

MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIÓN DE HEPATITIS B

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente solicitud se refiere a oligonucleótidos y usos de los mismos, particularmente a usos relacionados al tratamiento de infección de hepatitis B.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La infección Crónica por Virus de Hepatitis B (HBV, por sus siglas en inglés) es una causa significativa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Las terapias actuales de HBV, tales como análogos de nucleósido requieren terapia de por vida para reducir la viremia en plasma, y generalmente son ineficaces a largo plazo. La cura funcional de la HBV crónica ha sido tradicionalmente el mejor resultado del tratamiento. La tecnología de ARN de interferencia (ARNi)
15 ofrece el potencial de intervenir farmacológicamente.

 Las proteínas de la envoltente exterior son conocidas colectivamente como antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg). El HBsAg consiste en tres polipéptidos relacionados llamados S, M, y L codificados por marcos de lectura abierta de superposición (ORF). La proteína de envoltente más pequeña es S con 226 aminoácidos, llamada la S-ORF. La M y L se producen desde
20 sitios de inicio de traducción en la dirección 5' y agregan 55 y 108 aminoácidos, respectivamente, a la S. Las glucoproteínas S, M, y L de HBV se encuentran en la envoltente viral de viriones de HBV infecciosos, intactos, llamados partículas de Dane, y los tres se producen y secretan en un vasto exceso que forma partículas esféricas y filamentosas subvirales no infecciosas (ambas referidas como partículas señuelo) encontradas en la sangre de pacientes con HBV crónica. Se cree que la
25 abundancia de HBsAg en la superficie de las partículas señuelo inhibe la inmunidad humoral y la eliminación espontánea en pacientes con infección crónica de HBV (CHB).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30 Los aspectos de la descripción se refieren a composiciones mejoradas a base de oligonucleótidos y a métodos relacionados para el tratamiento de infección de HBV en un sujeto. En algunas modalidades, la descripción se refiere al desarrollo de oligonucleótidos potentes que producen una reducción de la expresión (knockdown) duradera de la expresión del antígeno de superficie de HBV (HBsAg). El oligonucleótido induce el reconocimiento mediado por el ARN de
35 interferencia (ARNi) y la destrucción del ARNm que codifica todas las formas de HBsAg en los

hepatocitos. Esto incluye la proteína traducida de ARNs virales transcritos tanto de ADNccc como de ADN de HBV que ha sido integrado dentro del genoma anfitrión. En la presente se proporcionan oligonucleótidos diseñados para dirigirse a un conjunto expansivo de transcritos de HBsAg codificados por genomas de HBV a través de todos los genotipos conocidos. En algunas modalidades, se ha encontrado que los oligonucleótidos descritos en la presente que se dirigen a transcritos de HBsAg en hepatocitos pueden producir una reducción estable en la expresión de HBsAg con alta especificidad que persiste por un periodo de tiempo extendido (por ejemplo, mayor que 7 semanas a varios meses) después de la administración a un sujeto (Véase, por ejemplo, los Ejemplos 1 y 3). En algunas modalidades, se ha descubierto que el direccionamiento de la expresión de HBsAg utilizando los oligonucleótidos descritos en la presente resulta en la reducción de ARN pre-genómico (ARNpg) y otros intermediarios del ciclo de vida viral. También se ha encontrado que ciertos oligonucleótidos de ARNi descritos en la presente pueden reducir la expresión de los transcritos de ARNm de HBsAg que se originan de cualquiera de ADNccc o virus integrado. En aspectos adicionales, se ha descubierto que el direccionamiento de la expresión de HBsAg utilizando los oligonucleótidos descritos en la presente reduce la expresión de todas las proteínas de HBV (con la excepción de HBx), a saber HBcAg, HBeAg, y HBV Polimerasa, resultando en la retención citosólica de la proteína de núcleo de HBV. Así mismo, en algunas modalidades, la eliminación del HBsAg circulante que resulta de la reducción de la expresión del ARNm utilizando los métodos proporcionados en la presente es ventajosa clínicamente porque habilita la ruptura de la tolerancia inmune al HBV provocada por los altos niveles de HBsAg circulante en pacientes con CHB. Se cree que la reactivación de la actividad del sistema inmune contra la infección de HBV es una piedra angular del logro de la cura funcional, definida como la seroeliminación permanente del HBsAg.

Trabajo previo ha indicado que el uso de una combinación de agentes de ARNi que se dirigen a múltiples diferentes genes de HBV (a saber, los genes S, C, P, y X), o en algunos casos que se dirigen solo a transcritos del gen X, logra la inhibición eficaz de la replicación y la expresión génica del HBV. Sin embargo, los resultados proporcionados en la presente demuestran que el uso de oligonucleótidos de ARNi que se dirigen solo a los transcritos de HBsAg también logra la inhibición eficaz de la replicación y expresión génica del HBV, lo que proporciona un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento de infecciones de HBV. Además del efecto directo de silenciar los ARNs virales, los precursores de HSB(s)-219 previenen la localización nuclear del Antígeno de Núcleo de HBV (HBcAg). De manera importante, el direccionamiento a HBV-X o ambos genes simultáneamente no previene la localización nuclear del HBcAg. Los datos preclínicos sugieren fuertemente que la inhibición de la localización de núcleo nuclear provocada por la terapia de ARNi de que se dirige a S resulta en una duración mejorada significativamente de la supresión de HBsAg. Notablemente, la falta de localización nuclear de HBcAg en pacientes ha demostrado correlacionarse con respuestas

favorables a la terapia antiviral.

Algunos aspectos de la presente descripción proporcionan oligonucleótidos para reducir la expresión del ARNm del antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg), el oligonucleótido comprende una cadena antisentido de 19 a 30 nucleótidos de longitud, en donde la

5 cadena antisentido comprende una región de complementariedad a una secuencia de ARNm de HBsAg como se establece en ACAANAAUCCUCACAAUA (SEQ ID NO: 1).

En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende además una cadena sentido de 19 a 50 nucleótidos de longitud, en donde la cadena sentido forma una región dúplex con la cadena antisentido. En algunas modalidades, la cadena sentido comprende una región de

10 complementariedad a una secuencia como se establece en UUNUUGUGAGGAUUN (SEQ ID NO: 2). En algunas modalidades, la cadena sentido comprende una región de complementariedad a una secuencia como se establece en 5'-UUAUUGUGAGGAUUNUUGUC (SEQ ID NO: 3).

En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende una secuencia como se establece en UUAUUGUGAGGAUUNUUGUCGG (SEQ ID NO: 4). En algunas modalidades, la cadena

15 antisentido consiste en una secuencia como se establece en UUAUUGUGAGGAUUCUUGUCGG (SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, la cadena antisentido consiste en una secuencia como se establece en UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG (SEQ ID NO: 5.1).

En algunas modalidades, la cadena sentido comprende una secuencia como se establece en ACAANAAUCCUCACAAUAA (SEQ ID NO: 6). En algunas modalidades, la cadena sentido

20 comprende una secuencia como se establece en GACAANAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 7). En algunas modalidades, la cadena sentido consiste en una secuencia como se establece en GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 8). En algunas modalidades, la cadena sentido consiste en una secuencia como se establece en GACAAGAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 8.1).

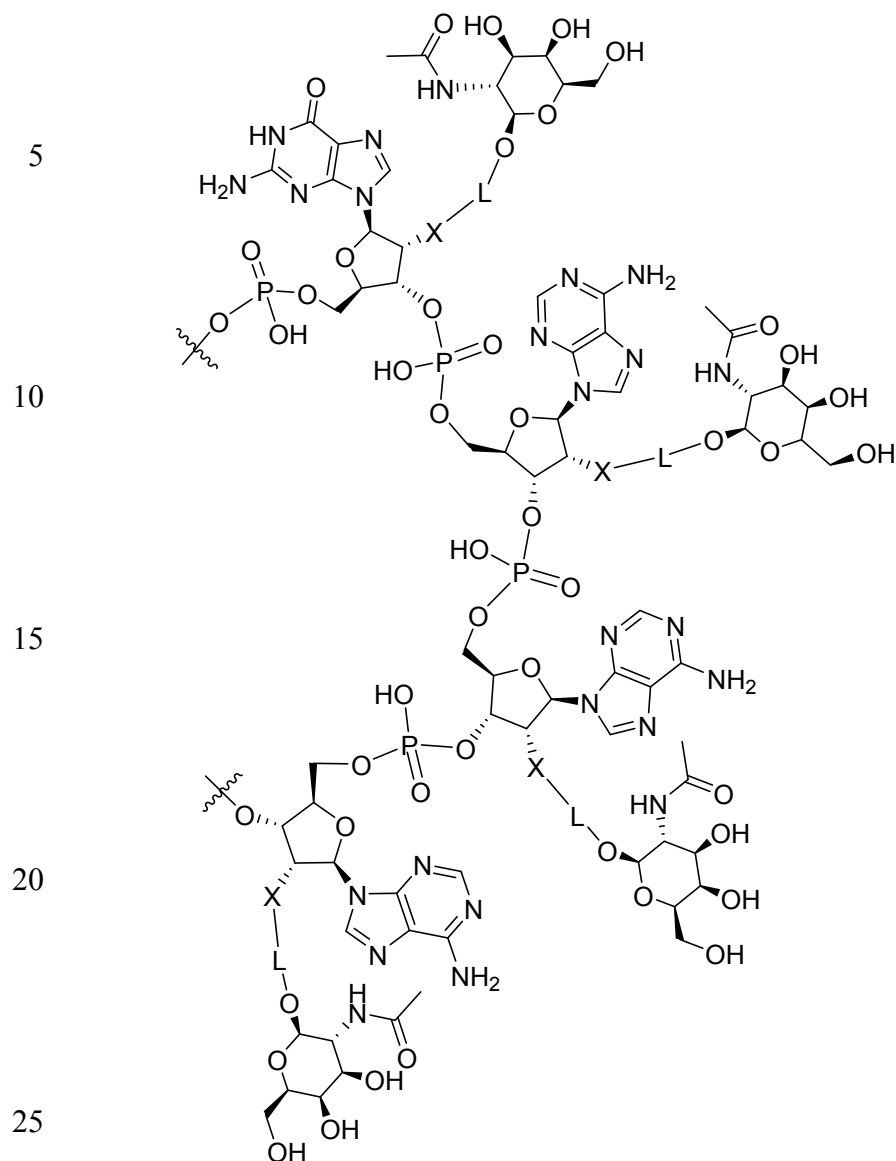
Otros aspectos de la presente descripción proporcionan oligonucleótidos para la reducción de la expresión de ARNm de antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg), el oligonucleótido comprende una cadena sentido que forma una región dúplex con una cadena

25 antisentido, en donde la cadena sentido comprende una secuencia como se establece en GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 8), en donde la cadena antisentido comprende una secuencia como se establece en UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG (SEQ ID NO: 5.1), en donde cada una de la cadena antisentido y la cadena sentido comprende uno o más nucleótidos modificados con 2'-fluoro y 2'-O-metilo y por lo menos un enlace fosforotioato, en donde el 4'-carbono del azúcar del 5'-nucleótido de la cadena antisentido comprende un análogo de fosfato, y en donde la cadena sentido está conjugada a una o más porciones de N-acetilgalactosamina (GalNAc).

30

Además se proporcionan en la presente oligonucleótidos para la reducción de la

35



en donde:

- 30 L representa un enlace, manejo de química-click, o un enlazador de 1 a 20 átomos de longitud unidos covalentemente, inclusivos, consecutivos, seleccionado del grupo que consiste en alquileo sustituido y no sustituido, alquenileno sustituido y no sustituido, alquinileno sustituido y no sustituido, heteroalquileo sustituido y no sustituido, heteroalquenileno sustituido y no sustituido, heteroalquinileno sustituido y no sustituido, y
- 35 combinaciones de los mismos; y

X es un O, S, o N.

En algunas modalidades, L es un enlazador de acetal. En algunas modalidades, X es

O.

En algunas modalidades, la secuencia –GAAA– comprende la estructura:

5

10

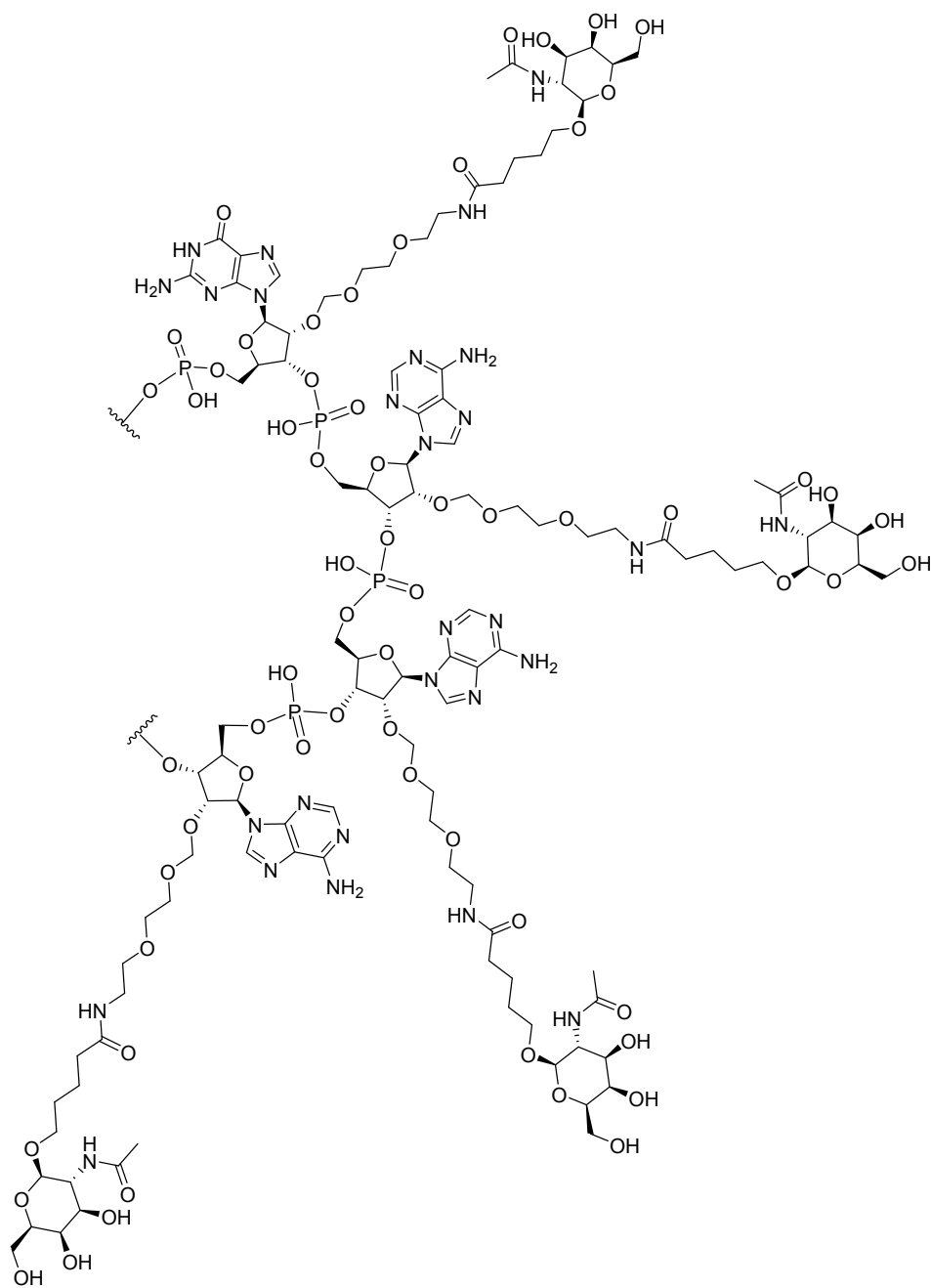
15

20

25

30

35



En algunas modalidades, la cadena sentido comprende en su extremo 3' un tallo-bucle establecido como: S_1 -L- S_2 , en donde S_1 es complementario a S_2 , y en donde L forma un bucle entre S_1 y S_2 de hasta 6 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, L es un tetrabucle. En algunas modalidades, L forma un bucle entre S_1 y S_2 de 4 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, L comprende una secuencia establecida como GAAA. En algunas modalidades, cada uno de hasta 4 nucleótidos de L del tallo-bucle está conjugado a un GalNAc separado.

En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende por lo menos un nucleótido modificado. En algunas modalidades, el nucleótido modificado comprende una modificación 2'. En algunas modalidades, la modificación 2' es una modificación seleccionada de: 2'-aminoetilo, 2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo, y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro- β -d-arabinonucleico. En algunas modalidades, todos los nucleótidos del oligonucleótido son nucleótidos modificados. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende por lo menos un enlace internucleótido modificado. En algunas modalidades, el por lo menos un enlace internucleótido modificado es un enlace fosforotioato. El 4'-carbono del azúcar del 5'-nucleótido de la cadena antisentido comprende un análogo de fosfato.

En algunas modalidades, por lo menos un nucleótido del oligonucleótido está conjugado a un ligando de direccionamiento. En algunas modalidades, el ligando de direccionamiento es una porción de N-acetilgalactosamina (GalNAc).

Además se proporcionan en la presente composiciones que comprenden un oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un contraión, y composiciones que comprenden un oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un portador farmacéuticamente aceptable.

Otros aspectos de la presente descripción proporcionan métodos para la reducción de la expresión del antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBV) en una célula, el método comprende suministrar a la célula un oligonucleótido descrito en la presente. En algunas modalidades, la célula es un hepatocito. En algunas modalidades, la célula está *in vivo*. En algunas modalidades, la célula está *in vitro*.

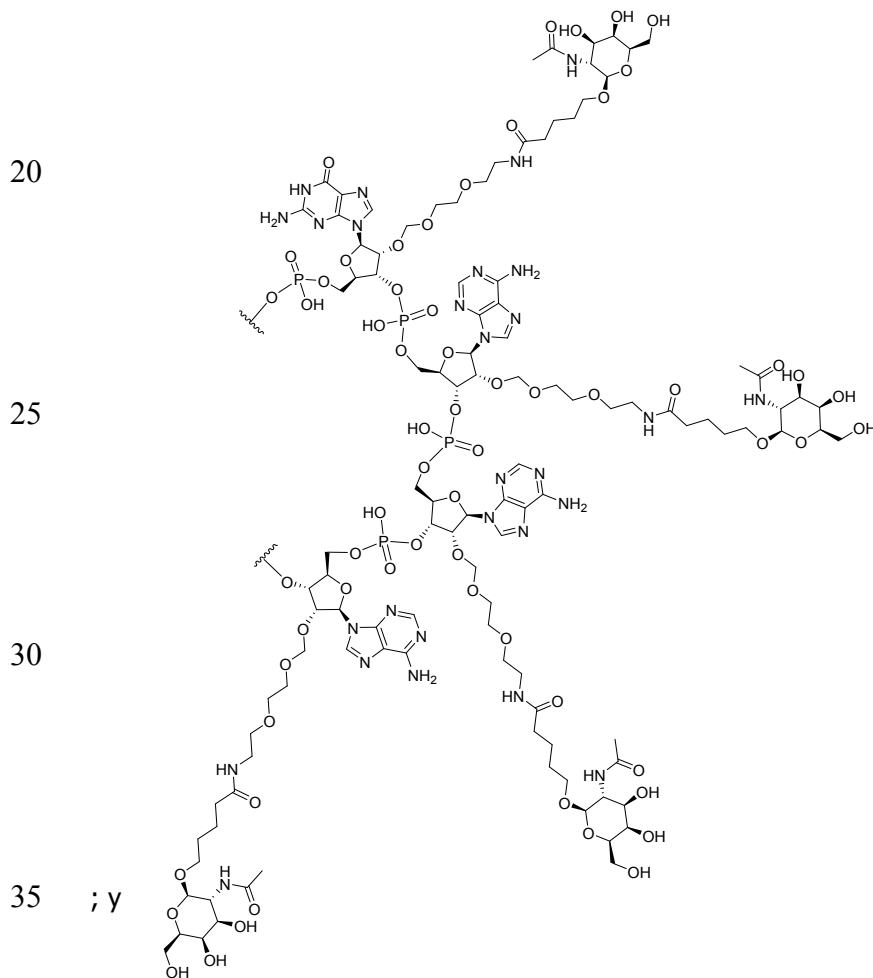
Otros aspectos de la presente descripción proporcionan métodos de tratamiento de una infección de virus de hepatitis B (HBV) en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un oligonucleótido de o una composición descrita en la presente.

También se proporcionan métodos de tratamiento de la infección de HBV en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un oligonucleótido de ARNi que se dirige selectivamente al ARNm de HBsAg, en donde el oligonucleótido de ARNi se administra en la ausencia de tratamiento con un oligonucleótido de ARNi que se dirige a un antígeno no de superficie que codifica al transcrito de ARNm de HBV. También se proporcionan métodos de tratamiento de la

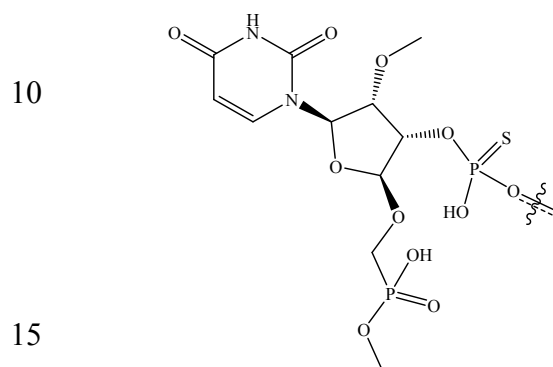
infección de HBV en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un oligonucleótido de ARNi que se dirige selectivamente al ARNm de HBsAg, en donde el sujeto no es administrado con un oligonucleótido de ARNi que se dirige selectivamente al transcrito de ARNm de HBxAg. En algunas modalidades, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de Entecavir.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona oligonucleótidos para la reducción de la expresión de ARNm de antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg), el oligonucleótido comprende una cadena sentido que forma una región dúplex con una cadena antisentido, en donde:

La cadena sentido comprende una secuencia como se establece en GACAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 8) y comprende nucleótidos modificados con 2'-fluoro en las posiciones 3, 8-10, 12, 13, y 17, nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-26, y 31-36, y un enlace fosforotioato internucleótido entre los nucleótidos en las posiciones 1 y 2, en donde cada uno de los nucleótidos de la secuencia –GAAA– en la cadena sentido está conjugado a una porción de GalNac monovalente, en donde la secuencia –GAAA– comprende la estructura:



la cadena antisentido comprende una secuencia como se establece en UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG (SEQ ID NO: 5.1) y comprende nucleótidos modificados con 2'-fluoro en las posiciones 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16, y 19, nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, y 20-22, y cinco enlaces fosforotioato internucleótidos entre los nucleótidos 1 y 2, 2 y 3, 3 y 4, 20 y 21, y 21 y 22, en donde el 4'-carbono del azúcar del 5'-nucleótido de la cadena antisentido tiene la siguiente estructura:



También se proporciona una composición que comprende el oligonucleótido. En algunas modalidades, la composición comprende además contraiones Na⁺.

También se proporcionan métodos para la reducción de la expresión de antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBV) en una célula, el método comprende suministrar el oligonucleótido o la composición. En algunas modalidades, la célula es un hepatocito. En algunas modalidades, la célula está *in vivo*. En algunas modalidades, la célula está *in vitro*.

Se proporcionan métodos de tratamiento de una infección de virus de hepatitis B (HBV) en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto el oligonucleótido o la composición. En algunas modalidades, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de Entecavir.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y que constituyen una parte de esta especificación, ilustran ciertas modalidades, y junto con la descripción escrita, sirven para proporcionar ejemplos no limitantes de ciertos aspectos de las composiciones y métodos descritos en la presente.

La Figura 1 muestra un ejemplo de un sitio objetivo de ARNi en una representación

esquemática de la organización del genoma de HBV.

La Figura 2 muestra la evaluación de la dosis única de un oligonucleótido para la reducción de la expresión de HBsAg en ratones HDI.

La Figura 3 es una representación gráfica de niveles de HBsAg en plasma con el tiempo durante un régimen de dosificación especificado con un oligonucleótido que se dirige a HBsAg. Como se muestra en este ejemplo, el oligonucleótido demostró potencia preclínica y mantuvo niveles disminuidos mucho después del periodo de dosificación.

La Figura 4 muestra gráficos que representan los resultados del mapeo de HBsAg en células HeLa utilizando un ensayo de reportero. Una posición 254 de direccionamiento de ARNsi sin modificar del genoma de HBV fue utilizado como un control positivo a las concentraciones especificadas. Un ARNsi Silencer disponible comercialmente de Thermo Fisher sirvió como el control negativo para estos experimentos. Las barras de error representan el SEM.

La Figura 5 muestra una comparación de la conservación del genotipo que muestra que el mal apareamiento diseñado en el oligonucleótido que se dirige a HBsAg, HBV-219, aumenta la cobertura a través de los genotipos de HBV.

La Figura 6 ilustra un vector diseñado para ensayos de reportero de psiCHECK2 utilizando el Genotipo A de HBV como una secuencia prototipo.

La Figura 7 muestra muchos ejemplos de oligonucleótidos diseñados para evaluar los efectos de introducir malos apareamientos. Las secuencias de oligonucleótidos para las cadenas madre y mal apareadas se muestran alineadas y con posiciones mal apareadas en cuadros. Las secuencias de reportero correspondientes utilizadas en los ensayos de reportero de psiCHECK2 se representan adicionalmente.

La Figura 8 muestra un gráfico de titulación de dosis única para un oligonucleótido evaluado en estudios de mal apareamiento, que demuestra que un mal apareamiento en la cadena guía es tolerado *in vivo*.

La Figura 9 muestra un gráfico de titulación de dosis *in vivo* que demuestra que la incorporación de un mal apareamiento en un oligonucleótido que se dirige a HBsAg no afecta adversamente la potencia *in vivo*.

La Figura 10 muestra un ejemplo de un oligonucleótido que se dirige a HBsAg (HBV(s)-219) con modificaciones químicas y en forma dúplex. La sombra más oscura indica el 2'-O-metil ribonucleótido. La sombra más clara indica 2'-fluoro-desoxiribonucleótido.

La Figura 11A representa los resultados de la tinción inmunohistoquímica que detecta la distribución subcelular del antígeno de núcleo de HBV (HBcAg) en hepatocitos.

La Figura 11B representa resultados del secuenciamiento de ARN que mapean las secuencias de transcrito de ARN detectado contra el ARNpg de HBV.

La Figura 12A representa un transcurso de tiempo de la expresión de ARNm de HBsAg después del tratamiento con el precursor del oligonucleótido HBV(s)-219, HBV(s)-219P2, que se dirige al ARNm de HBsAg en comparación con control de vehículo y un oligonucleótido de ARNi que se dirige a ARNm de HBxAg en un modelo de inyección hidrodinámica (HDI) de HBV.

5 La Figura 12B representa un transcurso de tiempo de la expresión de ARNm de HBsAg después de tratamiento con el precursor de oligonucleótido HBV(s)-219, HBV(s)-219P2, que se dirige a ARNm de HBsAg en comparación con control de vehículo y un oligonucleótido de ARNi que se dirige a ARNm de HBxAg en un modelo de AAV-HBV.

10 La Figura 13 muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica que muestran la distribución subcelular de HBcAg en hepatocitos obtenidos del modelo de AAV-HBV y modelo de HDI de HBV después del tratamiento con el oligonucleótido HBV(s)-219 que se dirige a ARNm de HBsAg comparado con control de vehículo y un oligonucleótido de ARNi que se dirige a ARNm de HBxAg (GalXC-HBVX).

15 Las Figuras 14A a 14D muestran la actividad antiviral del precursor 1 de HBV(s)-219, (HBV(s)-219 P1), en un modelo de PXB-HBV. Cohortes de 9 ratones recibieron 3 dosis semanales de cualquiera de 0 o 3 mg/kg de HBV(s)-219P1 en PBS, administradas subcutáneamente. Seis ratones de cada cohorte se analizaron por sangrados de mejilla mandibular no terminal en cada uno de los puntos de tiempo indicados (Figuras 14A y 14B) para HBsAg en suero y ADN de HBV en suero. En el día 28 (iniciando de la primera dosis de HBV(s)-219P1), todos los ratones restantes fueron eutanizados y se recolectaron biopsias de hígado para ADN de HBV hepático (Figura 14C) y ADNccc hepático (Figura 14D) por RT-qPCR.

20 Las Figuras 15A a 15C muestran que el precursor 2 de HBV(s)-219, (HBV(s)-219P2) potencia la actividad antiviral de entecavir. En un modelo de inyección hidrodinámica de ratón de HBV (HDI), una dosis única de HBV(s)-219P2 fue administrada a ratones subcutáneamente en el Día 1 seguido por dosificación oral diaria de 500 ng/kg de Entecavir (ETV) por 14 días. La carga viral circulante (ADN de HBV) fue medida por qPCR (Figura 15A). El nivel de HBsAg en plasma fue medido por ELISA (Figura 15B). Los niveles de ARNm y ARNpg de HBV fueron medidos por qPCR (Figura 15C). Los resultados muestran efectos aditivos claros con la terapia de combinación. La terapia de ETV sola no muestra eficacia contra el HBsAg circulante o ARNs virales hepáticos. La actividad antiviral de HBV(s)-219P2 según se mide por HBsAb o ARN de HBV no es impactada por codosificación de ETV. "BL0D" significa "debajo del límite de detección."

35 Las Figuras 16A a 16B muestran una comparación de la actividad de supresión de HBsAg oligonucleótido conjugado a GalNac que se dirige al antígeno S (HBV(s)-219P2) o el antígeno X (designado GalXC-HBVX). El resultado muestra que el HBVS-219P2 suprime el HBsAg por una duración más larga que GalXC-HBVX o una combinación equimolar de ambos Agentes de ARNi. La

Figura 16A muestra que la ubicación del sitio objetivo de ARNi en el genoma de HBV afecta la cinética de recuperación de HBsAg en ratones que expresan HBV. La Figura 16B muestra el nivel de HBsAg en plasma 2 semanas post-dosis (panel izquierdo) y 9 semanas post-dosis (panel derecho), indicando que el direccionamiento a la región codificante de HBVX, ya sea solo o en combinación con HBV(s)-219P2, resulta en una duración más corta de la actividad. Se mostraron datos de animales individuales. Muchos puntos de datos (círculos grises más claros) estuvieron debajo del límite de detección.

Las Figuras 17A a 17C muestran la ubicación subcelular del antígeno de núcleo de HBV (HBcAg) en ratones que expresan HBV tratados con HBV(s)-219P2, GalXC-HBVX o una combinación 1:1. La Figura 17A muestra hepatocitos representativos en secciones de hígado obtenidas en las semanas 1, 2, 6, 9, y 13 post-administración y teñidas para HBcAg. La Figura 17B muestra el porcentaje de células positivas a HBcAg con tinción nuclear en cada animal (n=3/grupo, 50 células contadas por animal, 2 semanas después de la dosificación). Se diseñaron secuencias alternativas y se probaron dirigiéndolas dentro de los marcos de lectura abiertos de X y S. La Figura 17C muestra la distribución subcelular de HBcAg en hepatocitos obtenidos en las semanas 2, 3, y 9 post-administración de un oligo ARNi alternativo que se dirige a cualquiera del antígeno S y el antígeno X.

La Figura 18 muestra la dosis por información de cohorte para un estudio diseñado para evaluar la seguridad y tolerancia de HBV(s)-219 en pacientes sanos y la eficacia terapéutica de HBV(s)-219 en pacientes con HBV.

Las Figuras 19A a 19B muestran la estructura química de HBV(s)-219 y HBV(s)-219P2. (Figura 19A) Estructura Química para HBV(s)-219. (Figura 19B) Estructura Química para HBV(s)-219P2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con algunos aspectos, la descripción proporciona oligonucleótidos potentes que son eficaces para la reducción de la expresión de HBsAg en células, particularmente células hepáticas (por ejemplo, hepatocitos) para el tratamiento de infecciones de HBV. En ciertas modalidades, los oligonucleótidos que se dirigen a HBsAg proporcionados en la presente son diseñados para el suministro a células seleccionadas de tejidos objetivo (*por ejemplo*, hepatocitos hepáticos) para tratar infección de HBV en esos tejidos. En consecuencia, en aspectos relacionados, la descripción proporciona métodos de tratamiento de infección de HBV que involucran reducir selectivamente la expresión del gen de antígeno de superficie de HBV en células (por ejemplo, células del hígado).

Aspectos adicionales de la descripción, incluyendo una descripción de términos

definidos, se proporcionan a continuación.

I. Definiciones

Aproximadamente: Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" o "cerca de," como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas modalidades, el término "aproximadamente" o "cerca de" se refiere a un intervalo de valores que cae dentro de 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos en cualquier dirección (mayor que o menor que) del valor de referencia establecido a menos que se establezca de otro modo o que sea evidente de otro modo a partir del contexto (excepto donde tal número pudiera exceder 100% de un valor posible).

Administración: Como se usa en la presente, los términos "administrar" o "administración" significan proporcionar una sustancia (*por ejemplo*, un oligonucleótido) a un sujeto en una manera que es farmacológicamente útil (*por ejemplo*, para tratar una condición en el sujeto).

Receptor de Asialoglucoproteína (ASGPR): Como se usa en la presente, el término "receptor de Asialoglucoproteína" o "ASGPR" se refiere a una lectina bipartita tipo C formada por una subunidad mayor de 48 kDa (ASGPR-1) y una menor de 40 kDa (ASGPR-2). El ASGPR se expresa principalmente en la superficie sinusoidal de las células de hepatocito y tiene un papel principal en la unión, internalización, y subsecuente eliminación de las glucoproteínas circulantes que contienen residuos de galactosa o N-acetilgalactosamina terminales (asialoglucoproteínas).

Complementario: Como se usa en la presente, el término "complementario" se refiere a una relación estructural entre dos nucleótidos (*por ejemplo*, en dos ácidos nucleicos opuestos o en regiones opuestas de una cadena simple de ácidos nucleicos), o entre dos secuencias de nucleótidos, lo que permite a los dos nucleótidos, o dos secuencias de nucleótidos, formar pares de bases entre sí. Por ejemplo, un nucleótido purina de un ácido nucleico que es complementario a un nucleótido pirimidina de un ácido nucleico opuesto pueden aparear bases al formar enlaces de hidrógeno entre sí. En algunas modalidades, los nucleótidos complementarios pueden formar pares de bases en la manera de Watson-Crick o en cualquier otra manera que permita la formación de dúplexes estables. En algunas modalidades, dos ácidos nucleicos pueden tener regiones de múltiples nucleótidos que son complementarias entre sí a modo de formar regiones de complementariedad, como se describe en la presente.

Desoxirribonucleótido: Como se usa en la presente, el término "desoxirribonucleótido" se refiere a un nucleótido que tiene un hidrógeno en lugar de un hidroxilo en la posición 2' de su azúcar pentosa en comparación con un ribonucleótido. Un desoxirribonucleótido modificado es un desoxirribonucleótido que tiene una o más modificaciones o sustituciones de

átomos distintos que en la posición 2', incluyendo modificaciones o sustituciones en o del azúcar, grupo fosfato o base.

Oligonucleótido de cadena doble: Como se usa en la presente, el término "oligonucleótido de cadena doble" se refiere a un oligonucleótido que sustancialmente está en una forma dúplex. En algunas modalidades, el apareamiento de bases complementarias de la(s) región(es) dúplex de un oligonucleótido de cadena doble se forma entre secuencias de nucleótidos antiparalelas de cadenas de ácidos nucleicos separadas covalentemente. En algunas modalidades, el apareamiento de bases complementarias de la(s) región(es) dúplex de un oligonucleótido de cadena doble se forma entre secuencias de nucleótidos antiparalelas de cadenas de ácidos nucleicos que están enlazadas covalentemente. En algunas modalidades, el apareamiento de bases complementarias de la(s) región(es) dúplex de un oligonucleótido de cadena doble se forma de una cadena simple de ácidos nucleicos que se pliega (*por ejemplo*, vía una horquilla) para proporcionar secuencias de nucleótidos antiparalelas complementarias que aparean las bases en conjunto. En algunas modalidades, un oligonucleótido de cadena doble comprende dos cadenas de ácidos nucleicos separadas covalentemente que están completamente duplexadas entre sí. Sin embargo, en algunas modalidades, un oligonucleótido de cadena doble comprende dos cadenas de ácidos nucleicos separadas covalentemente que están parcialmente duplexadas, *por ejemplo*, que tienen colgantes en uno o ambos extremos. En algunas modalidades, un oligonucleótido de cadena doble comprende secuencias de nucleótidos antiparalelas que son parcialmente complementarias, y por lo tanto, pueden tener uno o más malos apareamientos, lo que puede incluir malos apareamientos internos o malos apareamientos de extremos.

Dúplex: Como se usa en la presente, el término "dúplex," en referencia a ácidos nucleicos (*por ejemplo*, oligonucleótidos), se refiere a una estructura formada a través del apareamiento de bases complementarias de dos secuencias de nucleótidos antiparalelas.

Excipiente: Como se usa en la presente, el término "excipiente" se refiere a un agente no terapéutico que puede estar incluido en una composición, *por ejemplo*, para proporcionar o contribuir a una consistencia o efecto de estabilización deseados.

Hepatocito: Como se usa en la presente, el término "hepatocito" o "hepatocitos" se refiere a células de los tejidos parenquimales del hígado. Estas células conforman aproximadamente 70-85% de la masa hepática y fabrican la albúmina de suero, fibrinógeno, y el grupo protrombina de los factores de coagulación (excepto por los Factores 3 y 4). Los marcadores de las células de linaje de hepatocito pueden incluir, pero no se limitan a: transtiretina (Ttr), glutamina sintetasa (Glut), factor 1a nuclear de hepatocito (Hnf1a), y factor 4a nuclear de hepatocito (Hnf4a). Los marcadores para hepatocitos maduros pueden incluir, pero no se limitan a: citocromo P450 (Cyp3a11), fumarilacetoacetato hidrolasa (Fah), glucosa 6-fosfato (G6p), albúmina (Alb), y OC2-2F8. Véase, *por*

ejemplo, Huch *et al.*, (2013), Nature, 494(7436): 247-250, cuyo contenido que se relaciona a marcadores de hepatocito se incorpora en la presente para referencia.

Virus de Hepatitis B: Como se usa en la presente, el término "Virus de Hepatitis B" o "HBV" se refiere a un virus de ADN pequeño que pertenece a la familia *Hepadnaviridae* y se clasifica como el tipo de especies del género *Orthohepadnavirus*. Las partículas del virus de HBV (viriones) comprenden una envoltura lipídica exterior y un núcleo de nucleocápside icosaédrico compuesto de proteína. El nucleocápside generalmente encierra el ADN viral y una ADN polimerasa que tiene actividad de transcriptasa inversa similar a los retrovirus. La envoltura exterior del HBV contiene proteínas incorporadas que están involucradas en la unión viral de, y entrada a, células susceptibles. El HBV, que ataca al hígado, ha sido clasificado de acuerdo con por lo menos diez genotipos (A a J) con base en la secuencia. En general, existen cuatro genes codificados por el genoma, cuyos genes son referidos como C, P, S, y X. La proteína de núcleo es codificada por el gen C (HBcAg), y su codón de inicio es precedido por un codón de inicio AUG en marco en la dirección 5' desde el cual se produce la proteína pre-núcleo. El HBeAg es producido por el procesamiento proteolítico de la proteína pre-núcleo. La ADN polimerasa es codificada por el gen P. El gen S codifica el antígeno de superficie (HBsAg). El gen de HBsAg es un marco de lectura abierto largo pero contiene tres codones de "inicio" (ATG) en marco que dividen el gen en tres secciones, pre-S1, pre-S2, y S. Debido a los múltiples codones de inicio, se producen polipéptidos de tres tamaños diferentes llamados grande, mediano, y pequeño (pre-S1 + pre-S2 + S, pre-S2 + S, o S). Estos pueden tener una proporción de 1:1:4 (Heermann et al, 1984).

Las proteínas del Virus de Hepatitis B (HBV) pueden ser organizadas en muchas categorías y funciones. Las polimerasas funcionan como una transcriptasa inversa (RT) para formar ADN viral de ARN pregenómico (ARNpg), y también como una polimerasa dependiente de ADN para formar ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) de ADN viral. Ellas se unen covalentemente al extremo 5' de la cadena menor. Las proteínas de núcleo forman el cápside viral y el antígeno E secretado. Los antígenos de superficie son los ligandos de internalización de hepatocitos, y también el componente principal de las partículas esféricas y filamentosas avirales. Las partículas avirales son producidas >1000 veces sobre las partículas de Dane (viriones infecciosos) y pueden actuar como señuelos inmunes.

Antígeno de Superficie del Virus de Hepatitis B: Como se usa en la presente, el término "antígeno de superficie del virus de hepatitis B" o "HBsAg" se refiere a una proteína de dominio de S codificada por el gen S (por ejemplo, ORF S) de un genoma de HBV. Las partículas del virus de hepatitis B portan ácido nucleico viral en las partículas de núcleo encerradas por tres proteínas codificadas por el gen S, que son las proteínas de superficie grande, de superficie media, y de superficie principal. Entre estas proteínas, la proteína de superficie principal tiene generalmente

cerca de 226 aminoácidos y contiene solo el dominio de S.

Infección: Como se usa en la presente, el término "infección" se refiere a la invasión y/o expansión patogénica de microorganismos, tales como virus, en un sujeto. Una infección puede ser lisogénica, por ejemplo, en la que el ADN viral queda latente dentro de una célula.

5 Alternativamente, una infección puede ser lítica, por ejemplo, en la que los virus proliferan activamente y provocan la destrucción de las células infectadas. Una infección puede o no puede provocar síntomas clínicamente evidentes. Una infección puede permanecer localizada, o se puede extender, por ejemplo, a través de la sangre o el sistema linfático de un sujeto. Un individuo que tiene, por ejemplo, una infección de HBV, puede ser identificada al detectar uno o más de carga

10 viral, antígeno de superficie (HBsAg), antígeno e (HBeAg), y varios otros ensayos para la detección de la infección de HBV conocidos en la técnica. Los ensayos para la detección de la infección de HBV pueden involucrar la prueba de muestras de suero o sangre para la presencia de HBsAg y/o HBeAg, y opcionalmente investigar además la presencia de uno o más anticuerpos virales (por ejemplo, IgM y/o IgG) para compensar cualesquier periodos en el que un antígeno de HBV puede estar a un nivel

15 no detectable.

Inflamación del hígado: Como se usa en la presente, el término "inflamación del hígado" o "hepatitis" se refiere a una condición física en la que el hígado se torna hinchado, disfuncional, y/o con dolor, especialmente como un resultado de lesión o infección, ya que puede ser provocada por exposición a un agente hepatotóxico. Los síntomas pueden incluir ictericia

20 (amarillamiento de la piel o los ojos), fatiga, debilidad, náusea, vómito, reducción del apetito, y pérdida de peso. La inflamación del hígado, si se deja sin tratar, puede progresar a fibrosis, cirrosis, falla hepática, o cáncer de hígado.

Fibrosis hepática: Como se usa en la presente, el término "fibrosis hepática" o "fibrosis del hígado" se refiere a una acumulación excesiva en el hígado de proteínas de matriz

25 extracelular, que pudieran incluir colágenos (I, III, y IV), fibronectina, undulina, elastina, laminina, hialuronano, y proteoglicanos que resultan de la inflamación y muerte de las células hepáticas. La fibrosis hepática, si se deja sin tratar, puede progresar a cirrosis, falla hepática, o cáncer de hígado.

Bucle: Como se usa en la presente, el término "bucle" se refiere a una región no apareada de un ácido nucleico (*por ejemplo*, oligonucleótido) que está flanqueada por dos regiones

30 antiparalelas del ácido nucleico que son suficientemente complementarias entre sí, de modo que bajo condiciones apropiadas de hibridación (*por ejemplo*, en un regulador de fosfato, en unas células), las dos regiones antiparalelas, que flanquean la región no apareada, se hibridan para formar un dúplex (referido como un "tallo").

Enlace internucleótido modificado: Como se usa en la presente, el término "enlace internucleótido modificado" se refiere a un enlace internucleótido que tiene una o más

35

modificaciones químicas en comparación con un enlace internucleótido de referencia que comprende un enlace fosfodiéster. En algunas modalidades, un nucleótido modificado es un enlace que no existe naturalmente. Típicamente, un enlace internucleótido modificado confiere una o más propiedades deseables a un ácido nucleico en el que está presente el enlace internucleótido modificado. Por ejemplo, un nucleótido modificado puede mejorar la estabilidad térmica, resistencia a la degradación, resistencia a nucleasa, solubilidad, biodisponibilidad, bioactividad, reducción de inmunogenicidad, *etc.*

Nucleótido modificado: Como se usa en la presente, el término "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que tiene una o más modificaciones químicas en comparación con un nucleótido de referencia correspondiente seleccionado de: ribonucleótido de adenina, ribonucleótido de guanina, ribonucleótido de citosina, ribonucleótido de uracilo, desoxirribonucleótido de adenina, desoxirribonucleótido de guanina, desoxirribonucleótido de citosina, y desoxirribonucleótido de timidina. En algunas modalidades, un nucleótido modificado es un nucleótido que no existe naturalmente. En algunas modalidades, un nucleótido modificado tiene una o más modificaciones químicas en su grupo azúcar, nucleobase y/o fosfato. En algunas modalidades, un nucleótido modificado tiene una o más porciones químicas conjugadas a un nucleótido de referencia correspondiente. Típicamente, un nucleótido modificado confiere una o más propiedades deseables a un ácido nucleico en el que está presente el nucleótido modificado. Por ejemplo, un nucleótido modificado puede mejorar la estabilidad térmica, resistencia a la degradación, resistencia a nucleasa, solubilidad, biodisponibilidad, bioactividad, reducción de inmunogenicidad, *etc.*

Estructura de Tetrabucle con Muecas: Una "estructura de tetrabucle con muescas" es una estructura de un oligonucleótido de ARNi caracterizada por la presencia de cadenas sentido (pasajera) y antisentido (guía) separadas, en las que la cadena sentido tiene una región de complementariedad con la cadena antisentido, y en las que por lo menos una de las cadenas, generalmente la cadena sentido, tiene un tetrabucle configurado para estabilizar una región de tallo adyacente formada dentro de la por lo menos una cadena.

Oligonucleótido: Como se usa en la presente, el término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico corto, *por ejemplo*, de menos de 100 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido puede ser de cadena simple o de cadena doble. Un oligonucleótido puede o no puede tener regiones dúplex. Como un conjunto de ejemplos no limitantes, un oligonucleótido puede ser, pero no se limita a, un ARN de interferencia pequeño (ARNsi), microARN (miRNA), ARN de horquilla corta (ARNsh), ARN de interferencia de sustrato dicer (ARNdsi), oligonucleótido antisentido, ARNsi corto, o siRNA de cadena simple. En algunas modalidades, un oligonucleótido de cadena doble es un oligonucleótido de ARNi.

Colgante: Como se usa en la presente, el término "colgante" se refiere a nucleótido(s) de apareamiento no de bases terminales que resulta de una cadena o región que se extiende más allá del término de una cadena complementaria con la que la una cadena o región forma un dúplex. En algunas modalidades, un colgante comprende uno o más nucleótidos no
 5 apareados que se extienden desde una región dúplex en el término 5' o término 3' de un oligonucleótido de cadena doble. En ciertas modalidades, el colgante es un colgante de 3' o 5' en la cadena antisentido o cadena sentido de un oligonucleótido de cadena doble.

Análogo de fosfato: Como se usa en la presente, el término "análogo de fosfato" se refiere a una porción química que imita las propiedades electrostáticas y/o estéricas de un grupo
 10 fosfato. En algunas modalidades, un análogo de fosfato está posicionado en el nucleótido 5' terminal de un oligonucleótido en lugar de un 5'-fosfato, que a menudo es susceptible de eliminación enzimática. En algunas modalidades, un análogo de 5' fosfato contiene un enlace resistente a fosfatasa. Ejemplos de análogos de fosfato incluyen 5' fosfonatos, tal como 5' metilfosfonato (5'-MP) y 5'-(E)-vinilfosfonato (5'-VP). En algunas modalidades, un oligonucleótido tiene un análogo de
 15 fosfato en una posición 4'-carbono del azúcar (referido como un "análogo de 4'-fosfato") en un nucleótido 5'-terminal. Un ejemplo de un análogo de 4'-fosfato es oximetilfosfonato, en el que el átomo de oxígeno del grupo oximetilo se une a la porción azúcar (*por ejemplo*, en su 4'-carbono) o análogo del mismo. Véase, por ejemplo, las Solicitudes Provisionales de E.U.A. números 62/383,207, presentadas el 2 de septiembre de 2016, y 62/393,401, presentada el 12 de septiembre de 2016,
 20 cuyo contenido de cada una relacionado a los análogos de fosfato se incorpora en la presente para referencia. Otras modificaciones han sido desarrolladas para el extremo 5' de oligonucleótidos (véase, *por ejemplo*, WO 2011/133871; Patente de E.U.A. No. 8,927,513; y Prakash *et al.* (2015), Nucleic Acids Res., 43(6):2993-3011, cuyo contenido de cada una relacionado a los análogos de fosfato se incorpora en la presente para referencia).

Reducción de la expresión: Como se usa en la presente, el término "reducción de la expresión" de un gen se refiere a una disminución en la cantidad de transcrito de ARN o proteína
 25 codificada por el gen y/o una disminución en la cantidad de actividad del gen en una célula o sujeto, en comparación con una célula o sujeto de referencia apropiado. Por ejemplo, el acto de tratar una célula con un oligonucleótido de cadena doble (*por ejemplo*, uno que tiene una cadena antisentido
 30 que es complementaria a una secuencia de ARNm de HBsAg) puede resultar en una disminución en la cantidad de transcrito de ARN, proteína y/o actividad enzimática (*por ejemplo*, codificada por el gen S de un genoma de HBV) en comparación con una célula que no es tratada con el oligonucleótido de cadena doble. De manera similar, "reducir la expresión" como se usa en la presente se refiere a un acto que resulta en la reducción de la expresión de un gen (*por ejemplo*, el
 35 gen S de un genoma de HBV).

Región de complementariedad: Como se usa en la presente, el término "región de complementariedad" se refiere a una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico (*por ejemplo*, un oligonucleótido de cadena doble) que es suficientemente complementario a una secuencia de nucleótidos antiparalela para permitir la hibridación entre las dos secuencias de nucleótidos bajo condiciones apropiadas de hibridación, *por ejemplo*, en un regulador de fosfato, en una célula, *etc.*

Ribonucleótido: Como se usa en la presente, el término "ribonucleótido" se refiere a un nucleótido que tiene una ribosa como su azúcar pentosa, que contiene un grupo hidroxilo en su posición 2'. Un ribonucleótido modificado es un ribonucleótido que tiene una o más modificaciones o sustituciones de átomos distintas que en la posición 2', incluyendo modificaciones o sustituciones en o de la ribosa, grupo fosfato o base.

Oligonucleótido de ARNi: Como se usa en la presente, el término "oligonucleótido de ARNi" se refiere a cualquiera de (a) un oligonucleótido de cadena doble que tiene una cadena sentido (pasajera) y cadena antisentido (guía), en las que la cadena antisentido o parte de la cadena antisentido es usada por la Argonauta 2 (Ago2) endonucleasa en la disociación de un ARNm objetivo o (b) un oligonucleótido de cadena simple que tiene una cadena antisentido simple, donde esa cadena antisentido (o parte de esa cadena antisentido) es usada por la Ago2 endonucleasa en la disociación de un ARNm objetivo.

Cadena: Como se usa en la presente, el término "cadena" se refiere a una secuencia contigua simple de nucleótidos enlazados juntos a través de enlaces internucleótido (*por ejemplo*, enlaces fosfodiéster, enlaces fosforotioato). En algunas modalidades, una cadena tiene dos extremos libres, *por ejemplo*, un extremo 5' y un extremo 3'.

Sujeto: Como se usa en la presente, el término "sujeto" significa cualquier mamífero, incluyendo ratones, conejos, y humanos. En una modalidad, el sujeto es un humano o primate no humano. Los términos "individuo" o "paciente" pueden ser utilizados de manera intercambiable con "sujeto."

Sintético: Como se usa en la presente, el término "sintético" se refiere a un ácido nucleico u otra molécula que es sintetizada artificialmente (*por ejemplo*, utilizando una máquina (*por ejemplo*, un sintetizador de ácido nucleico de estado sólido)) o que de otro modo no se deriva de una fuente natural (*por ejemplo*, una célula u organismo) que normalmente produce la molécula.

Ligando de direccionamiento: Como se usa en la presente, el término "ligando de direccionamiento" se refiere a una molécula (*por ejemplo*, un carbohidrato, amino azúcar, colesterol, polipéptido o lípido) que se une selectivamente a una molécula cognada (*por ejemplo*, un receptor) de un tejido o célula de interés y que es conjugable a otra sustancia para los fines de dirigir la otra sustancia al tejido o célula de interés. Por ejemplo, en algunas modalidades, un ligando de direccionamiento puede ser conjugado a un oligonucleótido para los fines de dirigir el oligonucleótido

a un tejido o célula específicos de interés. En algunas modalidades, un ligando de direccionamiento se une selectivamente a un receptor de la superficie celular. En consecuencia, en algunas modalidades, un ligando de direccionamiento cuando se conjuga a un oligonucleótido facilita el suministro del oligonucleótido en una célula particular a través de la unión selectiva a un receptor expresado en la superficie de la célula y la internalización endosomal por la célula del complejo que comprende el oligonucleótido, ligando de direccionamiento y receptor. En algunas modalidades, un ligando de direccionamiento está conjugado a un oligonucleótido vía un enlazador que es disociado después o durante la internalización celular de modo que el oligonucleótido es liberado del ligando de direccionamiento en la célula.

10 Tetrabucle: Como se usa en la presente, el término "tetrabucle" se refiere a un bucle que aumenta la estabilidad de un dúplex adyacente formado por hibridación de secuencias de nucleótidos flanqueantes. El aumento en la estabilidad es detectable como un aumento en la temperatura de fusión (T_m) de un dúplex de tallo adyacente que es mayor que la T_m del dúplex de tallo adyacente esperada, en promedio, de un conjunto de bucles de longitud comparable que consisten en secuencias de nucleótidos seleccionadas aleatoriamente. Por ejemplo, un tetrabucle puede conferir una temperatura de fusión de por lo menos 50 °C, por lo menos 55 °C, por lo menos 56 °C, por lo menos 58 °C, por lo menos 60 °C, por lo menos 65 °C o por lo menos 75 °C en NaHPO₄ 10 mM a una horquilla que comprende un dúplex de por lo menos 2 pares de bases de longitud. En algunas modalidades, un tetrabucle puede estabilizar un par de bases en un dúplex de tallo adyacente por interacciones de apilamiento. Además, las interacciones entre los nucleótidos en un tetrabucle incluyen pero no se limitan a apareamiento de bases no de Watson-Crick, interacciones de apilamiento, enlaces de hidrógeno, e interacciones de contacto (Cheong *et al.*, Nature 1990 Aug. 16; 346(6285):680-2; Heus and Pardi, Science 1991 Jul. 12; 253(5016):191-4). En algunas modalidades, un tetrabucle comprende 4 a 5 nucleótidos. En ciertas modalidades, un tetrabucle comprende o consiste en tres, cuatro, cinco, o seis nucleótidos, que pueden o no pueden estar modificados (*por ejemplo*, que pueden o no pueden estar conjugados a una porción de direccionamiento). En una modalidad, un tetrabucle consiste en cuatro nucleótidos. Se puede utilizar cualquier nucleótido en el tetrabucle y se pueden utilizar los símbolos de IUPAC-IUB estándar para tales nucleótidos como se describe en Cornish-Bowden (1985) Nucl. Acids Res. 13: 3021-3030. Por ejemplo, la letra "N" se puede usar para dar a entender que cualquier base puede estar en esa posición, la letra "R" se puede usar para mostrar que A (adenina) o G (guanina) puede estar en esa posición, y "B" se puede usar para mostrar que C (citocina), G (guanina), o T (timina) puede estar en esa posición. Ejemplos de tetrabucles incluyen la familia de tetrabucles de UNCG (*por ejemplo*, UUCG), la familia de tetrabucles de GNRA (*por ejemplo*, GAAA), y el tetrabucle CUUG (Woese *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1990 November; 87(21):8467-71; Antao *et al.*, Nucleic Acids Res. 1991 Nov.

11; 19(21):5901-5). Ejemplos de tetrabucles de ADN incluyen la familia de tetrabucles de d(GNNA) (*por ejemplo*, d(GTTA)), la familia de tetrabucles de d(GNRA), la familia de tetrabucles de d(GNAB), la familia de tetrabucles de d(CNNG), y la familia de tetrabucles de d(TNCG) (*por ejemplo*, d(TTCG)). Véase, por ejemplo: Nakano *et al.* Biochemistry, 41 (48), 14281-14292, 2002. SHINJI *et al.* Nippon Kagakkai Koen Yokoshu VOL. 78th; NO. 2; PAGE. 731 (2000), que se incorporan para referencia en la presente por sus descripciones relevantes. En algunas modalidades, el tetrabucle está contenido dentro de una estructura de tetrabucle con muescas.

Tratar: Como se usa en la presente, el término "tratar" se refiere al acto de proporcionar cuidado a un sujeto en necesidad del mismo, *por ejemplo*, a través de la administración un agente terapéutico (*por ejemplo*, un oligonucleótido) al sujeto, para los fines de mejorar la salud y/o bienestar del sujeto con respecto a una condición existente (*por ejemplo*, una infección de HBV existente) o para prevenir o disminuir la probabilidad de la ocurrencia de una condición (por ejemplo, prevenir fibrosis hepática, hepatitis, cáncer de hígado u otra condición asociada con una infección de HBV). En algunas modalidades, el tratamiento implica reducir la frecuencia o gravedad de por lo menos un signo, síntoma o factor contribuyente de una condición (*por ejemplo*, infección de HBV o condición relacionada) experimentada por un sujeto. Durante una infección de HBV, un sujeto puede exhibir síntomas tales como amarillamiento de la piel y los ojos (ictericia), orina oscura, fatiga extrema, náusea, vómito y dolor abdominal. En consecuencia, en algunas modalidades, un tratamiento proporcionado en la presente puede resultar en una reducción en la frecuencia o gravedad de uno o más de tales síntomas. Sin embargo, la infección de HBV puede desarrollarse como una o más condiciones hepáticas, tales como cirrosis, fibrosis hepática, inflamación del hígado o cáncer de hígado. En consecuencia, en algunas modalidades, un tratamiento proporcionado en la presente puede resultar en una reducción en la frecuencia o gravedad de, o prevenir o atenuar, una o más de tales condiciones.

II. Inhibidores a base de oligonucleótidos

i. Direccionamiento al antígeno de superficie de HBV

En algunas modalidades, se proporcionan en la presente inhibidores a base de oligonucleótidos de la expresión de antígeno de superficie de HBV que se pueden usar para lograr un beneficio terapéutico. A través de examen del ARNm del antígeno de superficie de HBV y la prueba de diferentes oligonucleótidos, se han desarrollado oligonucleótidos potentes para la reducción de la expresión de antígeno de superficie de HBV (HBsAg) para tratar la infección de HBV. Los oligonucleótidos proporcionados en la presente, en algunas modalidades, son diseñados para dirigirse a las secuencias de ARNm de HBsAg que cubren >95% de los genomas conocidos del HBV a través de todos los genotipos conocidos. En algunas modalidades, tales oligonucleótidos resultan

en más que 90% de reducción de ARN pre-genómico de HBV (pgRNA) y ARNm de HBsAg en el hígado. En algunas modalidades, la reducción en la expresión de HBsAg persiste por un periodo de tiempo extendido después de una dosis única o régimen de tratamiento.

En consecuencia, en algunas modalidades, los oligonucleótidos proporcionados en la presente son diseñados a modo de tener regiones de complementariedad al ARNm de HBsAg para los fines de dirigir los transcritos en las células e inhibir su expresión. La región de complementariedad es generalmente de una longitud y contenido de bases adecuados para permitir el anillado del oligonucleótido (o una cadena del mismo) al ARNm de HBsAg para los fines de inhibir su expresión. En algunas modalidades, la región de complementariedad es de por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19 o por lo menos 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido proporcionado en la presente tiene una región de complementariedad a ARNm de HBsAg que está en el intervalo de 12 a 30 (*por ejemplo*, 12 a 30, 12 a 22, 15 a 25, 17 a 21, 18 a 27, 19 a 27, o 15 a 30) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido proporcionado en la presente tiene una región de complementariedad a ARNm de HBsAg que es de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, los oligonucleótidos proporcionados en la presente son diseñados para dirigirse a las secuencias de ARNm que codifican al HBsAg. Por ejemplo, en algunas modalidades, un oligonucleótido es proporcionado que tiene una cadena antisentido que tiene una región de complementariedad a una secuencia establecida como: ACAANAAUCCUCACAAUA (SEQ ID NO: 1), en la que N se refiere a cualquier nucleótido (A, G, T, o C). En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende además una cadena sentido que forma una región dúplex con la cadena antisentido. En algunas modalidades, la cadena sentido tiene una región de complementariedad a una secuencia establecida como: UUNUUGUGAGGAUUN (SEQ ID NO: 2). En algunas modalidades, la cadena sentido comprende una región de complementariedad a una secuencia como se establece en (mostrada de 5' a 3'): UUAUUGUGAGGAUUNUUGUC (SEQ ID NO: 3).

En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende, o consiste en, una secuencia establecida como: UUAUUGUGAGGAUUNUUGUCGG (SEQ ID NO: 4). En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende, o consiste en, una secuencia establecida como: UUAUUGUGAGGAUUCUUGUCGG (SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende, o consiste en, una secuencia establecida como: UUAUUGUGAGGAUUUUGUCGG (SEQ ID NO: 5.1). En algunas modalidades, la cadena sentido comprende, o consiste en, una secuencia establecida como: ACAANAAUCCUCACAAUA (SEQ ID NO: 6). En algunas modalidades, la cadena sentido comprende, o consiste en, una secuencia establecida como: GACAANAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 7). En algunas modalidades, la

cadena sentido comprende, o consiste en, una secuencia establecida como: GACAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 8). En algunas modalidades, la cadena sentido comprende, o consiste en, una secuencia establecida como: GACAAGAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 8.1).

- 5 En algunas modalidades, un oligonucleótido para la reducción de la expresión de ARNm de HBsAg comprende una cadena sentido que forma una región dúplex con una cadena antisentido, donde la cadena sentido comprende una secuencia como se establece en cualquiera de SEQ ID NOs: 6-8.1, y la cadena antisentido comprende una secuencia como se establece en cualquiera de SEQ ID NOs: 4-5.1. En algunas modalidades, la cadena sentido comprende
- 10 nucleótidos modificados con 2'-fluoro y 2'-O-metilo y por lo menos un enlace fosforotioato internucleótido. En algunas modalidades, la cadena sentido está conjugada a una porción de N-acetilgalactosamina (GalNAc). En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende nucleótidos modificados con 2'-fluoro y 2'-O-metilo y por lo menos un enlace fosforotioato internucleótido. En algunas modalidades, el 4'-carbono del azúcar del 5'-nucleótido de la cadena
- 15 antisentido comprende un análogo de fosfato. En algunas modalidades, cada una de la cadena antisentido y la cadena sentido comprende nucleótidos modificados con 2'-fluoro y 2'-O-metilo y por lo menos un enlace fosforotioato internucleótido, donde el 4'-carbono del azúcar del 5'-nucleótido de la cadena antisentido comprende un análogo de fosfato, y la cadena sentido está conjugada a una porción de N-acetilgalactosamina (GalNAc).
- 20 En algunas modalidades, una cadena sentido comprende una secuencia como se establece en cualquiera de SEQ ID NOs: 7-8.1 comprende nucleótidos modificados con 2'-fluoro en las posiciones 3, 8-10, 12, 13, y 17. En algunas modalidades, la cadena sentido comprende nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-26, y 31-36. En algunas modalidades, la cadena sentido comprende un enlace fosforotioato internucleótido. En
- 25 algunas modalidades, la cadena sentido comprende un enlace fosforotioato internucleótido entre nucleótidos en las posiciones 1 y 2. En algunas modalidades, la cadena sentido está conjugada a una porción de N-acetilgalactosamina (GalNAc).

- En algunas modalidades, una cadena antisentido comprende una secuencia como se establece en cualquiera de SEQ ID NOs: 4-5.1 comprende nucleótidos modificados con 2'-fluoro en
- 30 las posiciones 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16, y 19. En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, y 20-22. En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende tres enlaces fosforotioato internucleótido. En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende enlaces fosforotioato internucleótido entre nucleótidos en las posiciones 1 y 2, entre nucleótidos en las posiciones 2 y 3,
- 35 entre nucleótidos en las posiciones 3 y 4, entre nucleótidos en las posiciones 20 y 21, y entre

nucleótidos en las posiciones 21 y 22. En algunas modalidades, el 4'-carbono del azúcar del 5'-nucleótido de la cadena antisentido comprende un análogo de fosfato.

ii. Oligonucleótidos de cadena doble

5 Existe una variedad de estructuras de oligonucleótidos que son útiles para el direccionamiento a la expresión de ARNm de HBsAg en los métodos de la presente descripción, incluyendo ARNi, antisentido, ARNmi, etc. Cualquiera de las estructuras descritas en la presente o en otro lado se pueden usar como un marco de trabajo para incorporar o dirigir una secuencia descrita en la presente. Los oligonucleótidos de cadena doble para dirigir la expresión del antígeno de HBV (por ejemplo, vía la trayectoria del ARNi) generalmente tienen una cadena sentido y una
10 cadena antisentido que forman un dúplex entre sí. En algunas modalidades, las cadenas sentido y antisentido no están enlazadas covalentemente. Sin embargo, en algunas modalidades, las cadenas sentido y antisentido están enlazadas covalentemente.

 En algunas modalidades, los oligonucleótidos de cadena doble para la reducción de la expresión de ARNm de HBsAg se acoplan a ARN de interferencia (ARNi). Por ejemplo, los
15 oligonucleótidos ARNi han sido desarrollados con cada cadena teniendo tamaños de 19-25 nucleótidos con por lo menos un colgante 3' de 1 a 5 nucleótidos (véase, *por ejemplo*, la Patente de E.U.A. No. 8,372,968). También se han desarrollado oligonucleótidos más largos que son procesados por Dicer para generar productos de ARNi activo (véase, *por ejemplo*, la Patente de
20 E.U.A. No. 8,883,996). Trabajo adicional produjo oligonucleótidos de cadena doble extendidos donde por lo menos un extremo de por lo menos una cadena se extiende más allá de una región de direccionamiento dúplex, incluyendo estructuras donde una de las cadenas incluye una estructura de tetrabucle termodinámicamente estabilizante (véase, *por ejemplo*, las Patentes de E.U.A. Nos. 8,513,207 y 8,927,705, así como la WO2010033225, que se incorporan para referencia en la
25 presente por su descripción de estos oligonucleótidos). Tales estructuras pueden incluir extensiones de cadena simple (en uno o ambos lados de la molécula) así como extensiones de doble cadena.

 En algunas modalidades, los oligonucleótidos proporcionados en la presente son disociables por enzimas Dicer. Tales oligonucleótidos pueden tener un colgante (*por ejemplo*, de 1, 2, o 3 nucleótidos de longitud) en el extremo 3' de la cadena sentido. Tales oligonucleótidos (*por
30 ejemplo*, los ARNsi) pueden comprender una cadena guía de 21 nucleótidos que es antisentido a un ARN objetivo y una cadena pasajera complementaria, en la que ambas cadenas se anillan para formar un dúplex de 19-bp y colgantes de 2 nucleótidos en cualquiera o a ambos extremos 3'. También están disponibles diseños de oligonucleótidos más largos incluyendo oligonucleótidos que tienen una cadena guía de 23 nucleótidos y una cadena pasajera de 21 nucleótidos, donde hay un
35 extremo romo en el lado derecho de la molécula (extremo 3' de la cadena pasajera/extremo 5' de la

cadena guía) y un colgante de cadena de guía 3' de dos nucleótidos en el lado izquierdo de la molécula (extremo 5' de la cadena pasajera/extremo 3' de la cadena guía). En tales moléculas, hay una región dúplex de 21 pares de bases. Véase, por ejemplo, US9012138, US9012621, y US9193753, cada una de las cuales se incorpora en la presente por sus descripciones relevantes.

5 En algunas modalidades, los oligonucleótidos como se describen en la presente pueden comprender cadenas sentido y antisentido ambas en el intervalo de 17 a 26 (*por ejemplo*, 17 a 26, 20 a 25, 19 a 21 o 21 a 23) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las cadenas sentido y antisentido tienen la misma longitud. En algunas modalidades, para los oligonucleótidos que tienen cadenas sentido y antisentido ambas en el intervalo de 21 a 23 nucleótidos de longitud,
10 un colgante 3' en la cadena sentido, antisentido, o ambas de sentido y antisentido tiene 1 o 2 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido tiene una cadena guía de 23 nucleótidos y una cadena pasajera de 21 nucleótidos, donde hay un extremo romo en el lado derecho de la molécula (extremo 3' de la cadena pasajera/extremo 5' de la cadena guía) y un colgante de cadena guía 3' de dos nucleótidos en el lado izquierdo de la molécula (extremo 5' de la
15 cadena pasajera/extremo 3' de la cadena guía). En tales moléculas, hay una región dúplex de 21 pares de bases. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una cadena sentido de 25 nucleótidos y una cadena antisentido de 27 nucleótidos que cuando actúan por una enzima dicer resulta en una cadena antisentido que es incorporada en el RISC maduro.

Otros diseños de oligonucleótidos para uso con las composiciones y métodos
20 descritos en la presente incluyen: ARNsi de 16-mer (véase, *por ejemplo*, Nucleic Acids in Chemistry and Biology. Blackburn (ed.), Royal Society of Chemistry, 2006), ARNsh (*por ejemplo*, que tiene 19 bp o tallos más cortos; véase, *por ejemplo*, Moore *et al.* Methods Mol. Biol. 2010; 629:141-158), ARNsi romos (*por ejemplo*, de 19 bps de longitud; véase: *por ejemplo*, Kraynack and Baker, ARN Vol. 12, p163-176 (2006)), ARNsi asimétricos (ARNai; véase, *por ejemplo*, Sun *et al.*, Nat.
25 Biotechnol. 26, 1379-1382 (2008)), ARNsi dúplex más corto asimétrico (véase, *por ejemplo*, Chang *et al.*, Mol Ther. 2009 Apr; 17(4): 725-32), ARNsi de horquilla (véase, *por ejemplo*, Hohjoh, FEBS Letters, Vol 557, emisiones 1-3; Jan 2004, p 193-198), ARNsi de cadena simple (Elsner; Nature Biotechnology 30, 1063 (2012)), ARNsi circulares con forma de campana (véase, *por ejemplo*, Abe *et al.* J Am Chem Soc 129: 15108-15109 (2007)), y ARN de interferencia segmentado internamente
30 pequeño (ARNsisi; véase, *por ejemplo*, Bramsen *et al.*, Nucleic Acids Res. 2007 Sep; 35(17): 5886-5897). Cada una de las referencias anteriores se incorpora para referencia en su totalidad por las descripciones relacionadas en las mismas. Otros ejemplos no limitantes de estructuras de un oligonucleótido que se pueden usar en algunas modalidades para reducir o inhibir la expresión de HBsAg son microARN (miARN), ARN de horquilla corta (ARNsh), y ARNsi corto (véase, *por ejemplo*,
35 Hamilton *et al.*, Embo J., 2002, 21(17): 4671-4679; véase también la Solicitud de E.U.A. No.

20090099115).

a. Cadenas Antisentido

En algunas modalidades, una cadena antisentido de un oligonucleótido puede ser referida como una "cadena guía." Por ejemplo, si una cadena antisentido puede acoplarse con un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y se une a una proteína Argonauta, o se acopla con o se une a uno o más factores similares, y dirige el silenciamiento de un gen objetivo, puede ser referida como una cadena guía. En algunas modalidades, una cadena sentido complementaria con un cadena guía puede ser referida como una "cadena pasajera."

En algunas modalidades, un oligonucleótido proporcionado en la presente comprende una cadena antisentido que tiene hasta 50 nucleótidos de longitud (*por ejemplo*, hasta 30, hasta 27, hasta 25, hasta 21, o hasta 19 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, un oligonucleótido proporcionado en la presente comprende una cadena antisentido que tiene por lo menos 12 nucleótidos de longitud (*por ejemplo*, por lo menos 12, por lo menos 15, por lo menos 19, por lo menos 21, por lo menos 25, o por lo menos 27 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, una cadena antisentido de un oligonucleótido descrito en la presente está en el intervalo de 12 a 50 o 12 a 30 (*por ejemplo*, 12 a 30, 11 a 27, 11 a 25, 15 a 21, 15 a 27, 17 a 21, 17 a 25, 19 a 27, o 19 a 30) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, una cadena antisentido de cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente tiene 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad a una secuencia como se establece en (mostrada 5' a 3'): AATCCTCACA (SEQ ID NO: 9). En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende una secuencia como se establece en (mostrada 5' a 3'): UGUGAGGAUU (SEQ ID NO: 10). En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende una secuencia como se establece en (mostrada 5' a 3'): TGTGAGGATT (SEQ ID NO: 11).

En algunas modalidades, un oligonucleótido para la reducción de la expresión de ARNm de HBsAg puede comprender una cadena antisentido que tiene una región de complementariedad a una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 9, y uno o dos nucleótidos no complementarios en su término 3'. En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende la secuencia del nucleótido establecida en cualquiera de SEQ ID NOs: 4-5.1.

En algunas modalidades, un oligonucleótido para la reducción de la expresión de ARNm de HBsAg puede comprender una cadena antisentido que tiene una región de complementariedad a una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 9, donde la cadena antisentido no tiene una secuencia como se establece en cualquiera de las siguientes (mostradas 5'

a 3'): TATTGTGAGGATTCTTGTC (SEQ ID NO: 12); CGGTATTGTGAGGATTCTTG (SEQ ID NO: 13); TGTGAGGATTCTTGCAACA (SEQ ID NO: 14); UAUUGUGAGGAUUUUUGUCA (SEQ ID NO: 15); UGCGGUAUUGUGAGGAUUCTT (SEQ ID NO: 16); ACAGCATTGTGAGGATTCTTGTC (SEQ ID NO: 17); UAUUGUGAGGAUUUUUGUCAACA (SEQ ID NO: 18); AUUGUGAGGAUUUUUGUCAACAA (SEQ ID NO: 19); y UUGUGAGGAUUUUUGUCAACAAG (SEQ ID NO: 20). En algunas modalidades, la cadena antisentido difiere de la secuencia del nucleótido establecida en SEQ ID NOs: 4, 5, o 5.1 por no más de tres nucleótidos.

b. Cadenas Sentido

En algunas modalidades, un oligonucleótido de cadena doble puede tener una cadena sentido de hasta 40 nucleótidos de longitud (*por ejemplo*, hasta 40, hasta 35, hasta 30, hasta 27, hasta 25, hasta 21, hasta 19, hasta 17, o hasta 12 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, un oligonucleótido puede tener una cadena sentido de por lo menos 12 nucleótidos de longitud (*por ejemplo*, por lo menos 12, por lo menos 15, por lo menos 19, por lo menos 21, por lo menos 25, por lo menos 27, por lo menos 30, por lo menos 35, o por lo menos 38 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, un oligonucleótido puede tener una cadena sentido en un intervalo de 12 a 50 (*por ejemplo*, 12 a 40, 12 a 36, 12 a 32, 12 a 28, 15 a 40, 15 a 36, 15 a 32, 15 a 28, 17 a 21, 17 a 25, 19 a 27, 19 a 30, 20 a 40, 22 a 40, 25 a 40, o 32 a 40) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido puede tener una cadena sentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, una cadena sentido de un oligonucleótido es más larga que 27 nucleótidos (*por ejemplo*, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos). En algunas modalidades, una cadena sentido de un oligonucleótido es más larga que 25 nucleótidos (*por ejemplo*, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos).

En algunas modalidades, una cadena sentido comprende un tallo-bucle en su extremo 3'. En algunas modalidades, una cadena sentido comprende un tallo-bucle en su extremo 5'. En algunas modalidades, una cadena comprende un tallo-bucle que está en el intervalo de 2 a 66 nucleótidos de largo (*por ejemplo*, 2 a 66, 10 a 52, 14 a 40, 2 a 30, 4 a 26, 8 a 22, 12 a 18, 10 a 22, 14 a 26, o 14 a 30 nucleótidos de largo). En algunas modalidades, una cadena comprende un tallo-bucle de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un tallo comprende un dúplex de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un tallo-bucle proporciona a la molécula con mejor protección contra la degradación (*por ejemplo*, degradación enzimática) y facilita las características de direccionamiento para el suministro a una célula objetivo. Por ejemplo, en algunas modalidades, un bucle proporciona nucleótidos añadidos en los que se

puede hacer la modificación sin afectar sustancialmente la actividad de inhibición de la expresión génica de un oligonucleótido. En ciertas modalidades, en la presente se proporciona un oligonucleótido en el que la cadena sentido comprende (*por ejemplo*, en su extremo 3') un tallo-bucle establecido como: S_1 -L- S_2 , en el que S_1 es complementario a S_2 , y en el que L forma un bucle entre S_1 y S_2 de hasta 10 nucleótidos de longitud (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos de longitud).

En algunas modalidades, un bucle (L) de un tallo-bucle es un tetrabucle (*por ejemplo*, con una estructura de tetrabucle con muescas). Un tetrabucle puede contener ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos modificados, y combinaciones de los mismos. Típicamente, un tetrabucle tiene 4 a 5 nucleótidos.

c. Longitud Dúplex

En algunas modalidades, un dúplex formado entre una cadena sentido y antisentido es de por lo menos 12 (*por ejemplo*, por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19, por lo menos 20, o por lo menos 21) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un dúplex formado entre una cadena sentido y antisentido está en el intervalo de 12 a 30 nucleótidos de longitud (*por ejemplo*, 12 a 30, 12 a 27, 12 a 22, 15 a 25, 18 a 30, 18 a 22, 18 a 25, 18 a 27, 18 a 30, 19 a 30 o 21 a 30 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, un dúplex formado entre una cadena sentido y antisentido es de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades un dúplex formado entre una cadena sentido y antisentido no expande toda la longitud de la cadena sentido y/o cadena antisentido. En algunas modalidades, un dúplex entre una cadena sentido y antisentido se expande toda la longitud de cualquiera de las cadenas sentido o antisentido. En ciertas modalidades, un dúplex entre una cadena sentido y antisentido se expande toda la longitud tanto de la cadena sentido como de la cadena antisentido.

d. Extremos del oligonucleótido

En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende cadenas sentido y antisentido, de modo que hay un colgante 3' en cualquiera de la cadena sentido o la cadena antisentido, o tanto en la cadena sentido como en la antisentido. En algunas modalidades, los oligonucleótidos proporcionados en la presente tienen un extremo 5' que es termodinámicamente menos estable en comparación con el otro extremo 5'. En algunas modalidades, se proporciona un oligonucleótido asimétrico que incluye un extremo romo en el extremo 3' de una cadena sentido y un colgante en el extremo 3' de una cadena antisentido. En algunas modalidades, un colgante 3' en una cadena antisentido es de 1 a 8 nucleótidos de longitud (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8

nucleótidos de longitud).

Típicamente, un oligonucleótido para ARNi tiene un colgante de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido (guía). Sin embargo, son posibles otros colgantes. En algunas modalidades, un colgante es un colgante 3' que comprende una longitud de entre uno y seis nucleótidos, opcionalmente uno a cinco, uno a cuatro, uno a tres, uno a dos, dos a seis, dos a cinco, dos a cuatro, dos a tres, tres a seis, tres a cinco, tres a cuatro, cuatro a seis, cuatro a cinco, cinco a seis nucleótidos, o uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis nucleótidos. Sin embargo, en algunas modalidades, el colgante es un colgante 5' que comprende una longitud de entre uno y seis nucleótidos, opcionalmente uno a cinco, uno a cuatro, uno a tres, uno a dos, dos a seis, dos a cinco, dos a cuatro, dos a tres, tres a seis, tres a cinco, tres a cuatro, cuatro a seis, cuatro a cinco, cinco a seis nucleótidos, o uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis nucleótidos.

En algunas modalidades, uno o más (*por ejemplo*, 2, 3, 4) nucleótidos terminales del extremo 3' o extremo 5' de una cadena sentido y/o antisentido están modificados. Por ejemplo, en algunas modalidades, uno o dos nucleótidos terminales del extremo 3' de una cadena antisentido están modificados. En algunas modalidades, el último nucleótido en el extremo 3' de una cadena antisentido está modificado, *por ejemplo*, comprende una 2'-modificación, *por ejemplo*, un 2'-O-metoxietilo. En algunas modalidades, el último o dos nucleótidos terminales en el extremo 3' de una cadena antisentido son complementarios con el objetivo. En algunas modalidades, el último o dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido no son complementarios con el objetivo.

En algunas modalidades, se proporciona un oligonucleótido de cadena doble que tiene una estructura de tetrabucle con muescas en el extremo 3' de la cadena sentido, y dos nucleótidos colgantes terminales en el extremo 3' de su cadena antisentido. En algunas modalidades, los dos nucleótidos colgantes terminales son GG. Típicamente, uno o ambos de los dos nucleótidos GG terminales de la cadena antisentido no son complementarios con el objetivo.

En algunas modalidades, el extremo 5' y/o el extremo 3' de una cadena sentido o antisentido tiene un nucleótido de tapa invertida.

En algunas modalidades, uno o más (*por ejemplo*, 2, 3, 4, 5, 6) enlaces internucleótido modificados se proporcionan entre los nucleótidos terminales del extremo 3' o el extremo 5' de una cadena sentido y/o antisentido. En algunas modalidades, se proporcionan enlaces internucleótido modificados entre los nucleótidos colgantes en el extremo 3' o extremo 5' de una cadena sentido y/o cadena antisentido.

e. Malos apareamientos

En algunas modalidades, un oligonucleótido puede tener uno o más (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5) malos apareamientos entre una cadena sentido y antisentido. Si hay más que un mal

apareamiento entre una cadena sentido y antisentido, pueden estar posicionados consecutivamente (*por ejemplo*, 2, 3 o más en una fila), o interdispersos a través de toda la región de complementariedad. En algunas modalidades, el término 3' de la cadena sentido contiene uno o más malos apareamientos. En una modalidad, dos malos apareamientos están incorporados en el término 3' de la cadena sentido. En algunas modalidades, los malos apareamientos de bases o desestabilización de segmentos en el extremo 3' de la cadena sentido del oligonucleótido mejoraron la potencia de dúplexes sintéticos en ARNi, posiblemente a través de facilitar el procesamiento por Dicer.

En algunas modalidades, una cadena antisentido puede tener una región de complementariedad a un transcrito de HBsAg que contiene uno o más malos apareamientos en comparación con una secuencia de transcrito correspondiente. Una región de complementariedad en un oligonucleótido puede tener hasta 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, *etc.* malos apareamientos a condición de que mantenga la capacidad de formar pares de bases complementarias con el transcrito bajo condiciones de hibridación apropiadas. Como alternativa, una región de complementariedad de un oligonucleótido puede tener no más que 1, no más que 2, no más que 3, no más que 4, o no más que 5 malos apareamientos a condición de que mantenga la capacidad de formar pares de bases complementarias con el ARNm de HBsAg bajo condiciones de hibridación adecuadas. En algunas modalidades, si hay más de un mal apareamiento en una región de complementariedad, se pueden posicionar consecutivamente (*por ejemplo*, 2, 3, 4, o más en una fila), o interdispersos a través de toda la región de complementariedad a condición de que el oligonucleótido mantenga la capacidad de formar pares de bases complementarias con el ARNm de HBsAg bajo condiciones de hibridación apropiadas.

iii. Oligonucleótidos de cadena simple

En algunas modalidades, un oligonucleótido para la reducción de la expresión de HBsAg como se describe en la presente es un oligonucleótido de cadena simple que tiene complementariedad con el ARNm de HBsAg. Tales estructuras pueden incluir, pero no se limitan a oligonucleótidos de ARNi de cadena simple. Esfuerzos recientes han demostrado la actividad de los oligonucleótidos de ARNi de cadena simple (véase, *por ejemplo*, Matsui *et al.* (Mayo 2016), Molecular Therapy, Vol. 24(5), 946-955). Sin embargo, en algunas modalidades, los oligonucleótidos proporcionados en la presente son oligonucleótidos antisentido (ASOs). Un oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de cadena simple que tiene una secuencia de nucleobase que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso de un segmento objetivo de un ácido nucleico particular y es modificado adecuadamente (*por ejemplo*, como un gapmero) a modo de inducir la disociación mediada por ARNasaH de su ARN objetivo en las células o

(por ejemplo, como un mixmero) a modo de inhibir la traducción del ARNm objetivo en las células. Los oligonucleótidos antisentido para uso en la presente descripción se pueden modificar en cualquier manera adecuada conocida en la técnica incluyendo, por ejemplo, como se muestra en la Patente de E.U.A. No. 9,567,587, que se incorpora para referencia en la presente por su descripción con respecto a la modificación de oligonucleótidos antisentido (incluyendo, *por ejemplo*, longitud, porciones azúcar de la nucleobase (pirimidina, purina), y alteraciones de la porción heterocíclica de la nucleobase). Además, las moléculas antisentido han sido utilizadas para reducir la expresión de genes objetivo específicos (véase, *por ejemplo*, Bennett *et al.*; Pharmacology of Antisense Drugs, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Vol. 57: 81-105).

iv. Modificaciones a oligonucleótidos

Los oligonucleótidos pueden ser modificados en varias maneras para mejorar o controlar la especificidad, estabilidad, suministro, biodisponibilidad, resistencia de degradación de nucleasa, inmunogenicidad, propiedades de apareamiento de bases, distribución de ARN y captación celular y otras características relevantes al uso terapéutico o de investigación. Véase, *por ejemplo*, Bramsen *et al.*, Nucleic Acids Res., 2009, 37, 2867-2881; Bramsen and Kjems (Frontiers in Genetics, 3 (2012): 1-22). En consecuencia, en algunas modalidades, los oligonucleótidos de la presente descripción pueden incluir una o más modificaciones adecuadas. En algunas modalidades, un nucleótido modificado tiene una modificación en su base (o nucleobase), el azúcar (*por ejemplo*, ribosa, desoxirribosa), o el grupo fosfato.

El número de modificaciones en un oligonucleótido y las posiciones de estas modificaciones de nucleótidos pueden influir en las propiedades de un oligonucleótido. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden ser suministrados *in vivo* al conjugarlos a o incorporándolos en una nanopartícula lipídica (LNP) o portador similar. Sin embargo, cuando un oligonucleótido no está protegido por un LNP o portador similar, puede ser ventajoso que por lo menos algunos de sus nucleótidos sean modificados. En consecuencia, en ciertas modalidades de cualquiera de los oligonucleótidos proporcionados en la presente, todos o sustancialmente todos los nucleótidos de un oligonucleótido están modificados. En ciertas modalidades, más de la mitad de los nucleótidos están modificados. En ciertas modalidades, menos de la mitad de los nucleótidos están modificados. Típicamente, con un suministro vacío, cada azúcar está modificado en la posición 2'. Estas modificaciones pueden ser reversibles o irreversibles. En algunas modalidades, un oligonucleótido como se describe en la presente tiene un número y tipo de nucleótidos modificados suficientes para provocar las características deseadas (*por ejemplo*, protección de degradación enzimática, capacidad de dirigirse a una célula deseada después de administración *in vivo*, y/o estabilidad termodinámica).

a. Modificaciones al azúcar

En algunas modalidades, un azúcar modificado (también referido en la presente como un análogo de azúcar) incluye una porción desoxirribosa o ribosa modificada, *por ejemplo*, en la que una o más modificaciones ocurren en la posición del carbono 2', 3', 4', y/o 5' del azúcar. En algunas modalidades, un azúcar modificado también puede incluir estructuras de carbono alternativas no naturales tales como esas presentes en ácidos nucleicos bloqueados ("LNA, por sus siglas en inglés") (véase, *por ejemplo*, Koshkin *et al.* (1998), Tetrahedron 54, 3607-3630), ácidos nucleicos no bloqueados ("UNA, por sus siglas en inglés") (véase, *por ejemplo*, Snead *et al.* (2013), Molecular Therapy – Nucleic Acids, 2, e103), y ácidos nucleicos puenteados ("BNA, por sus siglas en inglés") (véase, *por ejemplo*, Imanishi and Obika (2002), The Royal Society of Chemistry, Chem. Commun., 1653-1659). Koshkin *et al.*, Snead *et al.*, e Imanishi and Obika se incorporan para referencia en la presente por sus descripciones relacionadas a las modificaciones al azúcar.

En algunas modalidades, una modificación a un nucleótido en un azúcar comprende una modificación 2'. Una modificación 2' puede ser 2'-aminoetilo, 2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo, y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinonucleico. Típicamente, la modificación es 2'-fluoro, 2'-O-metilo, o 2'-O-metoxietilo. En algunas modalidades, una modificación en un azúcar comprende una modificación del anillo de azúcar, que puede comprender la modificación de uno o más carbonos del anillo de azúcar. Por ejemplo, una modificación de un azúcar de un nucleótido puede comprender un 2'-oxígeno de un azúcar está enlazado a un 1'-carbono o 4'-carbono del azúcar, o un 2'-oxígeno está enlazado al 1'-carbono o 4'-carbono vía un puente etileno o metileno. En algunas modalidades, un nucleótido modificado tiene un azúcar acíclico que carece de un enlace de 2'-carbono a 3'-carbono. En algunas modalidades, un nucleótido modificado tiene un grupo tiol, *por ejemplo*, en la posición 4' del azúcar.

En algunas modalidades, el grupo de extremo 3' terminal (*por ejemplo*, un 3'-hidroxilo) es un grupo fosfato u otro grupo, que puede ser usado, por ejemplo, para unir enlazadores, adaptadores o etiquetas o para la ligadura directa de un oligonucleótido a otro ácido nucleico.

b. Fosfatos 5' Terminales

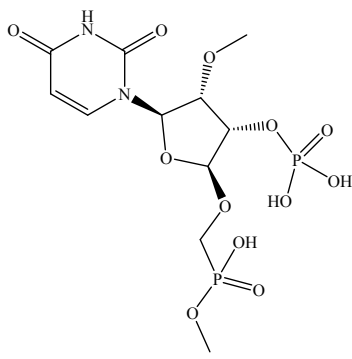
En algunas modalidades, los grupos fosfato 5'-terminales de los oligonucleótidos aumentan la interacción con Argonauta 2. Sin embargo, los oligonucleótidos que comprenden un grupo 5'-fosfato pueden ser susceptibles de degradación vía fosfatasas u otras enzimas, que pueden limitar su biodisponibilidad *in vivo*. En algunas modalidades, los oligonucleótidos incluyen análogos de 5' fosfatos que son resistentes a tal degradación. En algunas modalidades, un análogo de fosfato puede ser oximetilfosfonato, vinilfosfonato, o malonilfosfonato. En ciertas modalidades, el extremo

5' de una cadena de oligonucleótido está unido a una porción química que imita las propiedades electrostáticas y estéricas de un grupo 5'-fosfato natural ("imitador de fosfato") (véase, *por ejemplo*, Prakash *et al.* (2015), Nucleic Acids Res., Nucleic Acids Res. 2015 Mar 31; 43(6): 2993–3011, el contenido de los cuales relacionado a los análogos de fosfato se incorpora en la presente para referencia). Se han desarrollado muchos imitadores de fosfato que se pueden unir al extremo 5' (véase, *por ejemplo*, la Patente de E.U.A. No. 8,927,513, cuyo contenido relacionado a los análogos de fosfato se incorpora en la presente para referencia). Otras modificaciones han sido desarrolladas para el extremo 5' de oligonucleótidos (véase, *por ejemplo*, WO 2011/133871, cuyo contenido relacionado a análogos de fosfato se incorpora en la presente para referencia). En ciertas modalidades, un grupo hidroxilo está unido al extremo 5' del oligonucleótido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido tiene un análogo de fosfato en una posición de 4'-carbono del azúcar (referido como un "4'-análogo de fosfato"). Véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de E.U.A. número 62/383,207, titulada *4'-Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Same* (4'-Análogos de fosfato y oligonucleótidos que los comprenden), presentada el 2 de septiembre de 2016, y la 62/393,401, presentada el 12 de septiembre de 2016, titulada *4'-Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Same* (4'-Análogos de fosfato y oligonucleótidos que los comprenden), el contenido de cada una de las cuales relacionado a análogos de fosfato se incorpora en la presente para referencia. En algunas modalidades, un oligonucleótido proporcionado en la presente comprende un 4'-análogo de fosfato en un nucleótido 5'-terminal. En algunas modalidades, un análogo de fosfato es un oximetilfosfonato, en el que el átomo de oxígeno del grupo oximetilo está unido a la porción azúcar (*por ejemplo*, en su carbono 4') o análogo del mismo. En otras modalidades, un 4'-análogo de fosfato es un tiometilfosfonato o un aminometilfosfonato, en el que el átomo de azufre del grupo tiometilo o el átomo de nitrógeno del grupo aminometilo está unido al 4'-carbono de la porción azúcar o análogo del mismo. En ciertas modalidades, un 4'-análogo de fosfato es un oximetilfosfonato. En algunas modalidades, un oximetilfosfonato se representa por la fórmula $\text{--O--CH}_2\text{--PO(OH)}_2$ o $\text{--O--CH}_2\text{--PO(O)}_2$, en la que R se selecciona independientemente de H, CH₃, un grupo alquilo, CH₂CH₂CN, CH₂OCOC(CH₃)₃, CH₂OCH₂CH₂Si(CH₃)₃, o un grupo protector. En ciertas modalidades, el grupo alquilo es CH₂CH₃. Más típicamente, R se selecciona independientemente de H, CH₃, o CH₂CH₃.

En ciertas modalidades, un análogo de fosfato unido al oligonucleótido es un metoxi fosfonato (MOP). En ciertas modalidades, un análogo de fosfato unido al oligonucleótido es un MOP protegido con 5' mono-metilo. En algunas modalidades, el siguiente nucleótido de uridina que comprende un análogo de fosfato puede ser usado, *por ejemplo*, en la primera posición de una cadena guía (antisentido):

5



10

dicho nucleótido modificado es referido como [Mefosfonato-4O-mU] o 5'-Metoxi, fosfonato-4'oxi- 2'-O-metiluridina.

15

c. Enlaces Internucleósido Modificados

En algunas modalidades, las modificaciones o sustituciones de fosfato pueden resultar en un oligonucleótido que comprende por lo menos un (*por ejemplo*, por lo menos 1, por lo menos 2, por lo menos 3 o por lo menos 5) enlace internucleótido modificado. En algunas modalidades, cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente comprende 1 a 10 (*por ejemplo*, 1 a 10, 2 a 8, 4 a 6, 3 a 10, 5 a 10, 1 a 5, 1 a 3 o 1 a 2) enlaces internucleótido modificados. En algunas modalidades, cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 enlaces internucleótido modificados.

20

Un enlace internucleótido modificado puede ser un enlace fosforotioato, un enlace fosforotioato, un enlace fosfotriéster, un enlace tionoalquilfosfonato, un enlace tionoalquilfosfotriéster, un enlace fosforamidita, un enlace fosfonato o un enlace boranofosfato. En algunas modalidades, por lo menos un enlace internucleótido modificado de cualquiera de los oligonucleótidos como se describe en la presente es un enlace fosforotioato.

25

d. Modificaciones de bases

30

En algunas modalidades, en la presente se proporcionan oligonucleótidos que tienen una o más nucleobases modificadas. En algunas modalidades, las nucleobases modificadas (también referidas en la presente como análogos de bases) están enlazadas en la posición 1' de una porción azúcar de nucleótido. En ciertas modalidades, una nucleobase modificada es una base nitrogenosa. En ciertas modalidades, una nucleobase modificada no contiene un átomo de nitrógeno. Véase *por ejemplo*, la Solicitud de Patente Publicada de E.U.A. No. 20080274462. En algunas modalidades, un

35

nucleótido modificado comprende una base universal. Sin embargo, en ciertas modalidades, un nucleótido modificado no contiene una nucleobase (abásico).

En algunas modalidades, una base universal es una porción heterocíclica ubicada en la posición 1' de una porción azúcar de nucleótido en un nucleótido modificado, o la posición equivalente en una sustitución de porción azúcar de nucleótido que, cuando está presente en un dúplex, puede estar posicionada opuesta a más de un tipo de base sin alterar sustancialmente la estructura del dúplex. En algunas modalidades, en comparación con un ácido nucleico de cadena simple de referencia (*por ejemplo*, oligonucleótido) que es completamente complementario a un ácido nucleico objetivo, un ácido nucleico de cadena simple que contiene una base universal forma un dúplex con el ácido nucleico objetivo que tiene una T_m menor que un dúplex formado con el ácido nucleico complementario. Sin embargo, en algunas modalidades, en comparación con un ácido nucleico de cadena simple de referencia en el que la base universal ha sido reemplazada con una base para generar un único mal apareamiento, el ácido nucleico de cadena simple que contiene la base universal forma un dúplex con el ácido nucleico objetivo que tiene una T_m mayor que un dúplex formado con el ácido nucleico que comprende la base mal apareada.

Ejemplos no limitantes de nucleótidos de unión universal incluyen inosina, 1- β -D-ribofuranosil-5-nitroindol, y/o 1- β -D-ribofuranosil-3-nitropirrolo (Publ. de Sol. de Pat. de E.U.A. No. 20070254362 de Quay *et al.*; Van Aerschot *et al.*, An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside. Nucleic Acids Res. 1995 Nov 11;23(21):4363-70; Loakes *et al.*, 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR. Nucleic Acids Res. 1995 Jul 11;23(13):2361-6; Loakes and Brown, 5-Nitroindole as an universal base analogue. Nucleic Acids Res. 1994 Oct 11;22(20):4039-43. Cada una de las anteriores se incorpora para referencia en la presente por sus descripciones relacionadas a las modificaciones de bases).

25 e. Modificaciones Reversibles

Aunque pueden realizarse ciertas modificaciones para proteger un oligonucleótido del entorno *in vivo* antes de alcanzar las células objetivo, pueden reducir la potencia o actividad del oligonucleótido una vez que alcanza el citosol de la célula objetivo. Se pueden realizar modificaciones reversibles de modo que la molécula retiene las propiedades deseables fuera de la célula, que entonces son eliminadas luego de ingresar al entorno citosólico de la célula. La modificación reversible puede ser eliminada, por ejemplo, por la acción de una enzima intracelular o por las condiciones químicas al interior de una célula (*por ejemplo*, a través de la reducción por glutatona intracelular).

En algunas modalidades, un nucleótido modificado reversiblemente comprende una porción sensible a glutatona. Típicamente, las moléculas de ácido nucleico han sido modificadas

química con porciones bisulfuro cíclicas para enmascarar la carga negativa creada por los enlaces difosfato internucleótidos y mejorar la captación celular y resistencia a nucleasa. Véase la Solicitud Publicada de E.U.A. No. 2011/0294869 originalmente cedida a Traversa Therapeutics, Inc. ("Traversa"), Publicación PCT No. WO 2015/188197 de Solstice Biologics, Ltd. ("Solstice"), Meade *et al.*, *Nature Biotechnology*, 2014,32:1256-1263 ("Meade"), Publicación PCT No. WO 2014/088920 de Merck Sharp & Dohme Corp, cada una de las cuales se incorpora para referencia por sus descripciones de tales modificaciones. Esta modificación reversible de los enlaces difosfato internucleótido es diseñada para ser disociada intracelularmente por el entorno reductor del citosol (*por ejemplo* glutatona). Ejemplos anteriores incluyen neutralizar las modificaciones fosfotriéster que fueron reportadas por ser disociables dentro de las células (Dellinger *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 2003,125:940-950).

En algunas modalidades, tal modificación reversible permite la protección durante la administración *in vivo* (*por ejemplo*, tránsito a través de la sangre y/o compartimentos lisosomales/endosomales de una célula) donde el oligonucleótido será expuesto a nucleasas y otras condiciones ambientales severas (*por ejemplo*, pH). Cuando se libera en el citosol de una célula donde los niveles de glutatona son más altos en comparación con el espacio extracelular, la modificación se invierte y el resultado es un oligonucleótido disociado. Utilizando porciones sensibles a glutatona, reversibles, es posible introducir grupos químicos estéricamente más grandes en el oligonucleótido de interés en comparación con las opciones disponibles utilizando modificaciones químicas irreversibles. Esto se debe a que estos grupos químicos más grandes serán eliminados en el citosol y, por lo tanto, no deberían intervenir con la actividad biológica de los oligonucleótidos dentro del citosol de una célula. Como un resultado, estos grupos químicos más grandes pueden ser diseñados para conferir varias ventajas al nucleótido u oligonucleótido, tal como resistencia a nucleasa, lipofiliidad, carga, estabilidad térmica, especificidad, y reducción de inmunogenicidad. En algunas modalidades, la estructura de la porción sensible a glutatona puede ser diseñada para modificar la cinética de su liberación.

En algunas modalidades, una porción sensible a glutatona está unida al azúcar del nucleótido. En algunas modalidades, una porción sensible a glutatona está unida al 2'-carbono del azúcar de un nucleótido modificado. En algunas modalidades, la porción sensible a glutatona está ubicada en el 5'-carbono de un azúcar, particularmente cuando el nucleótido modificado es el nucleótido 5'-terminal del oligonucleótido. En algunas modalidades, la porción sensible a glutatona está ubicada en el 3'-carbono de un azúcar, particularmente cuando el nucleótido modificado es el nucleótido 3'-terminal del oligonucleótido. En algunas modalidades, la porción sensible a glutatona comprende un grupo sulfonilo. Véase, *por ejemplo*, la Sol. Prov. de E.U.A. No. 62/378,635, titulada Compositions Comprising Reversibly Modified Oligonucleotides and Uses Thereof (Composiciones que

Comprenden Oligonucleótidos Modificados Reversiblemente y Usos de los Mismos), que fue presentada el 23 de agosto de 2016, cuyo contenido se incorpora para referencia en la presente por sus descripciones relevantes.

5 v. Ligandos de direccionamiento

En algunas modalidades, puede ser deseable dirigir los oligonucleótidos de la descripción a una o más células o uno o más órganos. Tal estrategia puede ayudar a evitar efectos indeseables en otros órganos, o puede evitar la pérdida indebida del oligonucleótido en las células, tejidos u órganos que no podrían beneficiarse del oligonucleótido. En consecuencia, en algunas modalidades, los oligonucleótidos descritos en la presente pueden ser modificados para facilitar el direccionamiento de un tejido, célula u órgano particular, *por ejemplo*, para facilitar el suministro del oligonucleótido al hígado. En ciertas modalidades, los oligonucleótidos descritos en la presente pueden ser modificados para facilitar el suministro del oligonucleótido a los hepatocitos del hígado. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende un nucleótido que está conjugado a uno o más ligandos de direccionamiento.

Un ligando de direccionamiento puede comprender un carbohidrato, amino azúcar, colesterol, péptido, polipéptido, proteína o parte de una proteína (*por ejemplo*, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo) o lípido. En algunas modalidades, un ligando de direccionamiento es un aptámero. Por ejemplo, un ligando de direccionamiento puede ser un péptido RGD que se usa para dirigirse a la vasculatura de tumor o células de glioma, péptido CREKA para dirigirse a la vasculatura de tumor o estoma, transferrina, lactoferrina, o un aptámero para dirigirse a los receptores de transferrina expresados en la vasculatura del SNC, o un anticuerpo anti-EGFR para dirigirse a EGFR en células de glioma. En ciertas modalidades, el ligando de direccionamiento es una o más porciones GalNAc.

En algunas modalidades, cada uno de 1 o más (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) nucleótidos de un oligonucleótido está conjugado a un ligando de direccionamiento separado. En algunas modalidades, cada uno de 2 a 4 nucleótidos de un oligonucleótido está conjugado a un ligando de direccionamiento separado. En algunas modalidades, los ligandos de direccionamiento son conjugados a 2 a 4 nucleótidos en cualquier extremo de la cadena sentido o antisentido (*por ejemplo*, los ligandos son conjugados a un colgante o extensión de 2 a 4 nucleótidos en el extremo 5' o 3' de la cadena sentido o antisentido) de modo que los ligandos de direccionamiento se asemejan a cerdas de un cepillo dental y el oligonucleótido se asemeja a un cepillo dental. Por ejemplo, un oligonucleótido puede comprender un tallo-bucle en cualquier extremo 5' o 3' de la cadena sentido y 1, 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle del tallo puede estar conjugado individualmente a un ligando de direccionamiento.

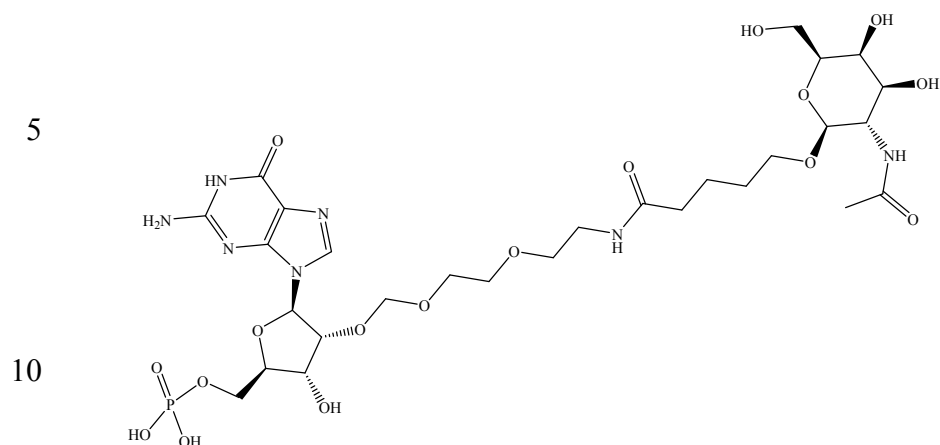
En algunas modalidades, es deseable dirigir un oligonucleótido que reduce la expresión del antígeno de HBV a los hepatocitos del hígado de un sujeto. Cualquier porción de direccionamiento a hepatocito adecuada se puede usar para este fin.

El GalNAc es un ligando de alta afinidad para el receptor de asialoglucoproteína (ASGPR), que se expresa principalmente en la superficie sinusoidal de células de hepatocito y tiene un papel principal en la unión, internalización, y eliminación subsecuente de glucoproteínas circulantes que contienen residuos de galactosa o N-acetilgalactosamina terminales (asialoglucoproteínas). La conjugación (ya sea indirecta o directa) de las porciones GalNAc a oligonucleótidos de la presente descripción puede usarse para dirigir estos oligonucleótidos al ASGPR expresado en estas células de hepatocitos.

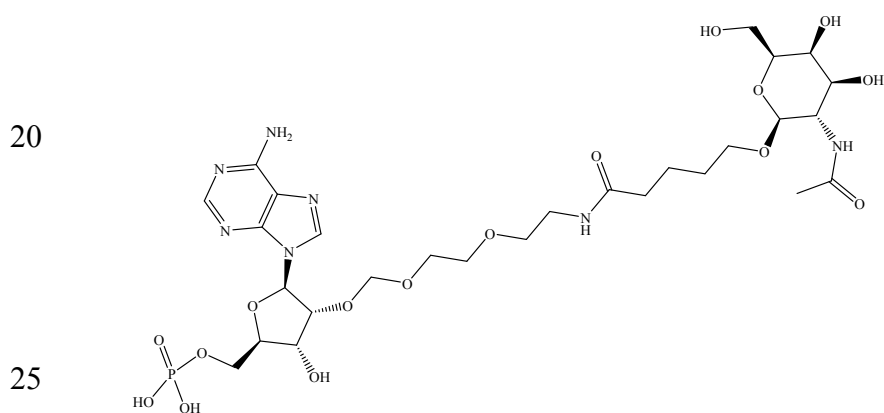
En algunas modalidades, un oligonucleótido de la presente descripción está conjugado directa o indirectamente a un GalNAc monovalente. En algunas modalidades, el oligonucleótido está conjugado directa o indirectamente a más de un GalNAc monovalente (*es decir*, está conjugado a 2, 3, o 4 porciones de GalNAc monovalente, y está conjugado típicamente a 3 o 4 porciones de GalNAc monovalente). En algunas modalidades, un oligonucleótido de la presente descripción está conjugado a una o más porciones GalNAc bivalentes, GalNAc trivalentes, o GalNAc tetravalentes.

En algunas modalidades, cada uno de 1 o más (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) nucleótidos de un oligonucleótido está conjugado a una porción GalNAc. En algunas modalidades, cada uno de 2 a 4 nucleótidos del bucle (L) del tallo-bucle están conjugados a un GalNAc separado. En algunas modalidades, los ligandos de direccionamiento están conjugados a 2 a 4 nucleótidos en cualquier extremo de la cadena sentido o antisentido (*por ejemplo*, los ligandos están conjugados a un colgante o extensión de 2 a 4 nucleótidos en el extremo 5' o 3' de la cadena sentido o antisentido) de modo que las porciones GalNAc se asemejan a cerdas de un cepillo dental y el oligonucleótido se asemeja a un cepillo dental. Por ejemplo, un oligonucleótido puede comprender un tallo-bucle en cualquier extremo 5' o 3' de la cadena sentido y 1, 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle del tallo puede estar conjugado individualmente a una porción GalNAc. En algunas modalidades, las porciones GalNAc están conjugadas a un nucleótido de la cadena sentido. Por ejemplo, cuatro porciones GalNAc pueden estar conjugadas a nucleótidos en el tetrabucle de la cadena sentido, donde cada porción GalNAc está conjugada a un nucleótido.

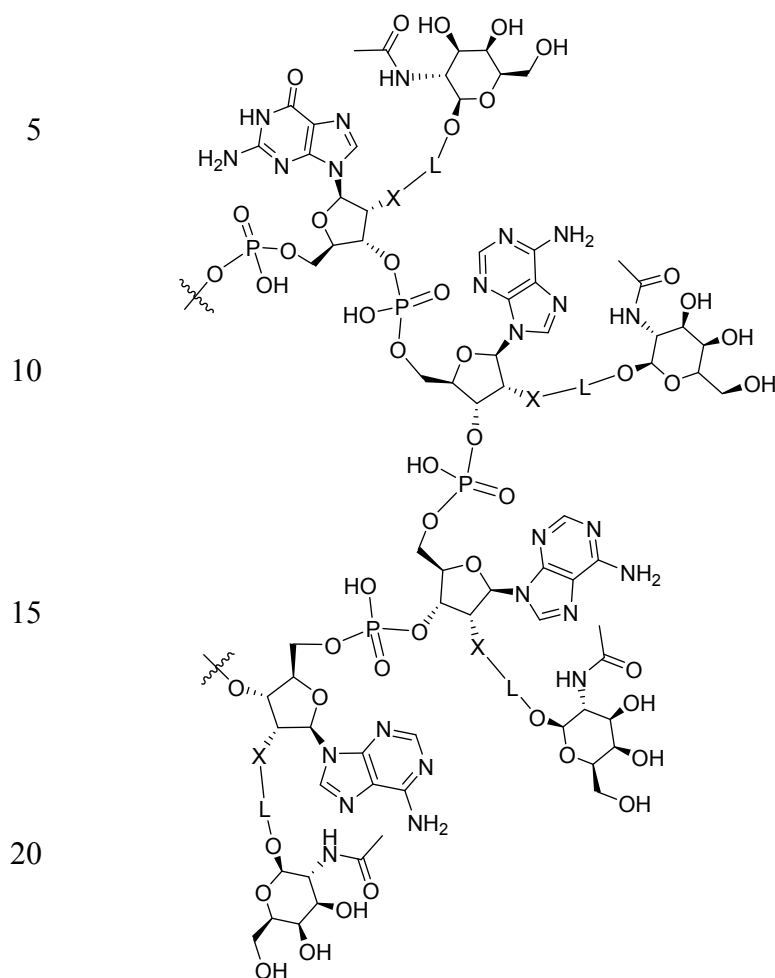
En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente comprende un GalNAc monovalente unido a un nucleótido Guanidina, referido como [ademG-GalNAc] o 2'-aminodietoximetanol-Guanidina-GalNAc, como se representa a continuación:



En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente comprende un GalNAc monovalente unido a un nucleótido adenina, referido como [ademA-GalNAc] o 2'-aminodietoximetanol-Adenina-GalNAc, como se representa a continuación.



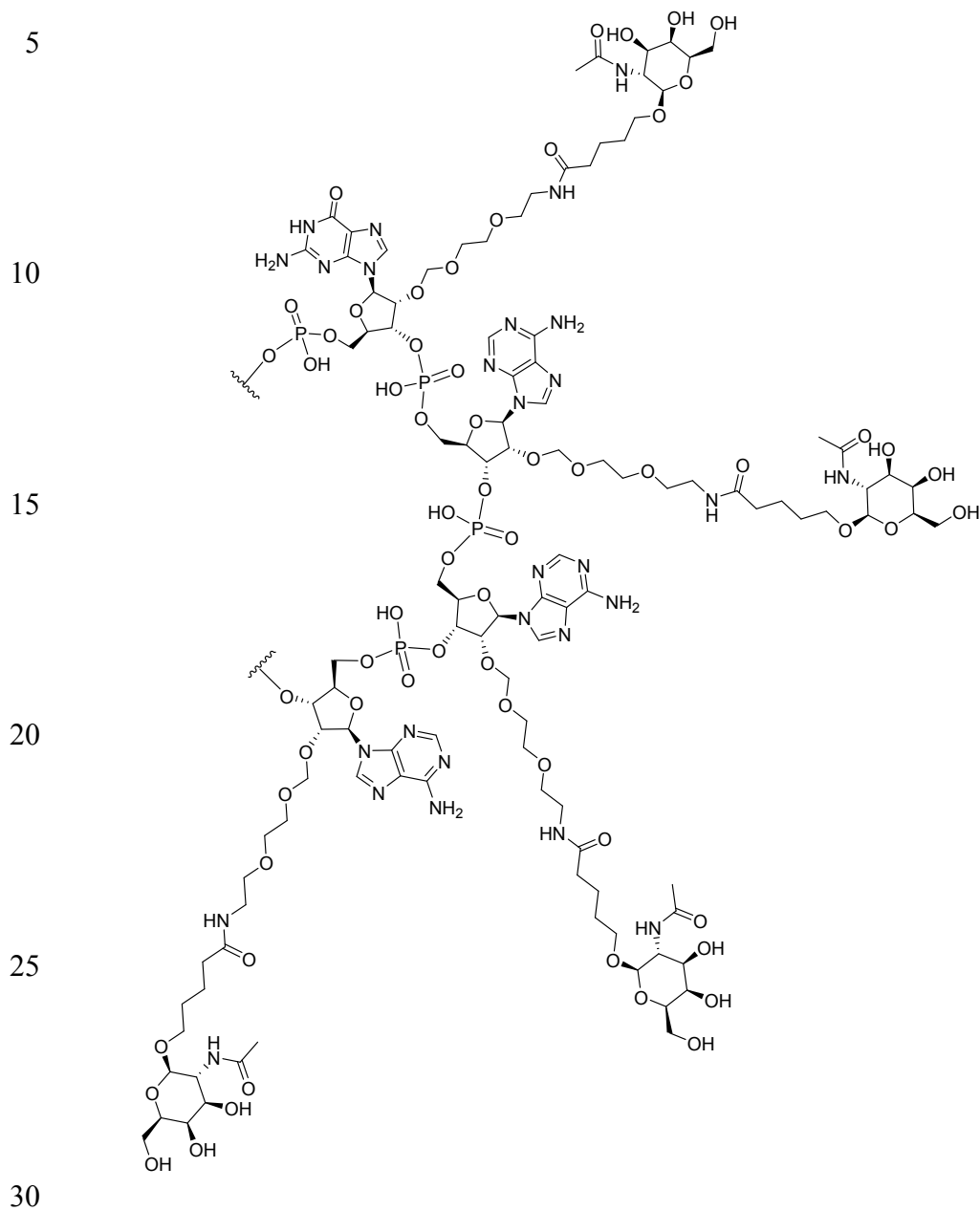
Un ejemplo de tal conjugación se muestra a continuación para un bucle que comprende de 5' a 3', se muestran los puntos de unión al tallo de la secuencia del nucleótido GAAA (L = enlazador, X = heteroátomo). Tal bucle puede estar presente, por ejemplo, en las posiciones 27 a 30 de la molécula mostrada en la Figura 1A. En la fórmula química,  es un punto de unión a la cadena del oligonucleótido.



Se pueden utilizar métodos o química apropiados (*por ejemplo*, química-click) para enlazar un ligando de direccionamiento a un nucleótido. En algunas modalidades, un ligando de direccionamiento está conjugado a un nucleótido utilizando un enlazador click. En algunas modalidades, se utiliza un enlazador a base de acetal para conjugar un ligando de direccionamiento a un nucleótido de cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente. Los enlazadores a base de acetal se describen, por ejemplo, en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Número WO2016100401 A1, que se publicó el 23 de junio de 2016, y cuyo contenido relacionado a tales enlazadores se incorpora en la presente para referencia. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador lábil. Sin embargo, en otras modalidades, el enlazador es bastante estable.

Un ejemplo se muestra a continuación para un bucle que comprende de 5' a 3' los nucleótidos GAAA, en el que las porciones GalNAc están unidas a nucleótidos del bucle utilizando un enlazador de acetal. Tal bucle puede estar presente, por ejemplo, en las posiciones 27 a 30 de la

molécula mostrada en la Figura 10. En la fórmula química,  es un punto de unión a la cadena del oligonucleótido.



III. Formulaciones

Se han desarrollado varias formulaciones para facilitar el uso del oligonucleótido. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden ser suministrados a un sujeto o un entorno celular utilizando una formulación que minimiza la degradación, facilita el suministro y/o captación, o

proporciona otra propiedad benéfica a los oligonucleótidos en la formulación. En algunas modalidades, en la presente se proporcionan composiciones que comprenden oligonucleótidos (*por ejemplo*, oligonucleótidos de cadena simple o de cadena doble) para reducir la expresión del antígeno de HBV (por ejemplo, HBsAg). Tales composiciones pueden ser formuladas
5 adecuadamente de modo que cuando se administran a un sujeto, ya sea en el entorno inmediato de una célula objetivo o sistémicamente, una porción suficiente de los oligonucleótidos entra a la célula para reducir la expresión del antígeno de HBV. Cualquiera de una variedad de formulaciones adecuadas del oligonucleótido se puede usar para suministrar los oligonucleótidos para la reducción del antígeno de HBV como se describe en la presente. En algunas modalidades, un oligonucleótido
10 es formulado en soluciones reguladoras de pH tales como soluciones de salina regulada con fosfato, liposomas, estructuras micelares, y cápsides.

Se pueden usar las formulaciones de oligonucleótidos con lípidos catiónicos para facilitar la transfección de los oligonucleótidos en las células. Por ejemplo, se pueden usar lípidos catiónicos, tales como lipofectina, derivados de glicerol catiónico, y moléculas policatiónicas (*por
15 ejemplo*, polilisina). Lípidos adecuados incluyen Oligofectamina, Lipofectamina (Life Technologies), NC388 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, Colo.), o FuGene 6 (Roche) todos los cuales pueden ser usados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En consecuencia, en algunas modalidades, una formulación comprende una nanopartícula lipídica. En algunas modalidades, un excipiente comprende un liposoma, un lípido, un
20 complejo de lípido, una microesfera, una micropartícula, una nanoesfera, o un nanopartícula, o puede ser formulado de otro modo para administración a las células, tejidos, órganos, o cuerpo de un sujeto en necesidad del mismo (véase, *por ejemplo*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22a edición, Pharmaceutical Press, 2013).

En algunas modalidades, las formulaciones como se describen en la presente
25 comprenden un excipiente. En algunas modalidades, un excipiente confiere a una composición estabilidad mejorada, absorción mejorada, solubilidad mejorada y/o mejora terapéutica del ingrediente activo. En algunas modalidades, un excipiente es un agente regulador (*por ejemplo*, citrato de sodio, fosfato de sodio, una base tris, o hidróxido de sodio) o un vehículo (*por ejemplo*, una solución regulada, petrolato, sulfóxido de dimetilo, o aceite mineral). En algunas modalidades,
30 un oligonucleótido es liofilizado para extender su vida útil y luego se forma como una solución antes del uso (*por ejemplo*, administración a un sujeto). En consecuencia, un excipiente en una composición que comprende cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente puede ser un lioprotector (*por ejemplo*, manitol, lactosa, polietilen glicol, o polivinil pirrolidona), o un modificador de temperatura de colapso (*por ejemplo*, dextrano, ficoll, o gelatina).

35 En algunas modalidades, se formula una composición farmacéutica para ser

compatible con su ruta de administración destinada. Ejemplos de rutas de administración incluyen parenteral, *por ejemplo*, administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (*por ejemplo*, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones
 5 acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables. Para administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.) o salina regulada con fosfato (PBS). El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, y
 10 polietilen glicol líquido, y lo similar), y mezclas adecuadas de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar los oligonucleótidos en una cantidad requerida en un solvente seleccionado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido
 15 por esterilización por filtración.

En algunas modalidades, una composición puede contener por lo menos cerca de 0.1% del agente terapéutico (*por ejemplo*, un oligonucleótido para la reducción de la expresión de antígeno de HBV) o más, aunque el porcentaje del(los) ingrediente(s) activo(s) puede estar entre cerca de 1% y cerca de 80% o más del peso o volumen de la composición total. Factores tales
 20 como solubilidad, biodisponibilidad, vida útil biológica, ruta de administración, vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas serán contempladas por un experto en la técnica de preparación de tales formulaciones farmacéuticas, y como tal, puede ser deseable una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

Incluso si un número de modalidades están dirigidas al suministro dirigido al hígado
 25 de cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente, también se contempla el direccionamiento a otros tejidos.

IV. Métodos de Uso

i. Reducción de la Expresión de HBsAg

30 En algunas modalidades, se proporcionan métodos para suministrar a una célula una cantidad eficaz de cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente para los fines de reducción de la expresión de HBsAg. Los métodos proporcionados en la presente son útiles en cualquier tipo apropiado de célula. En algunas modalidades, una célula es cualquier célula que expresa el antígeno de HBV (*por ejemplo*, hepatocitos, macrófagos, células derivadas de monocitos,
 35 células de cáncer de próstata, células del cerebro, tejido endócrino, médula ósea, nodos linfáticos,

pulmón, vesícula biliar, hígado, duodeno, intestino delgado, páncreas, riñón, tracto gastrointestinal, vejiga, tejido adiposo y suave y piel). En algunas modalidades, la célula es una célula primaria que ha sido obtenida de un sujeto y que puede haber sufrido un número limitado de pasajes, de modo que la célula mantiene sustancialmente sus propiedades fenotípicas naturales. En algunas

5 modalidades, una célula a la que se suministra el oligonucleótido está *ex vivo* o *in vitro* (*es decir*, puede ser suministrada a una célula en cultivo o a un organismo en el que reside la célula). En modalidades específicas, se proporcionan métodos para suministrar a una célula una cantidad eficaz de cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente para los fines de reducción de la expresión de HBsAg solamente en hepatocitos.

10 En algunas modalidades, los oligonucleótidos descritos en la presente pueden ser introducidos utilizando métodos apropiados de suministro de ácido nucleico incluyendo inyección de una solución que contiene los oligonucleótidos, bombardeo por partículas cubiertas por los oligonucleótidos, exponer la célula u organismo a una solución que contiene los oligonucleótidos, o electroporación de membranas celulares en la presencia de los oligonucleótidos. Se pueden usar

15 otros métodos apropiados para suministrar oligonucleótidos a las células, tal como transporte de portador mediado por lípido, transporte mediado por sustancia química, y transfección de liposoma catiónico tal como fosfato de calcio, y otros.

Las consecuencias de la inhibición pueden ser confirmadas por un ensayo apropiado para evaluar una o más propiedades de una célula o sujeto, o por técnicas bioquímicas que evalúan

20 moléculas indicativas de la expresión de antígeno de HBV (*por ejemplo*, ARN, proteína). En algunas modalidades, el grado al que un oligonucleótido proporcionado en la presente reduce los niveles de expresión de antígeno de HBV es evaluado al comparar los niveles de expresión (*por ejemplo*, niveles de ARNm o de proteína) de antígeno de HBV a un control apropiado (*por ejemplo*, un nivel de expresión de antígeno de HBV en una célula o población de células a las que un oligonucleótido

25 no ha sido suministrado a las que se ha suministrado un control negativo). En algunas modalidades, un nivel de control apropiado de la expresión de antígeno de HBV puede ser un nivel o valor predeterminado, de modo que un nivel de control no necesita ser medido cada vez. El nivel o valor predeterminado puede tomar una variedad de formas. En algunas modalidades, un nivel o valor predeterminado puede ser un valor de un solo corte, tal como una mediana o media.

30 En algunas modalidades, la administración de un oligonucleótido como se describe en la presente resulta en una reducción en el nivel de la expresión del antígeno de HBV (*por ejemplo*, HBsAg) en una célula. En algunas modalidades, la reducción en los niveles de la expresión de antígeno de HBV puede ser una reducción a 1% o menos, 5% o menos, 10% o menos, 15% o menos, 20% o menos, 25% o menos, 30% o menos, 35% o menos, 40% o menos, 45% o menos,

35 50% o menos, 55% o menos, 60% o menos, 70% o menos, 80% o menos, o 90% o menos en

comparación con un nivel de control apropiado de antígeno de HBV. El nivel de control apropiado puede ser un nivel de expresión de antígeno de HBV en una célula o población de células que no ha sido puesta en contacto con un oligonucleótido como se describe en la presente. En algunas modalidades, el efecto del suministro de un oligonucleótido a una célula de acuerdo con un método descrito en la presente es evaluado después de un periodo de tiempo finito. Por ejemplo, los niveles de antígeno de HBV pueden ser analizados en una célula por lo menos 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas; o por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, catorce, veintiún, veintiocho, treinta y cinco, cuarenta y dos, cuarenta y nueve, cincuenta y seis, sesenta y tres, setenta, setenta y siete, ochenta y cuatro, noventa y uno, noventa y ocho, 105, 112, 119, 126, 133, 140, o 147 días después de la introducción del oligonucleótido en la célula.

En algunas modalidades, la reducción en el nivel de la expresión del antígeno de HBV (por ejemplo, HBsAg) persiste por un periodo de tiempo extendido después de la administración. En algunas modalidades, una reducción detectable en la expresión de HBsAg persiste dentro de un periodo de 7 a 70 días después de la administración de un oligonucleótido descrito en la presente. Por ejemplo, en algunas modalidades, la reducción detectable persiste dentro de un periodo de 10 a 70, 10 a 60, 10 a 50, 10 a 40, 10 a 30, o 10 a 20 días después de la administración del oligonucleótido. En algunas modalidades, la reducción detectable persiste dentro de un periodo de 20 a 70, 20 a 60, 20 a 50, 20 a 40, o 20 a 30 días después de la administración del oligonucleótido. En algunas modalidades, la reducción detectable persiste dentro de un periodo de 30 a 70, 30 a 60, 30 a 50, o 30 a 40 días después de la administración del oligonucleótido. En algunas modalidades, la reducción detectable persiste dentro de un periodo de 40 a 70, 40 a 60, 40 a 50, 50 a 70, 50 a 60, o 60 a 70 días después de la administración del oligonucleótido.

En algunas modalidades, una reducción detectable en la expresión de HBsAg persiste dentro de un periodo de 2 a 21 semanas después de la administración de un oligonucleótido descrito en la presente. Por ejemplo, en algunas modalidades, la reducción detectable persiste dentro de un periodo de 2 a 20, 4 a 20, 6 a 20, 8 a 20, 10 a 20, 12 a 20, 14 a 20, 16 a 20, o 18 a 20 semanas después de la administración del oligonucleótido. En algunas modalidades, la reducción detectable persiste dentro de un periodo de 2 a 16, 4 a 16, 6 a 16, 8 a 16, 10 a 16, 12 a 16, o 14 a 16 semanas después de la administración del oligonucleótido. En algunas modalidades, la reducción detectable persiste dentro de un periodo de 2 a 12, 4 a 12, 6 a 12, 8 a 12, o 10 a 12 semanas después de la administración del oligonucleótido. En algunas modalidades, la reducción detectable persiste dentro de un periodo de 2 a 10, 4 a 10, 6 a 10, o 8 a 10 semanas después de la administración del oligonucleótido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido es suministrado en la forma de un transgén que es diseñado para expresar en una célula los oligonucleótidos (*por ejemplo*, sus cadenas

sentido y antisentido). En algunas modalidades, un oligonucleótido es suministrado utilizando un transgén que es diseñado para expresar cualquier oligonucleótido descrito en la presente. Los Transgenes pueden ser suministrados utilizando vectores virales (*por ejemplo*, adenovirus, retrovirus, virus de vacuna, poxvirus, virus adeno-asociado o virus de herpes simple) o vectores no virales (*por ejemplo*, plásmidos o ARNm sintéticos). En algunas modalidades, los transgenes pueden ser inyectados directamente a un sujeto.

ii. Métodos de tratamiento

Los aspectos de la descripción se refieren a métodos para la reducción de la expresión de HBsAg (por ejemplo, reducción de la expresión de HBsAg) para el tratamiento de infección de HBV en un sujeto. En algunas modalidades, los métodos pueden comprender administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente. La presente descripción proporciona tanto métodos profilácticos como terapéuticos de tratamiento de un sujeto en riesgo de (o susceptible a) infección de HBV y/o una enfermedad o trastorno asociado con la infección de HBV.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona un método para prevenir en un sujeto, una enfermedad o trastorno como se describe en la presente al administrar al sujeto un agente terapéutico (*por ejemplo*, un oligonucleótido o vector o transgén que codifica el mismo). En algunas modalidades, el sujeto a ser tratado es un sujeto quien se beneficiará terapéuticamente de una reducción en la cantidad de proteína de HBsAg, *por ejemplo*, en el hígado. Los sujetos en riesgo de la enfermedad o trastorno pueden ser identificados, por ejemplo, mediante uno o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico conocidos en la técnica (*por ejemplo*, la identificación de cirrosis hepática y/o inflamación del hígado). La administración de un agente profiláctico puede ocurrir antes de la detección de o la manifestación de síntomas característicos de la enfermedad o trastorno, de modo que la enfermedad o trastorno se previene o, alternativamente, se demora en su progresión.

Los métodos descritos en la presente típicamente involucran administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un oligonucleótido, es decir, una cantidad capaz de producir un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente aceptable puede ser una cantidad que es capaz de tratar una enfermedad o trastorno. La dosificación apropiada para cualquier sujeto dependerá de ciertos factores, incluyendo el tamaño del sujeto, área superficial corporal, edad, la composición particular que será administrada, el(los) ingrediente(s) activo(s) en la composición, tiempo y ruta de administración, salud general, y otros fármacos que se estén administrando concurrentemente. Por ejemplo, la dosificación puede estar en el intervalo de 0.1 mg/kg a 12 mg/kg. La dosificación también podría estar en el intervalo de 0.5 a 10 mg/kg. Alternativamente, la

dosificación puede estar en el intervalo de 1.0 a 6.0 mg/kg. La dosificación también podría estar en el intervalo de 3.0 a 5.0 mg/kg.

En algunas modalidades, un sujeto es administrado con cualquiera de las composiciones descritas en la presente ya sea enteralmente (*por ejemplo*, oralmente, por tubo de alimentación gástrica, por tubo de alimentación duodenal, vía gastrostomía o rectalmente),
 5 parenteralmente (*por ejemplo*, inyección subcutánea, inyección o infusión intravenosa, inyección o infusión intra-arterial, infusión intraósea, inyección intramuscular, inyección intracerebral, inyección intracerebroventricular, intratecal), tópicamente (*por ejemplo*, epicutánea, inhalación, vía gotas para los ojos, o a través de una membrana mucosa), o por inyección directa en un órgano objetivo (*por*
 10 *ejemplo*, el hígado de un sujeto). Típicamente, los oligonucleótidos descritos en la presente son administrados intravenosamente o subcutáneamente.

Como un conjunto de ejemplos no limitantes, los oligonucleótidos de la presente descripción podrían ser administrados típicamente trimestralmente (una vez cada tres meses), bi-
 mensualmente (una vez cada dos meses), mensualmente, o semanalmente. Por ejemplo, los
 15 oligonucleótidos pueden ser administrados cada una, dos, o tres semanas. Los oligonucleótidos pueden ser administrados diariamente.

En algunas modalidades, el sujeto a ser tratado es un primate humano o no humano u otro sujeto mamífero. Otros sujetos ejemplares incluyen animales domesticados tales como perros y gatos; ganado tal como caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras, y gallinas; y animales tales como
 20 ratones, ratas, cobayos, y hámsters.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Desarrollo de los inhibidores de la expresión de HBsAg de oligonucleótido potente

El antígeno de superficie de HBV fue identificado como un objetivo para la terapia a base de ARNi para tratar la infección de HBV. Como se representa en la organización del genoma de HBV mostrado en la Figura 1, el HBsAg es codificado por tres moléculas de ARN transcritas de un
 30 único ORF. Los oligonucleótidos fueron diseñados para los fines de silenciar uno o más transcritos de ARN que contribuyen al ensamblaje del HBsAg (ejemplo de sitio objetivo de ARNi indicado por "X" en la Figura 1). Un oligonucleótido que se dirige a HBsAg, HBV-254, fue diseñado y evaluado *in vitro* e *in vivo*. El HBV-254 fue seleccionado y diseñado con base en una capacidad de dirigirse directamente a transcritos de ARNm para cuatro especies de ARN de HBV. El oligonucleótido dúplex
 35 HBV-254 usado en los experimentos incluyó una cadena sentido de una secuencia como se establece

en (mostrada 5' a 3'): GUGGUGGACUUCUCUCAAUAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 21); y una cadena antisentido de una secuencia como se establece en (mostrada 5' a 3'): UAUUGAGAGAAGUCCACCACGG (SEQ ID NO: 22).

Se realizó una evaluación de dosis única del oligonucleótido HBV-254 en ratones HDI, demostrando la capacidad de dirigir subcutáneamente el transcrito viral de HBsAg (Figura 2). Como se muestra, el HBV-254 redujo sistemáticamente los niveles de HBsAg en ratones con el aumento de la dosificación. La potencia preclínica fue evaluada además en ratones después de un régimen de dosificación QW×3 en el que se administró subcutáneamente HBV-254 a 3 mg/kg (Figura 3). Los puntos de administración son indicados por flechas en la figura. Los niveles de HBsAg fueron monitoreados tanto en ratones tratados con oligonucleótido como en ratones de control sin tratar por un periodo que abarcó 147 días. Persistieron niveles disminuidos de HBsAg en los ratones tratados a través de la totalidad del estudio, con niveles de expresión (con respecto al control) que parecen asentarse en un valor de referencia reducido aproximadamente a los dos meses después de la primera administración.

Se identificaron oligonucleótidos adicionales potentes que se dirigen a HBsAg por investigación *in vitro* utilizando un ensayo de reportero psiCHECK con oligonucleótidos en forma de tetrabucle sin modificar. Los resultados de tres diferentes placas se muestran en la Figura 4. Cada oligonucleótido, incluyendo HBV-254, fue evaluado a tres concentraciones (1, 10, y 100 pM) en células HeLa utilizando el ensayo de reportero a base de fluorescencia. Los resultados reportados para cada placa se muestran además en comparación con el control positivo (8, 40, y 200 pM), control negativo (1 nM), y transfección falsa. Los oligonucleótidos mostrados resaltados con cuadros fueron escalados hacia arriba para pruebas *in vivo*, en las que se encontró que el HBV-219 y HBV-258 eran los oligonucleótidos más potentes entre HBV-254 y esos identificados de la investigación. El HBV-219 exhibió una mejora multi-log en potencia sobre HBV-254 y fue seleccionado para evaluación adicional.

EJEMPLO 2

Análisis de conservación de secuencia y diseño de malos apareamientos para aumentar la utilidad terapéutica global

Muchos de los oligonucleótidos más potentes evaluados en el Ejemplo 1 fueron comparados contra secuencias de genoma para los genotipos A a I de HBV. Los resultados de un análisis de conservación inicial se listan en el Cuadro 1. Como se muestra, el HBV-219 tiene relativamente bajo por ciento de conservación a través de estos genomas. Sin embargo, el por ciento de conservación aumenta significativamente (de 66% a 96%) si se introduce un mal

apareamiento (MM) en la posición 15 de la cadena guía. Los datos de secuencia del virus de la hepatitis B virus (HBV) genotipificado de la base de datos pública GenBank, incorporado en la presente para referencia, se usó para la cura y alineación bioinformática.

5

CUADRO 1

Análisis de conservación inicial con las secuencias de HBV superiores

10

Oligonucleótido	Cadena guía con MM en letras negritas	% de conservación a través de los genomas	% de conservación si el MM es tolerado
HBV-0217	UUUGUGAGGAUU UU UGUCAAGG	66	97
HBV-0219	UUAUUGUGAGGAUU UU UGUCGG	66	96
HBV-0254	UC UGAGAGAAGUCCACCACGGG	94	98
HBV-0255	U AC UGAGAGAAGUCCACCACGG	95	99
HBV-0258	UAAAA C UGAGAGAAGUCCACGG	94	98

15

Un análisis de conservación subsecuente fue conducido, el cual se enfocó en muchos de los oligonucleótidos del Cuadro 1 e involucró parámetros más amplios de búsqueda. Por ejemplo, mientras el análisis inicial incluyó solo las secuencias de genoma de longitud completa, el análisis enfocado incluyó secuencias de longitud completa y parcial (>80% de identidad al sitio objetivo). Adicionalmente, el número de genomas examinado aumentó de 5,628 en el análisis inicial a más de 17,000 genomas en el análisis enfocado. Los resultados del análisis enfocado estuvieron en concordancia general con las tendencias observadas en el análisis inicial (Cuadro 2). Como se muestra—y se ilustra además en la Figura 5— se predijo que el HBV-219 sería inactivo contra los genotipos de HBV B, E, F, H, y I a menos que el mal apareamiento en la posición 15 de la cadena guía sea tolerado.

20

CUADRO 2
Análisis de conservación enfocada

5		HBV-219	HBV-254	HBV-258
	ORF Objetivo	S	S	S
	Sentido 19-mer	GACAAGAATCCTCACAATA	CGTGGTGGACTTCTCTCAA	GTGGACTTCTCTCAATTTT
	Sentido 19-mer c/Base ambigua	GACA A NAATCCTCACAAT	CGTGGTGGACTTCTCT CAN	GTGGACTTCTCT CAN TTTT
	Posición de la Guía de Mal apareamiento	15	2	6
10	de Conservación genotipo*	Genotipo A	97/99 [3278]	94/97 [4002]
		Genotipo B	03 /95 [2563]	81 /97 [2700]
		Genotipo C	92/97 [4783]	95/97 [4938]
		Genotipo D	95/97 [4311]	96/99 [4395]
		Genotipo E	01 /98 [1039]	93/95 [1234]
		Genotipo F	01 /90 [425]	94/96 [501]
		Genotipo G	92/99 [83]	98/98 [85]
		Genotipo H	03 /92 [71]	87 /99 [78]
		Genotipo I	00 /100 [18]	95/100 [22]
15	TOTAL (Análisis enfocado)	72 /97 [17021]	93/97 [17995]	93/98 [17959]
	TOTAL (Análisis inicial)	66 /96 [5628]	94/98 [5628]	94/98 [5628]

*Por ciento de conservación reportado como (*perfecto/MM*), con valores <90% mostrados en letras negritas; [Total N#]

20 Se utilizó un sistema reportero de luciferasa doble psiCHECK-2 para evaluar los efectos de un mal apareamiento en una posición seleccionada en cada uno de HBV-217, HBV-219, HBV-254, HBV-255, y HBV-258. El vector de psiCHECK habilita el monitoreo de los cambios en la expresión de un gen objetivo fusionado a un gen reportero, donde el ARNi activo degrada el constructo de fusión para producir una disminución correspondiente en la señal del reportero. El diagrama en la Figura 6 representa generalmente el vector utilizado en estos ensayos. La secuencia reportera parcial madre contuvo 120 fragmentos de pares de bases del Genotipo A (GenBank: AM282986.1) alrededor de los sitios objetivo de interés en el S ORF. Las secuencias dúplex del oligonucleótido madre tienen 100% de homología al plásmido del reportero en los sitios correspondientes mostrados en la Figura 6, mientras que las secuencias dúplex del oligonucleótido con mal apareamiento tienen un único mal apareamiento al plásmido del reportero. Las secuencias madre y con mal apareamiento para los oligonucleótidos probados se muestran en la Figura 7 alineados con las secuencias correspondientes de reportero parcial madre.

30 Para los ensayos de mal apareamiento de ejemplo, los oligonucleótidos probados incluyeron los mismos patrones de modificación. De acuerdo con el esquema de numeración mostrado para cada oligonucleótido en la Figura 7, las modificaciones fueron como sigue: 5'-Metoxi,

fosfonato-4'-oxi-2'-O-metiluridina en la posición 1; nucleótidos modificados con 2'-fluoro en las posiciones 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16, y 19; nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, y 20-22; y enlaces internucleótido fosforotioato entre los nucleótidos en las posiciones 1 y 2, 2 y 3, 3 y 4, 20 y 21, y 21 y 22. Las posiciones del mal apareamiento fueron diferentes para cada conjunto de madre y mal apareamiento, y se muestran en cuadros en la Figura 7.

Los ensayos de reportero de psiCHECK2 con cada oligonucleótido se realizaron durante un periodo de tres días utilizando una dilución serial de 6 puntos, de 5 veces iniciando a 1 nM transfectado en células HeLa. En el día 1, 10,000 células HeLa/pocillo (96 pocillos) se sembraron en una placa de fondo transparente, con paredes negras (80-90% confluyente). En el día 2, el ADN del vector y la molécula de ARNi se diluyeron en la cantidad apropiada de Medio Opti-MEM® I sin suero y se mezclaron suavemente. Después de mezclar suavemente Lipofectamine® 2000, 0.2 µL se diluyeron en 25 µL de Medio Opti-MEM® I sin suero para cada reacción. La dilución se mezcló suavemente y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Después de los 5 minutos de incubación, se combinaron volúmenes iguales del ADN diluido y molécula de ARNi con el Lipofectamine® 2000 diluido. La mezcla combinada fue mezclada suavemente e incubada por 20 minutos a temperatura ambiente para permitir que ocurriera la formación del complejo. Después de esto, los complejos de molécula de ADN-ARNi-Lipofectamine® 2000 se agregaron a cada pocillo conteniendo las células y medio y se mezcló suavemente al mecer la placa de un lado al otro. Luego las células fueron incubadas a 37 °C en una incubadora de CO₂ hasta que las células estuvieron listas para cosecha y ensayo para el gen objetivo. En el día 3, 100 µL de Reactivo Dual-Glo se agregaron a cada pocillo, se mezclaron e incubaron por 10 minutos antes de la lectura de luminiscencia. Se agregaron otros 100 µL de Dual-Glo Stop & Glo a cada pocillo, se mezclaron e incubaron por 10 minutos antes de la lectura de luminiscencia. Se generaron curvas de dosis-respuesta para cada oligonucleótido madre y con mal apareamiento para evaluar los efectos de los malos apareamientos en la actividad. Los valores de EC₅₀ determinados para cada oligonucleótido se muestran en el Cuadro 3 con especificaciones adicionales.

CUADRO 3**Evaluación de Mal apareamiento de oligonucleótidos que se dirigen a HBsAg**

	HBV-217	HBV-219	HBV-254	HBV-255	HBV-258
5 ORF Objetivo	S	S	S	S	S
Sentido 19-mer	TGTTGACAAGAA TCCTCACAAT	GACAAGAATCCT CACAATA	CGTGGTGGACT TCTCTCAA	TCGTGGTGGAC TTCTCTCAAT	GTGGACTTCTCT CAATTTT
Sentido 19-mer c/Base ambigua	TGTTGACAANA ATCCTCACAAT	GACAANAATCC TCACAATA	CGTGGTGGACT TCTCTCAN	TCGTGGTGGAC TTCTCTCANT	GTGGACTTCTCT CANTTTT
Posición de la Guía de Mal apareamiento	13	15	2	3	6
10 EC ₅₀ S Madre (pM)	20	5	37	35	10
EC ₅₀ S de MM (pM)	25	8	96	366	>1000

Como se demuestra por los valores de EC₅₀ relativos, las curvas de dosis-respuesta *in vitro* para los dúplexes de HBV-219 no mostraron pérdida de actividad con un único mal apareamiento en la posición 15 de la cadena guía. Análisis subsecuentes *in vivo* comparando oligonucleótidos HBV-219 madre (en la presente designado HBV(s)-219P1) y con mal apareamiento (en la presente designado HBV(s)-219P2) confirmaron que la introducción del mal apareamiento no produjo una pérdida de actividad (Figura 8). Como se muestra en el gráfico de titulación de dosis única representado en la Figura 9, el oligonucleótido dúplex con mal apareamiento HBV-219 (HBV(s)-219P2) fue tolerado *in vivo* sobre un periodo de 70 días después de la administración.

La Figura 10 ilustra un ejemplo de una estructura dúplex modificada para HBV-219 con el mal apareamiento incorporado (en la presente designado HBV(s)-219). De acuerdo con el esquema de numeración mostrado para cada oligonucleótido en la Figura 7, la cadena sentido expande los nucleótidos 1 a 36 y la cadena antisentido expande los oligonucleótidos 1 a 22, la última cadena se muestra numerada en la orientación de derecha a izquierda. La forma dúplex se muestra con una muesca entre los nucleótidos en la posición 36 en la cadena sentido y la posición 1 en la cadena antisentido. Las modificaciones en la cadena sentido fueron como sigue: Los nucleótidos modificados con 2'-fluoro en las posiciones 3, 8-10, 12, 13, y 17; nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-26, y 31-36; un enlace fosforotioato internucleótido entre los nucleótidos en las posiciones 1 y 2; 2'-OH nucleótidos en las posiciones 27-30; un 2'-aminodietoximetanol-Guanidina-GalNAc en la posición 27; y un 2'-aminodietoximetanol-Adenina-GalNAc en cada una de las posiciones 28, 29, y 30. Las modificaciones en la cadena antisentido fueron como sigue: 5'-Metoxi, fosfonato-4'-oxi-2'-O-metiluridina fosforotioato en la posición 1; nucleótidos modificados con 2'-fluoro en las posiciones 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16, y 19; nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, y 20-22; y enlaces

fosforotioato internucleótidos entre los nucleótidos en las posiciones 1 y 2, 2 y 3, 3 y 4, 20 y 21, y 21 y 22. La cadena antisentido incluyó un mal apareamiento incorporado en la posición 15. También como se muestra, la cadena antisentido del dúplex incluyó un colgante "GG" expandiendo las posiciones 21 a 22.

- 5 Los detalles acerca del HBV(s)-219 y los dos precursores referidos anteriormente (HBV(s)-219P1 y HBV(s)-219P2) se muestran en el Cuadro 4.

CUADRO 4

HBV(s)-219 y precursores

10

15

20

25

Oligonucleótidos de ARNi	Longitud (sentido/antisentido)	Modificaciones de Secuencia/Químicas
HBV(s)-219	36/22mer	Contiene mal apareamiento en la posición 15 de la cadena antisentido. Se usó un enlazador de GalNAc a base de acetal. Se usa metoxi, fosfonato-4'oxi- 2'-O-metiluridina (MeMOP) en la posición 1 de la cadena antisentido. Véase la Figura 10 y la Figura 19A
HBV(s)-219P2	36/22mer	Contiene mal apareamiento en la posición 15 de la cadena antisentido. Una conjugación a base de química click incorpora un enlazador de GalNAc a base de triazol. Se usa 5'-fosfonato-4'oxi- 2'-O-metiluridina (MOP) completamente protegido en la posición 1 de la cadena antisentido. Véase la Figura 19B
HBV(s)-219P1	36/22mer	No contiene el mal apareamiento en la posición 15 de la cadena antisentido. Mismas modificaciones químicas como HBV(s)-219P2.

EJEMPLO 3

Actividad antiviral de los Precursores de HBV(s)-219

30

35

Se evaluaron los efectos del tratamiento con los precursores de HBV(s)-219 en la localización subcelular del antígeno de núcleo de HBV (HBcAg). Ratones NOD_{scid} fueron sometidos a una inyección hidrodinámica (HDI) de un dímero de cabeza-cola de genoma de HBV. El tratamiento con el oligonucleótido fue iniciado 2 semanas post-HDI. La tinción inmunohistoquímica de hepatocitos aislados de los ratones después del tratamiento mostró una reducción aguda en la

expresión del antígeno de núcleo de HBV (HBcAg).

El secuenciamiento del ARN fue realizado para examinar los efectos de la reducción en la expresión de HBsAg en la expresión total de los transcritos virales de HBV. Los hepatocitos fueron aislados de ratones HDI cuatro días después de tres dosis una vez a la semana a 3mg/kg cada una. El ARN total fue extraído de los hepatocitos y sometido a secuenciamiento Illumina utilizando la Plataforma HiSeq. La Figura 11B representa los resultados del secuenciamiento de ARN en los que las secuencias del transcrito de ARN fueron mapeadas contra los ARN de HBV. El sitio objetivo del HBV(s)-219 y sus precursores también se representa, mostrando que el oligonucleótido se dirige a los transcritos de pgRNA (3.5kb), S1 (2.4kb), y S2 (2.1kb). Los resultados muestran que, en comparación con los controles de vehículo, el tratamiento con el HBV(s)-219P1 resultó en más de 90% de silenciamiento de todos los transcritos virales de HBV.

Los efectos duraderos del oligonucleótido HBV(s)-219P1 fueron examinados en dos modelos diferentes de ratón de HBV – un modelo de HDI, que es dependiente de ADNccc, y un modelo de AAV, que es independiente de ADNccc. Un análisis de transcurso de tiempo (12 semanas) de la expresión de ARNm de HBsAg fue realizado en el contexto de un tratamiento que involucra tres dosis una vez a la semana de 3mg/kg con el oligonucleótido HBV(s)-219P1 que se dirige al ARNm de HBsAg en comparación con el control de vehículo y un oligonucleótido de ARNi que se dirige al ARNm de HBxAg en el modelo de HDI de HBV (Figura 12A). El oligonucleótido HBV(s)-219P1 produjo una reducción de ≥ 3.9 log, con una duración relativamente larga de la actividad persistiendo por más de 7 semanas; mientras que por comparación un oligonucleótido que se dirige a HBV(x) produjo una reducción de cerca de 3.0 log, que persistió por una duración más corta.

Un análisis adicional de transcurso de tiempo (12 semanas) de la expresión de ARNm de HBsAg fue realizado en el contexto de un tratamiento que involucra tres dosis una vez a la semana de 3mg/kg con el oligonucleótido HBV(s)-219P2 que se dirige al ARNm de HBsAg en comparación con el control de vehículo y un oligonucleótido de ARNi que se dirige al ARNm de HBxAg en el modelo de AAV-HBV (Figura 12B). En este modelo, el oligonucleótido HBV(s)-219P2 produjo una reducción log y duración comparable como un oligonucleótido que se dirige a HBV(x). El oligonucleótido de ARNi que se dirige al ARNm de HBxAg usado en las Figuras 12A y 12B tiene una secuencia de la cadena sentido de UGCACUUCGCGUCACCUCUAGCAGCCGAAAGGCUGC y una secuencia de la cadena antisentido de UAGAGGUGACGCGAAGUGCAGG. Este oligonucleótido de ARNi que se dirige a HBxAg es designado en la presente GalXC-HBVX.

Se realizó la tinción inmunohistoquímica para examinar la distribución subcelular de HbcAg en hepatocitos obtenidos del modelo de AAV-HBV y del modelo de HDI de HBV después del tratamiento con los oligonucleótidos precursores de HBV(s)-219 como se indicó anteriormente que se

dirigen al ARNm de HBsAg en comparación con control de vehículo y un oligonucleótido de ARNi que se dirige al ARNm de HBxAg, como se describió anteriormente. (Figura 13) La proteína de Núcleo Residual (HBcAg) después del tratamiento exhibió diferencias notables en la localización subcelular entre los dos oligonucleótidos de ARNi en el modelo de HDI, pero no en el modelo de AAV.

5

EJEMPLO 4

Evaluación de HBV(s)-219P1 en el Modelo de Hígado Humano Quimérico de Genotipo C de PXB-HBV

10 La actividad antiviral de HBV(s)-219P1 fue evaluada en el modelo de PXB-HBV, también conocido en la literatura de HBV como el modelo de hígado humano quimérico. Esta tecnología se basa en injertar hepatocitos humanos en ratones gravemente inmunocomprometidos, utilizando luego un mecanismo genético para envenenar los hepatocitos murinos anfitriones (Tateno et al., 2015). Este proceso resulta en ratones que contienen hígados derivados de > 70% de tejido humano, que, a diferencia de los ratones de tipo silvestre, pueden ser infectados con HBV (Li et al., 15 2014). El modelo de PXB-HBV sirve muchos propósitos en el contexto de la farmacología de HBV(s)-219: (1) para confirmar que el oligonucleótido puede acoplarse a la maquinaria de ARNi humana (RISC) in vivo, (2) para confirmar que la configuración del ligando de direccionamiento a GalNAc se puede internalizar en los hepatocitos vía ASGR humano in vivo, y (3) para confirmar la eficacia en un 20 modelo de infección verdadero de HBV (de manera opuesta a un modelo diseñado de la expresión de HBV). A pesar de la limitación de que los hepatocitos humanos injertados resultan en una fisiología de hígado quimérico irregular (Tateno et al., 2015), se puede observar una eficacia antiviral significativa en este modelo.

Aproximadamente 8 semanas después de la infección inicial de los ratones con el 25 Genotipo C de HBV, se recolectaron plasmas de cada ratón para servir como una medición de HBsAg de valor de referencia. Luego, cohortes de 9 ratones cada uno (n=3 para PK, n=6 para PD) recibieron 3 inyecciones SC semanalmente de 0 (PBS) o 3 mg/kg de HBV(s)-219P1. El primer día de la dosificación es considerado el día 0. Las recolecciones de sangre no terminal se realizaron semanalmente para determinar los niveles de HBsAg en suero y ADN de HBV circulante en cada 30 ratón (Figuras 14A a 14D). Los ratones fueron eutanizados para los puntos finales de tejido terminal en el día 28. En el día 28 se analizaron muestras de hígado para los niveles de ADN de HBV intrahepático y de ADNccc. Se observó una actividad antiviral significativa en todos los puntos finales que fueron analizados para los ratones tratados con HBV(s)-219P1, incluyendo >80% de reducción de HBsAg, así como disminuciones significativas en el ADN de HBV circulante, ADN de HBV 35 intrahepático, y ADNccc (Figuras 14A a 14D). Estos datos demuestran que el tratamiento con

HBV(s)-219 resulta en actividad antiviral en hepatocitos humanos infectados después de administración sistémica.

EJEMPLO 5

El HBV(s)-219P2 Potencia la actividad antiviral de Entecavir

El estándar de cuidado actual, análogos de nucleótido(s) (por ejemplo, Entecavir) son eficaces para reducir el ADN genómico de HBV circulante, pero no reducen el HBsAg circulante. Aunque esto resulta en una viremia controlada mientras se está en tal tratamiento, se requiere tratamiento de por vida y raramente se logra una cura funcional. Los oligonucleótidos de ARNi que se dirigen al antígeno S impactan tanto a la polimerasa viral como a la proteína HBsAg. En este estudio, se exploraron los efectos combinatorios de HBV(s)-219P2 como una monoterapia y el tratamiento combinatorio con entecavir en un ratón que expresa HBV (modelo de HDI) para actividad antiviral.

Los ratones fueron administrados diariamente con dosificación oral de 500 ng/kg de Entecavir (ETV) por 14 días. Se realizó una única administración subcutánea de HBV(s)-219P2. La carga viral circulante (ADN de HBV) fue medida por qPCR (Figura 15A), se midieron los niveles en plasma de HBsAg por ELISA (Figura 15B), y se midieron los niveles de ARNm de HBV y pgRNA por qPCR. Se observaron efectos aditivos claros con la terapia de combinación con HBV(s)-219P2 y ETV. Los resultados muestran que la terapia de ETV sola no muestra eficacia contra el HBsAg circulante o los ARN virales hepáticos. Además, la actividad antiviral de HBV(s)-219P2 según se mide por HBsAg o HBV ARN no se ve impactada por la codosificación del ETV (Figuras 15B a 15C).

Como se muestra en las Figuras 15A a 15C, la monoterapia de entecavir dosificado a 500 ng/kg PO diariamente por 14 días resultó en una disminución media de ~ 1.6 log en el ADN de HBV detectado en plasma con respecto a los ratones tratados con PBS (n=6). No se observó una disminución significativa en cualquiera del HBsAg circulante, o ARN virales hepáticos. La monoterapia de una única dosis de 1 mg/kg, o 3 mg/kg SC de HBV(s)-219P2 en el día 0 resultó en una media de ~ 0.8 log, o ~ 1.8 log en el ADN de HBV detectado en plasma con respecto al PBS respectivamente (n=7). La monoterapia de una única dosis de 6 mg/kg SC de HBV(s)-219P2 en el día 0 resultó en una disminución media de ~ 2.5 log en ADN de HBV en plasma así como los niveles en dos ratones que caen debajo del límite de detección (n=7). La monoterapia de una única dosis SC de HBV(s)-219P2 en el día 0 resultó en disminuciones dependientes de dosis tanto en HBsAg circulante, así como en ARN virales hepáticos. La terapia de combinación de entecavir dosificado a 500 ng/kg PO diariamente por 14 días y una única dosis de 1 mg/kg SC de HBV(s)-219P2 en el día 0 resultó en la reducción aditiva en el ADN de HBV detectado en el plasma por una media de ~ 2.3 log.

Reducciones similares en niveles de HBsAg en plasma y transcritos virales hepáticos como se observa con una monoterapia de una única dosis de 1 mg/kg SC de HBV(s)-219P2 indicando la capacidad de adición en la reducción del ADN de HBV en plasma, pero no del HBsAg circulante, o transcrito viral hepático.

5

EJEMPLO 6

Comparación de la Actividad Antiviral de HBV(s)-219P2 y GalXC-HBVX

En este estudio, se monitorearon ratones que expresan HBV (modelo de HDI) fueron administrados con HBV(s)-219P2, GalXC-HBVX (misma secuencia que el GalXC-HBVX usado en las Figuras 12A y 12B), o una combinación de los dos niveles de oligonucleótidos de ARNi y de HBsAg en plasma dos semanas o nueve semanas post-dosis. Como se muestra en la Figura 16B, niveles similares de supresión de HBsAg se observaron 2 semanas después del tratamiento con una única dosis de saturación de 9 mg/kg SC de cualquiera de HBV(s)-219P2, GalXC-HBVX, o una combinación de ambos. La supresión prolongada de HBsAg fue observada en ratones tratados con el tratamiento de HBV(s)-219P2 que se dirige a S, mientras que los ratones tratados con el GalXC-HBVX, o una combinación de ambos, tuvo una recuperación significativa de HBsAg 9 semanas después del tratamiento (n=3).

La localización subcelular del Antígeno de Núcleo de HBV (HBcAg) en ratones que expresan HBV también fue evaluada en ratones que reciben HBV(s)-219P2, GalXC-HBVX, o una combinación de los dos oligonucleótidos de ARNi. Los ratones que expresan HBV (modelo de HDI) fueron tratados con una única dosis de saturación de (9 mg/kg, s.c.) de HBV(s)-219P2, GalXC-HBVX o una combinación 1:1. En los puntos de tiempo indicados en la Figura 17A, se tiñeron secciones de hígado para HBcAg; se muestran los hepatocitos representativos. Los cohortes tratados con HBV(s)-219P2, ya sea como una monoterapia o en combinación con GalXC-HBVX, representan el HBcAg nuclear. Los cohortes tratados solo con GalXC-HBVS muestran solo la localización citosólica de HBcAg, reportado como un indicador de pronóstico favorable de respuesta al tratamiento (Huang et al. J. Cell. Mol. Med. 2018). El porcentaje de células positivas a HBcAg con tinción nuclear en cada animal es mostrado en la Figura 17B (n=3/grupo, 50 células contadas por animal, 2 semanas después de la dosificación). Para confirmar que el efecto en la localización subcelular de HBcAg se debe a la región del transcriptoma de HBV, y no a una propiedad desconocida de la secuencia de ARNi, se diseñaron y probaron secuencias alternativas, dirigidas dentro de los marcos de lectura abiertos de X y S (véase la Figura 17C). HBV-254 fue usado en la Figura 17C. La secuencia de HBV-254 se describe en el Ejemplo 1. El oligonucleótido alternativo que se dirige a HBxAg usado en la Figura 17C tiene una secuencia de la cadena sentido de

GCACCUCUCUUUACGCGGAAGCAGCCGAAAGGCUGC y una secuencia antisentido de UUCCGCGUAAAGAGAGGUGCGG. Los dos oligonucleótidos de ARNi alternativos tienen diferentes secuencias objetivo de ARNi en el antígeno S o X que los oligonucleótidos de ARNi usados en la Figura 16B. Sin embargo, ellos presentan el mismo efecto diferencial en el nivel de HBcAg en plasma, indicando que el efecto es específico al direccionamiento a S per se, pero no específico al oligonucleótido utilizado.

EJEMPLO 7

Evaluación de la Seguridad, Tolerancia en sujetos humanos sanos y Eficacia del HBV(s)-219 en pacientes con HBV

Este estudio es diseñado para evaluar la seguridad y tolerancia en sujetos sanos (Grupo A) y la eficacia del HBV(s)-219 en pacientes con HBV (Grupo B). La información de dosis por cohorte se muestra en la Figura 18. La estructura molecular del HBV(s)-219 se muestra en la Figura 10, la Figura 19A, y también se ilustra a continuación:

Cadena Sentido: 5' mG-S-mA-fC-mA-mA-mA-mA-fA-fU-fC-mC-fU-fC-mA-mC-mA-fA-mU-mA-mA-mG-mC-mA-mG-mC-mC-[ademG-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-mG-mG-mC-mU-mG-mC 3'

Hibridada a:

Cadena Antisentido: 5' [MeFosfonato-4O-mU]-S-fU-S-fA-S-mU-fU-mG-fU-fG-mA-fG-mG-fA-mU-fU-mU-mG-fU-mC-S-mG-S-mG 3'

Leyenda:

mX: 2'-O-metil ribonucleótido

fX: 2'-fluoro-desoxiribonucleótido

[ademA-GalNAc]: 2'-modificado-GalNAc adenosina

[ademG-GalNAc]: 2'-modificado-GalNAc guanosina

[Me-Fosfonato-4O-mU]: 4'-O-monometilfosfonato-2'-O-metil uridina

Enlaces: "-" denota fosfodiéster

"-S-" denota fosforotioato

Los criterios de selección de pacientes se muestran a continuación.

Grupo A – Sujetos Sanos

Criterios de Inclusión:

1. Edad 18 (o edad de consentimiento legal, el que sea más antiguo) a 65 años inclusive, al momento de firmar el consentimiento informado.

2. Manifiestamente sano al momento de la investigación según se determinó por evaluación médica incluyendo historial médico, examen físico, y pruebas de laboratorio.

a. Sin síntomas de enfermedad en curso

b. Sin anormalidades clínicamente significativas en la temperatura corporal, ritmo cardíaco, ritmo respiratorio, presión sanguínea

c. Sin enfermedad cardiovascular o pulmonar clínicamente significativa, y sin enfermedad cardiovascular o pulmonar que requiera medicación farmacológica.

3. Electrocardiograma de 12 derivaciones (ECG) dentro de los límites normales o sin anormalidades clínicamente significativas en la investigación y en el día -1 en la opinión del Investigador

4. Examen negativo para abuso de alcohol o fármacos en la Visita 1 de Investigación y admisión (día -1)

5. No fumadores por lo menos por 5 años precedente a la Visita 1 de Investigación, con una concentración de cotinina urinaria negativa en la Visita 1 de Investigación

6. Índice de masa corporal (BMI) dentro del intervalo 18.0 – 32.0 kg/m² (inclusive).

7. Masculino o Femenino:

a. Participantes masculinos:

Un participante masculino debe estar de acuerdo en usar contracepción, durante el periodo de tratamiento y por lo menos por dos semanas después de la intervención de la dosis de estudio y restringirse de donar esperma durante este periodo.

b. Participante Femeninos:

Un participante femenino es elegible para participar si ella no está embarazada, no está lactando, y por lo menos aplica una de las siguientes condiciones: No es una mujer con potencial de embarazo (WOCBP), o, dependiendo de la región; un WOCBP que está de acuerdo en seguir la guía contraceptiva, iniciando al enrolarse en el estudio post-investigación continuando a través de todo el periodo de tratamiento y por lo menos por 12 semanas después de la intervención de la dosis de estudio.

8. Capaz de dar consentimiento informado firmado 1, que incluye el cumplimiento con los requerimientos y restricciones.

Criterios de Exclusión, Grupo A

1. Historia de cualquier condición médica que pueda interferir con la absorción, distribución o eliminación del fármaco de estudio, o con las evaluaciones clínicas y de laboratorio en este estudio, incluyendo (pero no limitado a); enfermedad renal crónica o recurrente, trastornos funcionales del intestino (por ejemplo, diarrea o estreñimiento frecuentes), enfermedad del tracto

GI, pancreatitis, trastorno de convulsiones, trastorno mucocutáneo o músculo-esquelético, historia de intento(s) de suicidio(s) o ideas suicidas, o depresión clínicamente significativa u otro trastorno neuropsiquiátrico que requiera intervención farmacológica

2. Hipertensión controlada deficientemente o inestable; o BP sistólica sostenida > 150 mmHg (19.99 KPa) o BP diastólica > 95 mmHg (12.66 KPa) en el Examen
3. Historia de diabetes mellitus tratada con insulina o agentes hipoglucémicos
4. Historia de asma que requiera admisión a hospital dentro de los 12 meses anteriores
5. Evidencia de deficiencia de G-6-PD según se determina por el resultado del Examen en el laboratorio central del estudio
6. Condiciones endócrinas actualmente controladas deficientemente, con la excepción de condiciones tiroideas (hiper/hipotiroidismo, etc.) donde se excluyen cualesquier condiciones de tiroides tratadas farmacológicamente
7. Una historia de malignidad es seguida si la malignidad del participante ha estado en remisión completa sin quimioterapia y sin intervenciones adicionales médicas o quirúrgicas durante los tres años anteriores
8. Historia de alergias a múltiples fármacos o historia de reacción alérgica a un oligonucleótido o GalNAc
9. Historia de intolerancia a inyección(es) SC o cicatrices abdominales significativas que pudieran ocultar potencialmente la administración o evaluación de la intervención de estudio de tolerancia local
10. Historia quirúrgica clínicamente relevante
11. Historia de abuso persistente de etanol (> 40 gm de etanol/día) o uso de fármacos ilícitos dentro de los 3 años anteriores.
12. Enfermedad clínicamente significativa dentro de los 7 días antes de la administración de la intervención de estudio
13. Donación de más de 500 mL de sangre dentro de los 2 meses antes de la administración de la intervención de estudio o donación de plasma dentro de 7 días antes del Examen
14. Infección significativa o proceso inflamatorio conocido en curso en la Investigación (en la opinión del Investigador)
15. Historia de infección del tracto urinario crónica o recurrente (UTI), o UTI dentro de un mes antes del Examen
16. Programado para un procedimiento quirúrgico de elección durante la realización de este estudio

17. Uso de medicamentos de prescripción dentro de 4 semanas antes de la administración de la intervención de estudio

18. Uso de medicamentos sin receta médica (OTC) o suplementos herbales, excluyendo vitaminas de rutina, dentro de 7 días de la primera dosificación, a menos que sea acordado como clínicamente no relevante por el Investigador y Patrocinador.

19. Ha recibido un agente bajo investigación dentro de los 3 meses antes de la dosificación o está en seguimiento de otro estudio clínico antes de enrolarse al estudio.

20. Seropositivo para HBV, HIV, HCV, o anticuerpo de HDV en la Investigación (se puede usar la prueba histórica si se realiza dentro de los 3 meses antes de Investigación)

21. Alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamyl transferasa (GGT), bilirrubina total, fosfatasa alcalina (ALP), o albúmina fuera del intervalo de referencia en la Visita de Investigación o en la admisión (Día -1)

22. Anormalidades en las pruebas de conteo sanguíneo completo que son consideradas clínicamente relevante e inaceptables por el Investigador; hemoglobina <12.0 g/dL (equivalente a 120 g/L); plaquetas fuera del intervalo normal.

23. Hemoglobina A1C (HbA1C) > 7%

24. Cualquier otro resultado de prueba de laboratorio de seguridad considerado clínicamente significativo e inaceptable por el Investigador

25. Ha realizado, o planea realizar, un cambio significativo en los niveles de ejercicio de 48 horas antes de la entrada en el centro de investigación clínica hasta el final del estudio.

26. Cualquier condición que, en la opinión del Investigador, pudiera hacer al participante inadecuado para enrolarse o que podría interferir con la participación en o el término del estudio.

25 Grupo B Adultos con Hepatitis B

Criterios de Inclusión, Grupo B

1. Edad 18 (o edad de consentimiento legal, el que sea más viejo) a 65 años inclusive, al momento de firmar el consentimiento informado.

2. Infección crónica de hepatitis B, documentada mediante:

30 a. historia clínica compatible con CHB, basada en información clínica compatible, y seropositividad previa para HBsAg y potencialmente otros marcadores serológicos de HBV (HBeAg, ADN de HBV)

b. HBsAg en suero > 1000 IU/mL en la Investigación para pacientes positivos a HBeAg, o > 500 IU/mL para pacientes negativos a HBeAg

35 c. ADN de HBV en suero > 20,000 IU/mL en la Investigación para pacientes sin

tratamiento, según se determina por el ensayo TaqMan™ de ADN de HBV v2.0 en el laboratorio central del estudio

- d. IgM anti-HBc en suero negativo
- 3. Historia clínica compatible con enfermedad hepática compensada, sin evidencia de
- 5 cirrosis:
 - a. Sin historia de hemorragia de várices esofágicas o gastrointestinales
 - b. Sin historia de ascitis
 - c. Sin historia de ictericia atribuida a enfermedad hepática crónica
 - d. Sin historia de encefalopatía hepática
 - 10 e. Sin estigmata física de hipertensión portal – angiomata de araña, etc.
 - f. Sin biopsia hepática previa, estudio de imagenología hepática, o resultado de elastografía que indique cirrosis
- 4. Sin tratamiento para hepatitis B: sin terapia antiviral previa para hepatitis B (sin tratamiento previo de HBV que contenga nucleótido o interferón) O continuamente en terapia de
- 15 nucleótido(s) (entecavir o tenofovir) por lo menos por 12 semanas antes de la visita de Investigación, con tolerancia y cumplimiento satisfactorios
- 5. ALT en suero > 60 U/L (hombres) o > 38 U/L (mujeres) (2x ULN por la American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) HBV guidance criteria, Terrault et al., 2016)
- 6. ECG de 12 derivaciones sin anomalías clínicamente significativas en la
- 20 Investigación y Día -1 (en la opinión del Investigador)
- 7. Sin otra causa conocida de enfermedad hepática
- 8. Sin otra condición médica que requiera manejo médico persistente o intervención farmacológica crónica o recurrente, distinta de hipertensión bien controlada y manejo de estatina de hipercolesterolemia
- 25 9. BMI dentro del intervalo 18.0 – 32.0 kg/m² (inclusive)
- 10. Masculino o femenino
 - a. Participantes masculinos:
 - Un participante masculino debe estar de acuerdo en usar contracepción durante el periodo de tratamiento y por lo menos por 12 semanas después de la última dosis de la intervención
 - 30 de estudio y restringirse de donar esperma durante este periodo.
 - b. Participante Femeninos:
 - Un participante femenino es elegible para participar si ella no está embarazada, no está lactando, y por lo menos aplica una de las siguientes condiciones: No ser una WOCBP o, dependiendo de la región UNA WOCBP quien está de acuerdo en seguir la guía contraceptiva
 - 35 durante el periodo de tratamiento y por lo menos por 12 semanas después de la dosis de la

intervención de estudio.

11. Capaz de dar consentimiento informado firmado, que incluye el cumplimiento con los requerimientos y restricciones.

5 Criterios de Exclusión, grupo B

1. Historia de cualquier condición médica que pueda interferir con la absorción, distribución o eliminación del fármaco de estudio, o con las evaluaciones clínicas y de laboratorio en este estudio, incluyendo (pero no limitado a); enfermedad renal crónica o recurrente, trastornos funcionales del intestino (por ejemplo, diarrea o estreñimiento frecuentes), enfermedad del tracto
10 GI, pancreatitis, trastorno de convulsiones, trastorno mucocutáneo o músculo-esquelético, historia de intento(s) de suicidio(s) o ideas suicidas, o depresión clínicamente significativa u otro trastorno neuropsiquiátrico que requiera intervención farmacológica

2. Hipertensión controlada deficientemente o inestable

3. Historia de diabetes mellitus tratada con insulina o agentes hipoglucémicos

15 4. Historia de asma que requiera admisión a hospital dentro de los 12 meses anteriores

5. Evidencia de deficiencia de G-6-PD según se determina por el resultado del Examen en el laboratorio central del estudio

20 6. Condiciones endócrinas actualmente controladas deficientemente, con la excepción de condiciones tiroideas (por ejemplo, hiper/hipotiroidismo, etc.) donde se excluyen cualesquier condiciones de tiroides tratadas farmacológicamente

7. Historia de UTI crónica o recurrente, o UTI dentro de un mes antes de la Investigación

8. Historia de HCC

25 9. Historia de malignidad distinta de HCC es permisible si la malignidad del participante ha estado en remisión completa sin quimioterapia y sin intervenciones adicionales médicas o quirúrgicas durante los tres años anteriores

10. Historia de abuso persistente de etanol (> 40 gm de etanol/día) o uso de fármacos ilícitos dentro de los 3 años anteriores.

30 11. Historia de intolerancia a inyección(es) SC o cicatrices abdominales significativas que pudieran ocultar potencialmente la administración o evaluación de la intervención del estudio de tolerancia local.

12. Recepción de una transfusión en las últimas 6 semanas antes de la terapia o transfusiones anticipadas a través del seguimiento post-ensayo.

35 13. Donación o pérdida de > 500 mL de sangre dentro de 2 meses antes de la

Investigación, o donación de plasma dentro de 7 días antes de la Investigación

14. Terapia antiviral (distinta de entecavir o tenofovir) dentro de 3 meses de la Investigación o tratamiento con interferón en los últimos 3 años

15. Uso dentro de los últimos 6 meses de (o un requerimiento anticipado para) anticoagulantes, corticosteroides administrados sistémicamente, inmunomoduladores administrados sistémicamente, o inmunosupresores administrados sistémicamente

16. Uso de medicamentos de prescripción dentro de 14 días antes de la administración de la intervención de estudio que, en la opinión del PI o el Patrocinador, pudiera interferir con la realización del estudio. Productos tópicos sin absorción sistémica, estatinas (excepto rosuvastatina), medicamentos hipertensores, medicamentos para el dolor OTC y de prescripción o contraceptivos hormonales (mujeres) son aceptable.

17. Inyección de depósito o implante de cualquier fármaco dentro de 3 meses antes de la administración de la intervención de estudio, con la excepción de control de natalidad inyectable/implantable.

18. Uso persistente de suplementos herbales o medicamentos sistémicos sin receta médica; los participantes deben estar dispuestos a suspender por la duración del periodo de estudio

19. Ha recibido un agente bajo investigación dentro de los 3 meses antes de la dosificación o está en seguimiento de otro estudio clínico antes de enrolarse al estudio.

20. Elastografía Hepática (es decir FibroScan®) kPa > 10.5 en la Investigación

21. Presión sanguínea sistólica >150 mmHg (19.99 KPa) y una presión sanguínea diastólica de >95 mmHg (12.66 KPa) después de 10 minutos de reposo supina, en la Investigación.

22. Transaminasas hepáticas (ALT o AST) confirmadas > 7 x ULN en la Investigación

23. Historia de hiperbilirrubinemia persistente o recurrente, a menos que se sepa de Enfermedad de Gilbert o Síndrome de Dubin-Johnson

24. Seropositivo para anticuerpos al virus de inmunodeficiencia humana (HIV) o virus de hepatitis C (HCV) o virus de hepatitis delta (HDV)

25. Hgb < 12 g/dL (hombres) o < 11 g/dL (mujeres)

26. Albúmina en suero <3.5 g/dL en la Investigación.

27. Conteo total de WBC < 4,000 células/ μ L o conteo absoluto de neutrófilos (ANC) <1800 células/ μ L en la Investigación.

28. Conteo de plaquetas $\leq$ 100,000 por μ L en la Investigación.

29. Proporción normalizada internacional (INR) o tiempo de protrombina (PT) arriba del límite superior del intervalo de referencia normal (de acuerdo al intervalo de referencia del laboratorio local) en la Investigación.

30. BUN o creatinina en suero > ULN

31. Amilasa o lipasa en suero > 1.25 x ULN

32. HbA1c en suero > 7.0%

33. alfa fetoproteína en suero (AFP) valor >100 ng/mL. Si el AFP en la Investigación es > ULN pero < 100 ng/mL, el paciente es elegible si un estudio de imagenología hepático no
5 revela lesiones sospechosas de posible HCC

34. Cualquier otro resultado de prueba de laboratorio de seguridad considerado clínicamente significativo e inaceptable por el Investigador

35. Ha realizado, o planea realizar, un cambio significativo en los niveles de ejercicio de 48 horas antes de la entrada en el centro de investigación clínica hasta el final del estudio.

10 36. Cualquier condición que, en la opinión del Investigador, pudiera hacer al participante inadecuado para enrolarse o que podría interferir con la participación en o el término del estudio.

La descripción descrita ilustrativamente en la presente puede ser practicada convenientemente en la ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que
15 no se describen específicamente en la presente. Por lo tanto, por ejemplo, en cada caso en la presente cualquiera de los términos "comprende", "consiste esencialmente de", y "consiste en" puede ser reemplazado con cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que han sido empleados son usados como términos de descripción y no de limitación, y no existe la intención de que en el uso de tales términos y expresiones se excluya cualesquier equivalentes de
20 las características mostradas y descritas o porciones de las mismas, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reclamada. Por lo tanto, se debe entender que aunque la presente invención ha sido descrita específicamente mediante modalidades preferidas, se pueden reorganizar características opcionales, con la modificación y variación de los conceptos descritos en la presente por esos expertos en la técnica, y que tales modificaciones y
25 variaciones son consideradas estando dentro del alcance de esta invención como se define por la descripción y las reivindicaciones anexas.

El uso de los términos "un" y "una" y "el, la" y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se han de considerar cubriendo tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en la
30 presente o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "comprende," "tiene," "incluye," y "contiene" han de ser considerados como términos de extremo abierto (*es decir*, significa "incluye, pero no se limita a,") a menos que se indique de otro modo. La indicación de intervalos de valores en la presente meramente pretende servir como un método inmediato para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, a menos que se indique de otro modo en la
35 presente, y cada valor separado es incorporado en la especificación como si estuviese indicado

individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente pueden ser realizados en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otro modo en la presente o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (*por ejemplo*, "tal como") proporcionado en la presente, pretende solamente ilustrar mejor
5 la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención a menos que se reclame de otro modo. Ningún lenguaje en la especificación ha de considerarse como indicando cualquier elemento no reclamado como esencial para la práctica de la invención.

Las modalidades de esta invención son descritas en la presente, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de esas
10 modalidades pueden volverse evidentes a esos de experiencia ordinaria en la técnica luego de la lectura de la descripción anterior.

Los inventores esperan que los técnicos expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención sea practicada de otro modo que como se describe específicamente en la presente. En consecuencia, esta invención incluye todas las
15 modificaciones y equivalentes de la materia objeto recitada en las reivindicaciones anexas a la misma según lo permita la ley aplicable. Así mismo, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos está comprendida por la invención a menos que se indique de otro modo en la presente o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando no más
20 que la experimentación de rutina, numerosos equivalentes a las modalidades específicas de la invención que se describen en la presente. Tales equivalentes pretenden estar comprendidos por las siguientes reivindicaciones.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un oligonucleótido para la reducción de la expresión de ARNm de antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg), el oligonucleótido comprende una cadena antisentido de 19 a 30 nucleótidos de longitud, en donde la cadena antisentido comprende una región de complementariedad a una secuencia de ARNm de HBsAg como se establece en ACAANAAUCCUCACAAUA (SEQ ID NO: 1).
- 10 2.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende adicionalmente una cadena sentido de 19 a 50 nucleótidos de longitud, en donde la cadena sentido forma una región dúplex con la cadena antisentido.
- 3.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque la cadena sentido comprende una región de complementariedad a una secuencia como se establece en UUNUUGUGAGGAUUN (SEQ ID NO: 2).
- 15 4.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 2 o 3, caracterizado además porque la cadena sentido comprende una región de complementariedad a una secuencia como se establece en 5'-UUAUUGUGAGGAUUNUUGUC (SEQ ID NO: 3).
- 5.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque la cadena antisentido comprende una secuencia como se establece en UUAUUGUGAGGAUUNUUGUCGG (SEQ ID NO: 4).
- 20 6.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque la cadena antisentido consiste en una secuencia como se establece en UUAUUGUGAGGAUUCUUGUCGG (SEQ ID NO: 5).
- 25 7.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque la cadena antisentido consiste en una secuencia como se establece en UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG (SEQ ID NO: 5.1).
- 8.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, caracterizado además porque la cadena sentido comprende una secuencia como se establece en ACAANAAUCCUCACAAUAA (SEQ ID NO: 6).
- 30 9.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, caracterizado además porque la cadena sentido comprende una secuencia como se establece en GACAANAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 7).
- 10.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, caracterizado además porque la cadena sentido consiste en una secuencia como se establece en
- 35

GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 8).

11.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, caracterizado además porque la cadena sentido consiste en una secuencia como se establece en GACAAGAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 8.1).

5 12.- Un oligonucleótido para la reducción de la expresión de ARNm de antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg), el oligonucleótido comprende una cadena sentido que forma una región dúplex con una cadena antisentido, en donde la cadena sentido comprende una secuencia como se establece en GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 8), en donde la cadena antisentido comprende una secuencia como se establece en
10 UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG (SEQ ID NO: 5.1), en donde cada una de la cadena antisentido y la cadena sentido comprende uno o más nucleótidos modificados con 2'-fluoro y 2'-O-metilo y por lo menos un enlace fosforotioato, en donde el 4'-carbono del azúcar del 5'-nucleótido de la cadena antisentido comprende un análogo de fosfato, y en donde la cadena sentido está conjugada a una o más porciones de N-acetilgalactosamina (GalNAc).

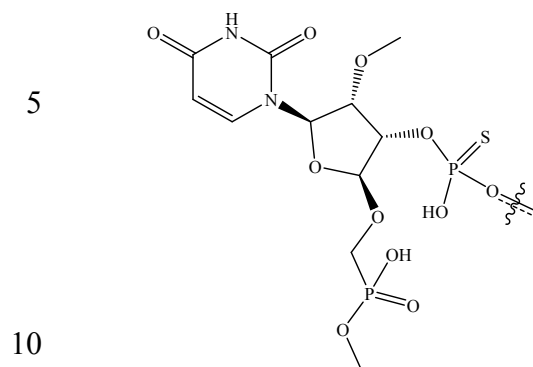
15 13.- Un oligonucleótido para la reducción de la expresión de ARNm de antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg), el oligonucleótido comprende una cadena sentido que forma una región dúplex con una cadena antisentido, en donde: la cadena sentido comprende una secuencia como se establece en GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 8) y comprende nucleótidos modificados con 2'-fluoro en las posiciones 3, 8 a 10, 12, 13, y 17,
20 nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 2, 4 a 7, 11, 14 a 16, 18 a 26, y 31 a 36, y por lo menos un enlace fosforotioato internucleótido, en donde la cadena sentido está conjugada a una o más porciones de N-acetilgalactosamina (GalNAc); y la cadena antisentido comprende una secuencia como se establece en UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG (SEQ ID NO: 5.1) y comprende nucleótidos modificados con 2'-fluoro en las posiciones 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16, y 19,
25 nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, y 20 a 22, y por lo menos tres enlaces fosforotioato internucleótidos, en donde el 4'-carbono del azúcar del 5'-nucleótido de la cadena antisentido comprende un análogo de fosfato.

14.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque la cadena sentido comprende un enlace fosforotioato entre los nucleótidos en las
30 posiciones 1 y 2.

15.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 13 o 14, caracterizado además porque la cadena antisentido comprende cinco enlaces fosforotioato entre los nucleótidos 1 y 2, 2 y 3, 3 y 4, 20 y 21, y 21 y 22.

16.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a
35 14, caracterizado además porque el 5'-nucleótido de la cadena antisentido tiene la siguiente

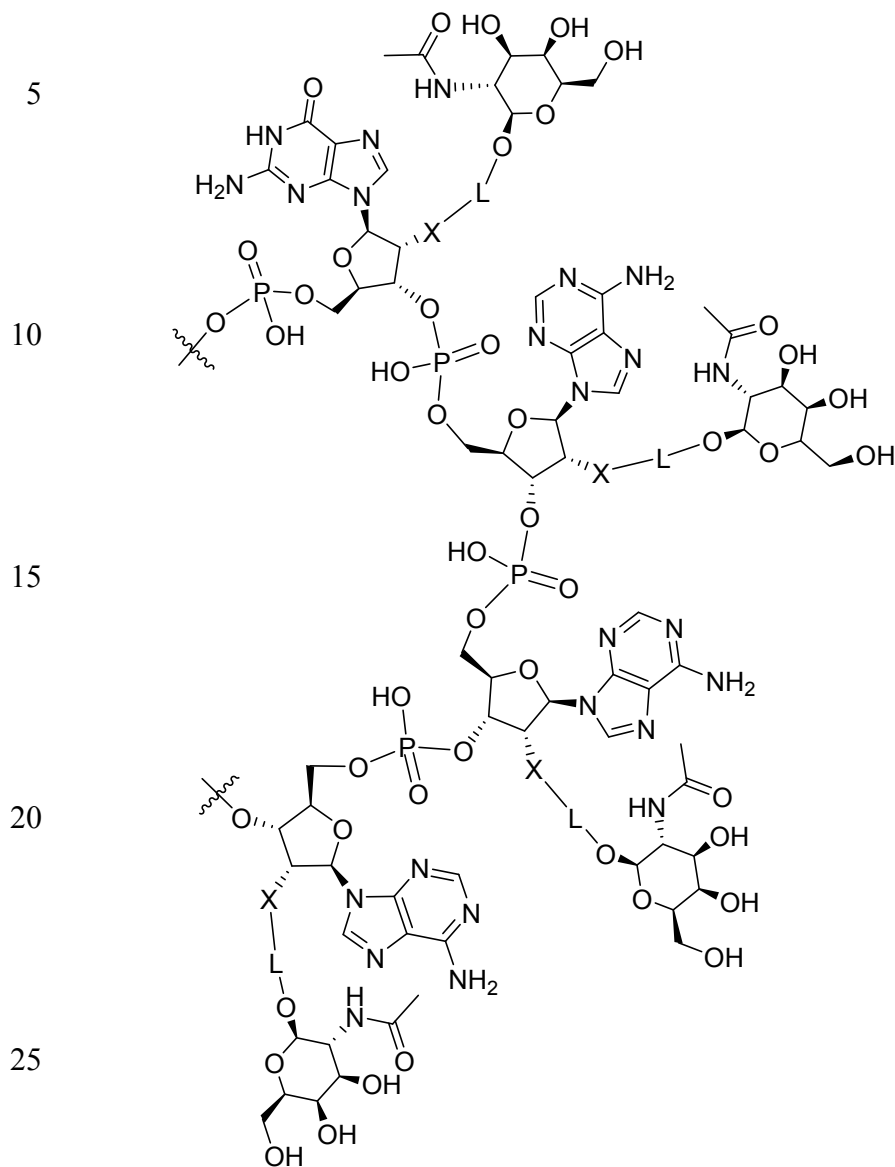
estructura:



17.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, caracterizado además porque uno o más de los nucleótidos de la secuencia –GAAA– en la cadena sentido está conjugado a una porción de GalNac monovalente.

18.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado además porque cada uno de los nucleótidos de la secuencia –GAAA– en la cadena sentido está conjugado a una porción de GalNac monovalente.

19.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado
20 además porque el motivo –GAAA– comprende la estructura:



en donde: L representa un enlace, manejo de química-click, o un enlazador de 1 a 20, inclusive, átomos de longitud, unidos covalentemente, consecutivos, seleccionados del grupo que consiste en alquileo sustituido y no sustituido, alquilenilo sustituido y no sustituido, alquinileo sustituido y no sustituido, heteroalquileo sustituido y no sustituido, heteroalquilenilo sustituido y no sustituido, heteroalquinileo sustituido y no sustituido, y combinaciones de los mismos; y X es un O, S, o N.

20.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado además porque L es un enlazador de acetal.

21.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 19 o la reivindicación 20, caracterizado además porque X es O.

22.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado además porque la secuencia –GAAA– comprende la estructura:

5

10

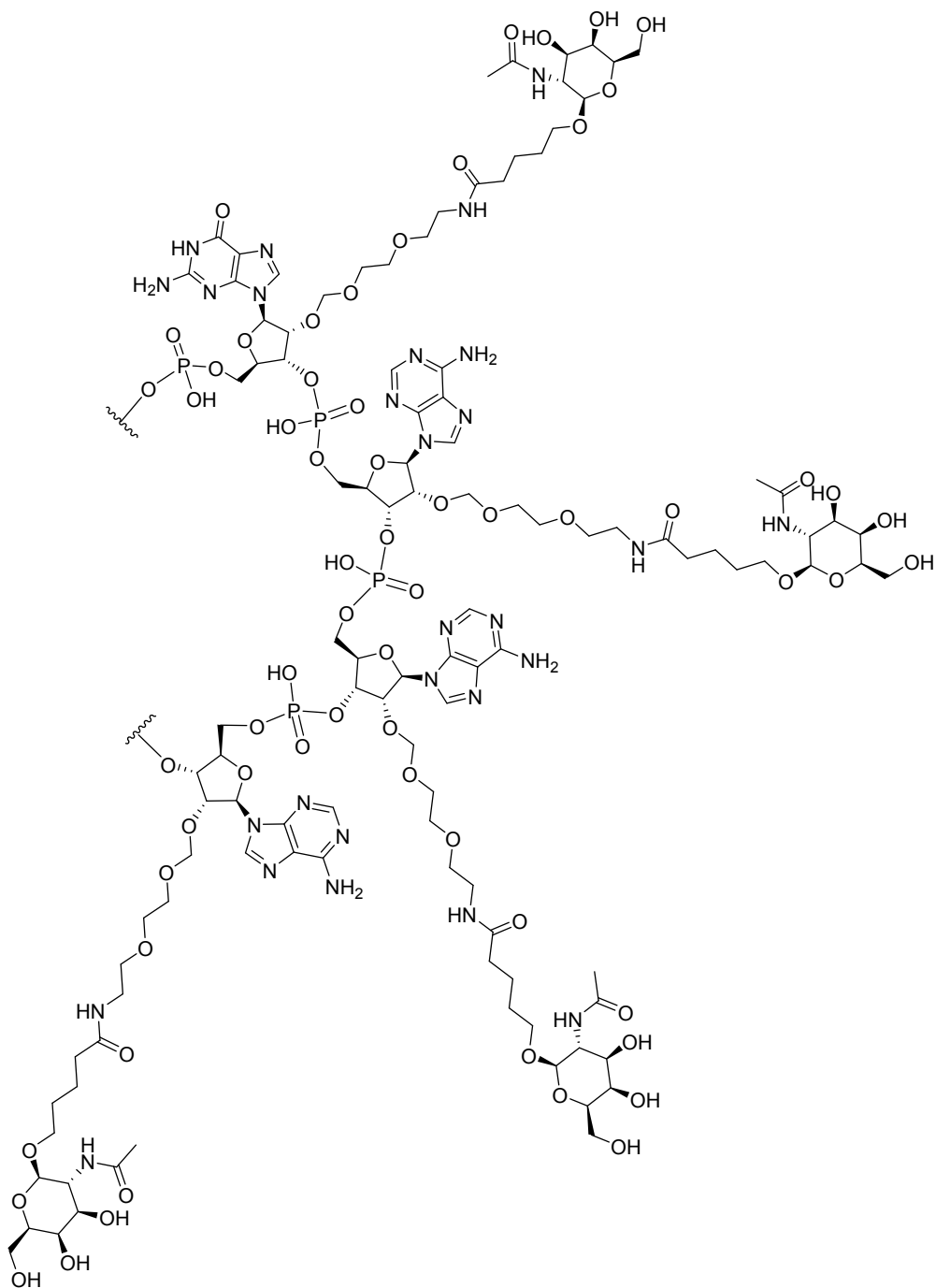
15

20

25

30

35



23.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque la cadena sentido comprende en su extremo 3' un tallo-bucle establecido como: S_1 -L- S_2 , en donde S_1 es complementario a S_2 , y en donde L forma un bucle entre S_1 y S_2 de hasta 6 nucleótidos de longitud.

5 24.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque L es un tetrabucle.

25.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 23 o 24, caracterizado además porque L forma un bucle entre S_1 y S_2 de 4 nucleótidos de longitud.

10 26.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, caracterizado además porque L comprende una secuencia establecida como GAAA.

27.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, caracterizado además porque cada uno de hasta 4 nucleótidos de L del tallo-bucle está conjugado a un GalNAc separado.

15 28.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado además porque el oligonucleótido comprende por lo menos un nucleótido modificado.

29.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque el nucleótido modificado comprende una modificación 2'.

20 30.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado además porque la modificación 2' es una modificación seleccionada de: 2'-aminoetilo, 2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo, y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro- β -d-arabinonucleico.

31.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado además porque todos los nucleótidos del oligonucleótido son nucleótidos modificados.

25 32.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado además porque el oligonucleótido comprende por lo menos un enlace internucleótido modificado.

33.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado además porque el por lo menos un enlace internucleótido modificado es un enlace de fosforotioato.

30 34.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado además porque el 4'-carbono del azúcar del 5'-nucleótido de la cadena antisentido comprende un análogo de fosfato.

35.- El oligonucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado además porque por lo menos un nucleótido del oligonucleótido está conjugado a un ligando de direccionamiento.

35 36.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado además porque el ligando de direccionamiento es una porción de N-acetilgalactosamina (GalNAc).

37.- Una composición que comprende un oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un contraión.

38.- Una composición que comprende un oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 39.- Un método para la reducción de la expresión de antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBV) en una célula, el método comprende suministrar a la célula un oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36.

40.- El método de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado además porque la célula es un hepatocito.

10 41.- El método de conformidad con la reivindicación 30 a 40, caracterizado además porque la célula está *in vivo*.

42.- El método de conformidad con la reivindicación 39 o 40, caracterizado además porque la célula está *in vitro*.

15 43.- Un método de tratamiento de una infección de virus de hepatitis B (HBV) en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36 o una composición de la reivindicación 37 o 38.

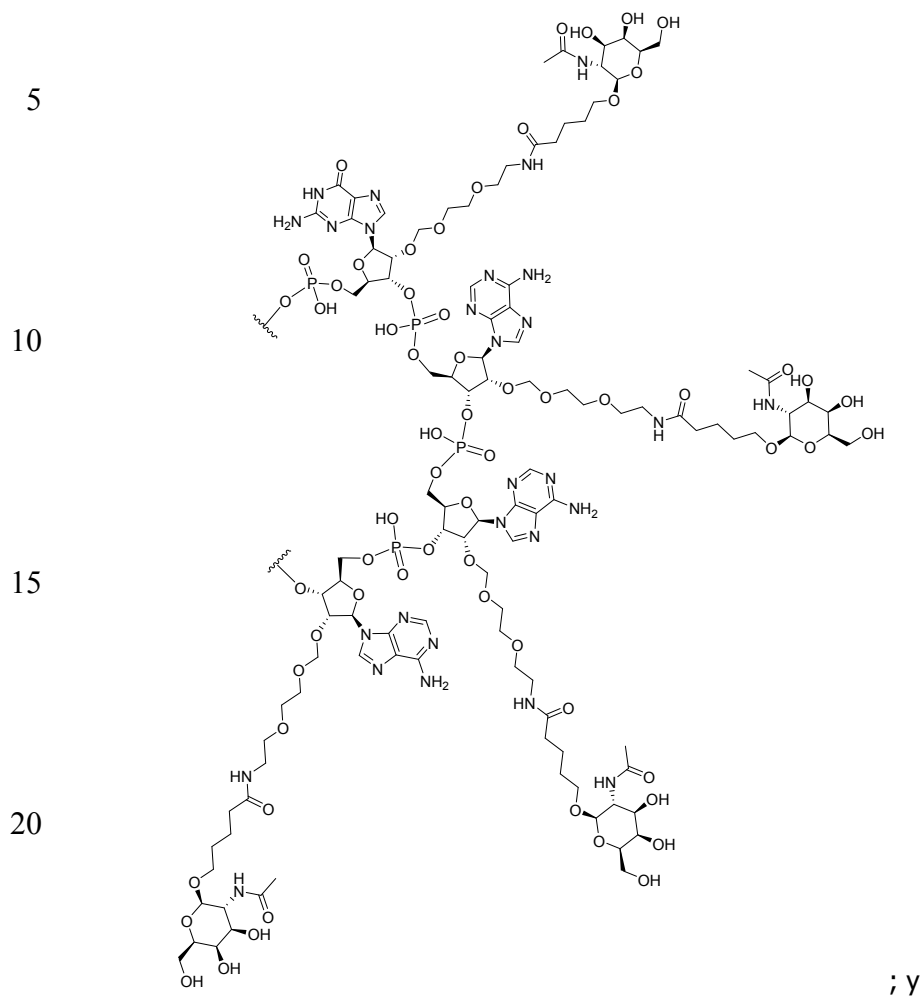
20 44.- Un método de tratamiento de infección de HBV en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un oligonucleótido de ARNi que se dirige selectivamente al ARNm de HBsAg, en donde el oligonucleótido de ARNi es administrado en la ausencia de tratamiento con un oligonucleótido de ARNi que se dirige a un antígeno no de superficie que codifica el transcrito de ARNm de HBV.

25 45.- Un método de tratamiento de infección de HBV en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un oligonucleótido de ARNi que se dirige selectivamente al ARNm de HBsAg, en donde el sujeto no es administrado con un oligonucleótido de ARNi que se dirige selectivamente al transcrito de ARNm de HBxAg.

46.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 39 a 45, caracterizado además porque comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de Entecavir.

30 47.- Un oligonucleótido para la reducción de la expresión de ARNm de antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg), el oligonucleótido comprende una cadena sentido que forma una región dúplex con una cadena antisentido, en donde: la cadena sentido comprende una secuencia como se establece en GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 8) y que comprende nucleótidos modificados con 2'-fluoro en las posiciones 3, 8 a 10, 12, 13, y 17, nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 2, 4 a 7, 11, 14 a 16, 18 a 26, y 31 a
35 36, y un enlace fosforotioato internucleótido entre los nucleótidos en las posiciones 1 y 2, en donde

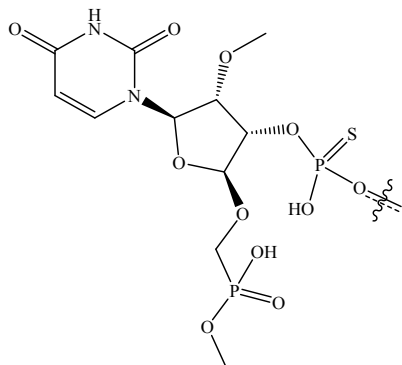
cada uno de los nucleótidos de la secuencia –GAAA– en la cadena sentido está conjugado a una porción de GalNac monovalente, en donde la secuencia –GAAA– comprende la estructura:



25 la cadena antisentido comprende una secuencia como se establece en UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG (SEQ ID NO: 5.1) y comprende nucleótidos modificados con 2'-fluoro en las posiciones 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16, y 19, nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, y 20 a 22, y cinco enlaces fosforotioato internucleótidos entre los nucleótidos 1 y 2, 2 y 3, 3 y 4, 20 y 21, y 21 y 22, en donde el 4'-carbono del azúcar del 5'-nucleótido de la cadena antisentido tiene la siguiente estructura:

30

5



10

48.- Una composición que comprende el oligonucleótido de la reivindicación 47.

49.- La composición de conformidad con la reivindicación 48, caracterizada además porque comprende adicionalmente contraiones de Na⁺.

15

50.- Un método para la reducción de la expresión de antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBV) en una célula, el método comprende suministrar a la célula un oligonucleótido de la reivindicación 47, o la composición de la reivindicación 48 o la reivindicación 49.

51.- El método de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado además porque la célula es un hepatocito.

20

52.- El método de conformidad con la reivindicación 50 o la reivindicación 51, caracterizado además porque la célula está *in vivo*.

53.- El método de conformidad con la reivindicación 50 o la reivindicación 51, caracterizado además porque la célula está *in vitro*.

25

54.- Un método de tratamiento de una infección de virus de hepatitis B (HBV) en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un oligonucleótido de la reivindicación 47 o una composición de la reivindicación 48 o 49.

55.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 50 a 54, caracterizado además porque comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de Entecavir.

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta solicitud se refiere a oligonucleótidos potentes útiles para la reducción de la expresión de HBsAg y el tratamiento de infecciones de HBV.

5

41B

P20/462F