los valores observados de una combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran aditivas o sinérgicas, sin antagonismo (Tabla 20d) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992). No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo CCK8 en las muestras analizadas.

Tabla 20a: Efecto sobre el ADN de VHB en la Combinación *in vitro* de TAF y Compuesto 3

5	[FÁRMACO]	0,00	68,64	205,93	617,78	1853,33	5560,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO
	TAF (nM)							COMPUESTO 3 (nM)
	3,70	78,31	76,66	75,83	84	83	87,22	-
	1,23	63,39	66,71	65,36	76,33	81,98	88,21	
	0,41	28,78	50,25	43,6	56,51	77,12	86,4	
	0,14	3,84	22,99	19,73	44,15	74,08	86,53	
	0,05	-8,77	15,84	18,49	40,03	71,93	83,56	
	0,00	0	-2,79	-5,02	34,78	66,43	85,32	
10	[FÁRMACO]	0,00	68,64	205,93	617,78	1853,33	5560,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
	TAF (nM)							COMPUESTO 3 (nM)
	3,70	4,13	5,74	5,65	2,86	6,34	3,87	-
	1,23	6,26	4	1,75	3,36	2,15	1,61	
	0,41	15,82	4,83	4,35	8,44	2,31	0,77	
	0,14	5,2	10,08	12,17	5,9	2,81	1,93	
	0,05	11,46	2,67	13,74	8,32	4	6,05	
	0,00	19,74	24,58	16,02	21,37	3,11	3,19	
15	[FÁRMACO]	0,00	68,64	205,93	617,78	1853,33	5560,00	INHIBICIÓN ADITIVA
	TAF (nM)							COMPUESTO 3 (nM)
	3,70	78,31	77,7	77,22	85,85	92,72	96,82	-
	1,23	63,39	62,37	61,55	76,12	87,71	94,63	
	0,41	28,78	26,79	25,2	53,55	76,09	89,54	
	0,14	3,84	1,16	-0,99	37,28	67,72	85,88	
	0,05	-8,77	-11,8	-14,23	29,06	63,49	84,03	
	0,00	0	-2,79	-5,02	34,78	66,43	85,32	
20	[FÁRMACO]	0	68,642	205,93	617,78	1853,3	5560	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	TAF (nM)							Bonferroni Adj. 98%
	3,70	0	0	0	0	0	0	SINERGIA 30,5
	1,23	0	0	0	0	0	-1,1215	volumen log 6,94
	0,41	0	7,56447	4,08415	0	0	-0,6059	ANTAGONISMO -1,73
	0,14	0	0	0	0	0	0	volumen log -0,39
	0,05	0	18,853	0	0	0	0	
	0,00	0	0	0	0	0	0	

Tabla 20b: Efecto sobre el HBsAg en la Combinación *in vitro* de TAF y Compuesto 3

5	[FÁRMACO]	0,00	68,64	205,93	617,78	1853,33	5560,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO	
	TAF (nM)							COMPUESTO 3 (nM)	
	3,70	-6,72	6,49	7,67	0,89	29,25	52,65		
	1,23	10,97	13,51	15,13	15,13	27,31	58,97		
	0,41	11,29	12,8	10,81	11,93	27,47	49,79		
	0,14	12,83	3,2	5,03	3,13	16,78	48,23		
	0,05	-7,35	-0,27	0,03	7,65	24,53	50,59		
	0,00	0	-16,35	-21,58	-5,12	14,6	43,83		
10	[FÁRMACO]	0,00	68,64	205,93	617,78	1853,33	5560,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)	
	TAF (nM)							COMPUESTO 3 (nM)	
	3,70	3,91	5,1	5,03	8,91	7,06	8,33		
	1,23	3,52	5,17	5,31	13	7,04	5,03		
	0,41	8,18	13,14	3,12	11,46	12,56	2,98		
	0,14	10,96	14,74	11,52	2,55	6,84	7,2		
	0,05	11,13	9,98	4,72	15,21	8,94	3,8		
	0,00	22,17	16,06	23,58	14,67	9,83	6,94		
15	[FÁRMACO]	0,00	68,64	205,93	617,78	1853,33	5560,00	INHIBICIÓN ADITIVA	
	TAF (nM)							COMPUESTO 3 (nM)	
	3,70	-6,72	-24,17	-29,75	-12,18	8,86	40,06		
	1,23	10,97	-3,59	-8,24	6,41	23,97	49,99		
	0,41	11,29	-3,21	-7,85	6,75	24,24	50,17		
	0,14	12,83	-1,42	-5,98	8,37	25,56	51,04		
	0,05	-7,35	-24,9	-30,52	-12,85	8,32	39,7		
	0,00	0	-16,35	-21,58	-5,12	14,6	43,83		
20	[FÁRMACO]	0,00	68,64	205,93	617,78	1853,33	5560,00	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
	TAF (nM)							Bonferroni Adj. 98%	
	3,70	0	13,8759	20,8663	0	0	0	SINERGIA 64,13	
	1,23	0	0,08553	5,89479	0	0	0	volumen log 14,6	
	0,41	0	0	8,39208	0	0	0		
	0,14	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO 0	
	0,05	0	0	15,0165	0	0	0	volumen log 0	
	0,00	0	0	0	0	0	0		
25	[FÁRMACO]	0,00	68,64	205,93	617,78	1853,33	5560,00		
	TAF (nM)								
	3,70	0	13,8759	20,8663	0	0	0		
	1,23	0	0,08553	5,89479	0	0	0		
	0,41	0	0	8,39208	0	0	0		
	0,14	0	0	0	0	0	0		
	0,05	0	0	15,0165	0	0	0		
	0,00	0	0	0	0	0	0		
30	[FÁRMACO]	0,00	68,64	205,93	617,78	1853,33	5560,00		
	TAF (nM)								
	3,70	0	13,8759	20,8663	0	0	0		
	1,23	0	0,08553	5,89479	0	0	0		
	0,41	0	0	8,39208	0	0	0		
	0,14	0	0	0	0	0	0		
	0,05	0	0	15,0165	0	0	0		
	0,00	0	0	0	0	0	0		

Tabla 20c: Efecto sobre el HBeAg en la Combinación *in vitro* de TAF y Compuesto 3

5

10

15

20

25

[FÁRMACO]	0,00	68,59	205,76	617,28	1851,85	5555,56	INHIBICIÓN % PROMEDIO
TAF (nM)							COMPUESTO 3 (nM)
3,70	11,87	6,27	25,76	19,94	27,49	61,6	
1,23	9,91	11,39	10,58	18,23	26,38	55,2	
0,41	1,76	1,32	-4,69	15,28	22,07	48,25	
0,14	-2,78	-3,24	1,07	13,95	18,72	46,8	-
0,05	1,17	3,04	0,21	10,48	17,05	49,18	
0,00	0	-5,05	-6,33	2,77	29,66	40,38	
[FÁRMACO]	0,00	68,59	205,76	617,28	1851,85	5555,56	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
TAF (nM)							COMPUESTO 3 (nM)
3,70	8,54	19,25	17,35	14,39	11,4	3,56	
1,23	13,91	1,05	5,26	6,23	11,06	5,69	
0,41	18,44	7,35	8,98	4,02	7,19	2,75	
0,14	11,41	19,4	4,08	12,99	5,4	4,89	-
0,05	16,36	9,09	6,96	4,15	9,2	7,01	
0,00	28,29	2,3	6,31	5,64	11,69	6,37	
[FÁRMACO]	0,00	68,59	205,76	617,28	1851,85	5555,56	INHIBICIÓN ADITIVA
TAF (nM)							COMPUESTO 3 (nM)
3,70	11,87	7,42	6,29	14,31	38,01	47,46	
1,23	9,91	5,36	4,21	12,41	36,63	46,29	
0,41	1,76	-3,2	-4,46	4,48	30,9	41,43	
0,14	-2,78	-7,97	-9,29	0,07	27,7	38,72	-
0,05	1,17	-3,82	-5,09	3,91	30,48	41,08	
0,00	0	-5,05	-6,33	2,77	29,66	40,38	
[FÁRMACO]	0,00	68,59	205,76	617,28	1851,85	5555,56	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
TAF (nM)							Bonferroni Adj. 98%
3,70	0	0	0	0	0	2,42404	SINERGIA 5
1,23	0	2,57445	0	0	0	0	volumen log 1,14
0,41	0	0	0	0	0	0	
0,14	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO 0
0,05	0	0	0	0	0	0	volumen log 0
0,00	0	0	0	0	0	0	

Tabla 20d: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* de TAF y Compuesto 3 en el sistema de cultivo celular de PHH:

Criterio									
de	Inhibid	Inhibidor	Inhibid	Inhibid	Volume	Volume	Volumen	Volumen	Conclusi
valoraci	Inhibid		or A	or B	n de	n log	de	log de	ón
ón del	or A	B	EC ₅₀	EC ₅₀	sinerg	de	antagonis	antagonis	
ensayo			(nM) #	(nM) #	ia (µM ²	sinerg	mo (µM ²	mo	
de VHB					%) *	ia	%) *		
ADN de	TAF	COMPUESTO	0,405	876,5	30,5	6,94	-1,73	-0,39	Sinergia
HBV		3							
HBsAg	TAF	COMPUESTO	>100	7793	64,13	14,6	0	0	Sinergia
		3							
HBeAg	TAF	COMPUESTO	>100	8850	5,0	1,14	0	0	Aditivo
		3							

*con un intervalo de confianza de 99,9 %

#determinado en un experimento separado anterior

Ejemplo 21

Combinación *in vitro* de IFNα2a y Compuesto 22

Meta del estudio

Determinar si una combinación de dos fármacos del compuesto **22** (un inhibidor de molécula pequeña de la encapsulación de VHB que pertenece a la clase química de benzamida de sulfamoilo) y el interferón alfa 2a pegilado (IFNα2a, citocina antiviral que activa las vías inmunitarias innatas en los hepatocitos) es aditiva, sinérgica o antagonista *in vitro* mediante el uso de hepatocitos primarios humanos infectados con VHB en un sistema de modelo de cultivo celular.

Resultados y conclusión

El IFN α 2a (intervalo de concentración de 10,0 IU/mL a 0,123 IU/mL en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con el compuesto **22** (intervalo de concentración de 5000 nM a 61,721 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). Se muestra la inhibición % promedio en ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, y la desviación estándar de 3 replicados observadas con los tratamientos de IFN α 2a o compuesto **22** por sí solos o de forma combinada en las Tablas 21a, 21b y 21c tal como se indica más adelante. Se determinaron los valores EC₅₀ de IFN α 2a y compuesto **22** en un experimento anterior y se muestran en la Tabla 21d; se observó un grado de varianza de lotes distintos de células de PHH.

Cuando los valores observados de una combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran de aditivas a sinérgicas, sin antagonismo (Tabla 21d) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992). No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo CCK8 en las muestras analizadas.

Tabla 21a: Efecto sobre el ADN de VHB en la Combinación *in vitro* de IFN α 2a y Compuesto 22

5	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO
	IFN α 2a							COMPUESTO 22 (μ M)
	IU/mL							
	10,00	59	70,58	67,36	66,34	75,72	83,3	
	3,33	52,39	69,79	71,36	68,3	72,01	84,76	
	1,11	28,08	59,77	59,61	55,17	63,22	80,59	
	0,37	6,59	44,09	42,48	42,82	61,33	75,33	
	0,12	-18,56	29,97	23,99	27,7	45,63	78,65	-
	0,00	0	-9,02	-33,53	-13,72	22,31	69,19	
10	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
	IFN α 2a							COMPUESTO 22 (μ M)
	IU/mL							
	10,00	7,24	3,95	0,56	10,17	3,06	4,6	
	3,33	11,43	3,1	4,52	7,4	11,11	4,42	
	1,11	16,44	2,71	2,78	22,26	6,66	1,34	
	0,37	33,49	11,81	2,73	7,7	14,25	1,86	
	0,12	23,97	16,1	11,97	10,1	9,2	2,49	-
	0,00	35,38	12,95	29,16	24,96	22,77	2,75	
15	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN ADITIVA
	IFN α 2a							COMPUESTO 22 (μ M)
	IU/mL							
	10,00	59	55,3	45,25	53,37	68,15	87,37	
	3,33	52,39	48,1	36,43	45,86	63,01	85,33	
	1,11	28,08	21,59	3,97	18,21	44,13	77,84	
	0,37	6,59	-1,84	-24,73	-6,23	27,43	71,22	
	0,12	-18,56	-29,25	-58,31	-34,83	7,89	63,47	-
	0,00	0	-9,02	-33,53	-13,72	22,31	69,19	
20	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	IFN α 2a							Bonferroni Adj. 98%
	IU/mL							
	10,00	0	2,28055	20,267	0	0	0	SINERGIA 311,72
	3,33	0	11,4879	20,0547	0	0	0	volumen log 70,96
	1,11	0	29,2614	46,491	0	0	0	
	0,37	0	7,06329	58,2256	23,7093	0	0	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	6,2349	42,9067	29,2909	7,4628	6,98541	volumen log 0
	0,00	0	0	0	0	0	0	
25	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	IFN α 2a							Bonferroni Adj. 98%
	IU/mL							
	10,00	0	2,28055	20,267	0	0	0	SINERGIA 311,72
	3,33	0	11,4879	20,0547	0	0	0	volumen log 70,96
	1,11	0	29,2614	46,491	0	0	0	
	0,37	0	7,06329	58,2256	23,7093	0	0	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	6,2349	42,9067	29,2909	7,4628	6,98541	volumen log 0
	0,00	0	0	0	0	0	0	
30	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	IFN α 2a							Bonferroni Adj. 98%
	IU/mL							
	10,00	0	2,28055	20,267	0	0	0	SINERGIA 311,72
	3,33	0	11,4879	20,0547	0	0	0	volumen log 70,96
	1,11	0	29,2614	46,491	0	0	0	
	0,37	0	7,06329	58,2256	23,7093	0	0	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	6,2349	42,9067	29,2909	7,4628	6,98541	volumen log 0
	0,00	0	0	0	0	0	0	

Tabla 21c: Efecto sobre el HBeAg en la Combinación *in vitro* de IFN α 2a y Compuesto 22

[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO	
IFNa2a							COMPUESTO 22 (µM)	
IU/mL								
10,00	30,13	29,1	26,43	26,51	34,37	48,55		
3,33	17,16	17,85	18	19,33	29,38	39,7		
1,11	15,27	14,17	15,76	10,98	26,67	41,95		
0,37	1,78	2,04	2,11	-0,99	10,34	27,11		
0,12	7,42	11,7	10,2	8,06	14,8	34,39		
0,00	0	-7,2	-9,57	-8,17	5,92	20,93		
[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)	
IFNa2a							COMPUESTO 22 (µM)	
IU/mL								
10,00	0,33	8,25	5,02	1,12	4,12	3,3		
3,33	5,51	6,25	6,16	6,03	3,41	4,79		
1,11	2,91	12,64	3,52	11,08	6,97	8,93		
0,37	3,5	12,74	8,62	13,47	7,91	4,93		
0,12	6,9	9,72	7,43	4,72	11,46	7,25		
0,00	7,86	5,83	6,88	13,23	8,51	9,89		
[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN ADITIVA	
IFNa2a							COMPUESTO 22 (µM)	
IU/mL								
10,00	30,13	25,1	23,44	24,42	34,27	44,75		
3,33	17,16	11,2	9,23	10,39	22,06	34,5		
1,11	15,27	9,17	7,16	8,35	20,29	33		
0,37	1,78	-5,29	-7,62	-6,24	7,59	22,34		
0,12	7,42	0,75	-1,44	-0,14	12,9	26,8		
0,00	0	-7,2	-9,57	-8,17	5,92	20,93		
[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
IFNa2a							Bonferroni Adj. 98%	
IU/mL								
10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	0
3,33	0	0	0	0	0	0	volumen log	0
1,11	0	0	0	0	0	0		
0,37	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO	0
0,12	0	0	0	0	0	0	volumen log	0
0,00	0	0	0	0	0	0		

Tabla 21d: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* de IFN α 2a y Compuesto 22 en el sistema de cultivo celular de PHH:

Criterio de valoración del ensayo de VHB	Inhibidor or A	Inhibidor B	Inhibid or A EC ₅₀ (IU/mL) #	Inhibid or B EC ₅₀ (nM) #	Volume n de sinergia (μ M ²) *	Volume n log de sinergia	Volumen de antagonis mo (μ M ²) *	Volumen log de antagonis mo	Conclusión
ADN de HBV	IFN α 2a	COMPUESTO 22	2,154	1020	311,72	70,96	0	0	Sinergia
HBsAg	IFN α 2a	COMPUESTO 22	13,8	12.800	8,59	1,96	0	0	Aditivo
HBeAg	IFN α 2a	COMPUESTO 22	10,24	10.740	0	0	0	0	Aditivo

*con un intervalo de confianza de 99,9 %

#determinado en un experimento separado anterior

Ejemplo 22

Combinación *in vitro* del Compuesto 22 y TAF

Meta del estudio

Determinar si una combinación de dos fármacos del compuesto **22** (un inhibidor de molécula pequeña de encapsulación de VHB que pertenece a la clase química de benzamida de sulfamoilo) y tenofovir (en la forma del profármaco tenofovir alafenamida, o TAF, análogo de nucleótido inhibidor de la polimerasa de VHB) es aditiva, sinérgica o antagonista *in vitro* mediante el uso de hepatocitos primarios humanos infectados con VHB en un sistema de modelo de cultivo celular.

Resultados y conclusión

El TAF (intervalo de concentración de 10,0 nM a 0,12 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con el compuesto **22** (intervalo de concentración de 5000 nM a 61,721 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). Se muestra la inhibición % promedio en ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, y la desviación estándar de 3 replicados observadas con los tratamientos del compuesto **22** o TAF por sí solos o de forma combinada en las Tablas 22a, 22b y 22c tal como se indica más adelante. Se determinaron los valores EC₅₀ de TAF y compuesto **22** en un experimento anterior y se muestran en la Tabla 22d; se observó un grado de varianza de lotes distintos de células de PHH.

Cuando los valores observados de una combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran aditivas, sin antagonismo (Tabla 22d) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992). No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo CCK8 en las muestras analizadas.

Tabla 22a: Efecto sobre el ADN de VHB en la Combinación *in vitro* del Compuesto 22 y TAF

[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	INHIBICIÓN % PROMEDIO
TAF (nM)							COMPUESTO 22 (nM)
10,00	50,21	60,62	59,41	66,66	65,77	71,26	-
3,33	40,16	51,09	48,53	60,14	55,25	70,85	
1,11	4,95	25,5	30,09	25,21	42,82	62,1	
0,37	-1,92	5,92	11,85	14,68	29,37	54,24	
0,12	-2,6	-5,22	5,12	11,67	36,5	52,5	
0,00	0	2,38	-3,33	8,01	27,98	54,66	
[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
TAF (nM)							COMPUESTO 22 (nM)
10,00	1,32	8,36	3,9	10,1	3,39	11,57	-
3,33	12,34	15,26	5,42	4,38	13,68	7,66	
1,11	25,38	8,61	20,31	18,26	6,64	11,33	
0,37	8,11	10,64	16,41	12,37	11,31	8,93	
0,12	3,28	6,41	13,44	11,64	0,94	10,76	
0,00	0,19	7,49	13,42	18,44	0,83	17,12	
[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	INHIBICIÓN ADITIVA
TAF (nM)							COMPUESTO 22 (nM)
10,00	50,21	51,4	48,55	54,2	64,14	77,43	-
3,33	40,16	41,58	38,17	44,95	56,9	72,87	
1,11	4,95	7,21	1,78	12,56	31,54	56,9	
0,37	-1,92	0,51	-5,31	6,24	26,6	53,79	
0,12	-2,6	-0,16	-6,02	5,62	26,11	53,48	
0,00	0	2,38	-3,33	8,01	27,98	54,66	
[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
TAF (nM)							Bonferroni Adj. 98%
10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA 8,07
3,33	0	0	0	0,77542	0	0	volumen log 1,84
1,11	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO 0
0,37	0	0	0	0	0	0	
0,12	0	0	0	0	7,29646	0	
0,00	0	0	0	0	0	0	volumen log 0

Tabla 22b: Efecto sobre el HBsAg en la Combinación *in vitro* del Compuesto 22 y TAF

[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	INHIBICIÓN % PROMEDIO
TAF (nM)							COMPUESTO 22 (nM)
10	7,97	3,97	21,33	7,89	24,84	38,54	
3,3333333	9,06	-6,48	16,7	16,53	24,27	44,07	
1,1111111	20,81	13,85	21,8	20,98	27,18	46,11	
0,3703704	10,78	-3,62	10,04	10,32	23,21	45,05	
0,1234568	29,82	19,99	14,56	21,8	21,67	48,57	
0	0	-0,32	2,37	-2,17	17,68	20,73	
[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
TAF (nM)							COMPUESTO 22 (nM)
10	5,77	2,84	10,6	6,45	2,33	6,64	
3,3333333	13,78	10,12	9,21	7,53	7,28	4,26	
1,1111111	5,53	6,36	15,1	9,66	4,2	2,72	
0,3703704	4,42	15,44	4,26	7,98	7,62	2,68	
0,1234568	3,67	4,25	4,49	3,91	8,82	1,51	
0	0,59	19,01	7,88	14,89	15,32	16,75	
[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	INHIBICIÓN ADITIVA
TAF (nM)							COMPUESTO 22 (nM)
10	7,97	7,68	10,15	5,97	24,24	27,05	
3,3333333	9,06	8,77	11,22	7,09	25,14	27,91	
1,1111111	20,81	20,56	22,69	19,09	34,81	37,23	
0,3703704	10,78	10,49	12,89	8,84	26,55	29,28	
0,1234568	29,82	29,6	31,48	28,3	42,23	44,37	
0	0	-0,32	2,37	-2,17	17,68	20,73	
[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
TAF (nM)							Bonferroni Adj. 98%
0							
10	0	0	0	0	0	0	SINERGIA 9,09
3,3333333	0	0	0	0	0	2,14034	volumen log 2,07
1,1111111	0	0	0	0	0	0	
0,3703704	0	0	0	0	0	6,95012	ANTAGONISMO -2,14
0,1234568	0	0	-2,1434	0	0	0	volumen log -0,49
0	0	0	0	0	0	0	

Tabla 22c: Efecto sobre el HBeAg en la Combinación *in vitro* del Compuesto 22 y TAF

5	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	INHIBICIÓN % PROMEDIO
	TAF (nM)							COMPUESTO 22 (nM)
	10,00	22,85	-0,79	17,72	8,41	23,95	42,03	-
	3,33	19,69	-14,8	8,11	3,2	24,12	36,2	
	1,11	22,56	1,31	15,81	20,43	22,71	49,56	
	0,37	9,9	-14,54	-2,63	10,7	21,6	42,03	
	0,12	26,61	17,84	15,03	21,04	26,27	50,3	
	0,00	0	-6,71	-12,41	-5,06	10,1	29,74	
10	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
	TAF (nM)							COMPUESTO 22 (nM)
	10,00	19,83	13,7	2,25	17,67	11,95	8,64	-
	3,33	9,59	13,32	15,74	3,59	14,71	9,54	
	1,11	8,99	14,21	16,19	10,78	1,53	2,78	
	0,37	5,26	34,36	16,86	12,05	12,45	7,4	
	0,12	4,71	14,39	8,61	5,08	4,18	4,19	
	0,00	0,63	20,55	10,69	17,17	20,78	11,65	
15	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	INHIBICIÓN ADITIVA
	TAF (nM)							COMPUESTO 22 (nM)
	10,00	22,85	17,67	13,28	18,95	30,64	45,79	-
	3,33	19,69	14,3	9,72	15,63	27,8	43,57	
	1,11	22,56	17,36	12,95	18,64	30,38	45,59	
	0,37	9,9	3,85	-1,28	5,34	19	36,7	
	0,12	26,61	21,69	17,5	22,9	34,02	48,44	
	0,00	0	-6,71	-12,41	-5,06	10,1	29,74	
20	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	TAF (nM)							Bonferroni Adj. 98%
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA 0
	3,33	0	0	0	-0,6153	0	0	volumen log 0
	1,11	0	0	0	0	-2,6348	0	ANTAGONISMO -3,25
	0,37	0	0	0	0	0	0	volumen log -0,74
	0,12	0	0	0	0	0	0	
	0,00	0	0	0	0	0	0	

Tabla 22d: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* del Compuesto 22 y TAF en el sistema de cultivo celular de PHH:

Criterio	de	Inhibidor	Inhibid	Inhibid	Volume	Volume	Volumen	Volumen	Conclusi
valoraci	Inhibid		or A	or B	n de	n log	de	log de	ón
ón del	or A	B	EC ₅₀	EC ₅₀	sinerg	de	antagonis	antagonis	ón
ensayo			(nM) #	(nM) #	ia (μM ²	sinerg	mo (μM ²	mo	
de VHB					%) *	ia	%) *		
ADN de	TAF	COMPUESTO	0,405	1020	8,07	1,84	0	0	Aditivo
HBV		22							
HBsAg	TAF	COMPUESTO	>100	12.800	9,09	2,07	-2,14	-0,49	Aditivo
		22							
HBeAg	TAF	COMPUESTO	>100	10.740	0	0	-3,25	-0,74	Aditivo
		22							

*con un intervalo de confianza de 99,9 %

#determinado en un experimento separado anterior

Ejemplo 23

Combinación *in vitro* de Compuesto 22 y Compuesto 25

Meta del estudio

Determinar si una combinación de dos fármacos del compuesto **22** (un inhibidor de molécula pequeña de encapsulación de VHB que pertenece a la clase química de benzamida de sulfamoilo) y compuesto **25** (un inhibidor de molécula pequeña de ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, que pertenece a la clase química de dihidroquinolizina) es aditivo, sinérgico o antagonista *in vitro* mediante el uso de hepatocitos primarios humanos infectados con VHB en un sistema de modelo de cultivo celular.

Resultados y conclusión

El Compuesto **25** (intervalo de concentración de 10,0 nM a 0,12 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con el compuesto **22** (intervalo de concentración de 5000 nM a 61,73 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). Se muestra la inhibición % promedio en ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, y la desviación estándar de 3 replicados observadas con los tratamientos del compuesto **25** o compuesto **22** por sí solos o de forma combinada en las Tablas 23a, 23b y 23c tal como se indica más adelante. Se determinaron los valores EC_{50} del compuesto **25** y compuesto **22** en un experimento anterior y se muestran en la Tabla 23d; se observó un grado de varianza de lotes distintos de células de PHH.

Cuando los valores observados de una combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran sinérgicas o aditivas, sin antagonismo (Tabla 23d) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992). No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo CCK8 en las muestras analizadas.

Tabla 23a: Efecto sobre el ADN de VHB en la Combinación *in vitro* del Compuesto 22 y Compuesto 25

5	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO
	COMPUESTO 25							COMPUESTO 22 (nM)
	(nM)							
	10,00	37,39	54,71	52,49	63,54	67,1	85,44	
	3,33	16,41	50,43	52,25	53,21	62,83	82,08	
	1,11	-19,21	32,08	42,5	41,58	57,56	80,93	
	0,37	-46,48	30,71	23,72	21,3	52,22	73,23	-
	0,12	-42,82	26,46	16,46	27,69	42,07	74,04	
	0,00	0	-11,75	-9,12	-12,7	17,94	63,06	
10	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
	COMPUESTO 25							COMPUESTO 22 (nM)
	(nM)							
	10,00	7,33	4,11	2,57	4,94	5,09	1,95	
	3,33	6,98	4,36	7,16	4,68	3,23	3,21	
	1,11	35,51	7,87	0,68	13,48	7,26	1,34	
	0,37	51,6	6,46	0,9	21	7,5	1,71	-
	0,12	21,05	7,83	6	5,3	0,16	2,16	
15	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN ADITIVA
	COMPUESTO 25							COMPUESTO 22 (nM)
	(nM)							
	10,00	37,39	30,03	31,68	29,44	48,62	76,87	
	3,33	16,41	6,59	8,79	5,79	31,41	69,12	
	1,11	-19,21	-33,22	-30,08	-34,35	2,18	55,96	
	0,37	-46,48	-63,69	-59,84	-65,08	-20,2	45,89	-
	0,12	-42,82	-59,6	-55,85	-60,96	-17,2	47,24	
20	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	COMPUESTO 25							Bonferroni Adj. 98%
	(nM)							
	10,00	0	11,154	12,3521	17,8425	1,72881	2,15255	SINERGIA 846,13
	3,33	0	29,4912	19,8964	32,0181	20,7901	2,39589	volumen log 192,62
	1,11	0	39,3998	70,3421	31,5673	31,4873	20,5601	
	0,37	0	73,1401	80,5981	17,269	47,7375	21,7124	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	60,2915	52,564	71,2077	58,7434	19,6914	volumen log 0
25	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	COMPUESTO 25							Bonferroni Adj. 98%
	(nM)							
	10,00	0	11,154	12,3521	17,8425	1,72881	2,15255	SINERGIA 846,13
	3,33	0	29,4912	19,8964	32,0181	20,7901	2,39589	volumen log 192,62
	1,11	0	39,3998	70,3421	31,5673	31,4873	20,5601	
	0,37	0	73,1401	80,5981	17,269	47,7375	21,7124	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	60,2915	52,564	71,2077	58,7434	19,6914	volumen log 0
30	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	COMPUESTO 25							Bonferroni Adj. 98%
	(nM)							
	10,00	0	11,154	12,3521	17,8425	1,72881	2,15255	SINERGIA 846,13
	3,33	0	29,4912	19,8964	32,0181	20,7901	2,39589	volumen log 192,62
	1,11	0	39,3998	70,3421	31,5673	31,4873	20,5601	
	0,37	0	73,1401	80,5981	17,269	47,7375	21,7124	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	60,2915	52,564	71,2077	58,7434	19,6914	volumen log 0

Tabla 23b: Efecto sobre el HBsAg en la Combinación *in vitro* del Compuesto 22 y Compuesto 25

5	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO
								COMPUESTO 22 (nM)
	10,00	42,95	47,96	44,95	47,05	56,23	64,25	
	3,33	20,81	33,92	29,53	31,58	44,61	49,94	
	1,11	26,4	29,53	17,24	26,62	40,43	49,49	
	0,37	12,93	20,99	10,45	16,99	34,42	42,55	
	0,12	9,32	13,24	11,87	15,52	33,87	42,69	-
	0,00	0	-9,16	-10,21	-3,82	20,61	30,96	
10	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
	COMPUESTO 25							COMPUESTO 22 (nM)
	(nM)							
	10,00	6,31	7,49	10,92	7,96	3,9	3,54	
	3,33	6,77	3,56	12,39	9,02	3,89	7,17	
	1,11	6,88	5,71	15,84	10,95	8,57	9,32	
	0,37	1,49	4,56	17,71	9,5	7,06	8,21	-
15	0,12	7,25	4,15	9,26	8,38	9,2	6,29	
	0,00	14,86	17,38	15,2	14,87	11,14	12,14	
20	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN ADITIVA
	COMPUESTO 25							COMPUESTO 22 (nM)
	(nM)							
	10,00	42,95	37,72	37,13	40,77	54,71	60,61	
	3,33	20,81	13,56	12,72	17,78	37,13	45,33	
	1,11	26,4	19,66	18,89	23,59	41,57	49,19	
	0,37	12,93	4,95	4,04	9,6	30,88	39,89	-
25	0,12	9,32	1,01	0,06	5,86	28,01	37,39	
	0,00	0	-9,16	-10,21	-3,82	20,61	30,96	
30	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
	COMPUESTO 25							Bonferroni Adj. 98%
	(nM)							
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA 9,68
	3,33	0	8,64404	0	0	0	0	volumen log 2,2
	1,11	0	0	0	0	0	0	
	0,37	0	1,03304	0	0	0	0	ANTAGONISMO 0
	0,12	0	0	0	0	0	0	volumen log 0
	0,00	0	0	0	0	0	0	

10

15

20

Tabla 23d: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* del Compuesto 22 y Compuesto 25 en el sistema de cultivo celular de PHH:

	Inhibido			Volumen		Volumen		Conclusión	
	Inhibido r A	r	Inhibido r A EC ₅₀ (nM) #	Inhibido r B EC ₅₀ (nM) #	de sinergi a (µM ² %)*	Volumen log de sinergi a	Volumen de antagonism o (µM ² %)*		Volumen log de antagonism o
ADN	COMPUEST	COMPUEST	0,6535	1020	846,13	19,62	0	0	Sinergia
de HBV	O 25	O 22							
HBsA	COMPUEST	COMPUEST	4,503	12.800	9,68	2,2	0	0	Aditivo
g	O 25	O 22							
HBeA	COMPUEST	COMPUEST	5,75	10.740	57,43	13,07	0	0	Sinergia
g	O 25	O 22							
*con un intervalo de confianza de 99,9 %									
#determinado en un experimento separado anterior									

Ejemplo 24

Combinación *in vitro* de IFNα2a y Compuesto 3

Meta del estudio

Determinar si una combinación de dos fármacos del compuesto **3** y el interferón alfa 2a pegilado (IFNα2a, citocina antiviral que activa las vías inmunitarias innatas en los hepatocitos) es aditiva, sinérgica o antagonista *in vitro* mediante el uso de hepatocitos primarios humanos infectados con VHB en un sistema de modelo de cultivo celular.

Resultados y conclusión

El FN α 2a (intervalo de concentración de 10,0 IU/mL a 0,123 IU/mL en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con el compuesto **3** (intervalo de concentración de 5000 nM a 61,73 nM en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). Se muestra la inhibición % promedio en ADN de VHB, HBsAg y HBeAg, y la desviación estándar de 3 replicados observadas con los tratamientos de IFN α 2a o compuesto **3** por sí solos o de forma combinada en las Tablas 24a, 24b y 24c tal como se indica más adelante. Se determinaron los valores EC₅₀ de IFN α 2a y compuesto **3** en un experimento anterior y se muestran en la Tabla 24d; se observó un grado de varianza de lotes distintos de células de PHH.

Cuando los valores observados de una combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran sinérgicas, sin antagonismo (Tabla 24d) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992). No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo CCK8 en las muestras analizadas.

Tabla 24a: Efecto sobre el ADN de VHB en la Combinación *in vitro* de IFN α 2a y Compuesto 3

[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO	
IFNα2a							COMPUESTO 3 (µM)	
IU/mL								
10,00	61,87	71,15	80,53	79,65	80,46	83,13		
3,33	59,88	65,87	74,49	76,8	84,91	87,1		
1,11	43,03	53,87	58,69	73,59	83,9	86,29		
0,37	38,46	40,68	50,62	61,26	79,98	87,96	-	
0,12	8,4	28,63	36,65	50,15	78,43	86,51		
0,00	0	-11,71	4,14	26,47	69,39	84,26		

[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)	
IFNα2a							COMPUESTO 3 (µM)	
IU/mL								
10,00	5,9	5,47	5,52	2,67	4,37	2,84		
3,33	5,53	2,04	2,64	4,62	3,33	1,29		
1,11	6,9	8,86	6,4	0,85	1,88	1,74		
0,37	4,9	5,86	4,86	5,2	2,07	0,96	-	
0,12	10,36	7,77	6,24	3,95	6,78	1,78		
0,00	15,33	3,13	10,75	14,76	3,99	2,26		

[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN ADITIVA	
IFNα2a							COMPUESTO 3 (µM)	
IU/mL								
10,00	61,87	57,4	63,45	71,96	88,33	94		
3,33	59,88	55,18	61,54	70,5	87,72	93,69		
1,11	43,03	36,36	45,39	58,11	82,56	91,03		
0,37	38,46	31,25	41,01	54,75	81,16	90,31	-	
0,12	8,4	-2,33	12,19	32,65	71,96	85,58		
0,00	0	-11,71	4,14	26,47	69,39	84,26		

[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
IFNα2a							Bonferroni Adj. 98%	
IU/mL								
10,00	0	0	0	0	0	-1,5236	SINERGIA 34,73	
3,33	0	3,97636	4,26176	0	0	-2,3446	volumen log 7,91	
1,11	0	0	0	12,6827	0	0		
0,37	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO -3,87	
0,12	0	5,38893	3,92416	4,50055	0	0	volumen log -0,88	
0,00	0	0	0	0	0	0		

Tabla 24b: Efecto sobre el HBsAg en la Combinación *in vitro* de IFN α 2a y Compuesto 3

5	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO	
	IFN α 2a							COMPUESTO 3 (μ M)	
	IU/mL								
	10,00	24,94	33,38	33,93	39,7	49,84	67,18		
	3,33	12,8	24,89	29,71	34,46	45,53	64,96		
	1,11	14,91	22,82	26,09	36,42	44,97	67,18		
	0,37	6,9	9,75	17,87	27,62	42,09	61,42		
	0,12	1,56	10,13	19,07	22,18	42,08	62,05		
10	0,00	0	-5,49	-1,46	4,63	22,4	51,86		
	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)	
	IFN α 2a							COMPUESTO 3 (μ M)	
	IU/mL								
	10,00	24,86	7,76	9,93	15,02	12,81	9,59		
	3,33	18,96	8,14	7,22	2,01	3,5	5,21		
	1,11	20,01	4,74	6,41	3,05	5,38	4,26		
	0,37	15,28	4,3	7,35	8,74	6,16	2,9		
15	0,12	16,47	3,75	5,07	7,78	7,65	6,59		
	0,00	20,27	8,81	11,41	18,39	12,21	10,78		
	[FÁRMACO]	0,00	61,73	185,19	555,56	1666,67	5000,00	INHIBICIÓN ADITIVA	
	IFN α 2a							COMPUESTO 3 (μ M)	
	IU/mL								
	10,00	24,94	20,82	23,84	28,42	41,75	63,87		
	3,33	12,8	8,01	11,53	16,84	32,33	58,02		
	1,11	14,91	10,24	13,67	18,85	33,97	59,04		
20	0,37	6,9	1,79	5,54	11,21	27,75	55,18		
	0,12	1,56	-3,84	0,12	6,12	23,61	52,61		
	0,00	0	-5,49	-1,46	4,63	22,4	51,86		
	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
	IFN α 2a							Bonferroni Adj. 98%	
	IU/mL								
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	24,11
	3,33	0	0	0	11,0051	1,6815	0	volumen log	5,49
25	1,11	0	0	0	7,53245	0	0		
	0,37	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO	0
	0,12	0	1,62875	2,26463	0	0	0	volumen log	0
	0,00	0	0	0	0	0	0		
30	[FÁRMACO]	0	61,728	185,19	555,56	1666,7	5000	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)	
	IFN α 2a							Bonferroni Adj. 98%	
	IU/mL								
	10,00	0	0	0	0	0	0	SINERGIA	24,11
	3,33	0	0	0	11,0051	1,6815	0	volumen log	5,49
	1,11	0	0	0	7,53245	0	0		
	0,37	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO	0
	0,12	0	1,62875	2,26463	0	0	0	volumen log	0
	0,00	0	0	0	0	0	0		

10

15

20

Tabla 24d: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* de IFN α 2a y Compuesto 3 en el sistema de cultivo celular de PHH:

Criterio	Inhibidor	Inhibidor	Inhibidor	Inhibidor	Volume	Volume	Volumen	Volumen	Conclusión
de	Inhibidor	Inhibidor	or A	or B	n de	n log	de	Volumen	
valoraci	or A	B	EC ₅₀	EC ₅₀	sinerg	de	antagonis	log de	
ón del	or A		(IU/mL)	(nM) #	ia	sinerg	mo (μ M ²	antagonis	ón
ensayo			#		(μ M ²	ia	%) *	mo	
de VHB					%) *				
ADN de	IFN α 2a	COMPUESTO	2,154	876,5	34,73	7,91	-3,87	-0,88	Sinergia
HBV		3							
HBsAg	IFN α 2a	COMPUESTO	13,8	7793	24,11	5,49	0	0	Sinergia
		3							
HBeAg	IFN α 2a	COMPUESTO	10,24	8580	103,04	23,46	0	0	Sinergia
		3							

*con un intervalo de confianza de 99,9 %

#determinado en un experimento separado anterior

Ejemplo 25

Combinación *in vitro* de TAF y SIRNA-NP

Meta del estudio

Determinar si dos combinaciones de fármacos de tenofovir (en forma del profármaco tenofovir alafenamida, o TAF, un inhibidor de análogo de nucleótido de la polimerasa de VHB) y **SIRNA-NP**, un ARNip destinado a facilitar la inactivación potente de todas las transcripciones de ARNip viral y antígenos virales, es aditivo, sinérgico o antagonista *in vitro* mediante el uso de un sistema de modelo de cultivo celular de VHB.

Protocolo experimental de combinación *in vitro* en HepDE19

Se llevaron a cabo estudios de combinación *in vitro* mediante el uso del método de Prichard y Shipman (1990) (Prichard MN, Shipman C, Jr. 1990. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. Antiviral Res 14:181-205 AND Prichard MN. 1992. MacSynergy II, University of Michigan). Se desarrolló la línea celular HepDE19 tal como se describe en Guo et ál. (2007) (Guo H, Jiang D, Zhou T, Cuconati A, Block TM, Guo JT. 2007. Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular ADN of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular ADN formation. J Virol 81:12472-12484). Es una línea celular de hepatoma humano transfectada de forma estable con el genoma de VHB, y que puede expresar ARN pregenómico de VHB y brindar soporte a la síntesis de ADNcr de VHB (ADN circular relajado) de una forma regulada por tetraciclina. Se colocaron células HepDE19 en placas de 96 pocillos de microtítulo tratadas con cultivo de tejido en medio DMEM/F12 suplementado con suero bovino fetal al 10 % + penicilina-estreptomicina al 1 % sin tetraciclina y se incubaron en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se cambiaron las células a medio nuevo y se trataron con el inhibidor A y el inhibidor B, a un intervalo de concentración cerca de sus valores EC₅₀ respectivos, y se incubaron durante 7 días en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 %. Los inhibidores se diluyeron en DMSO al 100 % (TAF) o medio de cultivo (**SIRNA-NP**) y la concentración final de DMSO en el ensayo fue ≥0,5 %. Los dos inhibidores se evaluaron de forma individual y de forma combinada en forma de tablero de ajedrez, de forma tal que cada concentración del inhibidor A se combinara con cada concentración del inhibidor B para determinar los efectos de su combinación sobre la inhibición de la producción de ADNcr. Luego de una incubación de 48 horas, se midió el nivel de ADNcr presente en los pocillos tratados con inhibidor mediante el uso de un ensayo de ADNb (Affymetrix) con un conjunto de sonda específico de VHB y las instrucciones del fabricante. Se

calcularon los datos de RLU generados a partir de cada pocillo como inhibición % de los pocillos de control sin tratar y se analizaron mediante el uso del programa MacSynergy II para determinar si las combinaciones fueron sinérgicas, aditivas o antagonistas mediante el uso de los lineamientos de interpretación establecidos por Prichard y Shipman de la siguiente manera: volúmenes de sinergia $<25 \mu\text{M}^2$ % (volumen log <2) a 95 % CI= probablemente insignificante; $25-50 \mu\text{M}^2$ % (volumen log >2 y <5) = menor pero significativo; $50-100 \mu\text{M}^2$ % (volumen log >5 y <9) = moderado, puede ser importante *in vivo*; mayor que $100 \mu\text{M}^2$ % (volumen log >9) = sinergia potente, probablemente importante *in vivo*; volúmenes cercanos a $1000 \mu\text{M}^2$ % (volumen log >90) = inusualmente elevado, revisar datos. Al mismo tiempo, se evaluó el efecto de las combinaciones inhibidoras sobre la viabilidad celular mediante el uso de placas de replicación que se utilizaron para determinar el contenido de ATP como medición de la viabilidad celular mediante el uso del reactivo Cell-TiterGlo (Promega) según las instrucciones del fabricante.

Resultados y conclusión

El TAF (intervalo de concentración de $200,0 \text{ nM}$ a $0,781 \text{ nM}$ en una dilución en serie de 2 veces y titulación en 9 puntos) se evaluó junto con **SIRNA-NP** (intervalo de concentración de 60 ng/mL a $0,741 \text{ ng/mL}$ en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos). La inhibición % promedio de ADNcr y desviaciones estándar de 4 replicados observadas con los tratamientos de TAF o SIRNA-NP por sí solos o de forma combinada se muestra en la Tabla 25A. Los valores de EC_{50} de TAF y **SIRNA-NP** se muestran en la Tabla 25B. Cuando los valores observados de una combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva (Tabla 25A) para el intervalo de concentración que antecede, se halló que las combinaciones eran aditivas, sin antagonismo (Tabla 25B) según el análisis MacSynergy II

y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992). No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo Cell-TiterGlo en las muestras analizadas.

Tabla 25A: Combinación *in vitro* de Tenofovir alafenamida y SIRNA-NP

[FÁRMAC O]	0	0,781	1,563	3,125	6,25	12,50	25,00	50,00	100,00	200,00	INHIBICIÓN % PROMEDIO
SIRNA- NP (ng/mL)	TAF (nM)										
60	98,1 9	98,66	98,73	98,87	99,3 3	99,41	99,4	99,5	99,58	99,59	
20,000	96,4 2	95,42	96,67	97,25	98,0 9	98,71	98,41	98,86	99,28	99,49	
6,667	88,0 2	88,65	91,24	91,67	94,4	95,11	95,04	95,97	98,26	98,98	
2,222	80,1 8	72,86	78,16	81,28	82,7	87,98	87,09	91,03	95,81	98,08	—
0,741	53,0 5	55,46	55,43	62,01	63,6 5	78,75	72,62	82,47	90,47	96,24	
0	0	-4,76	3,49	0,6	10,5 9	28,61	20,04	53,2	77,59	89,93	

10

15

202530

Tabla 25B: Resumen de resultados de los estudios de combinación *in vitro* en el sistema de cultivo celular DE19 con cuantificación de ADNcr mediante el uso del ensayo ADNb:

Inhibidor	Inhibidor	Inhibidor	Inhibidor	Volumen	Volumen	Volumen de	Volumen log	
A	B	A EC ₅₀	B EC ₅₀	de	log de	antagonismo	de	Conclusión
		(ng/mL)	(nM)	sinergia	sinergia	(μM^2 %)*	antagonismo	
				(μM^2 %)*				
SIRNA-NP	TAF	0,624	44,52	6,26	0,9	0	0	Aditivo

*con un intervalo de confianza de 99,9 %

Ejemplo 26

Combinación *in vitro* del Compuesto 3 y GLS4

Meta del estudio

Determinar si una combinación de dos fármacos del compuesto **3** (un inhibidor de molécula pequeña de encapsulación de VHB que pertenece a la clase química de benzamida de sulfamoilo) y GLS4 (un inhibidor de molécula pequeña de encapsulación de VHB que pertenece a la clase química de heteroarildihidropirimidina, o HAP) es aditivo, sinérgico o antagonista *in vitro* mediante el uso de un sistema de modelo de cultivo celular de VHB.

Protocolo experimental de combinación *in vitro* en HepDE19

Se llevaron a cabo estudios de combinación *in vitro* mediante el uso del método de Prichard y Shipman (1990). Se desarrolló la línea celular HepDE19 tal como se describe en Guo et ál. (2007). Es una línea celular de hepatoma humano transfectada de forma estable con el genoma de VHB, y que puede expresar ARN pregenómico de VHB y brindar soporte a la síntesis de ADNcr de VHB (ADN circular relajado) de una

forma regulada por tetraciclina. Se colocaron células HepDE19 en placas de 96 pocillos de microtítulo tratadas con cultivo de tejido en medio DMEM/F12 suplementado con suero bovino fetal al 10 % + penicilina-estreptomicina al 1 % sin tetraciclina y se incubaron en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se cambiaron las células a medio nuevo y se trataron con el inhibidor A y el inhibidor B, a un intervalo de concentración cerca de sus valores EC₅₀ respectivos, y se incubaron durante 7 días en una incubadora humedecida a 37 °C y CO₂ al 5 %. Ambos inhibidores se diluyeron en DMSO al 100 % y la concentración final de DMSO en el ensayo fue ≥0,5 %. Los dos inhibidores se evaluaron de forma individual y de forma combinada en forma de tablero de ajedrez, de forma tal que cada concentración del inhibidor A se combinara con cada concentración del inhibidor B para determinar los efectos de su combinación sobre la inhibición de la producción de ADNcr. Luego de una incubación de 48 horas, se midió el nivel de ADNcr presente en los pocillos tratados con inhibidor mediante el uso de un ensayo de ADNb (Affymetrix) con un conjunto de sonda específico de VHB y las instrucciones del fabricante. Los datos de RLU generados a partir de cada pocillo se calcularon como % de inhibición de los pocillos de control sin tratar y se analizaron mediante el uso del programa MacSynergy II para determinar si las combinaciones eran sinérgicas, aditivas o antagónicas mediante el uso de las guías de interpretación establecidas por Prichard y Shipman de la siguiente forma: volúmenes de sinergia <25 μM^2 % (volumen log <2) a 95 % CI= probablemente insignificante; 25-50 μM^2 % (volumen log >2 y <5) = menor pero significativo 50-100 μM^2 % (volumen log >5 y <9) = moderado, puede ser importante *in vivo*; mayor que 100 μM^2 % (volumen log >9) = sinergia potente, probablemente importante *in vivo*; volúmenes cercanos a 1000 μM^2 % (volumen log >90) = inusualmente elevado, revisar datos. Al mismo tiempo, se evaluó el efecto de las combinaciones inhibidoras sobre la viabilidad celular mediante el uso de placas de replicación

que se utilizaron para determinar el contenido de ATP como medición de la viabilidad celular mediante el uso del reactivo Cell-TiterGlo (Promega) según las instrucciones del fabricante.

5 Resultados y conclusión

El Compuesto **3** (intervalo de concentración de 3,0 μ M a 0,04 μ M en una dilución en serie de 3 veces y titulación en 5 puntos) se evaluó junto con GLS4 (intervalo de concentración de 2,0 μ M a 0,008 μ M en una dilución en serie de 2 veces y titulación en 9 puntos). La inhibición % promedio de ADNcr y desviaciones estándar de 4 replicados observadas con los tratamientos de Compuesto **3** o GLS4 por sí solos o de forma combinada se muestra en la Tabla 26a. Los valores EC₅₀ del Compuesto **3** y GLS4 se muestran en la Tabla 26b. Cuando los valores observados de la combinación de dos inhibidores se compararon con lo que se espera de la interacción aditiva (Tabla 26a) para el intervalo de concentración que antecede, se halló que la combinación era aditiva en gran medida y muy ligeramente antagonista (Tabla 26b) según el análisis MacSynergy II y mediante el uso de los criterios de interpretación descritos anteriormente por Prichard y Shipman (1992), el grado de antagonismo es menor pero significativo. No se observó una inhibición significativa de la viabilidad o proliferación celular mediante microscopía o ensayo Cell-TiterGlo en las muestras analizadas.

Tabla 26a: Combinación *in vitro* del Compuesto 3 y GLS4

[FÁRMACO]	0	0,008	0,016	0,031	0,063	0,125	0,250	0,500	1,000	2,000	INHIBICIÓN % PROMEDIO										
COMPUESTO 3											GLS-4 (µM)										
µM																					
3,000												94,49	94,6	93,75	93,69	93,74	93,46	91,72	96,86	97	98,08
1,000												86,87	85,25	87,63	86,08	84,96	87,22	92,9	96,99	97,48	97,01
0,330												56,68	56,86	55,08	58,52	73,47	81,88	93,03	97,63	97,52	95,96
0,110												19,99	13,03	18,43	23,81	53,91	74,43	95,32	97,65	97,52	98,12
0,040												11,14	-4,48	-1,03	14,94	28,97	73,14	93,01	97,99	97,76	97,47
0,000												0	-1,17	-5,82	7,03	38,95	77,82	94,65	97,48	98,51	98,22
[FÁRMACO]	0	0,007813	0,01563	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)										
COMPUESTO 3											GLS-4 (µM)										
µM																					
3												1,29	1,34	1,38	0,33	0,71	0,37	1,37	0,57	0,95	1,25
1,000												3,95	5,47	1,98	1,54	3,07	2,38	0,89	0,56	0,8	1,43
0,330												6,93	11,7	7,92	5,09	4,36	5,69	1,6	0,73	1,02	2,33
0,110												15,95	12,76	10,23	4,24	14,05	5,6	1,61	0,83	0,72	0,31
0,040												22,92	26,91	6,36	31,59	16,09	5,54	1,82	0,68	0,72	0,31
0												0	17,17	15,42	15,34	10,95	6,65	1,39	1,47	0,59	0,35
[FÁRMACO]	0	0,007813	0,01563	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	INHIBICIÓN ADITIVA										
COMPUESTO 3											GLS-4 (µM)										
µM																					
3												94,49	94,43	94,17	94,88	96,64	98,78	99,71	99,86	99,92	99,9
1,000												86,87	86,72	86,11	87,79	91,98	97,09	99,3	99,67	99,8	99,77
0,330												56,68	56,17	54,16	59,73	73,55	90,39	97,68	98,91	99,35	99,23
0,110												19,99	19,05	15,33	25,61	51,15	82,25	95,72	97,98	98,81	98,58
0,040												11,14	10,1	5,97	17,39	45,75	80,29	95,25	97,76	98,68	98,42
0												0	-1,17	-5,82	7,03	38,95	77,82	94,65	97,48	98,51	98,22

[FÁRMACO]	0	0,00781	0,01563	0,0312	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	GRÁFICA DE SINERGIA (95%)
		3		5	5						
COMPUESTO											Bonferroni
3											Adj.
μM											-
3	0	0	0	-0,543	1,508	4,594	5,304	1,882	1,058	0	SINERGIA
1,000	0	0	0	0	1,002	5,205	4,655	1,582	0,752	0	volumen log
0,330	0	0	0	0	0	0	1,514	0	0	0	
0,110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO
0,040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	volumen log
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,342	-4,13
[FÁRMACO]	0	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	GRÁFICA DE SINERGIA (99,9 %)
COMPUESTO											Bonferroni
3											Adj.
μM											96 %
3,0	0	0	0	-0,103	-0,563	4,102	3,481	1,124	0	0	SINERGIA
1,000	0	0	0	0	0	2,037	3,471	0,837	0	0	volumen log
0,330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ANTAGONISMO
0,040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	volumen log
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-15,72
											-2,17

Tabla 26b: Resumen de resultados de los estudios de combinación in vitro en el sistema de cultivo celular DE19 con cuantificación de ADNcr mediante el uso del ensayo ADNb:

Inhibido	Inhibido	Inhibido	Inhibido	Volumen	Volumen	Volumen	Volumen	Conclusión
r A	r B	r A EC ₅₀	r B EC ₅₀	de	log de	Volumen de	log de	
		(μ M)	(μ M)	sinergi	sinergi	antagonism	antagonism	
				a (μ M ²	a	o (μ M ² %)*	o	
				%) *				
Compuest	GLS4	0,272	0,077	0	0	-15,72	-2,17	Aditivo*
o 3								
Compuest	GLS4	0,272	0,077	0	0	-29,95	-4,13	Antagonismo
o 3								menor#
*con un intervalo de confianza de 99,9 %								
#con un intervalo de confianza de 95 %								

Todas las publicaciones, patentes y documentos de patente se incorporan mediante esta referencia a la presente, tal como si se hubieran incorporado mediante referencia de forma individual. La invención se ha descrito con referencia a varias modalidades y técnicas específicas y preferidas. No obstante, debería entenderse que pueden realizarse muchas variaciones y modificaciones a la vez que se mantiene dentro del espíritu y alcance de la invención.