

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
12 de abril de 2012 (12.04.2012)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2012/045894 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 15/113 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)  
A61K 31/713 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2010/070643

(22) Fecha de presentación internacional:

5 de octubre de 2010 (05.10.2010)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.** [ES/ES]; Avenida Pío XII, 22 Oficina 1, E-31008 Pamplona - Navarra (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **BLÁZQUEZ GARCÍA, Lorea** [ES/ES]; ICT (DPI), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **FORTES ALONSO, María Purificación** [ES/ES]; ICT (DPI), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **GONZÁLEZ ROJAS, Sandra Jovanna** [CO/ES]; ICT (DPI), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES).

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))



WO 2012/045894 A1

(54) Title: COMPOUNDS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF ILLNESSES CAUSED BY THE HEPATITIS B VIRUS

(54) Título : COMPUESTOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEBIDAS A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B

(57) Abstract: The invention relates to agents able to inhibit the expression of hepatitis B virus genes by inhibiting the maturation of the various RNAm of said virus using U1 RNAs, by means of interferent RNAs or synergistic combinations that include both inhibiting agents. The invention also relates to the use of said agents and to compositions for the treatment of illnesses caused by a Hepatitis B virus infection.

(57) Resumen: La invención se relaciona con agentes capaces de inhibir la expresión de los genes del virus de la hepatitis B por medio de la inhibición de la maduración de los distintos ARNm de dicho virus usando ARNs U1, por medio de ARNs interferentes o por medio de combinaciones sinérgicas que comprenden ambos agentes inhibidores. La invención se relaciona también con el uso de dichos agentes y composiciones para el tratamiento de enfermedades causadas por una infección por HBV.

COMPUESTOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE  
ENFERMEDADES DEBIDAS A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA  
HEPATITIS B

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con métodos terapéuticos para inhibir la expresión génica del virus de la hepatitis B y, por tanto, con métodos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la infección por dicho virus. En particular, la invención se relaciona con  
10 compuestos y composiciones que actúan mediante la inhibición de la maduración de los ARNm del virus de la hepatitis B y mediante la interferencia mediada por ARN de la expresión de dichos ARNm.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

El virus de la hepatitis B (HBV) causa unos 400 millones de infecciones en todo el mundo. La infección crónica infección por VHB y el a carcinoma hepatocelular (CHC) asociado a HBV produce más de un millón de muertes al año. Desafortunadamente, el tratamiento actual de la infección crónica es menos eficaz debido a baja eficacia de los  
20 fármacos actuales y la aparición de resistencia a los medicamentos. Por lo tanto, se necesita urgentemente desarrollar un nuevo tratamiento para la infección por el VHB y el cáncer de hígado HBV asociados dado que el número de nuevos pacientes se encuentra en aumento constante.

25 El tratamiento con interferón-alpha es la terapia comúnmente utilizada para el tratamiento de la infección con HBV. No obstante, el uso de interferón-alpha va acompañado de una serie de efectos secundarios indeseables tales como síntomas de tipo gripe (fatiga, fiebre, mialgia, etc.), efectos neuropsiquiátricos (irritabilidad, apatía, etc.), reducción de células mieloides tales como granulocitos y plaquetas, aumentos en  
30 los niveles de triglicéridos, anomalías del tiroides, etc. Recientemente ha sido aprobado el tratamiento con lamivudina (3TC(R)), que es un análogo de nucleósido que inhibe la síntesis del ADN de HBV. No obstante, la interrupción del tratamiento con lamivudina resulta en una reactivación de la replicación de HBV en la mayoría de

pacientes. Además, se han identificado algunos casos de resistencia a este fármaco en algunos pacientes.

5 El virus de la hepatitis B es un virus ADN circular de doble cadena que codifica la polimerasa, la proteína X, el antígeno core y los antígenos de superficie (S y preS).

El genoma de HBV es muy compacto y contiene marcos abiertos de lectura que solapan entre sí, por lo que el uso de agentes silenciadores de la expresión dirigidos contra una región determinada del genoma de HBV pueden ser útiles para inhibir la expresión de múltiples ARNm de HBV. Así, es conocido el uso de ARNs interferentes dirigidos  
10 contra los ARNm de HBV para inhibir la replicación de HBV (Arbutnot et al.; Liver International. 2005; 25: 9-15; Chen et al.; Pharm Res. 2008; 25: 72-86 y Stein y Loomba; Infect Disord Drug Targets. 2009; 9: 105-106). No obstante, el uso de ARNs interferentes para inhibir la replicación de HBV tiene la desventaja de que se trata de un  
15 tratamiento costoso, de que los ARNs interferentes tienen una vida media en suero relativamente corta y que se pueden generar resistencias a la administración repetida de un único ARN interferente (Wu H. et al. Gastroenterology, 2005; 128:708-16).

Por tanto, existe una necesidad en la técnica de tratamientos alternativos a la infección con HBV que solventen parcial- o totalmente los problemas anteriormente  
20 mencionados.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un compuesto capaz de silenciar la  
25 expresión génica del virus de la hepatitis B seleccionado del grupo consistente en:

- (i) un snRNA U1, en donde la secuencia de unión a la secuencia consenso GU del extremo 5' del intrón de dicho snRNA U1 se encuentra modificada de forma que se una específicamente a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV de forma que es capaz de inhibir la maduración de dicho  
30 ARNm diana y en donde dicha secuencia diana se selecciona del grupo consistente en las secuencias SEQ ID NO:4-24;
- (ii) un polinucleótido que codifica un ARN U1 según (i);
- (iii) un vector de expresión que comprende un polinucleótido según (ii),

- (iv) un ARN interferente dirigido específicamente a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV que es capaz de provocar el silenciamiento de dicho ARNm de HBV en donde dicha secuencia diana se selecciona del grupo consistente en las secuencias SEQ ID NO:29 a 35;
- 5 (v) un polinucleótido que codifica un ARN de interferencia según (iv) y
- (vi) un vector de expresión que comprende un polinucleótido según (v).

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con una composición o un kit que comprende en uno o varios contenedores:

- 10 (a) un primer componente seleccionado del grupo de:
  - (i) un snRNA U1, en donde dicho snRNA U1 se encuentra modificado en su secuencia de unión a la secuencia consenso GU del extremo 5' del intrón de forma que se une específicamente a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV de forma que es capaz de inhibir la
  - 15 maduración de dicho ARNm diana,
  - (ii) Un polinucleótido que codifica un ARN U1 según (i),
  - (iii) Un vector de expresión que comprende un polinucleótido según (i) y
- (b) un segundo componente seleccionado del grupo de
  - (iv) Un ARN interferente dirigido específicamente a una secuencia diana
  - 20 del pre-ARNm de HBV que es capaz de provocar el silenciamiento de dicho pre-ARNm de HBV,
  - (v) Un polinucleótido que codifica un ARN de interferencia según (iv) y
  - (vi) Un vector de expresión que comprende un polinucleótido según (v).

25 En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido capaz de silenciar la expresión génica del virus de la hepatitis B que comprende

- (i) una secuencia que codifica al menos un snRNA U1 modificado en su secuencia de unión a la secuencia consenso GU del extremo 5' del sitio de corte del intrón de forma que se une específicamente a una secuencia diana
- 30 de al menos un ARNm de HBV y es capaz de inhibir el procesamiento de dicho ARNm diana y
- (ii) una secuencia que codifica un ARN interferente dirigido de forma específica a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV y que es

capaz de provocar el silenciamiento de dicho ARNm de HBV.

En aspectos adicionales, la invención se relaciona con compuesto, una composición o kit, un polinucleótido o un vector de la invención para su uso en medicina o para su uso  
5 en la prevención o tratamiento de enfermedades causadas por una infección por el virus de la hepatitis B así como con composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto, una composición o kit, un polinucleótido o un vector de la invención y vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Representación esquemática del genoma de HBV, de los ARNm generados a partir del genoma de HBV y de la situación en la molécula de las regiones diana para  
15 los ARN U1 y los ARN interferentes de la invención.

**Figura 2.** Actividad inhibidora de la expresión de HBV producida por los shRNA inhibidores. El Factor de Inhibición (F.I.) representa el número de veces que se inhibe la expresión en comparación con el control (Mock). S.D.: Desviación estándar.

**Figura 3.** Actividad inhibidora de la expresión de HBV producida por los inhibidores  
20 U1in. F.I.: Factor de Inhibición; S.D.: Desviación estándar. (1  $\mu\text{g}$  de plásmido por cada  $1,5 \times 10^5$  células).

**Figura 4A-4C.** Actividad inhibidora de la expresión de HBV producida por distintas combinaciones de inhibidores shRNA y U1in. F.I.: Factor de Inhibición; S.D.: Desviación estándar. Nótese que se usa la mitad de cada inhibidor y que por ello los  
25 resultados no pueden compararse con los obtenidos en las Figuras 3 y 4.

**Figura 5A-5B.** Actividad inhibidora de la expresión de HBV producida por distintos inhibidores shRNA y U1in en el modelo de transfección con pHBV-Luc en células HuH7. F.I.: Factor de Inhibición; S.D.: Desviación estándar. Las dosis del plásmido inhibidor ensayadas fueron la dosis máxima (1  $\mu\text{g}$ ), o la mitad de esta dosis ( $\frac{1}{2}\text{D}$ : 0,5  
30  $\mu\text{g}$ ).

**Figura 6.** Actividad inhibidora de la expresión de HBV producida por distintos inhibidores shRNA y U1in en el modelo de transfección con pHBV-Luc en células HuH7. F.I.: Factor de Inhibición; S.D.: Desviación estándar; S.I.: Índice de sinergia. Las dosis de cada plásmido inhibidor utilizadas fueron de 0,5 µg (en las combinaciones 0,5 µg/plásmido).

**Figura 7A – 7J.** Actividad inhibidora de la expresión de HBV producida por distintos inhibidores shRNA y U1in en el modelo in vivo de transfección con pHBV-Luc. [Luc]: actividad luciferasa expresada como fotones/s/cm<sup>2</sup>/sr (x10<sup>-5</sup>). S.D.: Desviación estándar. Las dosis del plásmido inhibidor ensayadas fueron de 10 µg (en las combinaciones también 10 µg/plásmido).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

### U1i de la invención

15 Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que el uso de snRNAs U1 modificados con capacidad de unirse a uno o varios de los ARNm de HBV permite inhibir la expresión génica de dicho virus. Así, según se demuestra en el ejemplo 2 de la presente invención, la expresión de dicho snRNA U1 en una célula previamente transfectada con un plásmido que permite expresar el ARNm de HBV inhibe la

20 expresión del antígeno E. Asimismo, según se observa en el ejemplo 3, la expresión de distintos snRNAs U1 en células que expresan un genoma de HBV modificado mediante la sustitución del gen del antígeno S por la secuencia que codifica luciferasa resulta en una disminución de la actividad luciferasa, indicativa de una inhibición de la expresión de dicho gen. Por otro lado, según se demuestra en el ejemplo 4 de la presente

25 invención, la administración de dichos snRNA U1 modificados a un animal al que se le ha administrado un plásmido que comprende el genoma de HBV modificado mediante la sustitución del antígeno S por la secuencia de la luciferasa permite reducir de forma estadísticamente significativa la actividad luciferasa en hígado en comparación con los animales a los que se le ha administrado el plásmido control.

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un compuesto capaz de silenciar la expresión génica del virus de la hepatitis B en donde dicho compuesto es un snRNA U1, en donde la secuencia de unión a la secuencia consenso GU del extremo 5' del intrón de dicho snRNA U1 se encuentra modificada de forma que se una específicamente a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV de forma que es capaz de inhibir la maduración de dicho ARNm diana y en donde dicha secuencia diana se selecciona del grupo consistente en las secuencias SEQ ID NO:4-24;

El término “snRNA U1”, según se usa en el contexto de la presente invención, se entiende como un ARN nuclear pequeño (snRNA por sus iniciales en inglés) que es capaz de incorporarse en la ribonucleoproteína pequeña nuclear (snRNP) U1 y que, conjuntamente con otras snRNPs forma un orgánulo llamado *spliceosoma* que se encarga del procesamiento o ajuste de los pre-ARNm para dar lugar a los ARNm maduros. snRNA U1 adecuados para su uso en la presente invención incluyen los snRNA U1 que aparecen de forma natural en distintos organismos tales como U1s de distintos mamíferos, incluyendo, sin limitación, U1 snRNA 4 de origen humano (número de acceso NR\_004421.1 en NCBI), el U1 snRNA 8 de origen humano (número de acceso NR\_004402.2 en NCBI), el U1 snRNA 7 de origen humano (número de acceso NR\_004424.2 en NCBI), el U1 snRNA 1 de origen humano (número de acceso NR\_004430.2 en NCBI); el U1 snRNA 2 de origen humano (número de acceso NR\_004427.2 en NCBI), el U1 snRNA 3 de origen humano (número de acceso NR\_004408.1 en NCBI), el U1 snRNA 5 de origen humano (número de acceso NR\_004400.1 en NCBI); el U1 snRNA 9 de origen humano (número de acceso NR\_004426.2 en NCBI), el U1 snRNA 6 de origen humano (número de acceso NR\_030723.1 en NCBI), el snRNA U1 de origen bovino (número de acceso M38483 en NCBI), el snRNA U1 de ratón (número de acceso M14121 en NCBI), el snRNA U1 de rata (número de acceso J01883 en NCBI) y similares.

Asimismo, el término snRNA U1 incluye, de acuerdo con la presente invención, snRNAs U1 cuya secuencia difiere de la secuencia del snRNA U1 nativo y que se denominan de forma genérica, genes snRNA U1 variantes. Ejemplos no limitativos de dichos genes incluyen los que se recogen en la base de datos GenBank con números de

acceso L78810, AC025268, AC025264 y AL592207 and las variantes descritas en Kyriakopoulou et al. (RNA (2006) 12:1603- 11).

En una forma preferida, el U1 corresponde al U1 snRNA 4 humano (Entrez Gene ID:  
5 6060) que corresponde a la secuencia SEQ.ID.NO.2.

Asimismo, el término “snRNA U1” incluye, de acuerdo con la presente invención, variantes funcionalmente equivalentes de los snRNA U1 definidos anteriormente y cuya secuencia deriva de la de éstos mediante inserción, sustitución o eliminación de uno o  
10 más nucleótidos y que conservan sustancialmente la capacidad de incorporarse en la snRNP U1 y de promover el procesamiento de los ARNm. Métodos adecuados para determinar la capacidad de un snRNA U1 de incorporarse en la snRNP U1 y de promover el procesamiento de los ARNm incluyen, por ejemplo, el método descrito por Hamm et al. (EMBO J., 1990, 9:1237-1244) basado en la capacidad del snRNA U1 de  
15 promover el procesamiento de un pre-ARNm co-administrado conjuntamente con dicho snRNA U1 en extractos en los que previamente se ha eliminado el U1 endógeno mediante la administración de un oligonucleótido que comprende una secuencia complementaria con el extremo 5' del U1 endógeno promoviendo así la eliminación de dicho extremo por la actividad RNasa H. OK

20

Preferiblemente, las variantes funcionalmente equivalentes de los snRNA U1 que aparecen de forma nativa muestran una identidad de secuencia de al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% en la totalidad de la secuencia con respecto a los snRNA U1 nativos mencionados anteriormente.  
25 Algoritmos adecuados para determinar la identidad de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST, descrito en Altschul *et al.* (1990) (J Mol Biol. Oct 5;215(3):403-10). Alternativamente, las variantes funcionalmente equivalentes de los snRNA U1 incluyen aquellas que hibridan con las secuencia de snRNA nativos en condiciones severas de hibridación. Las condiciones bajo las cuales  
30 hibridan cadenas de ácidos nucleicos totalmente complementarias se denominan “condiciones muy severas de hibridación” o “condiciones de hibridación específicas de secuencia”. El experto en la materia puede determinar empíricamente la estabilidad de

un dúplex teniendo en cuenta diversas variables, tales como, la longitud y concentración de pares de bases de las sondas, la fuerza iónica y la incidencia de los pares de bases desapareados, siguiendo las directrices del estado de la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); y Wetmur, *Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol.* 26 (3/4):227-259 (1991)). A modo ilustrativo, en una realización particular, las condiciones severas de hibridación comprenden, por ejemplo, una concentración comprendida entre 0,15 M y 0,9 M de NaCl y una temperatura comprendida entre 20°C y 65°C. En otra realización particular, las condiciones muy severas de hibridación comprenden, por ejemplo, una concentración comprendida entre 0,02 M y 0,15 M de NaCl y una temperatura comprendida entre 50°C y 70°C.

Por “secuencia de unión a la secuencia consenso GU del extremo 5’ del intrón” del snRNA U1 modificado se entiende la región formada por el extremo 5’ del snRNA U1 que interacciona mediante apareamiento de bases con el denominado sitio U1 o sitio 5’ del procesamiento (*5’-splice site*) que aparece en los pre-ARNm en la región 5’ de los intrones, caracterizado por la secuencia consenso AG/GURAGU (en donde R es una purina y / indica el límite exón/intrón) y que permite a la maquinaria de procesamiento de los pre-ARNm la localización del límite exón-intrón. Esta región corresponde a los nucleótidos en posiciones 1 a 11 en el extremo 5’ de la secuencia del snRNA U1 (Zhuang, Y y Weiner, A.M: 1986, *Cell*, 46:827-835).

Por “modificación” de la secuencia consenso de unión al sitio U1 en el pre-ARNm se entiende que dicha secuencia consenso contiene un número de mutaciones que resultan en una pérdida sustancial en la capacidad de snRNA U1 de unirse al sitio U1 en el pre-ARNm a la vez que dicho snRNA U1 adquiere una nueva complementariedad que le permite formar un duplex mediante apareamiento de bases con una región preseleccionada en un pre-ARNm diana. En la presente invención, las secuencias preseleccionadas corresponden a las secuencias identificadas como SEQ ID NO:4 a 24 y que corresponden a regiones del genoma de HBV. Estos snRNA U1 modificados se denominan U1in. El grado de complementariedad entre la secuencia de unión al sitio U1 en el snRNA modificado de acuerdo con la presente invención y la región

preseleccionada en el pre-ARNm diana puede variar entre 3 y 16 nucleótidos, preferiblemente entre 8 y 16 nucleótidos y, más preferiblemente, entre 10 y 11 nucleótidos. Sin embargo, la máxima eficacia en la inhibición de la expresión del gen diana se observa cuando los 10-11 nucleótidos que forman el sitio U1 han sido  
5 modificados para hacerlos complementarios al sitio preseleccionado en el pre-ARNm diana. Por tanto, preferiblemente, el U1in se encuentra modificado en todos aquellos nucleótidos en las posiciones 1 a 11 o de 2 a 11 de forma que dicha región sea totalmente complementaria con 11 o 10 nucleótidos consecutivos en el sitio preseleccionado del pre-ARNm diana. El experto en la materia apreciará que, para  
10 generar el U1in, será necesario únicamente modificar aquellos nucleótidos en el U1 nativo que sean distintos a los que aparecen en la secuencia diana.

El experto en la materia apreciará que las secuencias de los snRNA U1 de distintos organismos son conocidos. Por tanto, una vez que la secuencia de un determinado  
15 snRNA U1 es conocida, es posible determinar si este corresponde a un ARN U1 nativo o ha sido modificado en uno o más nucleótidos de la zona de interacción con el extremo 5' del intrón.

La modificación en la secuencia del snRNA U1 permite inhibir el procesamiento de los  
20 pre-ARNm, entendiendo como procesamiento del extremo 3' cualquiera de los pasos necesarios para la formación del ARNm poliadenilado a partir de un pre-ARNm sin poliadenilar (procesamiento del sitio consenso de poliadenilación y adición de la cola de poliA+). Estos snRNA U1 modificados se incorporan en la correspondiente snRNP para dar lugar a snRNP modificadas que, en lugar de unirse al pre-ARNm en el sitio de  
25 procesamiento del intrón, se unen al pre-ARNm en una región determinada de éste en función de la especificidad de secuencia de la región modificada en el snRNA U1. Esta interacción provoca una parada de la maquinaria de poliadenilación que resulta en el secuestro del pre-ARNm en el núcleo, una disminución de la maduración del pre-ARNm y, a su vez, una disminución en la producción de la proteína codificada por  
30 dicho pre-mRNA. A la vista de la capacidad de los snRNA U1 modificados de provocar la inhibición de la expresión del pre-ARNm diana, éstos U1 modificados se conocen

como U1in. El efecto de los U1in es por tanto el provocar una disminución o una inhibición de la expresión génica.

Dado que la mínima longitud óptima de la secuencia diana es de 10 nucleótidos, los  
5 sitios de unión para una secuencia de dicha longitud aparecerán de forma aleatoria una vez cada  $10^6$  nucleótidos, lo que implica que aparecerán unas 3000 veces en el genoma humano. Sin embargo, dado que los exones constituyen solo un 2% del genoma humano y que la inhibición mediada por snRNP con U1 modificados de la expresión de genes que comprenden exones requiere apareamiento con regiones no estructuradas en los  
10 exones terminales de los transcritos que contienen las señales de poliadenilación (AAUAAA), la especificidad de la inhibición es mucho mayor. Preferiblemente, se eligen aquellos sitios diana en el genoma de HBV que aparezcan un menor número de veces en los exones 3' terminales del organismo del que proceden las células en las que se va a llevar a cabo el silenciamiento.

15

La frecuencia de aparición de las posibles dianas se puede determinar por comparación de secuencias. Típicamente, para la comparación de secuencias, una secuencia actúa como la secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba  
20 y la de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del algoritmo de secuencia del programa. Preferiblemente, se pueden usar parámetros de programa por defecto, o se pueden designar parámetros de programa alternativos. El algoritmo de comparación de secuencia calcula los porcentajes de las identidades de secuencia de las secuencias de  
25 prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, en el contexto de la presente invención, hace referencia a un segmento de cualquiera de las posiciones contiguas seleccionadas del grupo que  
30 consiste en 19 a 600, preferiblemente alrededor de 50 a alrededor de 200, más preferiblemente alrededor de 100 a alrededor de 150, en el que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia con el mismo número de posiciones

contiguas, una vez que las dos secuencias se hayan alineado óptimamente. Métodos de alineamiento de secuencias para comparación son ampliamente conocidos en la técnica. Se pueden llevar a cabo alineamientos óptimos de secuencias para comparación, e.g., con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 5 2:482), con el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, (J. Mol. Biol., 1970, 48:443), por búsqueda de similitud con el método de Pearson y Lipman, (Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1988, 85:2444), por implementación computerizada de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., 10 Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual {véase, e.g., Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al, eds. 1995 supplement)}.

Ejemplos preferidos de algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia, son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que 15 están descritos en Altschul et al, (Nucl. Acids Res., 1977, 25:3389-3402) y Altschul et al, (J. Mol. Biol., 1990, 215:403-410), respectivamente.

Preferiblemente, los snRNAs U1 modificados usados en la composición de la invención se seleccionan de tal manera que su secuencia de unión a la secuencia consenso GU del 20 final 5' del intrón, que ha sido modificada de acuerdo con la secuencia del pre-ARNm diana, es idéntica o substancialmente idéntica a los sitios diana. Los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o sub-secuencias que son la misma (idénticas) o que presentan un porcentaje de residuos de aminoácidos o de nucleótidos 25 que es el mismo (por ejemplo, en al menos 70% de similitud, preferiblemente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y 100%.

#### Polinucleótidos y vectores que codifican los U1in de la invención

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica un snRNA U1in de acuerdo a la invención.

El término "polinucleótido", según se usa en la presente invención, se refiere a un polímero formado por un número variable de monómeros en donde los monómeros son nucleótidos, incluyendo tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. Los polinucleótidos incluyen monómeros modificados mediante metilación o así como formas no modificadas. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en la presente invención e incluyen mRNA, cDNA y polinucleótidos recombinantes. Según se usa en la presente invención, los polinucleótidos no están limitados a polinucleótidos tal y como aparecen en la naturaleza, sino que incluye polinucleótidos en los que aparecen análogos de nucleótidos y enlaces internucleotídicos no naturales. Ejemplos no limitantes de este tipo de estructuras no naturales incluyen polinucleótidos en los que el azúcar es distinto a la ribosa, polinucleótidos en los que aparecen enlaces fosfodiéster 3'-5' y 2'-5', polinucleótidos en los que aparecen enlaces invertidos (3'-3' y 5'-5') y estructuras ramificadas. Adicionalmente, los polinucleótidos de la invención incluyen enlaces internucleotídicos no naturales tales como péptidos ácidos nucleicos (PNA o peptide nucleic acids), ácidos nucleicos cerrados (LNA or locked nucleic acids), enlaces C1-C4 alquilfosfonato del tipo de metilfosfonato, fosforamidato, C1-C6 alquilfosfotrioéster, fosforotioato y fosforoditioato. En cualquier caso, los polinucleótidos de la invención mantienen la capacidad de hibridar con ácidos nucleicos diana de forma similar a polinucleótidos naturales.

El polinucleótido que codifica el snRNA U1 de acuerdo a la invención puede estar operativamente acoplado a un promotor que permita la transcripción de dicho polinucleótido en la célula en la que se desea la expresión del U1in. Promotores adecuados para la realización de la presente invención incluyen, sin estar necesariamente limitados, promotores constitutivos tales como el promotor de U1 o derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del poliovirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el promotor del gen de la timidina kinasa del virus del herpes simplex, regiones LTR de los retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobulina, el promotor del gen de la actina, el promotor del gen EF-1alpha así como promotores inducibles en los que la expresión del gen depende de la adición de

una molécula o de una señal exógena, tales como el sistema tetraciclina, el sistema NFkappaB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico, los promotores regulables de la ARN polimerasa II descritos en WO/2006/135436 así como promotores específicos de tejido ((por ejemplo, el promotor de PSA descrito en  
5 WO2006012221). En una forma de realización preferida, los promotores son promotores de la ARN polimerasa II que actúan de forma constitutiva.

No obstante, dado que los U1in de acuerdo a la invención van a ser expresados en células hepáticas, una forma preferida de realización de la presente invención  
10 contempla la posibilidad de que el polinucleótido se encuentre bajo control operativo de un promotor específico de hígado. Ejemplos no limitativos de tales promotores son el promotor de la proteína urinaria principal o el promotor de la albúmina.

Adicionalmente, puede usarse en el contexto de la presente invención cualquier  
15 promotor específico de hígado descrito en la base de datos de promotores específicos de tejido TiProD tal como se describe por Chen, X. *et al.*, (Nucleic Acids Res., 2006, 34, Database Issue).

En otra forma preferida de realización, el polinucleótido que codifica el U1in de  
20 acuerdo a la invención se encuentra bajo el control del propio promotor del gen que codifica el snRNA U1 del que deriva el U1in.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo a la invención. Vectores adecuados para la inserción de  
25 dichos polinucleótidos son vectores derivados de vectores de expresión en procariontes tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 and pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores  
30 de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y

vectores de expresión en células eucariotas superiores, incluyendo baculovirus adecuados para la transfección de células de insectos usando cualquier sistema de baculovirus disponible comercialmente. Los vectores de células eucariotas incluyen preferiblemente vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y, en particular, lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 5 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

10 Preferiblemente, los vectores comprenden un gen reportero o marcador que permite identificar aquellas células que han incorporado el vector tras haber sido puestas en contacto con éste. Genes reporteros útiles en el contexto de la presente invención incluyen lacZ, luciferasa, timidina quinasa, GFP y similares. Genes marcadores útiles en el contexto de la presente invención incluyen por ejemplo el gen de resistencia a la 15 neomicina, que confiere resistencia al aminoglucósido G418, el gen de la higromicina fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina, el gen ODC, que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa (2-(difluorometil)-DL-ornitina (DFMO), el gen de la dihidrofolato reductasa que confiere resistencia a metotrexato, el gen de la puromicina-N-acetil transferasa, que confiere resistencia a puromicina, el gen 20 ble que confiere resistencia a zeocina, el gen de la adenosina deaminasa que confiere resistencia a 9-beta-D-xilofuranosil adenina, el gen de la citosina deaminasa, que permite a las células crecer en presencia de *N*-(fosfonacetil)-L-aspartato, timidina kinasa, que permite a las células crecer en presencia de aminopterina, el gen de Xantina-guanina fosforibosiltransferasa, que permite a las células crecer en presencia de xantina 25 y ausencia de guanina, el gen *trpB* de *E.coli* que permite a las células crecer en presencia de indol en lugar de triptófano, el gen *hisD* de *E.coli*, que permite a las células el usar histidinol en lugar de histidina. El gen de selección se incorpora en un plásmido que puede incluir, adicionalmente, un promotor adecuado para la expresión de dicho gen en células eucariotas (por ejemplo, los promotores CMV o SV40), un sitio 30 optimizado de iniciación de la traducción (por ejemplo un sitio que sigue las denominadas reglas de Kozak o un IRES), un sitio de poliadenilación como, por ejemplo, el sitio de poliadenilación del SV40 o de la fosfoglicerato quinasa, intrones

como, por ejemplo, el intrón del gen de la beta-globulina. Alternativamente, es posible usar una combinación de gen reportero y gen marcador simultáneamente en el mismo vector.

- 5 En una forma preferida de realización, los vectores son vectores virales. En una forma aún más preferida de realización, los vectores usados para la expresión del primer o del segundo componente de la invención (siempre y cuando éste esté basado en ADN) es un vector viral seleccionado del grupo de adenovirus, virus adenoasociado, retrovirus, lentivirus, herpesvirus, SV40 y alfavirus.

10

#### ARN interferentes de la invención

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que el uso de ARN interferentes con capacidad de unirse a uno o varios de los ARNm de HBV permite  
15 inhibir la expresión génica de dicho virus. Así, según se demuestra en el ejemplo 2 de la presente invención, la expresión de dichos ARN interferentes en una célula previamente transfectada con un plásmido que permite expresar el ARNm de HBV inhibe la expresión del antígeno E. Asimismo, según se observa en el ejemplo 3, la expresión de distintos ARN interferentes en células que expresan un genoma de HBV modificado  
20 mediante la sustitución del gen del antígeno S por la secuencia que codifica luciferasa resulta en una disminución de la actividad luciferasa, indicativa de una inhibición de la expresión de dicho gen.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un ARN interferente dirigido  
25 específicamente a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV que es capaz de provocar el silenciamiento de dicho ARNm de HBV en donde dicha secuencia diana se selecciona del grupo consistente en las secuencias SEQ ID NO:29 a 35;

Por un “ARN interferente capaz de provocar el silenciamiento de la expresión de un  
30 ARNm” se entiende, en el contexto de la presente invención, una molécula de ARN que, cuando se encuentra en el interior de una célula, es capaz bien por sí misma o bien tras su modificación por la maquinaria celular, de unirse al ARNm diana que contiene

la secuencia preseleccionada y provocar la degradación de éste, inhibiendo así su traducción y la producción de la proteína codificada por éste.

Agentes silenciadores que inducen la respuesta RNAi frente a un ARNm diana y que podrían incorporarse en el segundo componente de la invención incluyen, sin  
5 limitación, siRNA, shRNA and miRNA

(i) siRNA

Los siRNA son agentes capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia de ARN. Un siRNA se puede sintetizar químicamente o se pueden obtener mediante transcripción in vitro. Típicamente, los siRNA consisten en una cadena doble  
10 de ARN de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de siRNA. Los siRNA actúan mediante la degradación o el silenciamiento post-transcripcional del mensajero diana. Los siRNA de la invención son sustancialmente homólogos a una región  
15 preseleccionada del ARNm diana. Por "sustancialmente homólogos" se entiende que tienen una secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana de forma que el siRNA sea capaz de provocar la degradación de éste por interferencia de ARN. "Sustancialmente homólogos" puede entenderse como "sustancialmente idénticos" según se ha explicado anteriormente. Los siRNA adecuados para provocar  
20 dicha interferencia incluyen siRNA formados por ARN, así como siRNA que contienen distintas modificaciones químicas tales como:

- siRNA en los que los enlaces entre los nucleótidos son distintos a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotioato.
- conjugados de la cadena de siRNA con un reactivo funcional, tal como un  
25 fluoróforo.
- Modificaciones de los extremos de las cadenas de siRNA, en particular el extremo 3' mediante la modificación con distintos grupos funcionales del hidroxilo en posición 2'.

- Nucleótidos con azúcares modificados tales como restos O-alkilados en posición 2' tales como 2'-O-metilribosa p 2'-O-fluorosibosa.
- Nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo 5-bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanosina).

Los siRNA de la invención se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas para el experto en la materia. Por ejemplo, el siRNA puede ser sintetizado químicamente a partir de ribonucleósidos protegidos con grupos forsoformidito en un sintetizador de ADN/ARN convencional.

#### 10 (ii) shRNA

En otra forma de realización, el ARN interferente de la invención es shRNA (short hairpin ARN). Por shRNA se entiende, en el contexto de la presente invención, una molécula de ARN formada dos cadenas antiparalelas conectadas por una región horquilla y en donde la secuencia de una de las cadenas antiparalelas es complementaria a una región preseleccionada en el ARNm diana. Los shRNA están compuestos de una secuencia antisentido corta (de 19 a 25 nucleótidos), seguida de un bucle de entre 5 y 9 nucleótidos a la que sigue la cadena sentido. Los shRNA pueden sintetizarse químicamente a partir de ribonucleósidos protegidos con grupos forsoformidito en un sintetizador de ADN/ARN convencional o bien pueden obtenerse a partir de un polinucleótido mediante transcripción *in vitro*. Los shRNA son procesados en el interior de la célula por la RNasa Dicer que elimina la región de la horquilla dando lugar a siRNAs según se ha descrito anteriormente. Los shRNA también pueden contener distintas modificaciones químicas tal y como se ha descrito anteriormente para el caso de los siRNA.

#### 25 (iii) miRNA

Los miRNA o microRNA son pequeñas moléculas de ARN que aparecen de forma natural en la célula y que se encargan de controlar la especificidad de la expresión génica regulando la degradación y la traducción de ARNm. Aunque los miRNA son moléculas endógenas que actúan regulando la vida media de ARNm celulares, se ha

demostrado que la estructura de un miRNA endógeno (por ejemplo miR-30) puede alterarse para incluir secuencias que codifican siRNA y que dichos miRNA modificadas pueden ser utilizados para promover la degradación de genes diana endógenos (WO03093441). También se ha demostrado que secuencias siRNA incorporadas en la  
5 región del tallo de mir-26a funcionan como efectores de RNAi provocando la degradación de ARNm homólogos (McManus, M.T. et al., 2002, RNA, 8:842-850). En ambos casos, la secuencia de nucleótidos introducida en el tallo del miRNA mostraba un 100% de identidad con el gen diana.

Los miRNA adecuados para su uso en las composiciones de la invención constan de 19-  
10 24 nucleótidos, preferiblemente de 21 o 22 nucleótidos. Los miRNA se pueden diseñar de forma que hibriden a un transcrito de ARN con un alto grado de especificidad. Preferiblemente, el miRNA se diseña de forma que muestra un 100% de identidad o que muestran un alto grado de identidad (por ejemplo, aceptando al menos 1, al menos 2, al menos 3 o más de malos emparejamientos) con el ARNm diana dado que un solo  
15 nucleótido no complementario puede, dependiendo de su localización en la cadena de miRNA, disminuir los niveles de inhibición. Los miRNA pueden ser diseñados de forma que se dirijan a la región 5' no traducida, a la región codificante o a la región 3' de un ARNm diana.

miRNA adecuados para la realización de la presente invención corresponden a aquellos  
20 basados en el miRNA endógeno miR-30, según se ha descrito en WO03093441 o basados en los miRNA endógenos según se ha descrito en WO03029459.

#### Polinucleótidos y vectores que codifican un ARN de interferencia de acuerdo a la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido cuya transcripción da  
25 lugar a un ARN Interferente de acuerdo a la invención. Este polinucleótido puede dar lugar a los siRNA, shRNA y/o miRNA descritos anteriormente. En el caso de polinucleótidos que codifican un shRNA o un miRNA, éstos comprenden una única región promotora que regula la transcripción de una secuencia que comprende las cadenas sentido y antisentido de los shRNA y miRNA conectadas por una horquilla o  
30 por una región stem-loop. En principio, cualquier promotor puede ser usado para la

expresión de los shRNA y miRNA siempre que dichos promotores sean compatibles con las células en las que se desea expresar los siRNAs. Así, promotores adecuados para la realización de la presente invención incluyen los que se mencionaron anteriormente para la expresión del U1in. En una forma de realización preferida, los  
5 promotores son promotores de la ARN polimerasa III que actúan de forma constitutiva. Los promotores de la ARN polimerasa III aparecen en un número limitado de genes tales como 5S ARN, ARNt, ARN 7SL y ARNsn U6.

Por otro lado, los polinucleótidos que codifican los siRNA comprenden dos unidades transcripcionales formadas cada una de ellas por un promotor que regula la  
10 transcripción de una de las cadenas que forma en siRNA (sentido y antisentido). Los polinucleótidos que codifican los siRNA pueden contener unidades transcripcionales convergentes o divergentes. En los polinucleótidos de transcripción divergente, las unidades transcripcionales que codifican cada una de las cadenas de ADN que forman el siRNA se encuentran localizadas en tándem en el polinucleótido de forma que la  
15 transcripción de cada cadena de ADN depende de su propio promotor, que puede ser igual o distinto (Wang, J. et al., 2003, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 100:5103-5106 y Lee, N.S., et al., 2002, Nat.Biotechnol., 20:500-505). En los polinucleótidos de transcripción convergente, las regiones de ADN que dan lugar al siRNA se encuentran formando las cadenas sentido y antisentido de una región de ADN que se encuentra flanqueada por  
20 dos promotores invertidos. Tras la transcripción de las cadenas de ARN sentido y antisentido, éstas formarán el híbrido correspondiente al siRNA funcional. Combinaciones adecuadas de promotores para los polinucleótidos que comprenden unidades transcripcionales invertidas incluyen 2 promotores U6 (Tran, N. et al., 2003, BMC Biotechnol., 3:21), un promotor U6 de ratón y un promotor H1 humano (Zheng, L., et al., 2004, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 101:135-140 y WO2005026322) y un  
25 promotor U6 humano y un promotor H1 de ratón (Kaykas, A. y Moon, R., 2004, BMC Cell Biol., 5:16). En una forma de realización preferida, las cadenas sentido y antisentido del siRNA se encuentran reguladas por promotores distintos. En una forma de realización aún más preferida, ambas unidades transcripcionales se encuentran  
30 orientadas de forma convergente. En una forma de realización preferida, los promotores de ARN polimerasa de tipo III son los promotores de los genes H1 y U6 de origen humano o murino. En una forma de realización aún más preferida, los promotores son 2

promotores U6 de origen humano o murino, un promotor U6 de ratón y un promotor H1 humano o un promotor U6 humano y un promotor H1 de ratón.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo a la invención. Vectores adecuados para la expresión de los  
5 ARN interferentes de acuerdo a la invención incluyen, sin limitación, cualquiera de los vectores mencionados anteriormente en el contexto de los vectores para la expresión de los snRNA U1 modificados de acuerdo a la invención.

### Composiciones de la invención

Los autores de la presente invención han demostrado que la combinación de un snRNA  
10 U1 modificado específico frente a HBV y de un ARN interferente específico frente a un ARNm de HBV permite inhibir la expresión génica de HBV de forma sinérgica más eficazmente que cada uno de los componentes actuando por separado. Dicha inhibición sinérgica ocurre independiente de que las moléculas de U1in y ARN interferente vayan dirigidas, respectivamente, a una región del pre-ARNm y a un ARNm procedente de la  
15 misma región del genoma o no. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición o un kit que comprende en uno o varios contenedores:

- (a) un primer componente seleccionado del grupo de:
  - (i) un snRNA U1, en donde dicho snRNA U1 se encuentra modificado en su secuencia de unión a la secuencia consenso GU del extremo 5' del  
20 intrón de forma que se una específicamente a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV de forma que es capaz de inhibir la maduración de dicho ARNm diana,
  - (ii) Un polinucleótido que codifica un ARN U1 según (i),
  - (iii) Un vector de expresión que comprende un polinucleótido según (i) y
- 25 (b) un segundo componente seleccionado del grupo de
  - (iv) Un ARN interferente dirigido específicamente a una secuencia diana del pre-ARNm de HBV que es capaz de provocar el silenciamiento de dicho pre-ARNm de HBV,
  - (v) Un polinucleótido que codifica un ARN de interferencia según (iv) y
  - 30 (vi) Un vector de expresión que comprende un polinucleótido según (v).

El primer componente de las composiciones de la invención es un snRNA U1 específico frente a HBV tal y como se ha definido anteriormente al describir los snRNA U1 de la invención, un polinucleótido que codifica un ARN U1 o un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un ARN U1. Formas particulares de dicho primer componente se han descrito con detalle anteriormente en el contexto de los snRNA U1 modificados de la invención, de los polinucleótidos que codifican dichos snRNA U1 modificados y de los vectores que contienen dichos polinucleótidos y son igualmente aplicables al primer componente de la invención. En una forma preferida de realización, la secuencia diana en el genoma de HBV frente a la que se une el snRNA U1 modificado se selecciona del grupo consistente en las secuencias SEQ ID NO:4 a 28.

El segundo componente de la composición de la invención es un ARN interferente específico frente a la menos un ARNm de HBV, un polinucleótido que codifica dicho ARN Interferente o un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido. Formas particulares de las distintas realizaciones de dicho segundo componente de la invención se han descrito con detalle anteriormente en el contexto de los ARN interferentes de la invención, de los polinucleótidos que codifican dichos ARN interferentes y de los vectores que contienen dichos polinucleótidos y son igualmente aplicables al segundo componente de la invención. En una forma preferida de realización, la secuencia diana en el genoma de HBV frente a la que se une el ARN intereferente se selecciona del grupo consistente en las secuencias SEQ ID NO:29 a 35.

En una forma preferida de realización, las composiciones de la invención comprenden componentes caracterizados por su capacidad de unirse a secuencias diana concretas en el ARNm de HBV y que se recogen en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Secuencias diana en el genoma de HBV frente a la que se dirigen los U1in y los ARN interferentes de acuerdo a la invención.

Secuencia diana a la que se une el snRNA U1 modificado	Secuencia diana a la que se une el ARN interferente
SEQ ID NO:4	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO:6	SEQ ID NO: 31

Secuencia diana a la que se une el snRNA U1 modificado	Secuencia diana a la que se une el ARN interferente
SEQ ID NO:8	SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO:8	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO:8	SEQ ID NO: 31
SEQ ID NO:8	SEQ ID NO: 32
SEQ ID NO:9	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO:12	SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO:12	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO:13	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO:13	SEQ ID NO: 32
SEQ ID NO:14	SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO:14	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO:14	SEQ ID NO: 32
SEQ ID NO:15	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO:16	SEQ ID NO: 31
SEQ ID NO:17	SEQ ID NO: 31
SEQ ID NO:18	SEQ ID NO: 31
SEQ ID NO:21	SEQ ID NO: 32
SEQ ID NO:21	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO:21	SEQ ID NO: 32
SEQ ID NO:24	SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO:24	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO:24	SEQ ID NO: 32
SEQ ID NO:26	SEQ ID NO: 34
SEQ ID NO:26	SEQ ID NO: 31

Polinucleótidos bifuncionales de la invención y vectores que comprenden dichos polinucleótidos

Los autores de la presente invención han demostrado que la combinación de un snRNA

U1 modificado específico frente a HBV y de un ARN interferente específico frente a HBV permite inhibir la expresión de génica de HBV de forma sinérgica más eficazmente que el cada uno de los componentes actuando por separado. Por tanto, en aquellos casos en los que snRNA U1 modificado y el ARN interferente se aportan como

5 los correspondientes ácidos nucleicos que codifican dichos ARNs, es posible la combinación de ambas secuencias en un único polinucleótido, dando lugar así a un polinucleótido (en adelante polinucleótido bifuncional de la invención) que permite la puesta en contacto del organismo a tratar con los dos componentes necesarios para obtener el efecto sinérgico de forma simultánea mediante una única administración. Así,

10 en otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido capaz de silenciar la expresión génica del virus de la hepatitis B que comprende:

- (i) una secuencia que codifica al menos un snRNA U1 modificado en su secuencia de unión a la secuencia consenso GU del extremo 5' del sitio de corte del intrón de forma que se une específicamente a una secuencia diana

15 de al menos un ARNm de HBV y es capaz de inhibir el procesamiento de dicho ARNm diana y

- (ii) una secuencia que codifica un ARN interferente dirigido de forma específica a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV y que es capaz de provocar el silenciamiento de dicho ARNm de HBV.

20 En una forma preferida de realización, el componente (ii) del polinucleótido bifuncional comprende las cadenas sentido y antisentido de al menos un siRNA, codifica al menos un pre-miRNA o codifica al menos un shRNA en donde dichos siRNA, miRNA y shRNA se unen específicamente el ARN U1 codificado por la secuencia definida en (i) y que es capaz de provocar el silenciamiento in vivo de dicho ARNm diana.

25 En una forma preferida de realización, la secuencia diana en el genoma de HBV a la que se une el snRNA U1 modificado codificado por la primera secuencia del polinucleótido bifuncional de la invención se selecciona del grupo consistente en las secuencias SEQ ID NO:4 a 28.

En una forma preferida de realización, la secuencia diana en el genoma de HBV a la que

30 se une el ARN interferente codificado por la segunda secuencia del polinucleótido bifuncional de la invención se selecciona del grupo consistente en las secuencias SEQ

ID NO:29 a 35.

Preferiblemente, el polinucleótido bifuncional de la invención comprende secuencias que codifican combinaciones particulares de snRNA U1 modificado y de ARN interferentes que muestran un efecto sinérgico en su capacidad de inhibición de la expresión génica de HBV. Así, en forma preferidas de realización, el polinucleótido bifuncional de la invención comprende secuencias codificantes para snRNA U1 modificados y ARN interferentes que se unen a secuencias diana tal y como se describe anteriormente en la Tabla 1.

Los polinucleótidos bifuncionales de la invención se encuentran habitualmente acoplados a regiones reguladoras de su expresión que pueden ser idénticas para las secuencias que codifican el U1in y para las secuencias que codifican el ARN interferente o pueden ser distintas. Promotores adecuados para la expresión de dichos polinucleótidos son los mismos (constitutivos, regulables y específicos de tejido) que se mencionaron anteriormente para la expresión de los U1in.

Asimismo, los polinucleótidos bifuncionales de la invención pueden estar formando parte de un vector de expresión. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con vectores de expresión que comprenden un polinucleótido bifuncional de la invención. Vectores adecuados para el clonaje y la propagación de los polinucleótidos de la invención son sustancialmente los mismos que se mencionaron anteriormente para la expresión de los polinucleótidos que codifican los U1in o los polinucleótidos que codifican los ARN interferentes. Preferiblemente, los vectores de expresión de los polinucleótidos de la invención son vectores virales, aún más preferiblemente vectores seleccionados del grupo de adenovirus, virus adenoasociado, retrovirus, lentivirus, herpesvirus, SV40 y alfavirus.

25

#### Usos médicos de los compuestos, las composiciones y polinucleótidos bifuncionales de la invención

Los autores de la presente invención han demostrado que los compuestos de la invención son capaces de inhibir la expresión génica de HBV. Asimismo, los autores de

la presente invención han puesto de manifiesto que las composiciones de la invención y los polinucleótidos bifuncionales son capaces de inhibir la expresión de los genes de HBV de forma sinérgica más eficazmente que cada uno de los componentes actuando por separado. Por ello, los compuestos, composiciones y polinucleótidos bifuncionales son de utilidad para su uso en medicina. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un compuesto, una composición de la invención o un polinucleótido bifuncional de acuerdo a la presente invención para su uso en medicina o como medicamento.

En el caso de que la terapia se lleva a cabo usando las composiciones de la invención, el experto en la materia apreciará que existen distintas posibilidades para la administración de la composición de la invención dado que los dos componentes pueden ser administrados como moléculas separadas o como una única molécula. Adicionalmente, tanto el primer como el segundo componente se pueden administrar en forma de moléculas inhibitoras tal cual, es decir, el componente (i) se puede administrar en forma de snRNA U1 y el componente (ii) se puede administrar como un agente silenciador basado en ARN (siARN, miARN, shARN). Alternativamente, el primer componente puede ser aportado como un polinucleótido que codifica el snRNA U1 modificado y/o el segundo componente puede estar basado en ADN, es decir, comprende un polinucleótido que codifica el agente silenciador. En este último caso, los polinucleótidos puede ser administrados como un único polinucleótido que comprende los componentes (i) y (ii) o como polinucleótidos separados, simultánea-, separada- o secuencialmente.

Así, la invención contempla distintas combinaciones de formas de administración que podrán ser determinadas por el experto según las circunstancias.

- Administración simultánea:
  - componente (i) es un ARNsn U1 como tal y el componente (ii) es un ARN interferente,
  - componente (i) es un ARNsn U1 como tal y el componente (ii) es un polinucleótido que codifica un ARN interferente.
  - componente (i) es un polinucleótido que codifica el ARNsn U1 y el componente (ii) es un ARN interferente,

- componente (i) es un polinucleótido que codifica el ARNsn U1 y el componente (ii) es un polinucleótido que un ARN interferente.
- Administración separada o secuencial
  - componente (i) es un ARNsn U1 como tal y el componente (ii) es un ARN interferente,
  - componente (i) es un ARNsn U1 como tal y el componente (ii) es un polinucleótido que codifica un ARN interferente.
  - componente (i) es un polinucleótido que codifica el ARNsn U1 y el componente (ii) es un ARN interferente,
  - componente (i) es un polinucleótido que codifica el ARNsn U1 y el componente (ii) es un polinucleótido que un ARN interferente, en cuyo caso ambos componentes deben encontrarse como polinucleótidos separados.

Alternativamente cuando el primer y el segundo componente de la composición de la invención se usan en forma de polinucleótidos que codifican las moléculas activas de ARN, dichos polinucleótidos pueden ser aportados formando parte de un vector. En el caso de la administración separada o secuencial, cada polinucleótido formará parte de un vector distinto. En el caso de la administración simultanea, es posible que ambos polinucleótidos formen parte de vectores distintos o del mismo vector.

La capacidad de los compuestos, composiciones y polinucleótidos de la presente invención de inhibir la expresión génica de HBV permite el uso de dichos compuestos, composiciones y polinucleótidos para el tratamiento de enfermedades asociadas a una infección por HBV. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un compuesto, una composición, un polinucleótido bifuncional de la invención, o un vector que comprende dicho polinucleótido bifuncional para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad causada por una infección por HBV.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un compuesto, una composición, un polinucleótido bifuncional de la invención, o un vector que comprende

dicho polinucleótido bifuncional para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad causada por una infección por HBV.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento o la  
5 prevención de una enfermedad causada por una infección por HBV en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un compuesto, una composición, un polinucleótido bifuncional de la invención o un vector que comprende dicho polinucleótido bifuncional.

10 La expresión “una enfermedad causada por una infección por HBV”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier enfermedad causada por una patología progresiva del hígado y que incluye hepatitis B aguda, hepatitis B crónica, cirrosis y carcinoma hepático.

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con preparaciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención, las composiciones de la invención o los polinucleótidos bifuncionales de la invención junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En particular, la invención contempla composiciones farmacéuticas especialmente preparadas para la administración de los ácidos nucleicos  
20 que forman el compuesto de la invención, el primer y el segundo componente de la invención o para la administración de los polinucleótidos bifuncionales de la invención. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender tanto el primer componente como el segundo componente, tanto si está basado en ADN como en ARN en forma desnuda, es decir, en ausencia de compuestos que protejan a los ácidos nucleicos de su  
25 degradación por las nucleasas del organismo, lo que conlleva la ventaja de que se elimina la toxicidad asociada a los reactivos usados para la transfección. Rutas de administración adecuadas para los compuestos desnudos incluyen intravascular, intratumoral, intracraneal, intraperitoneal, intraesplénica, intramuscular, subretinal, subcutánea, mucosa, tópica y oral (Templeton, 2002, DNA Cell Biol., 21:857-867). Los  
30 temores iniciales con respecto a la capacidad de éstos compuestos de inducir una respuesta inmune cuando se administración desnudos han sido investigados por Heidel et al. (Nat. Biotechnol., 2004, 22:1579-1582). Mediante la determinación de los niveles

plasmáticos de interleuquinas e interferones tras la administración intraperitoneal e intravenosa de siRNAs, no se pudo observar una respuesta inmune a la vez que se observó que la administración sistémica de siRNA fue bien tolerada.

5 En otra forma de realización, las composiciones y polinucleótidos de la invención se administran mediante la llamada “administración hidrodinámica” en la que los compuestos se introducen en el organismo por vía intravascular a alta velocidad y volumen, lo que resulta en unos elevados niveles de transfección con una distribución más difusa. Una versión modificada de esta técnica ha permitido obtener resultados  
10 positivos para el silenciamiento mediante siRNAs desnudos de genes exógenos (Lewis et al., 2002, Nat.Gen., 32:107-108; McCaffrey et al., 2002, Nature, 418: 38-39) y endógenos (Song et al., 2003, Science, Nat.Med., 9:347-351) en múltiples órganos. En una forma preferida de realización, tanto el U1in que forma el primer componente de la composición de la invención, como los componentes basados en ARN que forman el  
15 segundo componente de la composición de la invención pueden contener modificaciones de su estructura que contribuyen a aumentar su estabilidad. Modificaciones adecuadas para disminuir la sensibilidad a nucleasas incluyen 2'-O-metil (Czuderna et al., 2003, Nucleic Acids Res., 31:2705-2716), 2'-fluoropirimidinas (Layzer et al, 2004, RNA, 10:766-771).

20

Las composiciones y polinucleótidos de la invención pueden administrarse formando parte de liposomas, conjugadas a colesterol o conjugados a compuestos capaces de promover la translocación a través de membranas celulares tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la  
25 proteína Antennapedia de *D.melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex, oligómeros de arginina y péptidos tales como los descritos en WO07069090 (Lindgren, A. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci, 21:99-103, Schwarze, S.R. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, Mol. Therapy 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393). Alternativamente, el  
30 segundo componente de la invención, cuando está basado en ADN, puede administrarse formando parte de un vector plasmídico o de un vector viral, preferiblemente vectores basados en adenovirus, en virus adenoasociados o en

retrovirus, particularmente virus basados en el virus de la leucemia murina (MLV) o en lentivirus (HIV, FIV, EIAV).

La invención se describe a continuación por medio del siguiente ejemplo que tiene  
5 carácter meramente ilustrativo y no limitativo del ámbito de protección.

## EJEMPLOS

### **EJEMPLO 1. Vectores de expresión de inhibidores de la expresión génica del virus 10 de la hepatitis B (HBV) y otros vectores de expresión utilizados.**

#### 1.1 Plásmidos para la expresión de U1 snRNA inhibidores (U1in)

Para la construcción de los plásmidos que expresan los U1in se tomó como referencia la secuencia genómica del virus de la hepatitis B subtipo ayw Galibert que se proporciona como SEQ.ID.NO.1.

15 Los U1in se construyeron tomando como patrón la secuencia del transcrito de ARN cuyo número de acceso en NCBI es NR\_004421.1, correspondiente al U1 snRNA 4 humano (Entrez Gene ID: 6060) que se incluye como secuencia SEQ.ID.NO.2:

```

1   A T A C T T A C C T   G G C A G G G G A G   A T A C C A T G A T   C A C G A A G G T G   G T T T T C C C A G
51  G G C G A G G C T T   A T C C A T T G C A   C T C C G G A T G T   G C T G A C C C C T   G C G A T T T C C C
20 101 C A A A T G T G G G   A A A C T C G A C T   G C A T A A T T T G   T G G T A G T G G G   G G A C T G C G T T
151 C G C G C T T T C C   C C T G

```

Para la construcción de los plásmidos de expresión para los U1in se partió del plásmido **pGem3z+:U1-MscI** (SEQ.ID.NO.3), ya descrito por Fortes y cols. (Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100:8264-8269). Este plásmido fue construido sobre el plásmido pGem  
25 (Promega), que contiene en el sitio BamHI el gen de U1 snRNA, incluidos el promotor y las secuencias de terminación. El U1 snRNA producido mediante este plásmido se diferencia del U1 snRNA endógeno en que los nucleótidos en las posiciones 98-99 y 109-110 (nucleótidos 498-499 y 509-510 de la SEQ.ID.NO.3; indicados a continuación

con doble subrayado) han sido sustituidos por sus nucleótidos complementarios. Estas sustituciones permiten diferenciar los U1 snRNA exógenos del endógeno sin que esté afectada su funcionalidad inhibidora.

SEQ.ID.NO.3:

```

5 1    GGATCCGGTA AGGACCAGCT TCTTTGGGAG AGAACAGACG CAGGGGCGGG
    51   AGGGAAAAAG GGAGAGGCAG ACGTCACTTC CCCTTGGCGG CTCTGGCAGC
    101  AGATTGGTCG GTTGAGTGGC AGAAAGGCAG ACGGGGACTG GGCAAGGCAC
    151  TGTCGGTGAC ATCACGGACA GGGCGACTTC TATGTAGATG AGGCAGCGCA
    201  GAGGCTGCTG CTTGCGCCACT TGCTGCTTCA CCACGAAGGA GTTCCCGTGC
10 251  CCTGGGAGCG GGTTCAGGAC CGCTGATCGG AAGTGAGAAT CCCAGCTGTG
    301  TGTCAGGGCT GGAAAGGGCT CGGGAGTGCG CGGGGCAAGT GACCGTGTGT
    351  GTAAAGAGTG AGGCGTATGA GGCTGTGTCG GGCAGAGGC CCAAGATCTC
    401  ATACTTACCT GGCAGGGGAG ATACCATGAT CACGAAGGTG GTTTTCCCAG
    451  GGCGAGGCTT ATCCATTGCA CTCCGGATGT GCTGACCCCT GCGATTTGGC
15 501  CAAATGTGCC AAACTCGACT GCATAATTTG TGGTAGTGGG GGACTGCGTT
    551  CGCGCTTTCC CCTGACTTTC TGGAGTTTCA AAAGTAGACT GTACGCTAAC
    601  CGGATCC
    
```

Alineamiento de las secuencias SEQ.ID.NO.2 (RNU1-4) y SEQ.ID.NO.3 (U1-Msc1):

```

20 RNU1-4 1    ATACTTACCTGGCAGGGGAGATACCATGATCACGAAGGTGGTTTTCCCAGGGCGAGGCTT 60
    U1-Msc1 401 ATACTTACCTGGCAGGGGAGATACCATGATCACGAAGGTGGTTTTCCCAGGGCGAGGCTT 460
    RNU1-4 61    ATCCATTGCACTCCGGATGTGCTGACCCCTGCGATTTCCCCAAATGTGGGAAACTCGACT 120
25 U1-Msc1 461 ATCCATTGCACTCCGGATGTGCTGACCCCTGCGATTTGGCCAAATGTGCCAAACTCGACT 520
    RNU1-4 121   GCATAATTTGTGGTAGTGGGGGACTGCGTTCGCGCTTTCCCCTG 164
30 U1-Msc1 521   GCATAATTTGTGGTAGTGGGGGACTGCGTTCGCGCTTTCCCCTG 564
    
```

Para la construcción de los plásmidos de expresión de los U1in seleccionados se introdujeron en el plásmido las sustituciones de nucleótidos necesarias para que los U1in expresados interaccionaran con un secuencia diana del mRNA de HBV (SEQ.ID.NO.1) elegida. Las sustituciones se realizaron siempre en nucleótidos comprendidos entre los nucleótidos 402-411 de **pGem3z+:U1-Msc1**, salvo en los plásmidos identificados como U1in52 a U1in55 donde las modificaciones comprendían los nucleótidos 402-415. La secuencia modificada se ha indicado en **negrita y subrayado**. Como ya se ha mencionado, esta es la secuencia de unión a la secuencia consenso GU del extremo 5' del intrón. Como resultado de las sustituciones, los U1in producidos son capaces de unirse con una complementariedad total con una secuencia diana de entre 10 y 11 nucleótidos (14 a 16 en el caso de U1in52 a U1in55). En la Tabla 2 se recogen los U1in ensayados, con sus secuencias diana en el mRNA de HBV.

**Tabla 2. Secuencias diana en el mRNA de HBV para los U1in inhibidores construidos y/o ensayados.**

Agente	Secuencia diana	SEQ.ID .NO.	Nucleótidos de la secuencia diana relativos a la SEQ.ID.NO. 1
U1in1B	CTCCTCCAGC	4	2285-2294; Core <sup>a</sup>
U1in1C	GCCCCATATCC	5	2311-2320; Core y Pol
U1in2	CTGGGCTTTA	6	2487-2496; Pol
U1in3	GTAAACCCTG	7	85-94; Pol y SAg
U1in4	TGACTACTGC	8	98-107; 530-539; 2x Pol y SAg
U1in5	CCCAACCTCC	9	321-330; Pol y SAg
U1in6	CTTGTCCTCC	10	347-356; Pol y SAg
U1in7	TTCATCCTGC	11	409-418; Pol y SAg
U1in8	CCGCTGTTAC	12	796-805; Pol y SAg
U1in9	CCCAAGGTCT	13	1643-1652; X prot
U1in10	GGGGAGGAGA	14	1745-1754; X prot
U1in11	TCACCTCTGC	15	1593-1602; 1827-1836; 2x Pol, X prot y SAg
U1in12	TCATCTCTTG	16	1841-1940; Core
U1in13	ACCGCCTCAG	17	1999-2008; Core
U1in14	ACTCAGGCAA	18	2064-2073; Core
U1in15	CTCCCTCGCCT	19	2381-2391; Core y Pol
U1in16	GCCTCTCCCTT	20	106-116; Pol y SAg
U1in17	CAACCCCCACT	21	1195-2205; Pol
U1in18	CCCTTCTCCGT	22	1492-1502; Pol y X prot

Agente	Secuencia diana	SEQ.ID .NO.	Nucleótidos de la secuencia diana relativos a la SEQ.ID.NO. 1
U1in19	CCGACCGACC	23	1511-1520; Pol y X prot
U1in20	CATGTCCTACT	24	1853-1863; Core
U1in52	GGAGGCTGTAGGCA	25	1778-1791; X prot y core;
U1in53	ATGCAACTTTTTCA	26	1816-1829; X prot y core;
U1in54	CCTCTGCCTAATCATC	27	1830-1845; Core;
U1in55	AAGCCTCCAAGCTG	28	1868-1881; Core;

<sup>a</sup> Las anotaciones Core, X prot, Pol y SAg indican en que mRNA de HBV se localiza la diana del inhibidor: respectivamente el mRNA que codifica para las proteínas virales core, proteína X, polimerasa (pol) y antígeno de superficie (SAg).

5 Para los distintos ensayos realizados se utilizó el plásmido pGem3z+:U1-MscI como control.

La construcción de los plásmidos que expresan los diferentes U1in ensayados se realizó como se describe a continuación: Se partió del plásmido pGem3z+:U1-MscI, que se digirió con los enzimas BclI y BglII para eliminar las secuencias correspondientes al extremo 5' del U1 snRNA. Los plásmidos que expresan los U1in se obtuvieron al  
10 introducir en los sitios BclI y BglII de pGem3z+:U1-MscI los oligonucleótidos hibridados siguientes:

Inhib.	Oligonucleótido Primer	SEQ.I D. NO.	Secuencia del oligonucleótido 5' -> 3'
U1in1B	U1iaHBVR1Bs	36	GATCTC <b>agctggaggag</b> GCAGGGGAGATACCAT
	U1iaHBVR1Bas	37	GATCATGGTATCTCCCCTGCCTCCTCCAGCTGA
U1in1C	U1iaHBVR1Cs	38	GATCTC <b>aggataggggc</b> GCAGGGGAGATACCAT
	U1iaHBVR1Cas	39	GATCATGGTATCTCCCCTGCGCCCCTATCCTGA
U1in2	U1iaHBVR2s	40	GATCTC <b>taaagcccag</b> GCAGGGGAGATACCAT
	U1iaHBVR2as	41	GATCATGGTATCTCCCCTGCCTGGGCTTTATGA
U1in3	U1iaHBVR3s	42	GATCTC <b>cagggtttac</b> GCAGGGGAGATACCAT
	U1iaHBVR3as	43	GATCATGGTATCTCCCCTGCGTAAACCTGTGA
U1in4	U1iaHBVR4s	44	GATCTC <b>agcagtagtca</b> GCAGGGGAGATACCAT
	U1iaHBVR4as	45	GATCATGGTATCTCCCCTGCTGACTACTGCTGA

U1in5	U1iaHBVR5s	46	GATCTCA <b>ggaggttggg</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR5as	47	GATCATGGTATCTCCCCTGCCCAACCTCCTGA
U1in6	U1iaHBVR6s	48	GATCTCA <b>ggaggacaag</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR6as	49	GATCATGGTATCTCCCCTGCCTTGTCTCCTGA
U1in7	U1iaHBVR7s	50	GATCTCA <b>gcaggatgaa</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR7as	51	GATCATGGTATCTCCCCTGCTTCATCCTGCTGA
U1in8	U1iaHBVR8s	52	GATCTCA <b>gtaacagcgg</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR8as	53	GATCATGGTATCTCCCCTGCCCGCTGTTACTGA
U1in9	U1iaHBVR9s	54	GATCTCA <b>agaccttggg</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR9as	55	GATCATGGTATCTCCCCTGCCCAAGGTCTTGA
U1in10	U1iaHBVR10s	56	GATCTCA <b>tctcctcccc</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR10as	57	GATCATGGTATCTCCCCTGCGGGGAGGAGATGA
U1in11	U1iaHBVR11s	58	GATCTCA <b>gcagaggtga</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR11as	59	GATCATGGTATCTCCCCTGCTCACCTCTGCTGA
U1in12	U1iaHBVR12s	60	GATCTCA <b>caagagatga</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR12as	61	GATCATGGTATCTCCCCTGCTCATCTCTTGTGA
U1in13	U1iaHBVR13s	62	GATCTCA <b>ctgaggcgg</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR13as	63	GATCATGGTATCTCCCCTGCACCGCCTCAGTGA
U1in14	U1iaHBVR14s	64	GATCTCA <b>ttgcctgagt</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR14as	65	GATCATGGTATCTCCCCTGCACTCAGGCAATGA
U1in15	U1iaHBVR15s	66	GATCTCA <b>ggcgaggag</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR15as	67	GATCATGGTATCTCCCCTGCCTCCCTCGCCTGA
U1in16	U1iaHBVR16s	68	GATCTCA <b>agggagaggc</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR16as	69	GATCATGGTATCTCCCCTGCGCCTCTCCCTTGA
U1in17	U1iaHBVR17s	70	GATCTCA <b>gtgggggttg</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR17as	71	GATCATGGTATCTCCCCTGCCAACCCCCACTGA
U1in18	U1iaHBVR18s	72	GATCTCA <b>cggagaagg</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR18as	73	GATCATGGTATCTCCCCTGCCCTTCTCCGTGA
U1in19	U1iaHBVR19s	74	GATCTCA <b>ggtcggtcgg</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR19as	75	GATCATGGTATCTCCCCTGCCGACCGACCTGA
U1in20	U1iaHBVR20s	76	GATCTCA <b>gtaggacatg</b> GCAGGGGAGATAACCAT
	U1iaHBVR20as	77	GATCATGGTATCTCCCCTGCCATGTCTACTGA

U1in52	U1iaHBVR52s	78	GATCATGGTATCTCCCGGAGGCTGTAGGCATGA
	U1iaHBVR52as	79	GATCTCAT <b>TGCCTACAGCCTCC</b> GGGAGATACCAT
U1in53	U1iaHBVR53s	80	GATCATGGTATCTCCCATGCAACTTTTTTCATGA
	U1iaHBVR53as	81	GATCTCAT <b>TGAAAAAGTTGCAT</b> GGGAGATACCAT
U1in54	U1iaHBVR54s	82	GATCATGGTATCTCCCTCTGCCTAATCATCTGA
	U1iaHBVR54as	83	GATCTCA <b>GATGATTAGGCAG</b> AGGAGATACCAT
U1in55	U1iaHBVR55s	84	GATCATGGTATCTCCCAAGCCTCCAAGCTGTGA
	U1iaHBVR55as	85	GATCTCA <b>CAGCTTGGAGGCTT</b> GGGAGATACCAT

La secuencia complementaria a la secuencia diana se ha resaltado en negrita.

### 1.2 Plásmidos para la expresión de shRNA inhibidores

Igualmente, se construyeron y ensayaron una serie de plásmidos para la expresión de  
5 diversos shRNA inhibidores de HBV, con las secuencias diana en el mRNA de HBV que se indican en la Tabla 2.

Los plásmidos para la expresión de los shRNA se generaron sobre un plásmido pSuper clonando las secuencias de oligonucleótidos que comprenden las secuencias diana de la Tabla 3.

10 Para ello se partió del plásmido pSuper (Brummelkamp et al. Science. 2002; 296(5567): 550-553). Este plásmido se digirió con BglII y HindI y en estos sitios se clonaron los oligonucleótidos hibridados que se indican a continuación:

<b>Inhibidor</b>	
<b>SEQ.ID.NO.</b>	
<b>Oligonucleótido – Primer (5' -&gt; 3')</b>	
shRNA1	
86	GATCCCCGGTCTTACATAAGAGGACTTTCAAGAGAAGTCCTCTTATGTAAGACCTTTTTGGAAA
87	AGCTTTTCCAAAAAGGTCTTACATAAGAGGACTTCTCTTGAAAGTCCTCTTATGTAAGACCGGG
shRNA2	
88	GATCCCCCTCAGTTTACTAGTGCCATTTCAAGAGAATGGCACTAGTAACTGAGTTTTTGGAAA
89	AGCTTTTCCAAAAACTCAGTTTACTAGTGCCATTTCTCTTGAAATGGCACTAGTAACTGAGGGG

---

shRNA3

90 GATCCCCCATCACATCAGGATTCCTATTCAAGAGATAGGAATCCTGATGTGATGTTTTGGAAA

91 AGCTTTTCCAAAAACATCACATCAGGATTCCTATCTCTTGAATAGGAATCCTGATGTGATGGGG

---

shRNA4

92 GATCCCCGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTCAAGAGAGCCCTACGAACCACTGAACTTTTTGGAAA

93 AGCTTTTCCAAAAAGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTCTCTTGAAGCCCTACGAACCACTGAACGGG

---

shRNA5

94 GATCCCCATCAAGGTATGTTGCCCGTTTCAAGAGAACGGGCAACATACCTTGATTTTTGGAAA

95 AGCTTTTCCAAAAAATCAAGGTATGTTGCCCGTCTCTTGAACGGGCAACATACCTTGATGGG

---

shRNA6

96 GATCCCCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTCAGAGACGCCGCAGACACATCCAGCTTTTTGGAAA

97 AGCTTTTCCAAAAAGCTGGATGTGTCTGCGGCGTCTCTTGAACGCCGCAGACACATCCAGCGGG

---

shRNA7

98 GATCCCCGCAATGTCAACGACCGACCTTCAAGAGAGGTCGGTCGTTGACATTGCTTTTTGGAAA

99 AGCTTTTCCAAAAAGCAATGTCAACGACCGACCTCTCTTGAAGGTCGGTCGTTGACATTGCGGG

---

**Tabla 3. Secuencias diana en el mRNA de HBV para los shRNA inhibidores  
construidos y/o ensayados.**

Agente	Secuencia diana	SEQ.ID. NO.	Nucleótidos de la secuencia diana relativos a la	
			SEQ.ID.NO.1	
shRNA4	GTTTCAGTGGTTCGTAGGGC	29	694-712	Pol y SAg
shRNA5	ATCAAGGTATGTTGCCCGT	30	455-473	Pol y SAg
shRNA6	GCTGGATGTGTCTGCGGCGT	31	374-393	Pol y SAg
shRNA7	GCAATGTCAACGACCGACC	32	1679-1698	X prot
shRNA1	GGTCTTACATAAGAGGACT	33	1648-1666	X prot
shRNA2	CTCAGTTTACTAGTGCCAT	34	672-691	Pol y SAg
shRNA3	CATCACATCAGGATTCCTA	35	165-183	Pol y SAg

5 1.2 Otros plásmidos utilizados en los ensayos

El plásmido pSP65-ayw 1.3 que contiene una copia del HBV (Chisari et al. Science. 1985; 230(4730):1157-1160) fue facilitado por el Dr. Chisari. En adelante lo denominaremos pHBV.

5 El plásmido pRL-SV40 (Promega, E2231) se utilizó como control de transfección de la luciferasa de Renilla.

El plásmido pHBV-Luc (Ely et al. Mol Ther. 2008; 16(6): 1105-1112) fue proporcionado por el Dr. Arbuthnot y contiene la secuencia que codificante de HBV en la que la región del antígeno E ha sido sustituida por una secuencia que codifica la luciferasa de luciérnaga.

10 Todos los clones se verificaron por secuenciación en ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems). El DNA plasmídico se purificó con un kit Maxiprep (Marlingen) antes de la transfección.

#### **EJEMPLO 2. Análisis *in vitro* de inhibición de la expresión génica de HBV.**

15 Los ensayos se realizaron sobre células HuH7 (ATCC), que se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de penicilina-estreptomicina, a 37 °C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>.

Todos los reactivos para el cultivo se obtuvieron de Gibco BRL/Life Technologies.

Las células HuH7 fueron transfectadas con fosfato de calcio.

Las células HuH7 (1,5 x 10<sup>5</sup> células) fueron co-transfectadas con

- 20 a. el plásmido pHBV (1 µg), que expresa el mRNA de HBV; y
- b. el plásmido control pGem3z+:U1-Msc1 (pMock) que expresa un U1 snRNA natural (1 µg); o alternativamente, uno o varios de los plásmidos inhibidores (1 µg en total) que expresan un inhibidor de HBV, bien sea U1in o shRNA.

25 Tres días después de la transfección, se evaluó la expresión viral mediante la valoración en el sobrenadante del antígeno E (EAg). La valoración se realizó mediante ELISA

[Diasorin. ETI-EBK PLUS (HBeAg)], en 10  $\mu$ L de sobrenadante y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente se calculó el Factor de Inhibición (F.I.), que representa el número de veces que se inhibe la expresión génica, y que se obtiene mediante el cociente del EAg medido en el sobrenadante de las células transfectadas con el plásmido control (Mock),  
5 entre el EAg medido en el sobrenadante de las células transfectadas con el plásmido inhibidor a evaluar:

$$\text{F.I.} = [\text{EAg}]_{\text{Mock}} / [\text{EAg}]_{\text{Inhibidor}}$$

Todos los plásmidos para la expresión de uno de los shRNA seleccionados  
10 proporcionaron factores de inhibición superiores a 3, siendo particularmente activos los que expresaban shRNA2 y shRNA6 (ver Fig.2).

Igualmente, todos los plásmidos que expresan uno de los U1in seleccionados fueron capaces de disminuir la expresión de EAg (ver Fig. 3), aunque con una menor eficiencia que los shRNA.

15 Por otra parte, en ensayos paralelos se comparó la actividad inhibidora en células transfectadas con uno de los plásmidos inhibidores o co-transfectadas con 2 plásmidos inhibidores, uno que expresaba un shRNA y el otro que expresaba un U1in. Para ello se transfectaron células HuH7 ( $1,5 \cdot 10^5$  células) con:

- a. el plásmido pHBV (1  $\mu$ g), que expresa el mRNA de HBV; y
- 20 b. 1  $\mu$ g del plásmido control pGem3z+:U1-Msc1 (pMock) que expresa un U1 snRNA natural; o 0,5  $\mu$ g del plásmido control pGem3z+:U1-Msc1 y 0,5  $\mu$ g del plásmido que expresa un inhibidor, bien sea U1in o shRNA, o 0,5  $\mu$ g del plásmido que expresa un U1in y 0,5  $\mu$ g del plásmido que expresa un shRNA.

Nótese que en el experimento anterior (Figuras 2 y 3) se utilizaba una dosis de 1  $\mu$ g del  
25 plásmido que expresa un inhibidor mientras que en este experimento se usan 0,5  $\mu$ g del plásmido que expresa un inhibidor, o el otro o de cada uno de ellos. Con esto se

consigue que la suma de los dos inhibidores sea de 1 µg, lo máximo que se puede poner en la mezcla de transfección.

Se pudo comprobar (ver Fig. 4) que la combinación de los inhibidores que expresa un shRNA con los que expresan un U1in aumentaba la inhibición, incluso cuando se  
5 utilizaron U1in que por si solos no fueron inhibidores muy eficientes. Nótese que se usa la mitad de cada inhibidor y que por ello los resultados no pueden compararse con los obtenidos en las Figuras 2 y 3.

### **EJEMPLO 3. Análisis *in vitro* de la inhibición de la expresión génica de HBV-Luc.**

En los ensayos del ejemplo 2 anterior se realizó una evaluación de la inhibición de HBV  
10 mediante una valoración por ELISA no cuantitativo de la expresión de EA<sub>g</sub>. De esta manera se obtuvo una buena estimación de la funcionalidad de los inhibidores, no tanto una cuantificación reproducible de la eficacia de inhibición.

Al objeto de poder obtener valores numéricos de inhibición reproducibles, se evaluó la eficacia de los nuevos U1in en células que expresan luciferasa a partir de un plásmido  
15 que tiene secuencias de HBV. Para generar estas células se utilizó el plásmido pHBV-Luc, que expresa un HBV en el que la región codificante del antígeno S (S<sub>Ag</sub>) ha sido sustituida por una secuencia codificante de la luciferasa de luciérnaga. De esta manera, para que se genere actividad luciferasa es necesaria la expresión desde el mRNA modificado de HBV.

20 A diferencia del plásmido pHBV utilizado en el ejemplo 2, el plásmido pHBV-Luc no puede replicarse en células hepáticas. El genoma de HBV es tan compacto que la sustitución de la secuencia que codifica S<sub>Ag</sub> afecta a la mayor parte de la región codificante de la polimerasa y del core 3'UTR (la región 3' no traducida). El mRNA de la proteína X no se ve afectado. Dado que se no puede producir una polimerasa  
25 funcional, el ARN pregenómico de HBV no puede generar nuevos genomas de HBV, y por tanto no puede tener lugar la replicación viral. En estas circunstancias, la única manera de que se reduzca la actividad luciferasa es que se interfiera la expresión del gen de la luciferasa. La expresión de la luciferasa debería originarse mayormente desde el

mRNA de la luciferasa, pero no es descartable que una fracción se origine desde el ARN pregenómico de HBV.

Algunos de los inhibidores de expresión de HBV seleccionados tienen como secuencia diana una secuencia que está dentro de la ventana de lectura ORF de SAg: U1in5,  
5 U1in6, U1in7, shRNA2, shRNA3, shRNA5 y shRNA6. Por tanto, estos inhibidores no deberían interferir la expresión de la luciferasa.

Los inhibidores que interfieran con la poliadenilación del mRNA de la proteína core, bien sea esté sólo o conjuntamente con el mRNA de la polimerasa, no debería interferir tampoco la expresión de la luciferasa. Entre estos inhibidores se incluyen U1in1b,  
10 U1in1c, U1in2, U1in3, U1in4 y U1in5.

Por tanto, en este modelo se ensayaron únicamente aquellos inhibidores de expresión de HBV cuya secuencia diana está incluida en la región no codificante del mRNA de SAg.

Los ensayos de inhibición de la actividad se realizaron también sobre células HuH7, de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 2, con la salvedad de que:

- 15 - en este caso la células se cotransfectaron con 0,75 µg del plásmido pHBV-Luc (en sustitución de pHBV); y que
- se incluyeron 0,25 µg del plásmido pRL-SV40, como control de transfección
- Las dosis del plásmido inhibidor ensayadas fueron la dosis máxima (1 µg), o la mitad de esta dosis ( $\frac{1}{2}D$ : 0,5 µg).
- 20 - dos días después de la cotransfección se cuantificó la actividad luciferasa.

La actividad luciferasa se midió en un luminómetro Berthold (Lumat LB9507) mediante el kit *Dual Luciferase System* (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Igualmente se calculó el Factor de Inhibición F.I. para cada inhibidor, como el cociente  
25 de la actividad luciferasa ([ Luc ]) medida en las células cotransfectadas con el plásmido

control (Mock) entre la actividad luciferasa medida en las células cotransfectadas con el plásmido inhibidor a evaluar, o una de sus combinaciones.

$$F.I. = [Luc]_{\text{Mock}} / [Luc]_{\text{Inhibidor}}$$

5 Como se muestra en la Figura 5, todos los U1in ensayados fueron capaces de inhibir la actividad luciferasa, aunque esta actividad disminuyó drásticamente cuando la dosis se redujo a la mitad, es decir cuando se transfectaron 0,5 µg de plásmido en vez de 1 µg. También, todos los shRNA inhibieron la actividad luciferasa, incluso a la mitad de dosis.

10 Igualmente se ensayaron distintas combinaciones de U1in y shRNA inhibidores, con los resultados de inhibición que se muestran en la Figura 6. Como puede observarse, la combinación de los U1in y shRNA seleccionados proporcionó factores de inhibición superiores, incluso cuando se utilizaron U1in que por sí solos no mostraron una gran eficiencia inhibidora.

15 Para estas combinaciones se calculó el Índice de Sinergia (S.I.) mediante la siguiente fórmula:

$$S.I. = (FI_{I1+I2} - (FI_{I1} + FI_{I2})) / (FI_{I1} + FI_{I2})$$

$FI_{I1+I2}$  es el Factor de Inhibición F.I. obtenido para la combinación de los dos inhibidores;  $FI_{I1}$  y  $FI_{I2}$  son los Factores de Inhibición obtenidos para cada uno de los inhibidores cuando se ensayaron separadamente.

20 Un valor de S.I. positivo indica que no hay sinergia entre los dos agentes; un valor próximo a 0 indica un efecto aditivo, mientras que un valor negativo indica que no hay sinergismo.

Como se observa en la Figura 6, las combinaciones de inhibidores resaltadas en negrita mostraron una actividad inhibidora sinérgica.

25 **EJEMPLO 4. Análisis *in vivo* de la inhibición de la expresión génica de HBV-Luc.**

El ensayo se realizó sobre ratones C56/BL6 macho, con 5 ratones por grupo de tratamiento, de acuerdo con los requerimientos y aprobación del Comité de Ética en Experimentación Animal de la institución.

Cada ratón recibió una inyección hidrodinámica en la vena de la cola de 1,8 ml de suero  
5 salino conteniendo 25 µg de plásmidos, con la siguiente composición:

- un plásmido pHBV-Luc (5 µg); y
- 20 µg de un plásmido control o 10 µg de un plásmido control y 10 µg de un plásmido que expresa uno de los inhibidores o 10 µg de un plásmido que expresa uno de los inhibidores basados en U1in y 10 µg del plásmido que expresa el  
10 shRNA contra HBV a ensayar.

A distintos tiempos después de la inyección hidrodinámica (1, 3, 5 y 7 días) se evaluó la actividad luciferasa en el hígado de los ratones mediante una cámara CCD (Xenogen). La actividad luciferasa se midió 5 minutos después de la inyección intraperitoneal de 3 mg de luciferina y un anestésico.

15 Como en ejemplo 2 anterior, también se calculó el Factor de Inhibición (F.I.), como el cociente de la actividad luciferasa ([ Luc ]) medida en los ratones que recibieron el plásmido control (Mock), entre la actividad luciferasa medida en los ratones que recibieron el plásmido que expresa el inhibidor (Inhibidor).

Cuando se ensayó la actividad inhibidora de una combinación de dos plásmidos que  
20 expresan un U1in y un shRNA respectivamente, se calculó el Índice de Sinergia (S.I.) mediante la fórmula descrita en el ejemplo 2.

Se realizaron 5 estudios independientes.

Como se observa en la Figura 7, la actividad luciferasa en los animales tratados con el plásmido control permaneció constante. Igualmente, el primer día después de la  
25 inyección la expresión de la luciferasa no varió en los animales que recibieron plásmidos inhibidores, lo que sugiere que la luciferasa podría ser expresada más rápidamente que los inhibidores. Sin embargo, la inyección de los plásmidos que

expresan shRNA1 o shRNA4 produjo una reducción de la actividad luciferasa en todos los animales. Sorprendentemente, la expresión de los inhibidores U1in4 o U1in20 produjo una inhibición mayor a la que se observó en los ensayos *in vitro*, a la vez que mostraron una actividad inhibidora sinérgica cuando se administraron en combinación un shRNA inhibidor (Figura 7). La inyección de shRNA inhibidores con U1in no funcionales produjo inhibiciones similares a las obtenidas para los mismos shRNA administrados solos. Por otra parte e inesperadamente, la administración en combinación de los inhibidores U1in10 y shRNA1 produjo una inhibición sinérgica.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto capaz de silenciar la expresión génica del virus de la hepatitis B seleccionado del grupo consistente en:
  - 5 (i) un snRNA U1, en donde la secuencia de unión a la secuencia consenso GU del extremo 5' del intrón de dicho snRNA U1 se encuentra modificada de forma que se una específicamente a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV de forma que es capaz de inhibir la maduración de dicho ARNm diana y en donde dicha secuencia diana se selecciona del grupo  
10 consistente en las secuencias SEQ ID NO:4-24;
  - (ii) un polinucleótido que codifica un snARN U1 según (i);
  - (iii) un vector de expresión que comprende un polinucleótido según (ii),
  - (iv) un ARN interferente dirigido específicamente a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV que es capaz de provocar el silenciamiento de  
15 dicho ARNm de HBV en donde dicha secuencia diana se selecciona del grupo consistente en las secuencias SEQ ID NO:29 a 35;
  - (v) un polinucleótido que codifica un ARN de interferencia según (iv) y
  - (vi) un vector de expresión que comprende un polinucleótido según (v).
  
- 20 2. Una composición o un kit que comprende en uno o varios contenedores:
  - (a) un primer componente seleccionado del grupo de:
    - (i) un snRNA U1, en donde dicho snRNA U1 se encuentra modificado en su secuencia de unión a la secuencia consenso GU del extremo 5' del intrón de forma que se una específicamente a una secuencia diana de  
25 al menos un ARNm de HBV de forma que es capaz de inhibir la maduración de dicho ARNm diana,
    - (ii) Un polinucleótido que codifica un ARN U1 según (i),
    - (iii) Un vector de expresión que comprende un polinucleótido según (i) y
  - (b) un segundo componente seleccionado del grupo de  
30 (iv) Un ARN interferente dirigido específicamente a una secuencia diana del pre-ARNm de HBV que es capaz de provocar el silenciamiento de dicho pre-ARNm de HBV,

- (v) Un polinucleótido que codifica un ARN de interferencia según (iv) y
  - (vi) Un vector de expresión que comprende un polinucleótido según (v).
3. Una composición o un kit según la reivindicación 2 en donde la secuencia diana a la que se une el snRNA U1 modificado se selecciona del grupo consistente en las secuencias SEQ ID NO:4 a 28.
- 5
4. Una composición o un kit según las reivindicaciones 3 ó 4 en donde la secuencia diana a la que se une el ARN interferente se selecciona del grupo consistente en las secuencias SEQ ID NO:29 a 35.
- 10
5. Una composición o un kit según la reivindicación 4 en donde:
- (i) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:4 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
  - (ii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:6 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31,
  - (iii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:8 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 33,
  - (iv) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:8 y la secuencia diana a la que se une ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
  - (v) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:8 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31,
  - (vi) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:8 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 32,
- 15
- 20
- 25
- 30

- (vii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:9 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- 5 (viii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:12 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 33,
- (ix) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:12 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- 10 (x) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:13 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- (xi) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:13 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 32,
- 15 (xii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:14 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 33,
- (xiii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:14 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- 20 (xiv) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:14 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 32,
- 25 (xv) la secuencia diana a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:15 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- (xvi) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:16 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31,
- 30

- (xvii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:17 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31,
- 5 (xviii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:18 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31 ,
- (xix) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:21 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 33,
- 10 (xx) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:21 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- (xxi) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:21 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 32,
- 15 (xxii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:24 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 33,
- (xxiii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:24 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- 20 (xxiv) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:24 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 32,
- 25 (xxv) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:26 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 34 o
- (xxvi) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:26 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31
- 30
6. Un polinucleótido capaz de silenciar la expresión génica del virus de la hepatitis B que comprende

- 5 (i) una secuencia que codifica al menos un snRNA U1 modificado en su secuencia de unión a la secuencia consenso GU del extremo 5' del sitio de corte del intrón de forma que se une específicamente a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV y es capaz de inhibir el procesamiento de dicho ARNm diana y
- (ii) una secuencia que codifica un ARN interferente dirigido de forma específica a una secuencia diana de al menos un ARNm de HBV y que es capaz de provocar el silenciamiento de dicho ARNm de HBV.
- 10 7. Un polinucleótido según la reivindicación 6 en donde la secuencia diana a la que se une el snRNA U1 modificado se selecciona del grupo consistente en la secuencias SEQ ID NO:4 a 28.
8. Un polinucleótido según las reivindicaciones 6 ó 7, en donde la secuencia diana a la que se une el ARN interferente se selecciona del grupo consistente en la secuencias SEQ ID NO:29 a 35.
- 15 9. Un polinucleótido según la reivindicación 8 en donde:
- (i) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:4 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- 20 (ii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:6 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31,
- 25 (iii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:8 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 33,
- (iv) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:8 y la secuencia diana a la que se une ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- 30

- (v) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:8 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31,
- 5 (vi) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:8 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 32,
- (vii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:9 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- 10 (viii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:12 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 33,
- (ix) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:12 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- 15 (x) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:13 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- (xi) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:13 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 32,
- 20 (xii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:14 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 33,
- 25 (xiii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:14 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- (xiv) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:14 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 32,
- 30

- (xv) la secuencia diana a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:15 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- 5 (xvi) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:16 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31,
- (xvii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:17 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31,
- 10 (xviii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:18 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31 ,
- (xix) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:21 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 33,
- 15 (xx) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:21 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- (xxi) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:21 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 32,
- 20 (xxii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:24 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 33,
- 25 (xxiii) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:24 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 29,
- (xxiv) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:24 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 32,
- 30

- (xxv) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es SEQ ID NO:26 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 34 o
- (xxvi) la región preseleccionada a la que se une el snRNA U1 modificado es  
5 SEQ ID NO:26 y la secuencia diana a la que se une el ARN interferente es SEQ ID NO: 31
10. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
- 10
11. Un compuesto según la reivindicación 1, una composición o kit según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o un vector según la reivindicación 10 para su uso en medicina.
- 15
12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1, una composición o kit según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o un vector según la reivindicación 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20
13. Un compuesto según la reivindicación 1, una composición o kit según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o un vector según la reivindicación 10 para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades causadas por una infección por el virus  
25 de la hepatitis B.

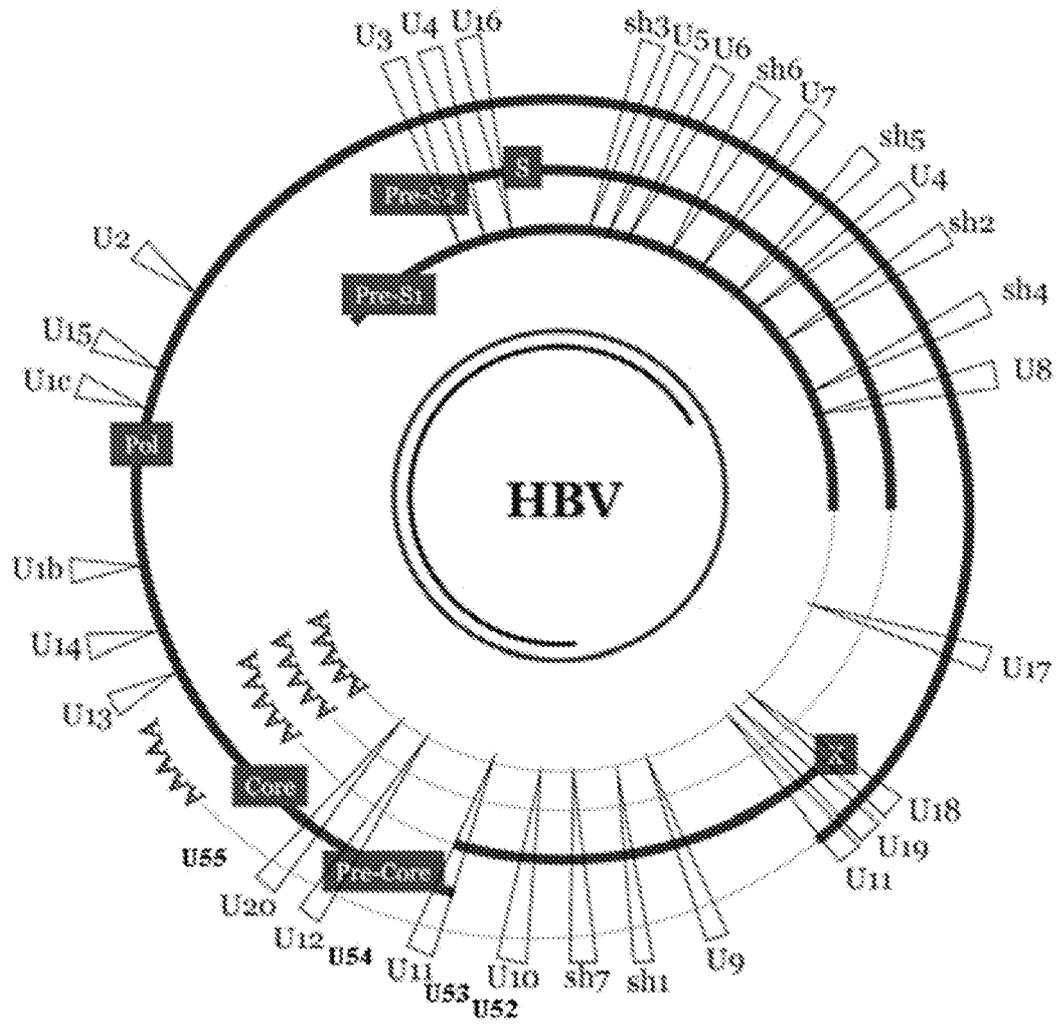
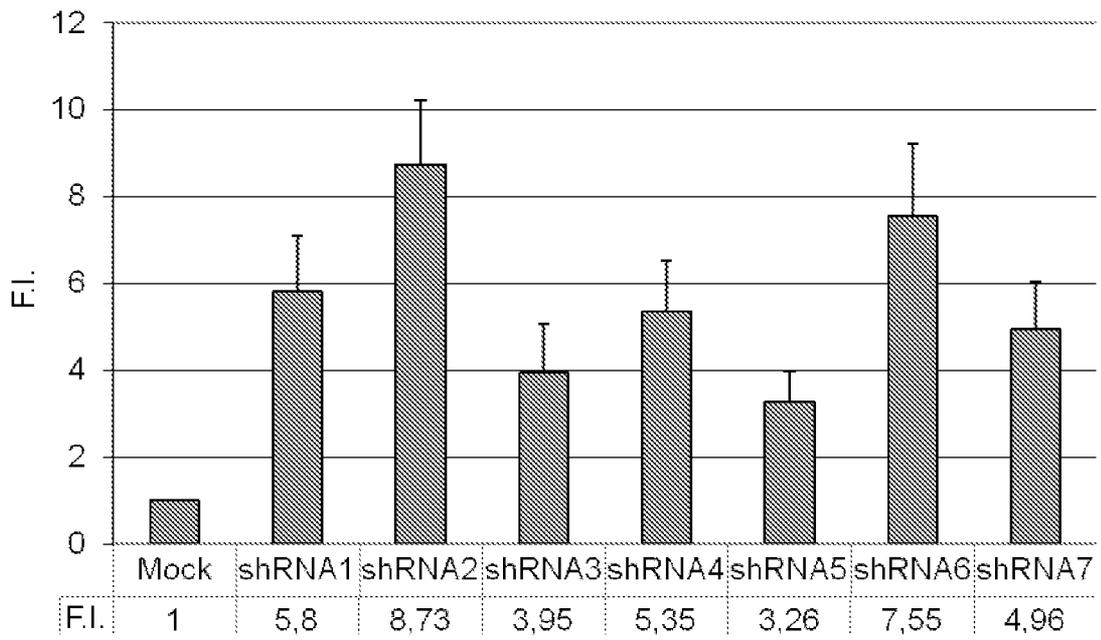


FIG. 1



**FIG. 2**

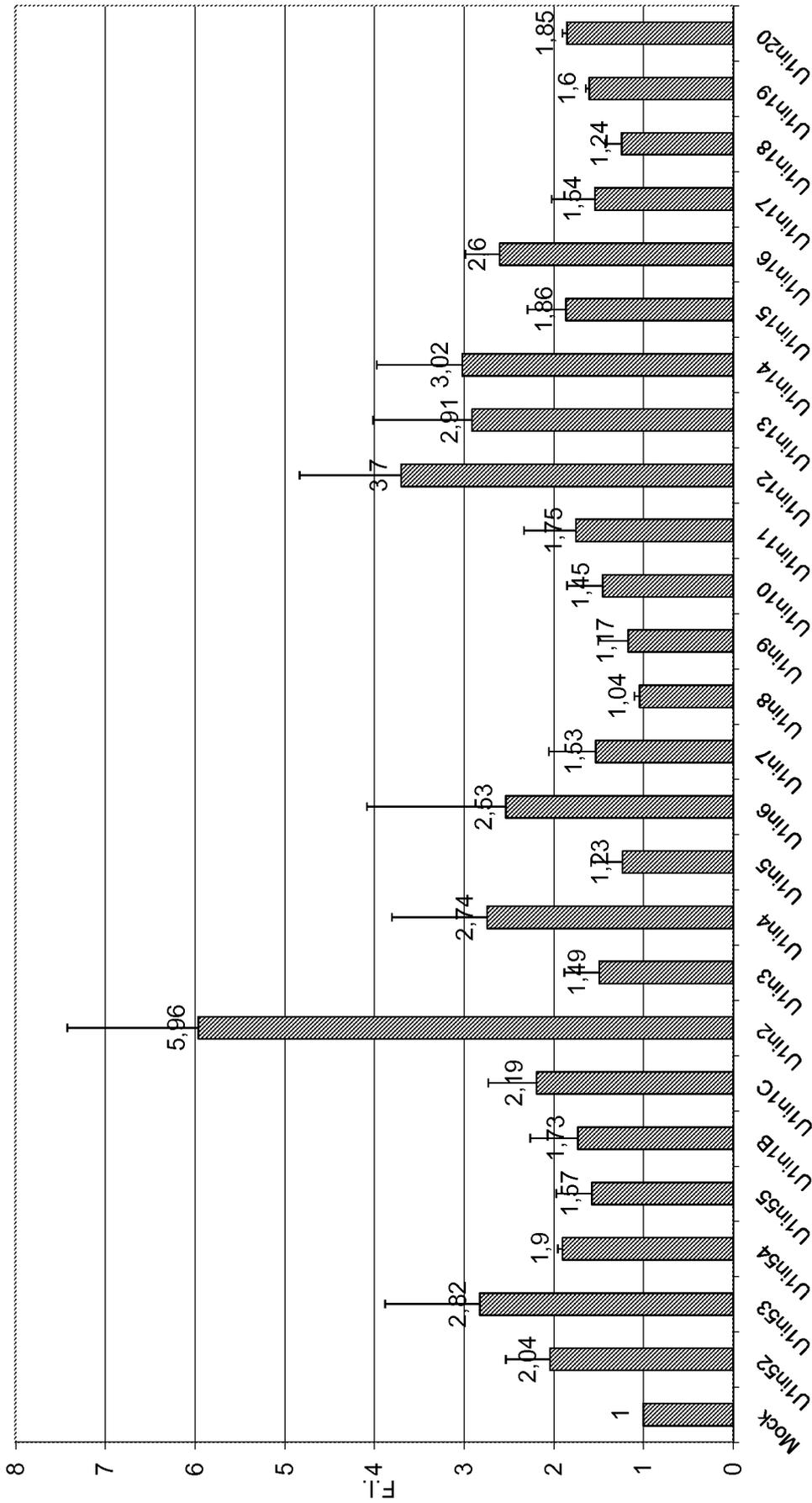


FIG. 3

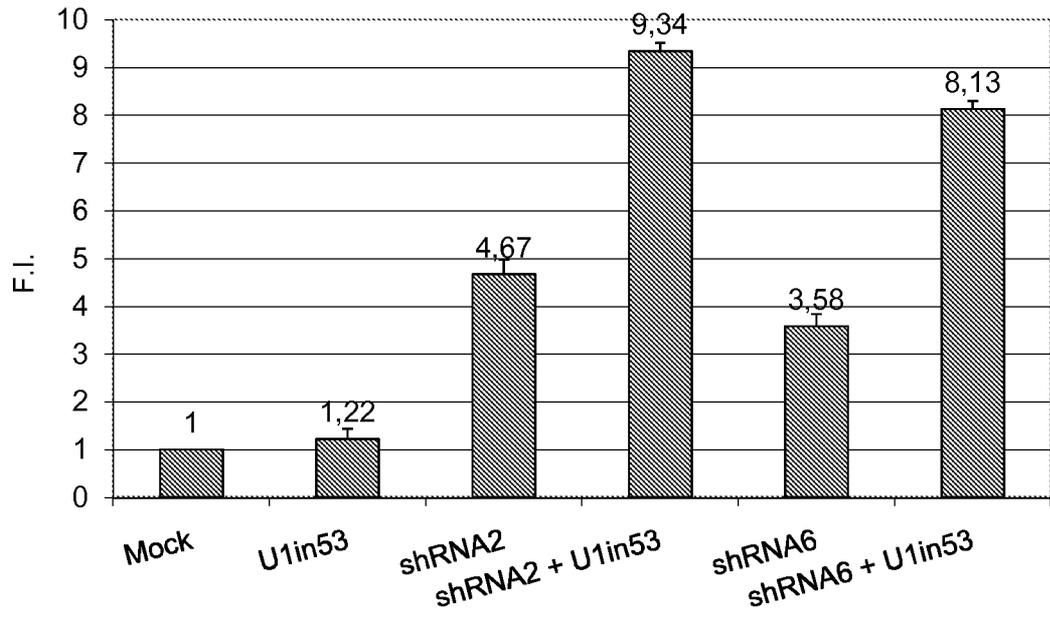


FIG. 4A

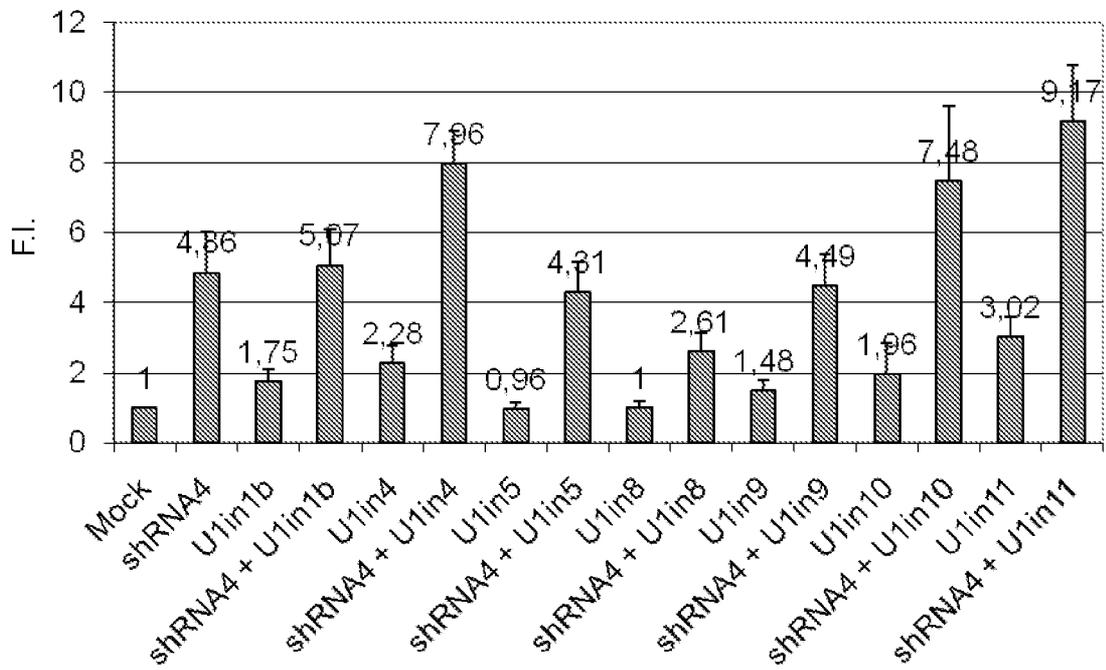


FIG. 4B

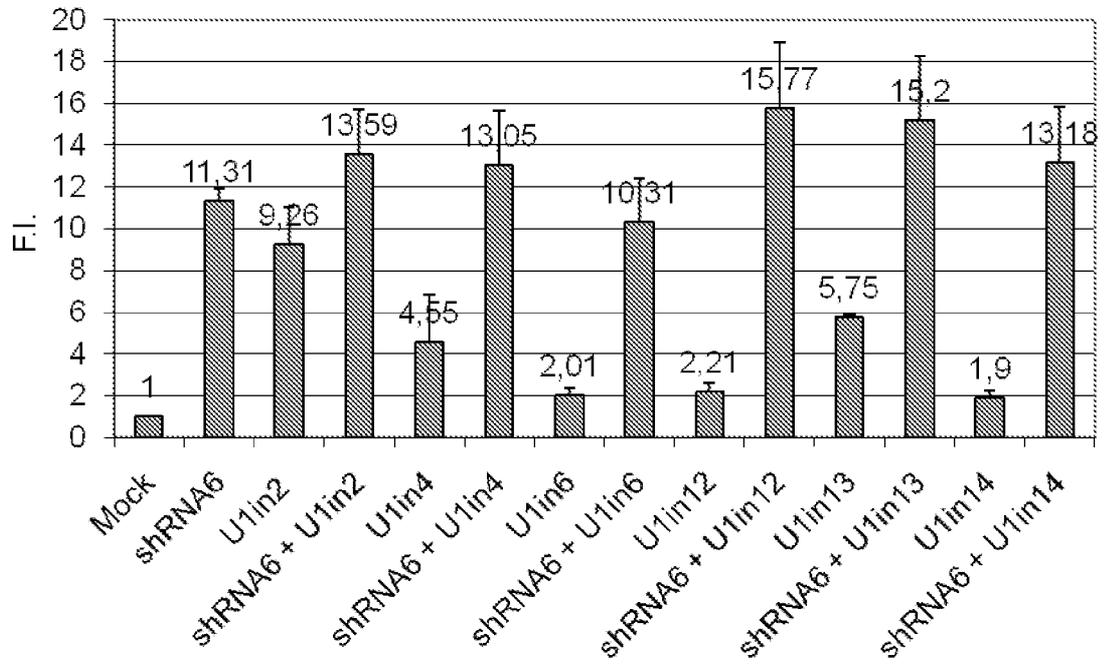


FIG. 4C

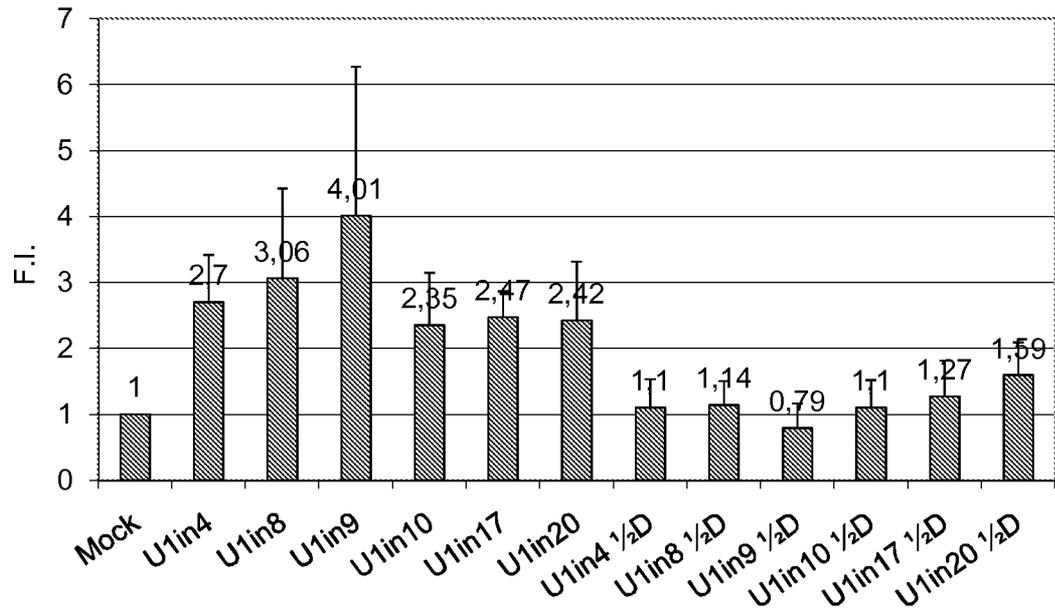


FIG. 5A

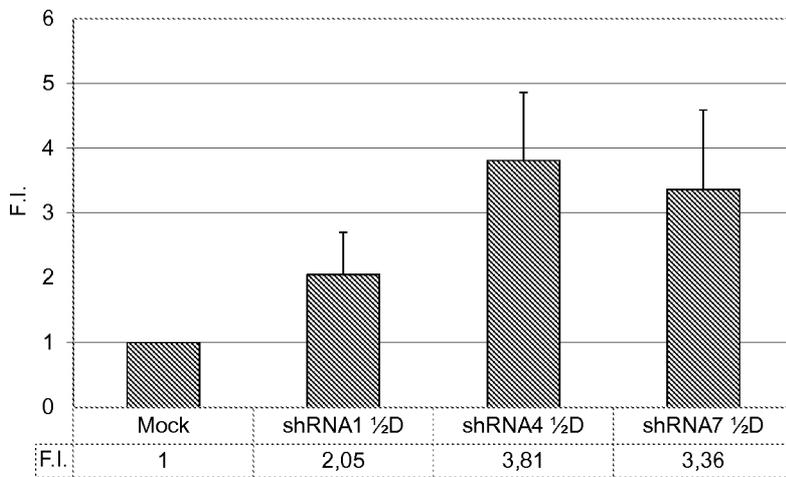


FIG. 5B

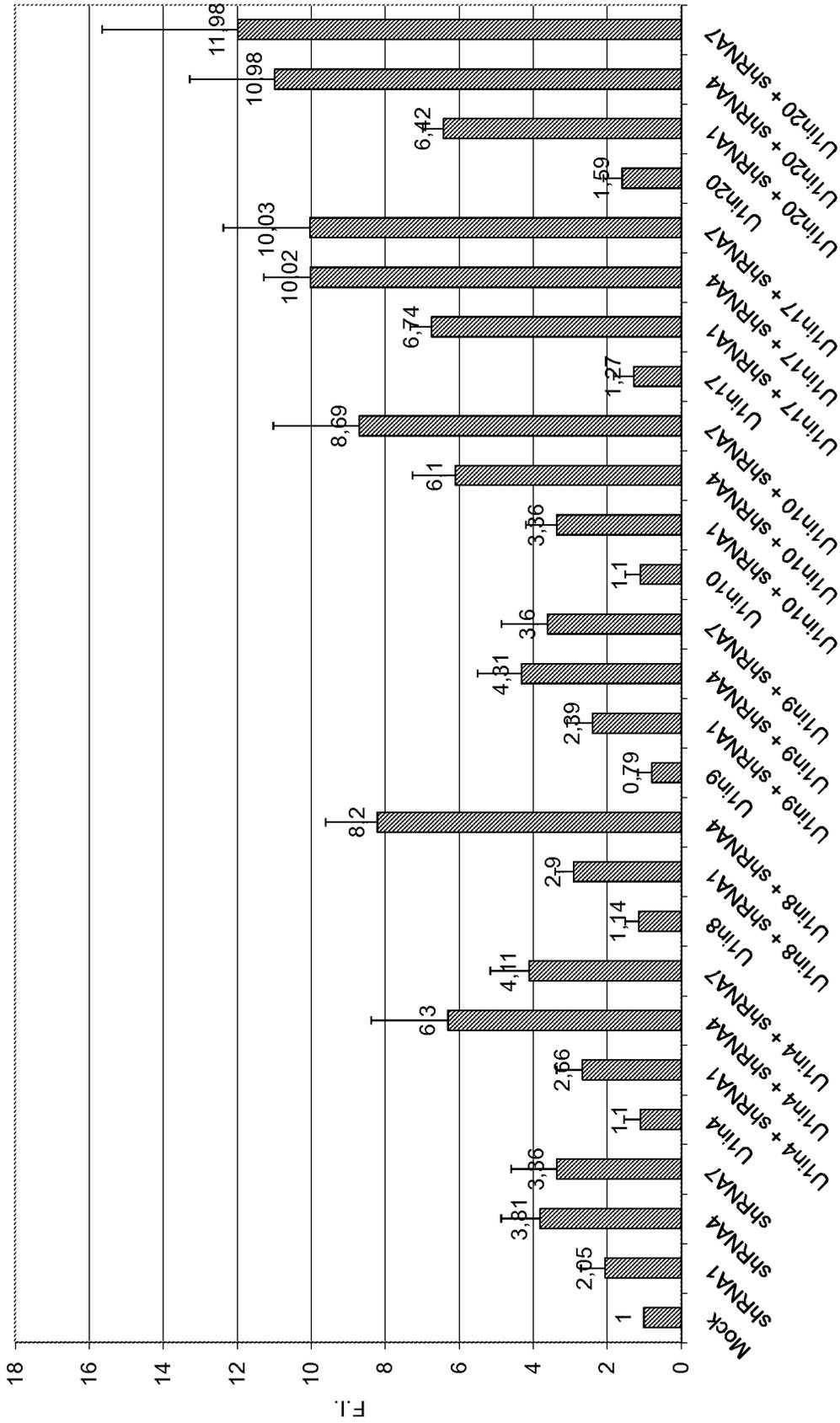


FIG. 6

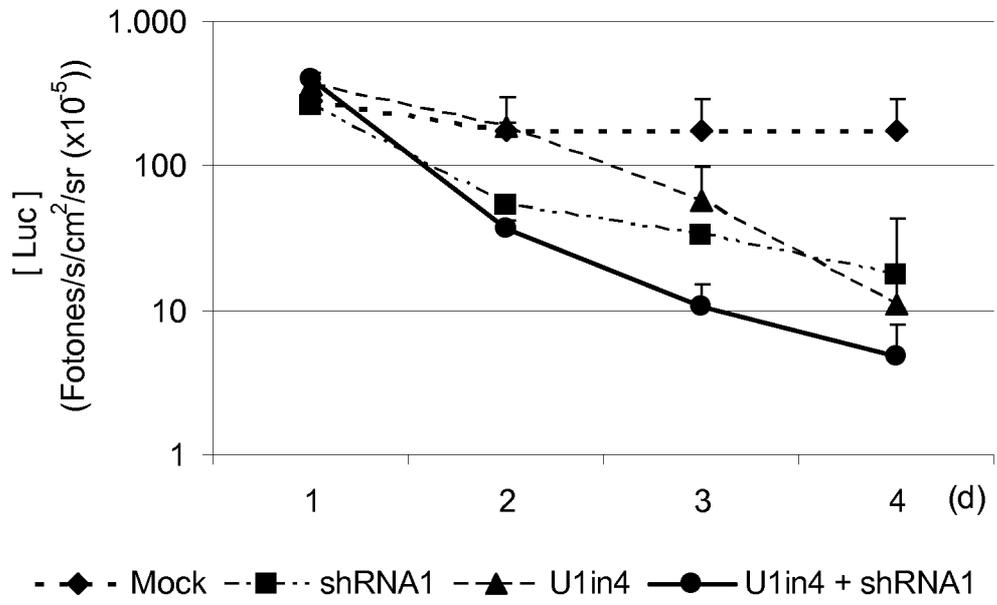


FIG. 7A

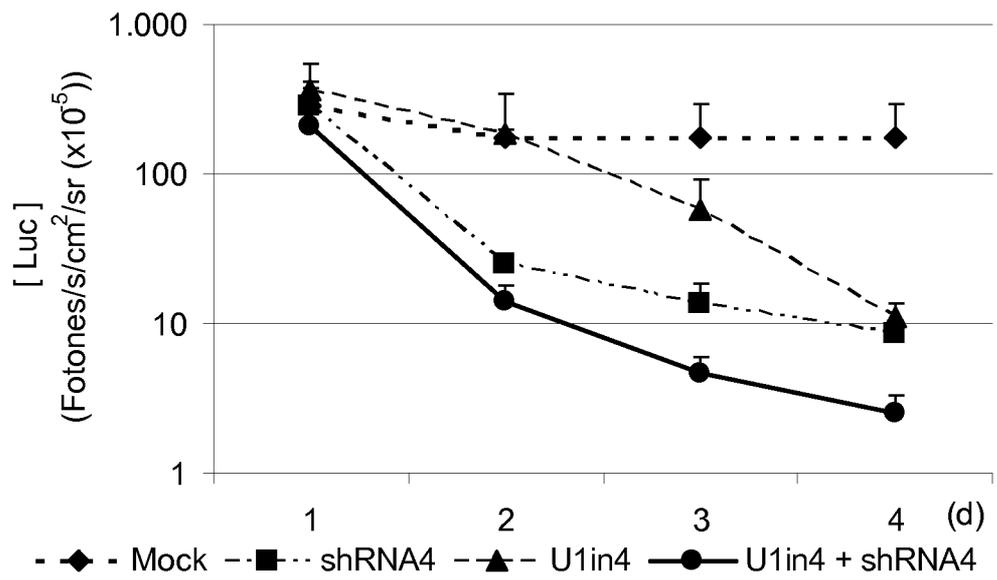


FIG. 7B

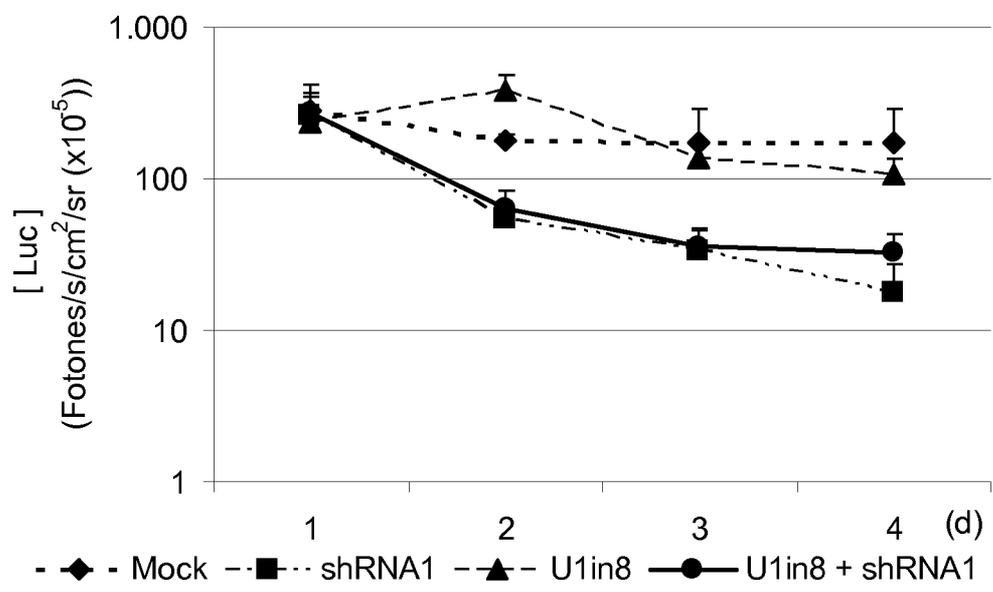


FIG. 7C

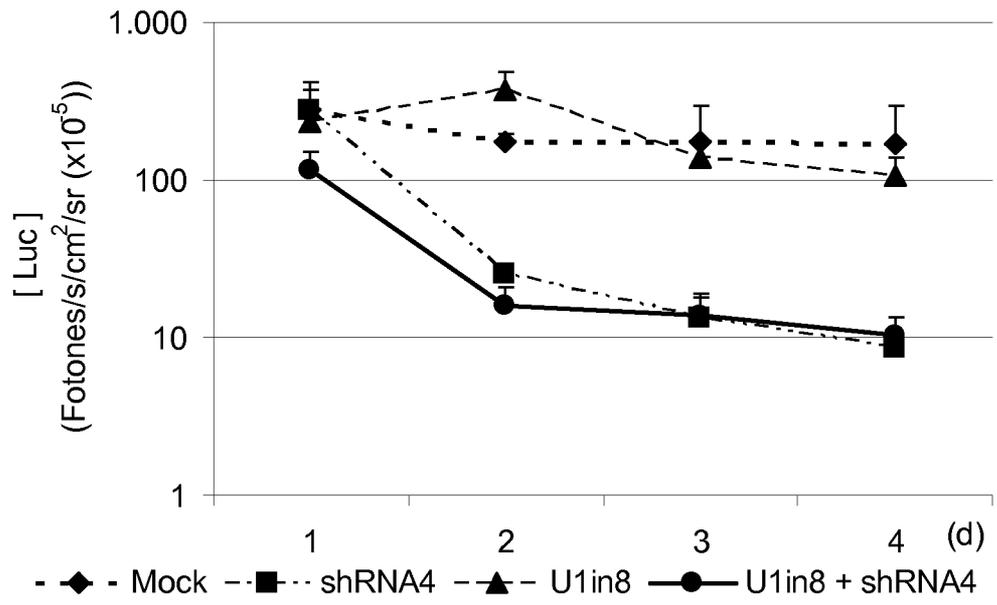


FIG. 7D

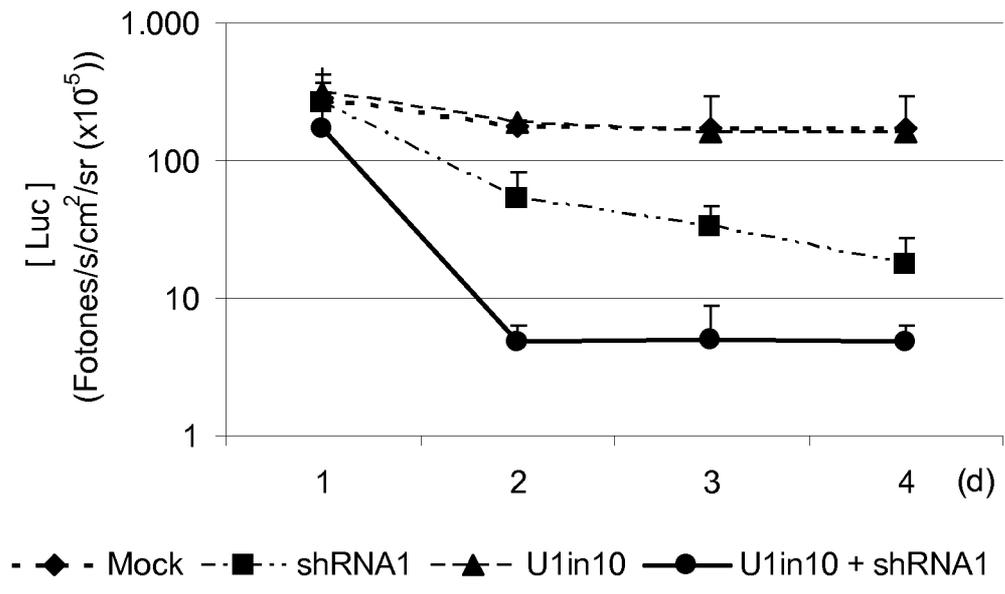


FIG. 7E

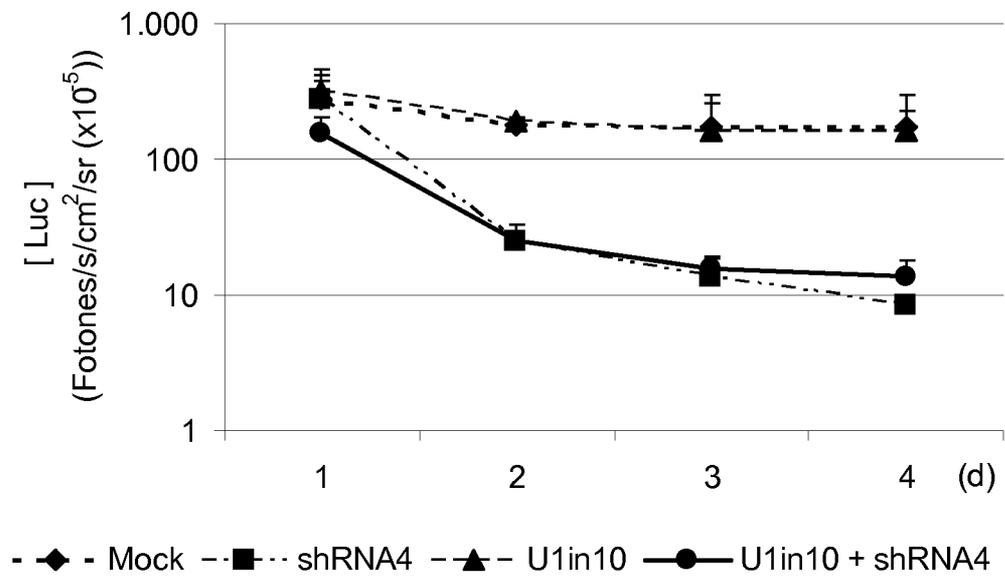


FIG. 7F

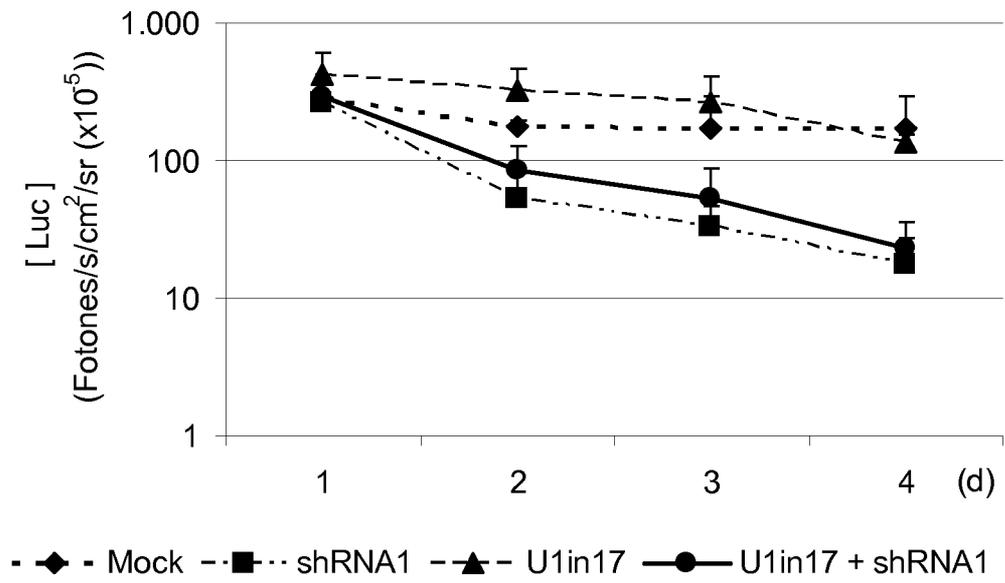


FIG. 7G

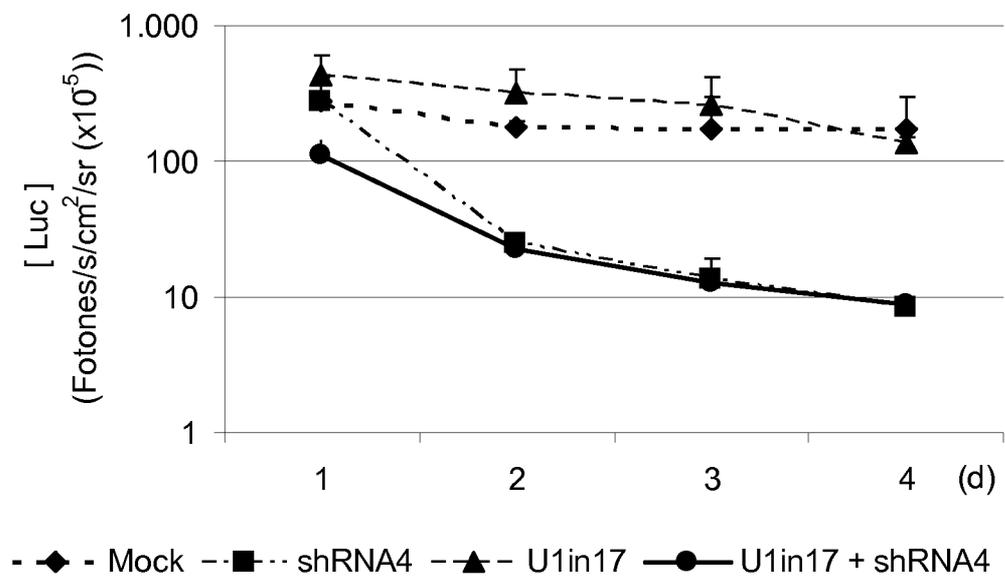


FIG. 7H

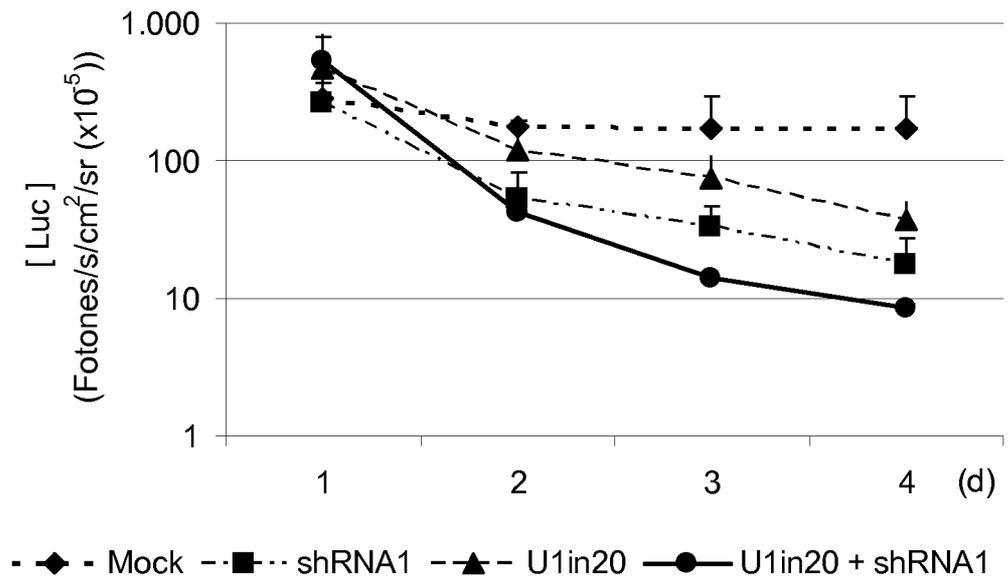


FIG. 7I

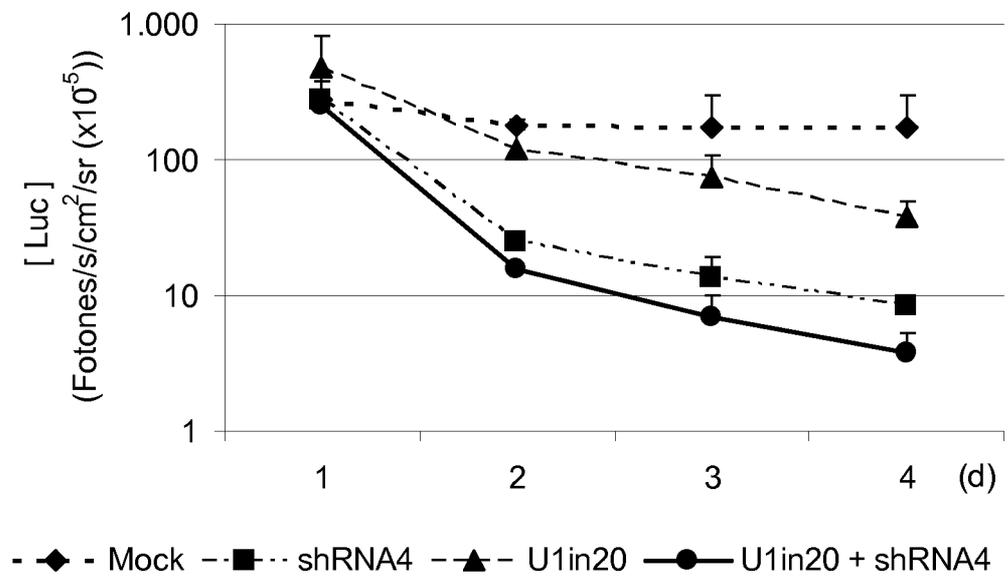


FIG. 7J

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070643

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD  
 INV. C12N15/113 A61K31/713 A61K48/00  
 ADD. A61P31/20

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

**B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA**

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

**C12N A61K**

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) **EPO-Internal**

**C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	EP 2 246 432 A2 (PROYECTO BIOMEDICINA CIMA, S.L. [ES] ABAD LLORET X.; FORTES A.) 3 Noviembre 2010 (2010-11-03) Todo el documento -----	1-13
A	US 2003/206887 A1 (MORRISSEY DAVID; MCSWIGGEN JAMES A.; BEIGELMAN LEONID) 6 Noviembre 2003 (2003-11-06) SEQ ID NO:362/1008, 535/1181, 272/918, 609/1255, 269/915 Todo el documento -----	1-13
A	WO 2004/078181 A1 (CAPITAL BIOCHIP CO., LTD. [CN]; TSINGHUA UNIVERSITY [CN]) 16 Septiembre 2004 (2004-09-16) page 13; sequence 26 Todo el documento -----	1-13
	-/--	

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&amp;” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional <b>5 Julio 2011</b>	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional <b>13/07/2011</b>
---	--

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado  <b>Macchia, Giovanni</b>
N° de fax	N° de teléfono

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070643

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	<p>CN 101 314 047 A (CHINESE ACAD INST  MICROBIOLOGY [CN])  3 Diciembre 2008 (2008-12-03)  Página 30; sequence 64  Todo el documento</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070643

EP 2246432	A2	03-11-2010	AU	2009209571	A1	06-08-2009
			CA	2713458	A1	06-08-2009
			CN	101981189	A	23-02-2011
			WO	2009095517	A2	06-08-2009
			JP	2011510647	A	07-04-2011
			US	2011030075	A1	03-02-2011

-----  
US 2003206887 A1 06-11-2003 NINGUNO

-----  
WO 2004078181 A1 16-09-2004 AU 2003258452 A1 28-09-2004  
CN 1526818 A 08-09-2004  
KR 20060029597 A 06-04-2006

-----  
CN 101314047 A 03-12-2008 NINGUNO  
-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/ES2010/070643

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12N15/113 A61K31/713 A61K48/00  
ADD. A61P31/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 246 432 A2 (PROYECTO BIOMEDICINA CIMA, S.L. [ES] ABAD LLORET X.; FORTES A.) 3 November 2010 (2010-11-03) the whole document	1-13
A	US 2003/206887 A1 (MORRISSEY DAVID; MCSWIGGEN JAMES A.; BEIGELMAN LEONID) 6 November 2003 (2003-11-06) SEQ ID NO:362/1008, 535/1181, 272/918, 609/1255, 269/915 the whole document	1-13
A	WO 2004/078181 A1 (CAPITAL BIOCHIP CO., LTD. [CN]; TSINGHUA UNIVERSITY [CN]) 16 September 2004 (2004-09-16) page 13; sequence 26 the whole document	1-13
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  5 July 2011	Date of mailing of the international search report  13/07/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Macchia, Giovanni

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/ES2010/070643

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101 314 047 A (CHINESE ACAD INST MICROBIOLOGY [CN]) 3 December 2008 (2008-12-03) page 30; sequence 64 the whole document -----	1-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/ES2010/070643
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2246432	A2	03-11-2010	AU 2009209571 A1 06-08-2009 CA 2713458 A1 06-08-2009 CN 101981189 A 23-02-2011 WO 2009095517 A2 06-08-2009 JP 2011510647 A 07-04-2011 US 2011030075 A1 03-02-2011
-----			
US 2003206887	A1	06-11-2003	NONE
-----			
WO 2004078181	A1	16-09-2004	AU 2003258452 A1 28-09-2004 CN 1526818 A 08-09-2004 KR 20060029597 A 06-04-2006
-----			
CN 101314047	A	03-12-2008	NONE
-----			