

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 393**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011 E 16188642 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3124610**

54 Título: **Tratamiento contra el VHB**

30 Prioridad:

28.10.2010 CN 201010521962
28.10.2010 CN 201010521972
28.10.2010 CN 201010521990
28.10.2010 CN 201010522003
28.10.2010 CN 201010521948
28.10.2010 CN 201010521975
28.10.2010 CN 201010522005
18.02.2011 WO PCT/CN2011/071107

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2019

73 Titular/es:

BENITEC BIOPHARMA LIMITED (100.0%)
F6A/1-15 Barr Street
Balmain, New South Wales 2041, AU

72 Inventor/es:

GRAHAM, MICHAEL WAYNE;
FRENCH, PETER;
ZHU, YORK YUAN YUAN;
LU, YIXIANG;
LI, TIEJUN;
SUN, YUNCHENG;
TANG, XIAOJUN y
SHAN, LI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 730 393 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento contra el VHB

5 **Campo de la invención**

[0001] Esta invención está dirigida a un agente de interferencia de ARN (RNAi) y el uso de ese agente ARNi para tratar la infección de hepatitis B en los individuos, así como composiciones farmacéuticas que contienen los agentes ARNi de la invención.

10

Antecedentes de la invención

[0002] La hepatitis es un término general que significa 'inflamación del hígado' y tiene un número de causas. Las causas virales son entre las más comunes, y pueden ser causadas por el virus de la hepatitis A, B, C, D o E. El virus de la hepatitis B (HBV) en particular, es una enfermedad infecciosa grave y frecuente del hígado, que afecta a millones de personas en todo el mundo.

15

[0003] HBV es un virus de ADN hepatotrofo perteneciente a la Hepadnaviridae. La longitud completa del genoma viral es de aproximadamente 3,2 kb, y tiene cuatro marcos de lectura abierta (ORFs), incluyendo el antígeno de superficie (el "gen S"), antígeno de núcleo (el "gen C"), ADN polimerasa (la "P gen") y un gen de función indeterminada que se refiere como el "gen X".

20

[0004] Más de 2.000 millones de personas vivas hoy en día han sido infectadas por el VHB en algún momento de sus vidas y de éstos aproximadamente 350 millones permanecen crónicamente infectada y se convierten en portadores del virus. La infección por VHB puede causar aguda y crónica de tipo B de la hepatitis, y eventualmente puede conducir al desarrollo de insuficiencia hepática crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular. Además, los portadores del VHB pueden transmitir la enfermedad durante muchos años.

25

[0005] VHB se transmite por contacto percutáneo o parenteral con fluidos corporales infectados o sangre. La vía más común de infección es a través de la transmisión vertical de madre a su bebé, y en los adultos a través de las relaciones sexuales o agujas intravenosas compartidas o equipos perforación de las orejas. Muchos casos de infección por VHB aguda se producen sin embargo, sin una vía de infección trazable.

30

[0006] Las personas con infección crónica por VHB ("portadores" - en todo el mundo alrededor de 350-400 millones de personas) tienen un riesgo mayor a 12-300x de desarrollar carcinoma hepatocelular que los no portadores del VHB y en el mundo causa del 60-80% de los cánceres de hígado primarios del mundo. Cada año alrededor del 25% de los más de 4 millones de casos clínicos agudos (es decir, 1 millón de personas en todo el mundo) mueren de hepatitis crónica activa, cirrosis o cáncer de hígado inducido por HBV. Como consecuencia, el VHB ocupa el segundo lugar, después del tabaco como un carcinógeno humano conocido. Aunque las vacunas contra el VHB han sido ampliamente utilizadas desde hace varias décadas, la tasa de prevalencia de VHB en la población sigue siendo alta. Las terapias actuales para la infección crónica por VHB sólo tienen efectos inhibitorios limitados sobre la expresión génica y la replicación viral en la mayoría de los pacientes con infección crónica. Lamivudine por ejemplo suprime la replicación del VHB en los portadores, pero el efecto es reversible si se detiene la terapia. Por otra parte, una limitación importante de tratamiento con lamivudina crónica es el desarrollo de resistencia viral, que típicamente se desarrolla después de 6 meses de tratamiento. La resistencia se asocia generalmente con mutaciones en la región catalítica altamente conservada del gen de la polimerasa del VHB.

35

40

45

[0007] Por estas razones, sigue habiendo una necesidad de un nuevo agente terapéutico para tratar la infección por VHB. Esta invención es dirigida a un agente de interferencia de ARN (RNAi) y el uso de ese agente ARNi para tratar la infección por hepatitis B en los individuos.

50

[0008] La vía de RNAi es iniciada por la enzima Dicer, que escinde ARN de doble cadena (dsRNA) moléculas en fragmentos cortos (comúnmente conocidos como siRNAs) de -20-25 nucleótidos. Una de las dos cadenas de cada fragmento, conocida como el *hebra guía* o *hebra activo*, se incorpora entonces en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) a través de la unión a un miembro de la familia de proteínas Argonaute. Después de la integración en el RISC, la guía de hebra pares de bases con su ARNm diana y se cree que se inhibe una diana mediante la inhibición de la traducción (al frenar la maquinaria de traducción) y/o se induce la escisión del ARNm, evitando de ese modo que sea utilizado como una plantilla de traducción.

55

[0009] Mientras que los fragmentos producidos por Dicer son de doble cadena, sólo la hebra guía, dirige el silenciamiento de genes. La otra *hebra anti-guía* denominada más comúnmente como una *hebra de pasajeros*, *cuerda de soporte* o hebra * se degrada con frecuencia durante la activación RISC (Gregory R, Chendrimada T, Cooch N, Shiekhattar R (2005). "parejas RISC humano microRNA biogénesis y silenciamiento génico postranscripcional" célula 123 (4):.. 631-40) montaje RISC se cree que está regulado por una enzima que selecciona qué cadena de un producto dsRNA de Dicer se carga en RISC. Esta cadena es generalmente una cuyo extremo 5' está menos estrechamente emparejado con su complemento, y también parece ser un claro sesgo de A, y en menor

65

medida U, en la posición 5' para facilitar la unión a algunas proteínas Argonaute (Schwarz DS, Hutvagner g, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003). "Asimetría en el ensamblaje del complejo de enzima RNAi". Cell 115 (2): Frank F, Sonenberg N, Nagar (2010) "base estructural para el reconocimiento específico de base 5' de nucleótidos de RNA guía por AGO2 humano". Nature. 465 (7299): 818-22).

[0010] La inhibición de la replicación del HBV y la expresión de genes se ha demostrado, el uso de vectores de AAV para entregar simultáneamente dos o tres ARN de horquilla corta dirigidos a diferentes genes relacionados con el VHB, específicamente los genes S y X de VHB (Zhi Li, Ming-Liang El, Hong Yao, Qing Ming-Dong, Yang Chao-Chen, Chu-Yan Chan, Bo-Jian Zheng, Kwok-Yung Yuen, Ying Peng, Qiang Sol, Xiao Yang, Marie C Lin, Joseph Sung JY, Hsiang-Kung Fu (2009). "Inhibición de la replicación del VHB en vitro e in vivo con expresado ARN largo horquilla" Reports BMB 42 (1):. 59-64) La inhibición específica de la replicación del VHB también se ha demostrado con ARN de horquilla largas expresadas que se dirigen a la fase de lectura abierta HBx conservada de HBV (Weinberg, MS, Ely, A., Barichiev, S., Crowther, C., Mufamadi, S., Carmona, S., Arbutnot, P. (2007) Molecular Terapia 15:534-541).

[0011] La referencia a cualquier técnica anterior en la memoria descriptiva no es, y no debe ser entendida como un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en Australia o cualquier otra jurisdicción o que esta técnica se podría esperar razonablemente sea fijada, entendida y considerada como relevante por una persona experta en la técnica.

Resumen de la invención

[0012] Se ha descubierto por los inventores actuales que las secuencias únicas dentro del genoma del virus de la hepatitis B (HBV) pueden ser dirigidas a inhibir el virus. Al dirigirse a regiones específicas de uno o más genes, la expresión de aquellos genes se inhibe, efectivamente "silenciando" el gen. Esto presenta una nueva oportunidad para dirigir la expresión del HBV en las células para tratar la infección por HBV.

[0013] Un agente de interferencia de ARN dirigida por ADN (ddRNAi) (siendo una molécula de ARN), y un casete o constructo de expresión para expresar el agente en una célula (incluyendo *en vivo*), para inhibir la expresión de al menos un virus del gen de hepatitis B (HBV), donde el agente comprende una secuencia de efector (que se describe más adelante) de al menos 17 nucleótidos de longitud complementaria a o sustancialmente (es decir, al menos 85%) complementaria a una secuencia predicha transcrita a partir de una región diana, la región diana se selecciona del grupo que consiste en cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de una cualquiera de SEQ ID NOS 1-19. En una realización alternativa, la región diana es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de una cualquiera de SEQ ID NOS: 20-27. En el agente ddRNAi de la invención, al menos una secuencia efectora comprende cualesquiera 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

[0014] La secuencia efectora está dirigida a una región diana de una secuencia de ARN diana, donde la secuencia diana es una transcripción de un gen diana. Por lo tanto la secuencia efectora es 'dirigida a' una región diana por ser suficientemente complementaria en secuencia para una transcripción de un gen diana que contiene la región diana. Un agente ARNi, tal como un agente ddRNAi, que tiene una porción de doble hebra que contiene la secuencia efectora, puede por lo tanto "inhibir la expresión de una secuencia génica diana" en virtud de la secuencia del gen diana que contiene la región diana. En consecuencia, dentro de una célula infectada con el VHB, el agente ARNi es capaz de inhibir la expresión de una secuencia de gen diana debido a que la secuencia del efector (como 'efector' se define a continuación) es sustancialmente complementaria a (al menos) una región de la diana de la secuencia de ARNm predicha del gen diana. Esto puede ilustrarse con la siguiente secuencia corta:

5'ATTGCG3' - secuencia diana de ADN del gen
 5'AUUGCG3' - región diana de ARNm/secuencia de la transcripción del gen
 3'UAACGC5' - secuencia de efector - que es sustancialmente complementaria a una región de la diana de la secuencia de ARNm predicha.

[0015] Típicamente, una región diana es una región de un ARNm de un gen que está destinada a ser silenciada o tener su expresión (a nivel de la transcripción o traducción) reducida.

[0016] El agente está diseñado de modo que también comprende una secuencia de complemento efector, es decir, una secuencia que es sustancialmente complementaria a la secuencia efectora tal que tenderá a reconocer el fin de formar un segmento de doble hebra de ARN - el grado de complementariedad requerido se explica más particularmente más adelante. Además, por lo general un extremo del segmento de doble hebra estará vinculado por una secuencia de bucle de manera que forman una estructura de 'horquilla' en forma. Esto también se conoce como una estructura de "repetición invertida 'interrumpida", como el DNA que codifica una secuencia de ARN contiene una repetición invertida de la región del gen diana que se transcribe a la secuencia efectora, interrumpidos por una secuencia espaciadora que codifica el bucle.

[0017] En la invención, el agente tiene más de una secuencia efectora. Múltiples efectores se pueden orientar a la

misma región de un gen de HBV, diferentes (posiblemente se solapan) regiones del mismo gen y/o genes diferentes agentes VHB. Los agentes ARNi tales como agentes ddRNAi, pueden contener 2 o 3 secuencias efectoras diferentes. Como se explicó anteriormente, el agente ddRNAi comprende una secuencia de complemento efector para cada secuencia efectora, formando así efector - pares de complemento efector (es decir, un primero efector - primer par complemento efector, un segundo efector - segundo par complemento efector, etc). Estos pares pueden ser, pero no es necesario, contiguos el uno al otro, siempre que el agente ARNi puede doblarse a fin de permitir que cada par se recuece. Varias otras consideraciones sugieren un orden u otro de los efectores y complemento efector a lo largo de la longitud del agente ARNi. Por lo tanto, realizaciones de la descripción y de la invención incluyen uno o más de los siguientes:

• agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', una primera secuencia de efector; una segunda secuencia de efector; segunda secuencia de complemento efector; y una primera secuencia de complemento efector;

• un agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', una primera secuencia de efector; una segunda secuencia de efector; una tercera secuencia efectora; una secuencia de complemento efector tercero; una segunda secuencia de complemento efector; y una primera secuencia de complemento efector;

• un agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', un primer efector; una primera secuencia de complemento efector; una segunda secuencia efectora; y una segunda secuencia de complemento efector;

• un agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', una primera secuencia de efector; una primera secuencia de complemento efector; una segunda secuencia de efector; una segunda secuencia de complemento efector; una tercera secuencia de efector; y una tercera secuencia de complemento efector;

• un agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', una primera secuencia de efector; una segunda secuencia de efector; una secuencia de 2 a 100 nucleótidos no auto-complementarios; una segunda secuencia de complemento efector; y una primera secuencia de complemento efector;

• un agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', una primera secuencia de efector; una secuencia de 2 a 100 nucleótidos no auto-complementarios; una primera secuencia de complemento efector; una segunda secuencia de efector; una secuencia de 2 a 100 nucleótidos no auto-complementarios; y una segunda secuencia de complemento efector.

[0018] En las realizaciones de la invención como se reivindica el agente ddRNAi comprende, en una dirección 5' a 3':

(i) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos en longitud; una segunda secuencia de complemento efector; y una primera secuencia de complemento efector; o

(ii) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una primera secuencia de complemento efector; un segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; y una segunda secuencia de complemento efector;

[0019] en donde cada secuencia efectora es al menos 85% complementarias a la transcripción predicha de una secuencia diana, y al menos una de las secuencias efectoras comprende cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

[0020] Como se entenderá por un experto en la técnica, y como se ilustra en las figuras, cualquier secuencia efectora particular, puede ser intercambiada en posición con su complemento en el agente. En formas particulares de cada una de las realizaciones descritas anteriormente, cada secuencia efectora es al menos 17 nucleótidos de longitud y comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de una cualquiera de SEQ ID NOS: 1-19 o SEQ ID NOS: 20-27. Las secuencias efectoras pueden ser todas iguales, o pueden ser todas diferentes, o pueden ser una combinación, por ejemplo, 2 secuencias efectoras de al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: secuencia 1 y un efector de al menos 10 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 4. En las realizaciones de la invención reivindicada, las secuencias efectoras primera y segunda son al menos 17 nucleótidos de longitud y al menos una secuencia efectora comprende cualquier 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

[0021] También se describen agentes en los que la secuencia efectora se selecciona del grupo que consiste de cualesquiera nucleótidos 11, 12, 13, 14, 15 o 16 contiguos dentro de una cualquiera de SEQ ID NOS: 1-19 o SEQ ID NOS: 20-27, y lo más preferiblemente 17 o más nucleótidos contiguos dentro de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-19 o SEQ ID NOS: 20-27. Típicamente, el complemento efector será la misma longitud, o aproximadamente la misma longitud (es decir, \pm 15% de nucleótidos de longitud) como su correspondiente secuencia efectora.

[0022] En realizaciones alternativas, el dsRNA se compone de 2 hebras de ARN separadas que se hibridan para formar un dúplex. Agentes ddRNAi pueden expresarse a partir de un casete de expresión de ADN insertado en cualquier vector o constructo ddRNAi adecuado. En consecuencia, casetes de expresión de ddRNAi que comprenden:

- 5 • una o más secuencias promotoras
- una o más secuencias de ADN, siendo preferiblemente secuencias que codifican para cualquier 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de una cualquiera de SEQ ID NOS: 1-19 o SEQ ID NOS: 20-27,
- 10 • una o más secuencias de ADN que codifican para una o más secuencias de complemento efectoras;
- una o más secuencias terminadoras y opcionalmente
- 15 • una o más secuencias de ADN que codifican para secuencias de bucle; y
- una o más secuencias potenciadoras se dan a conocer.

[0023] La invención proporciona un casete de expresión ddRNAi para expresar un agente ddRNAi para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en una o más genes de HBV, el agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3':

- 25 (iii) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos en longitud; una segunda secuencia de complemento efector; y una primera secuencia de complemento efector; o
- 30 (iv) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una primera secuencia de complemento efector; una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; y una segunda secuencia de complemento efector;

en donde cada secuencia efectora es al menos 85% complementarias a la transcripción predicha de una secuencia diana, y al menos una de las secuencias efectoras comprende cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9, el casete de expresión que comprende una o más secuencias promotoras, una o más secuencias de ADN que codifican para las una o más secuencias efectoras del agente ddRNAi, secuencias de uno o más ADN que codifican para una o más secuencias de complemento efector del agente ddRNAi, una o más secuencias de terminación; y opcionalmente una o más secuencias de ADN que codifican para secuencias de bucle, una o más secuencias potenciadoras.

[0024] En algunas realizaciones, un promotor está unido operativamente a múltiples regiones efectoras que codifican tal que puede conducir la expresión de ellas, mientras que en otras realizaciones, cada región efectora que codifica está unida operativamente a su propio promotor. En construcciones en las que hay múltiples promotores, éstos pueden ser todos iguales o diferentes. Los promotores preferidos son U6 y H1.

[0025] También se proporciona constructos de expresión de ddRNAi, en los que se insertan los casetes de expresión ddRNAi para la expresión. Además, cuando el esqueleto del vector de la construcción es compatible con un sistema de suministro, los constructos de expresión ddRNAi son también estructuras artificiales de liberación.

[0026] Agentes siRNA que comprenden una secuencia de al menos 17 nucleótidos de longitud seleccionada del grupo que consiste de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de una cualquiera de SEQ ID NOS: 1-19 o SEQ ID NOS: 20-27 y un complemento de secuencia con el que la secuencia forma un dúplex, y que son capaces de inhibir la expresión de un gen de HBV se dan a conocer.

[0027] Métodos de tratamiento de la infección aguda o crónica por VHB en un sujeto, la reducción de la carga viral del VHB en un sujeto, la reducción de la gravedad de los síntomas asociados con la infección por VHB en un sujeto, y la reducción de la infectividad de VHB, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un constructo ddRNAi, agente ddRNAi o siRNA agente como se describe en el que el constructo ddRNAi, agente ddRNAi o agente siRNA inhibe la expresión de una o más secuencias diana en un gen del virus de la hepatitis B (HBV), preferiblemente al menos se describen el gen de la polimerasa de HBV. La invención proporciona un agente ddRNAi, o una construcción de expresión ddRNAi de la invención, para uso en el tratamiento de la infección por VHB aguda o crónica en un sujeto, para el uso en la reducción de la carga viral del VHB en un sujeto, para el uso en la reducción de la gravedad de los síntomas asociados con la infección por VHB en un sujeto, o para el uso en la reducción de la infectividad de HBV.

[0028] Composición farmacéutica que comprende un agente ddRNAi, un casete de expresión ddRNAi, un constructo ddRNAi o un agente de ARNsi de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable se dan a conocer. La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente ddRNAi, un casete de expresión ddRNAi, o un constructo de ddRNAi de la invención, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos/figuras

[0029]

Figura 1A-F ilustra algunas de las estructuras de agente ddRNAi de la invención.

La Figura 2 muestra la distribución de los 642 clones de siRNA obtenidos a lo largo del gen de la polimerasa del VHB, en el que las líneas denotan regiones correspondientes a los clones de diana siRNA entero individuales (EST).

La Figura 3 es una comparación de la eficacia de ARNi de casetes de expresión de ARNsi (SECs) y sus correspondientes siRNAs sintéticos sobre los niveles de HBV polimerasa de ARNm con el fin de validar los resultados de cribado iniciales obtenidos con inhibición SEC de la expresión 3 de HBV de polimerasa.

La Figura 4 es el resultado de la pantalla de inhibición de la polimerasa de HBV con 501 secuencias de siRNA derivados de la biblioteca de EST.

La Figura 5A es una ilustración de la distribución de las 100 secuencias de siRNA más eficaces (como se identifica en la Pantalla gigante en la Figura 4) a lo largo del gen de la polimerasa del VHB. La figura 5B ilustra cómo cualquier secuencia dada puede asignarse al gen de la polimerasa del VHB. Se muestran las áreas en que SEQ ID NOS: se basa 1 a 3.

La Figura 6 es un esquema de 5 casetes de expresión individuales y agentes ARNi codificados por ellos, junto con la secuencia efectora después del procesamiento por Dicer. Los casetes de expresión se basan en la SEQ ID NO: 3, 9, 12, 13 y 23.

La Figura 7 es un esquema de un casete de expresión de la secuencia efectora múltiple que contiene (a) secuencias efectoras de cada uno unido operativamente a secuencias promotora y terminadora separadas para expresar agentes ARNi individuales en la forma de un agente de horquilla corta RNAi (shRNAi), (Figura 7A); o (b) una primera secuencia efectora unida operativamente a un promotor, y una tercera secuencia efectora unida operativamente a un terminador de tal manera que un solo se expresa bucle de tallo múltiple agente ARNi. Los casetes de expresión se basan en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.

La Figura 8 es un esquema de un casete de expresión de la secuencia efectora múltiple basada en SEQ ID NOS: 1, 4 y 6, lo que da lugar a un único agente ARNi de larga horquilla.

La Figura 9 ilustra la eficiencia knockdown de gen de la SEQ ID NOS: 1 a 14 y 20 a 27 después de la transfección en células HepG2 2.2.15. La eficiencia knockdown se determinó por análisis de QRT-PCR de ARNm del gen de la polimerasa. SINC es un control negativo, siendo un siRNA sin secuencias diana conocidos en HBV; normal es el nivel de ARNm de la polimerasa en las células no transfectadas, estandarizado a un nivel de 1.

Figura 10A y B muestran las actividades de luciferasa (+/- SD; n = 4) en células transfectadas con cantidades variables de construcciones químicamente sintetizadas de siRNA23 (A) o shRNA23 de expresión (B) de orientación pGL3-23 usando las condiciones enumeradas en las tablas 3 y 4. En la Figura 10A, SINC fue utilizado tanto como un control negativo y para ajustar las cantidades totales de siRNAs añadidos a las células para evitar posibles artefactos debido a la transfección desigual; siRNA GL3 se utilizó como control positivo, tal que es un ARNsi dirigido al gen de luciferasa. En la figura 10B, pUC57 se utilizó tanto como un control negativo y para ajustar las cantidades totales de ADN de plásmido añadido a las células para evitar posibles artefactos debido a la transfección desigual. Un plásmido que expresa un shRNA luciferasa basado en GL3 siRNA se utilizó como control positivo.

Descripción detallada de las realizaciones

Definiciones

[0030] Como se usa en el presente documento, excepto cuando el contexto requiera otra cosa, el término "comprende" y variaciones del término, tales como "que comprende", "comprende" y "compuesto", no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o pasos.

[0031] El término "interferencia de ARN" o "ARNi" se refiere generalmente a un proceso de silenciamiento de genes dependiente de ARN que es iniciado por las moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA) en el citoplasma de una célula. El dsRNA reduce la expresión de una secuencia diana de ácido nucleico, que puede ser un ADN cuyos productos de expresión de ARN se reducen, o un ARN, con el cual la molécula de dsRNA comparte homología sustancial o total.

[0032] Por "ARN de doble cadena" o "dsRNA" se quiere decir una molécula de ARN de doble cadena que es capaz de inhibir expresión de una secuencia de ácido nucleico diana con la que comparte homología. En algunas realizaciones el dsRNA es una horquilla o estructura de bucle, con una región dúplex unida opcionalmente por al menos 1 nucleótido del tallo, y que se conoce como una "ARN en horquilla" o "agente ARNi de horquilla corta" o "ARNhc". El dúplex se forma entre una secuencia efectora y una secuencia complementaria a la secuencia efectora en el presente documento se hace referencia como un "complemento efector". Típicamente, el complemento efector será la misma longitud que su secuencia efectora correspondiente. Como se explicará más adelante, la secuencia de complemento efector a la secuencia de ácido nucleico diana.

[0033] Una "secuencia efectora" es la secuencia de nucleótidos que, cuando una parte del complejo RISC, se une a la secuencia de nucleótidos de HBV diana, dirigiéndose a esa secuencia para su destrucción por la célula. Es análogo a la hebra "guía" discutida en la sección de antecedentes. La secuencia efectora es 'dirigida a' una región diana por ser complementaria o sustancialmente complementaria en secuencia a la transcripción de la región diana de manera que un agente de ARN que tiene una porción de doble hebra que contiene la secuencia efector inhibe la expresión de la secuencia de gen diana.

[0034] El "complemento efector", que es análogo a la hebra de paso discutido en el fondo es suficientemente complementario al efector de tal manera que es híbrido con la secuencia efectora. Es probable que el complemento efector será de una secuencia similar a la secuencia del gen diana, pero no necesariamente tiene por qué serla.

[0035] El término "agente ARNi" se refiere a una secuencia de dsRNA que provoca RNAi. Este término puede ser utilizado indistintamente con "ARN de interferencia pequeños" (agentes ARNsi) y de los pequeños ARN de horquilla (agentes shRNAi o hpRNAi).

[0036] La región de doble cadena o dúplex del agente ARNi es al menos 17 pares de bases de largo, y por lo general en el intervalo de 17 a 30 pares de agentes ARNi bases pueden sintetizarse químicamente o enzimáticamente fuera de las células y posteriormente entregarse a las células o puede expresarse in vivo mediante un vector adecuado en células (véase, por ejemplo, la patente US. No. 6.573.099, WO 2004/106517 y WO99/49029.

[0037] El término "agente RNAi dirigido por ADN" o "agente ddRNAi" se refiere a un agente ARNi que se transcribe a partir de un casete de expresión de ADN ("casete de expresión ddRNAi"). El agente ddRNAi transcribe a partir del casete de expresión puede ser transcrito como un único ARN que es capaz de auto-recogerse en una estructura de horquilla con una región dúplex unida por al menos 2 nucleótidos, o como un único ARN con múltiples dominios de ARNhc o como múltiples transcripciones cada uno capaz de plegarse como una sola shRNA.

[0038] El casete de expresión ddRNAi se puede ligar en vectores que se hace referencia como vectores ddRNAi o constructos ddRNAi. Los vectores pueden proporcionar secuencias especificando la transcripción del casete de expresión ddRNAi *in vivo* o *in vitro*. El vector puede servir, además, como el vehículo de administración para el casete de expresión ddRNAi. Vectores basados en virus, por ejemplo, generarán un constructo ddRNAi que es útil para la expresión del casete de expresión ddRNAi además de ser compatible con la entrega viral.

[0039] Una célula ha sido "transformada", "transducida" o "transfectada" por un ácido nucleico exógeno o heterólogo o vector cuando dicho ácido nucleico ha sido introducido en la célula. El ADN transformante puede o no estar integrado (unido covalentemente) en el genoma de la célula. Con respecto a células eucariotas, una célula establemente transformada es una en la que el ADN transformante se ha integrado en un cromosoma de la célula huésped o se mantiene extra-cromosómicamente (episomal) de manera que el ADN transformante es heredado por las células hijas durante la replicación celular. En no replicante, células diferenciadas de ADN transformante pueden persistir como un episoma.

[0040] "La expresión génica" puede ser una referencia a uno o ambos de transcripción o traducción.

[0041] "Inhibición de la expresión" se refiere a la ausencia o disminución observable en el nivel de proteína y/o ARNm producto del gen diana. La inhibición no tiene que ser absoluta, pero puede ser la inhibición parcial suficiente para un cambio detectable u observable como resultado de la administración de un agente ARNi o ddRNAi o agente siRNA o construcción ddRNAi de la invención. La inhibición se puede medir mediante la determinación de una disminución en el nivel de ARNm y/o producto de proteína a partir de un ácido nucleico diana con respecto a una célula que carece del agente ddRNAi o construir, y puede ser tan poco como 1%, 5% o 10%, o puede ser absoluta inhibición es decir 100%. Los efectos de inhibición pueden ser determinadas por examen de las propiedades externas, es decir, el fenotipo cuantitativo y/o cualitativo de la célula u organismo, y también puede incluir una evaluación de la carga viral después de la administración de un agente ddRNAi o construcción de la invención.

[0042] Como se usa en este documento, "un rasgo fenotípico cuantitativo" se refiere a un rasgo asociado con la expresión molecular de un ácido nucleico en una célula huésped y puede así incluir la cantidad de moléculas de ARN transcritas o replicadas, la cantidad de moléculas de ARN modificadas transcripcionalmente, la cantidad de péptidos o proteínas traducidas, o la actividad de tales péptidos o proteínas.

[0043] Una reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico donde el fenotipo es un rasgo cualitativo que en la presencia del agente de ARNi de la invención, el rasgo fenotípico cambia a un estado diferente en comparación con una situación en la que el agente ARNi está ausente. Una reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico puede así medirse como una reducción en los niveles de estado estacionario de (parte de) ese ácido nucleico, una reducción en la traducción de (parte de) ese ácido nucleico o una reducción en el efecto de la presencia del RNA (s) transcrito(s) o polipéptido (s) traducido(s) tienen en la célula eucariota o el organismo, y en última instancia conducir a rasgos fenotípicos alterados. Está claro que la reducción de expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés puede ir acompañada por o correlacionada con un cambio observable en el fenotipo. La evaluación puede ser por medio de técnicas bioquímicas tales como la hibridación del Norte, ensayos cuantitativos PCR en tiempo real, ensayos de expresión génica, unión de anticuerpos, ELISA, RIA, transferencia de Western y otros ensayos y técnicas conocidas en la técnica.

[0044] "Ácidos nucleicos diana" pueden ser ARN o ADN, cuyos productos de transcripción son secuencias dirigidas, de codificación o no de codificación, endógeno o exógeno. En una realización preferida, la polimerasa (P) de genes del virus DNA virus de la hepatitis B está destinada a la inhibición. En consecuencia, en esta realización, el ácido nucleico diana es de al menos la transcripción ARN del gen de la polimerasa.

[0045] Una secuencia de efector para una diana es complementaria a o sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana. Por "sustancialmente complementaria" se entiende que las secuencias son hibridables o se pueden reconocer. Sustancialmente complementaria es preferiblemente de aproximadamente 85% complementaria a una porción del gen diana. Más preferiblemente, es al menos 85-90% complementarias, y lo más preferiblemente al menos 95, 96, 97, 98 99 o 100% complementarias. Por lo tanto, la complementariedad sustancial incluye 100% de complementariedad, pero 100% de complementariedad también puede ser denominado a lo largo de la memoria descriptiva como "complementario", o "complementaria".

[0046] Una secuencia complementaria a o sustancialmente complementaria a una región de un gen diana tiene el grado de complementariedad de secuencia a través de una secuencia diana contigua. Generalmente, una región de ARN bicatenario de la invención se puede someter a mutagénesis para producir simples o varios nucleótidos sustituciones, deleciones o adiciones.

[0047] Una "composición terapéutica" o "composición farmacéutica" o "composición para el tratamiento de la infección por HBV" se refiere a una composición que incluye un agente ddRNAi, casete de expresión ddRNAi, constructo ddRNAi o agente siRNA.

[0048] Las palabras "tratar" o "tratamiento" se refieren al tratamiento terapéutico en el que el objeto es reducir la velocidad (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan al alivio de los síntomas de la infección por VHB, la reducción de la infectividad de HBV, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilizado (es decir, no empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. El tratamiento puede no necesariamente resultar en la desaparición completa de la infección por HBV, pero puede reducir o minimizar las complicaciones y efectos secundarios de la infección y la progresión de la infección.

[0049] La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto de la presente invención que (i) trata la enfermedad, afección, o trastorno, (ii) atenúa, mejora, o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno, o (iii) retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad en particular, afección o trastorno descritos aquí.

Descripción detallada

[0050] La presente invención proporciona un nuevo agente ARNi, y el uso del agente ARNi para la orientación VHB en individuos infectados. El tratamiento del VHB está dirigido a:

- i. la eliminación de infectividad para prevenir la transmisión y propagación de HBV de un individuo a otro; y
- ii. minimizar la progresión global de la enfermedad hepática en el individuo infectado.

Agente ddRNAi

[0051] Los agentes ARNi expresados a partir de casetes de expresión ddRNAi basados en ADN se denominan

agentes RNAi dirigidos por ADN, o agentes ddRNAi. Pueden dirigirse directamente a la actividad de genes con un mínimo de eventos fuera de objetivo. Por "eventos fuera de objetivo" se entiende que la expresión de ácidos nucleicos que no sean el objetivo no son inhibidos por los agentes ARNi o ddRNAi. En el caso de la infección por el VHB, esto ofrece una oportunidad única para hacer frente a las necesidades insatisfechas de tratamiento clínico para el VHB. Por consiguiente, un agente dirigido por ADN de interferencia ARN (ddRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en un gen del virus de la hepatitis B (VHB), comprendiendo el agente ddRNAi al menos:

una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; y

una primera secuencia de complemento efector;

en donde se describe la primera secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana.

[0052] Típicamente, la primera secuencia efectora forma una región de doble cadena con la primera secuencia de complemento efector.

[0053] Las secuencias de los agentes ddRNAi descritos tienen suficiente complementariedad con una región del gen de HBV con el fin de mediar RNAi diana específico. Por "sustancialmente complementaria" se entiende que las secuencias son hibridables o se pueden reconocer, y, o bien:

- la secuencia de la primera secuencia efectora es al menos aproximadamente 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 o 90% complementarias a al menos 17 o más nucleótidos contiguos de la secuencia diana, más preferiblemente al menos aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94 o 95% complementarias e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 95, 96, 97, 98 o 99% complementarias o absolutamente complementario (es decir, 100%) a 17 o más nucleótidos contiguos de la secuencia diana; o

- la secuencia efectora tiene al menos 10 o más nucleótidos contiguos que son 100% complementarias con la diana y preferiblemente menos de 6 nucleótidos que no pueden convertirse en par de bases con la secuencia diana. La primera secuencia efectora, por lo tanto, puede tener 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos que no se convertirán en par de bases GC/AU con la secuencia diana. Se cree que este nivel de diferencia no tendrá un impacto negativo en la capacidad del agente ddRNAi sea capaz de inhibir la expresión de la secuencia diana.

[0054] Cuando la primera secuencia efectora tiene 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos que no se convierten en par de bases GC/AU con la secuencia diana, se prefiere que las diferencias están en los primeros o últimos 5 nucleótidos de la primera secuencia efectora, con sólo 1 o 2 cambios de nucleótidos en la parte central de la secuencia efectora.

[0055] El agente ddRNAi también puede comprender una primera secuencia efectora que consta de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud, en donde la secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana. Un agente ddRNAi de acuerdo con esta realización de la descripción por lo tanto tiene una longitud máxima determinada por la longitud y el número de secuencia de efector/es es decir, cada secuencia de efector no está comprendida dentro de una secuencia más larga.

[0056] Como se señaló anteriormente, la complementariedad sustancial se entiende que significa que las secuencias son hibridables o se pueden reconocer. Los términos "de hibridación" y "reconocido" (y equivalentes gramaticales) se utilizan indistintamente en esta especificación con respecto a las secuencias de nucleótidos y se refieren a secuencias de nucleótidos que son capaces de formar pares de bases Watson Crick debido a su complementariedad. Preferentemente, las secuencias sustancialmente complementarias son capaces de hibridarse en condiciones de media o alta rigurosidad:

- condiciones de astringencia altas: 0.1xSSPE (o 0,1 x SSC), 0,1% de SDS, 65°C

- condiciones de astringencia media: 0.2xSSPE (o 1.0xSSC), 0,1% de SDS, 50°C Alternativamente, "sustancialmente complementaria" también se entendería por el experto en la técnica para implicar apareamiento de bases no de Watson-Crick, especialmente en el contexto de secuencias de ARN, tales como un llamado "par wobble" que puede formarse entre residuos guanosina y uracilo en ARN. "Complementario" se utiliza aquí en su forma habitual para indicar apareamiento de bases Watson-Crick, y "no complementario" se usa para significar apareamiento de bases no Watson-Crick, a pesar de que tales secuencias no complementarias pueden formar pares de oscilación u otras interacciones. En el contexto de la presente invención, la referencia a secuencias "no-emparejamiento" se refiere específicamente a las secuencias entre las que no forman pares de bases de Watson-Crick.

[0057] La primera secuencia efectora es al menos 17 nucleótidos de longitud, preferiblemente 17 a 50 nucleótidos y lo más preferiblemente 17 a 30 nucleótidos. Puede ser 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30

nucleótidos de longitud. Cuando la primera secuencia efectora es más larga que 17 nucleótidos, se prefiere que al menos 17 nucleótidos contiguos de la primera secuencia efectora forma la región de doble cadena con la cadena complementaria.

5 **[0058]** La invención proporciona un agente ddRNAi para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en uno o más genes de HBV, el agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3':

10 (i) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una segunda secuencia de complemento efector; y una primera secuencia de complemento efector; o

15 (ii) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una primera secuencia de complemento efector; una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; y una segunda secuencia de complemento efector;

20 en donde cada secuencia efectora es al menos 85% complementarias a la transcripción predicha de una secuencia diana, y en donde al menos una de las secuencias efectoras comprende cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9. Los agentes ddRNAi de la invención y como expresión de inhibición descrita de secuencias de ácido nucleico de VHB. Preferiblemente, el gen diana del VHB es la secuencia de ácido nucleico que se expresa como el gen de la polimerasa (P). Por consiguiente, en una realización de la invención, o de la divulgación, el agente ddRNAi de la invención, o de la divulgación, inhibe la expresión de una o más secuencias diana en un gen de la polimerasa del virus de la hepatitis B (HBV). El genoma HBV tiene marcos de lectura abiertos superpuestos. Como tal, la orientación secuencias particulares del gen de la polimerasa también se dirigirá a las mismas secuencias en el gen de superposición. Los agentes de la invención y la divulgación, por tanto, son capaces de dirigirse a múltiples genes con una única secuencia efectora. En cada forma de realización preferida sin embargo, al menos el gen de la polimerasa es diana.

25 **[0059]** En los agentes ddRNAi de la invención al menos una de las secuencias efectoras comprende cualesquiera 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9. En formas de realización dadas a conocer, se selecciona la primera secuencia efectora desde cualquier 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de cualquiera de la polimerasa de secuencias efectoras HBV ddRNAi SEQ ID NOS: 1-19, o SEQ ID NOS: 20-27 enumeradas a continuación. Por simplicidad, las SEQ ID NOS: serán denominadas colectivamente como SEQ ID NOS: 1 a 27.

35

Tabla 1: secuencias efectoras RNAi

SEQ ID	Secuencia efectora RNAi ^a	Sitios diana HBV ^b	nts	Diana de gen ^c
1	GAUUGACGAUAAGGGAGA	109-126	18	pol
2	UUGAAGUCCCAAUCUGGAU	2935-2953	19	pol
3	GCCGGGCAACGGGGUAAAGGUUC	1139-1161	23	pol
4	UAUUUGCGGGAGAGGACAACAGA GUUAUC	1335-1363	29	pol
5	UCCUGAUGUGAUGUUCUCAUGU	155-177	23	pol & HBsAg
6	AAGGCCUCCGUGCGGUGGGG	3019-3038	20	pol
7	GGUAUUGUUACACAGAAAGGC	1116-1137	22	pol
8	GAUGUGUUCUUGUGGCAAG	908-926	19	pol
9	GGGAAAGCCCUACGAACCACU	698-718	21	pol & HBsAg
10	GUGGAGACAGCGGGUAGGC	3128-3147	20	pol
11	GAGGACAACAGAGUUAUC	1335-1352	18	pol
12	GCCCACUCCAUAGGAAUUUUC	631-653	23	pol & HBsAg
13	GGAUCUUGCAGAGUUUGG	18-35	18	pol
14	CGUUGCCGGGCAACGGGGUA	1146-1165	20	pol
15	GCAAUUUCCGUCCGAAGGUUUGG	575-597	23	pol & HBsAg
16	GUUGGAGGACAGGAGGUUGG	340-359	20	pol & HBsAg
17	GUUGGAGGACAGGAGGUUGGUG	338-359	22	pol & HBsAg
18	GAAGUGCACACGGUCCGGCAGA	1568-1589	22	pol & X
19	CAAGAUGCUGUACAGACUUGGC	762-783	22	pol & HBsAg
20	GGGAGAGGACAACAGAGUUAUC	1335-1356	22	pol
21	CGGGAGAGGACAACAGAGUUAU	1336-1357	22	pol
22	GCGGGAGAGGACAACAGAGUUA	1337-1358	22	pol
23	UGCGGGAGAGGACAACAGAGUU	1338-1359	22	pol
24	UUGCGGGAGAGGACAACAGAGU	1339-1360	22	pol
25	UUUGCGGGAGAGGACAACAGAG	1340-1361	22	pol
26	AUUUGCGGGAGAGGACAACAGA	1341-1362	22	pol
27	UAUUUGCGGGAGAGGACAACAG	1342-1363	22	pol

^a Secuencia de secuencia efectora basada en el objetivo de genoma de HBV de acuerdo con GenbankID U95551

^b posición dentro del genoma de HBV, basado en la secuencia de U95551 diana; secuencias efectoras son el complemento inverso de estas posiciones.

^c ORFs dirigidos: pol corresponde a la polimerasa; HBsAg se corresponde con el antígeno de superficie de HBV y X corresponde a la proteína X

60 **[0060]** Como se explica en la sección de antecedentes, ambas cadenas de un dsRNA tienen el potencial de ser la
 secuencia efectora. Sin embargo, hay evidencia de que las características particulares de una secuencia pueden
 favorecer una hebra para entrar en el RISC y la otra hebra a ser destruida. Hay evidencia de que la proteína
 Argonaut 2 (AGO2) del complejo RISC tiene una preferencia para las secuencias con un 5' A, y en menor medida en
 5' U. En secuencias de adición de ARN con un mayor contenido de AU en 5 regiones parecen cargarse
 65 preferentemente en complejos RISC, debido a un mecanismo que "detecta" estabilidad termodinámica a través de
 dúplex de ARN y favores que incorporan secuencias desde el extremo menos estable del dúplex. Estas preferencias

de secuencia se reflejan en las realizaciones preferidas, pero no son esenciales.

[0061] Por ejemplo, en una realización de este aspecto de la descripción, se proporciona un agente de interferencia de ARN dirigida por ADN (DdRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en un virus de la hepatitis B (HBV) de genes, comprendiendo el agente ddRNAi al menos:

una primera secuencia efectora de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de GAUUGACGAUAAGGGAGA (SEQ ID NO: 1); y

una primera secuencia de complemento efector.

[0062] La primera secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana.

[0063] Preferiblemente, la primera secuencia efectora es al menos 17 o más nucleótidos contiguos dentro de GAUUGACGAUAAGGGAGA (SEQ ID NO: 1).

[0064] Cuando la primera secuencia efectora tiene 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos diferentes a la SEQ ID NO: 1, las diferencias están preferiblemente presentes en los primeros y/o los últimos 5 nucleótidos, y al menos los 10 nucleótidos centrales son 100% complementarios a la transcripción predicha de una región del gen diana.

[0065] En realizaciones alternativas de la divulgación, el agente ddRNAi comprende una primera secuencia efectora de cualesquiera 10 o más, preferiblemente cualesquiera 17 o más, nucleótidos contiguos dentro de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27.

[0066] En realizaciones particularmente preferidas, el agente ddRNAi comprende una primera secuencia efectora de cualesquiera 10 o más, preferiblemente, cualesquiera 17 o más, nucleótidos contiguos dentro de las secuencias capaces de inhibir la expresión de una región del gen diana por al menos 70%. Preferiblemente, en esta realización, el primer efector se selecciona entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23.

[0067] La primera secuencia de efector puede comprender una secuencia seleccionada de cualquier 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27, o alternativamente, cada secuencia efectora puede ser una variante de la SEQ ID NOS: 1-27, que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 variaciones de nucleótidos. Aún en otra forma de realización, cada secuencia efectora puede constar de 22 nucleótidos, de los cuales 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos son nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27.

Múltiples agentes ddRNAi dirigidos

[0068] En una realización preferida de la descripción y en los agentes ddRNAi de la invención, el agente ddRNAi comprende dos o más secuencias efectoras para permitir la orientación de más de una secuencia diana del genoma de HBV. Las múltiples secuencias diana pueden estar en la misma región del gen de HBV. Por ejemplo, una región de 17 a 30 nucleótidos que tiene la variación natural en la secuencia entre cepas, o polimorfismos de nucleótido único que han surgido para conferir resistencia a las drogas. Alternativamente, las secuencias diana pueden estar en diferentes regiones del gen de un gen diana.

[0069] Para proporcionar una mayor especificidad, el agente ddRNAi comprende las siguientes (en ningún orden particular):

- una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
- una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
- una primera secuencia de complemento efector; y
- una segunda secuencia de complemento efector;

[0070] En las realizaciones de la invención como se reivindica el agente ddRNAi comprende, en una dirección 5' a 3':

- (i) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos en longitud; una segunda secuencia de complemento efector; y una primera

secuencia de complemento efector; o

(ii) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una primera secuencia de complemento efector; una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; y una segunda secuencia de complemento efector.

5
10
[0071] Las secuencias efectoras primera y segunda de un agente ddRNAi de dianas múltiples forman una región de doble hebra con sus respectivos complementos efectores. Preferiblemente, las secuencias efectoras primera y segunda son 17 a 30 nucleótidos de longitud. Más preferiblemente, las secuencias efectoras primera y segunda están ambas seleccionadas de cualesquiera 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 1 anterior, o son secuencias que tienen una diferencia de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de aquellas secuencias enumeradas en la Tabla 1.

15
[0072] En una realización, la primera secuencia efectora se selecciona de cualesquiera 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de uno cualquiera del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27, y la segunda secuencia efectora se selecciona de cualesquiera 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de uno cualquiera del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27. La primera y segunda secuencia de efector pueden ser la misma secuencia o, alternativamente, pueden ser diferentes secuencias.

20
25
[0073] La primera y segunda secuencia de efector puede comprender cada uno una secuencia seleccionada de cualquier 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27, o alternativamente, cada secuencia efectora también puede ser una variante de la SEQ ID NOS: 1-27, que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 variaciones de nucleótidos. En aún una realización adicional, cada secuencia efectora puede constar de 22 nucleótidos, de los cuales 17, 18, 19, 20, 21 o los 22 nucleótidos son nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27. Cuando hay dos o más secuencias efectoras, pueden representar una combinación de los 3 tipos descritos anteriormente.

30
[0074] En realizaciones particularmente preferidas, la primera y segunda secuencia de efector comprende cualesquiera 10 o más, preferiblemente cualesquiera 17 o más, nucleótidos contiguos dentro de las secuencias capaces de inhibir la expresión de una región del gen diana por al menos 70%. Preferiblemente, en esta realización, cada secuencia efectora se selecciona entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23.

35
[0075] En las realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualesquiera 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

40
[0076] El uso de agentes ddRNAi con múltiples secuencias efectoras tiene la ventaja de limitar la aparición y dirigirse a mutantes de escape, que es un problema de muchas de las terapias anti-virales actuales. Un aspecto de la presente invención y la divulgación neutraliza mutantes de escape emergentes con un agente ddRNAi que contiene secuencias de ARNi basados en la secuencia genética del gen diana y adicionalmente secuencias de las mutaciones puntuales que se presentan para resistir tratamiento de RNAi.

45
[0077] Del mismo modo, los agentes ddRNAi con múltiples secuencias efectoras tienen la ventaja de ser capaces de dirigirse a una gama de secuencias encontradas en diferentes genotipos virales o cuasi especies, así como la ventaja de que los efectos aditivos o sinérgicos conseguidos con múltiples secuencias efectoras en oposición a secuencias efectoras individuales.

50
[0078] Como se mencionó anteriormente, sin embargo, las secuencias efectoras individuales pueden lograr la segmentación múltiple cuando la secuencia diana es común en 2 o más genes. VHB contiene una serie de marcos de lectura superpuestos, de manera que la orientación de una secuencia en las regiones superpuestas inhibirá la expresión de los genes que contienen esa secuencia.

Versión de horquilla larga

55
60
[0079] Cuando el agente ddRNAi contiene más de una secuencia efectora, y el agente ddRNAi se expresa como una sola hebra de ARN, que se plegará para formar diferentes estructuras dependiendo del orden de las secuencias efectoras y las secuencias complementarias a las secuencias efectoras. En una realización, se proporciona un agente de interferencia de ARN dirigida por ADN (DdRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en un virus de la hepatitis B (HBV) de genes, la que comprende agente ddRNAi, en una dirección 5' a 3', al menos:

65
una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
una segunda secuencia de complemento efector; y
una secuencia de complemento efector primera

en donde cada secuencia efectora es sustancialmente (es decir, al menos 85%) complementaria a la transcripción

predicha de una región del gen diana, y en donde al menos una de las secuencias efectoras comprende cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9. Esto resultará en un agente ddRNAi con una estructura como se muestra en la Figura 1A.
Véase también el documento WO2004/106517.

5 **[0080]** Alternativamente, al menos un efector, y preferiblemente ambas secuencias efectoras, son 100% complementarias a la transcripción predicha de una región del gen diana.

10 **[0081]** Preferentemente, las secuencias efectoras primera y segunda se seleccionan ambos del grupo que consiste de cualesquiera 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-27. Por ejemplo, en una forma de realización, se proporciona un agente dirigido por ADN de interferencia ARN (ddRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en un gen de virus de la hepatitis B (VHB), comprendiendo el agente ddRNAi, en una dirección 5' a 3', al menos:

15 una primera secuencia efectora de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de GAUUGACGAUAAGGGAGA (SEQ ID NO: 1);

20 una segunda secuencia efectora de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de UUGAAGUCCCAUCUGGAU (SEQ ID NO: 2) o GCCGGGCAACGGGGUAAAGGUUC (SEQ ID NO: 3);

una segunda secuencia de complemento efector; y

una primera secuencia de complemento efector.

25 **[0082]** Cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana.

30 **[0083]** Alternativamente, al menos un efector, y preferiblemente ambas secuencias efectoras, son 100% complementarias a la transcripción predicha de una región del gen diana.

35 **[0084]** En realizaciones particularmente preferidas, las secuencias efectoras primera y segunda comprenden cualesquiera 10 o más, preferiblemente, cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de las secuencias capaces de inhibir la expresión de una región del gen diana por al menos 70%. Preferiblemente, en esta realización, cada secuencia efectora se selecciona entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23.

[0085] En las realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualesquiera de 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

40 **[0086]** En aún otra realización, que es una realización donde el agente ddRNAi tiene 3 secuencias efectoras, se proporciona un agente dirigido por ADN de interferencia ARN (ddRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en un gen del virus de la hepatitis B (VHB), comprendiendo el agente ddRNAi, en un 5' a 3', al menos:

45 una primera secuencia efectora de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de GAUUGACGAUAAGGGAGA (SEQ ID NO: 1);

50 una segunda secuencia efectora de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de UUGAAGUCCCAUCUGGAU (SEQ ID NO: 2);

una tercera secuencia efectora de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de GCCGGGCAACGGGGUAAAGGUUC (SEQ ID NO: 3);

55 una tercera secuencia de complemento efector;

una segunda secuencia de complemento efector; y

una primera secuencia de complemento efector.

60 **[0087]** Cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana.

65 **[0088]** Alternativamente, al menos un efector, y, opcionalmente, 2 de los 3 o todos los 3 de los efectores, son 100% complementarios a la transcripción predicha de una región del gen diana.

[0089] En realizaciones particularmente preferidas, la primera, segunda y tercera secuencia de efector comprende

cualesquiera 10 o más, preferiblemente, cualesquiera 17 o más, nucleótidos contiguos dentro de las secuencias capaces de inhibir la expresión de una región del gen diana por al menos 70%. Preferiblemente, en esta realización, cada secuencia efectora se selecciona entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23.

5 **[0090]** En las realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualesquiera de 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

10 **[0091]** También se apreciará por la persona experta que el orden de efectores y complementos efectoras puede ser alterado, a condición de que una sola estructura de horquilla, de largo está formado por la hibridación de la secuencia efectora con su complemento efector para formar ARN de doble cadena. Por ejemplo, en un agente de secuencia ddRNAi 2 efector, las secuencias pueden estar dispuestas en los siguientes órdenes a modo de ejemplo 5' a 3':

- 15 • primer efector - segundo efector - segundo complemento efector - primer complemento efector;
- primer efector - segundo complemento efector - segundo efector - primer complemento efector;
- 20 • primer complemento efector - segundo complemento efector - segundo efector - primer efector;
- primer complemento efector - segundo efector - segundo complemento efector - primer efector.

25 **[0092]** En un agente de secuencia efectora ddRNAi 3, las secuencias pueden estar dispuestas en los siguientes órdenes ejemplares de 5' a 3':

- primer efector - segundo efector - tercer efector - tercer complemento efector - segundo complemento efector - primer complemento efector;
- 30 • primer efector - segundo efector del complemento - tercer efector - tercer complemento efector - segundo efector - primer complemento efector;
- primer efector - segundo efector - tercer complemento efector - tercer efector - segundo complemento efector - primer complemento efector
- 35 • primero complemento efector - segundo complemento efector - tercer complemento efector - tercer efector - segundo efector - primer complemento efector
- primero complemento efector - segundo complemento efector - tercer efector - tercer complemento efector - segundo efector - primer efector.

40 **[0093]** En todavía realizaciones adicionales, la primera secuencia de efector puede ser seleccionada de cualesquiera 10 o más y preferiblemente cualesquier 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27; la segunda secuencia efectora se puede seleccionar de cualesquiera 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27; la tercera secuencia efectora se puede seleccionar de cualesquiera 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27; y cualesquiera secuencias efectoras adicionales pueden ser seleccionadas de cualquier 10 o más y preferiblemente 17 o más cualesquiera nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27. Alternativamente, cada secuencia efectora también puede ser una variante de la SEQ ID NOS: 1-27, que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 variaciones de nucleótidos. Preferiblemente, las diferencias están presentes en los primeros y/o los últimos 5 nucleótidos, y al menos el centro de 11-12 nucleótidos son 100% complementarios a la transcripción predicha de una región del gen diana. Tales realizaciones son particularmente útiles para la orientación a HBV mutantes de escape, así como diferentes genotipos virales o cuasi especies. En realizaciones de la invención, el agente ddRNAi comprende en una dirección 5' a 3':

- 55 (i) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una segunda secuencia de complemento efector; y una primera secuencia de complemento efector; o
- 60 (ii) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una primera secuencia de complemento efector; una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; y una segunda secuencia de complemento efector;

65 en donde cada secuencia efectora es al menos 85% complementaria a la transcripción predicha de una secuencia diana, y en donde al menos una de las secuencias efectoras comprende cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos del conjunto de secuencias expuestas en SEQ ID NO: 9. La primera, segunda y tercera secuencia

efectora pueden comprender cada uno una secuencia seleccionada de cualquier 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27, o alternativamente, cada secuencia efectora también puede ser una variante de la SEQ ID NOS: 1-27, que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 variaciones de nucleótidos en todavía una realización adicional, cada secuencia efectora puede constar de 22 nucleótidos, de los cuales 17, 18, 19, 20, 21 o todos los 22 nucleótidos son nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27. Cuando haya múltiples secuencias efectoras, pueden representar una combinación de los 3 tipos descritos anteriormente. en realizaciones de la invención, el agente ddRNAi comprende en una dirección 5' a 3':

5
10 (i) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una segunda secuencia de complemento efector; y una primera secuencia de complemento efector; o

15 (ii) una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; una primera secuencia de complemento efector; una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; y una segunda secuencia de complemento efector;

20 en donde cada secuencia efectora es al menos 85% complementarias a la transcripción predicha de una secuencia diana, y en donde al menos una de las secuencias efectoras comprende cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos del conjunto de secuencias expuestas en SEQ ID NO: 9.

Versión de horquilla múltiple

25 **[0094]** En una realización alternativa, se proporciona un agente dirigido por ADN de interferencia ARN (ddRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en un gen de virus de la hepatitis B (VHB), el agente ddRNAi comprende, en una dirección 5' a 3', al menos:

30 una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
un primer complemento efector;
una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; y
un primer complemento efector

35 en donde cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana.

[0095] Alternativamente, al menos un efector, y preferiblemente ambas secuencias efectoras, es 100% complementario a la transcripción predicha de una región del gen diana.

40 **[0096]** Esto resultará en un agente ddRNAi con una estructura como se muestra en la Figura 1B o C, dependiendo del tipo de casete de expresión que utiliza para expresarlo (véase más adelante en la especificación). Véase también el documento WO2005/087926 y WO2006/084209.

45 **[0097]** Preferentemente, las secuencias efectoras primera y segunda se seleccionan ambos de cualesquiera 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27. Por ejemplo, en una forma de realización, se proporciona un agente dirigido por ADN de interferencia ARN (ddRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en un virus de la hepatitis B (HBV) gen, el agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', al menos:

50 una primera secuencia efectora de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de GAUUGACGAUAAGGGAGA (SEQ ID NO: 1);

una primera secuencia de complemento efector;

55 una segunda secuencia de efector cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de UUGAAGUCCCAUCUGGAU (SEQ ID NO: 2) o GCCGGGCAACGGGGUAAAGGUUC (SEQ ID NO: 3); y

una segunda secuencia de complemento efector.

60 **[0098]** Cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana.

[0099] Alternativamente, al menos un efector, y preferiblemente ambas secuencias efectoras, es 100% complementario a la transcripción predicha de una región del gen diana.

65 **[0100]** En realizaciones particularmente preferidas, la primera y segunda secuencia de efector comprende cualesquiera 10 o más, preferiblemente cualesquiera 17 o más, nucleótidos contiguos dentro de las secuencias

capaces de inhibir la expresión de una región del gen diana por al menos 70%. Preferiblemente, en esta realización, cada secuencia efectora se selecciona entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23.

5 **[0101]** En las realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualesquiera 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

10 **[0102]** En una realización en la que el agente ddRNAi tiene 3 secuencias efectoras, se proporciona un agente ARN dirigido por interferencia ADN (ddRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en un virus de la hepatitis B de genes (HBV), comprendiendo el agente ddRNAi, en una dirección 5' a 3', al menos:

una primera secuencia efectora de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de GAUUGACGAUAAGGGAGA (SEQ ID NO: 1);

15 una primera secuencia de complemento efector;

una segunda secuencia efectora de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de UUGAAGUCCCAUCUGGAU (SEQ ID NO: 2);

20 una segunda secuencia de complemento efector;

una tercera secuencia efectora de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de GCCGGCAACGGGGUAAAGGUUC (SEQ ID NO: 3); y

25 una tercera secuencia de complemento efector.

[0103] Cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana.

30 **[0104]** Alternativamente, al menos un efector, y, opcionalmente, 2 de los 3 o todos los 3 de los efectores, es 100% complementario a la transcripción predicha de una región del gen diana.

35 **[0105]** En realizaciones particularmente preferidas, la primera, segunda y tercera secuencia de efector comprende cualesquiera 10 o más, preferiblemente, cualesquiera 17 o más, nucleótidos contiguos dentro de las secuencias capaces de inhibir la expresión de una región del gen diana por al menos 70%. Preferiblemente, en esta realización, cada secuencia efectora se selecciona entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23.

40 **[0106]** En las realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualesquiera de 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

45 **[0107]** En todavía realizaciones adicionales, la primera secuencia de efector puede ser cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27; la segunda secuencia de efector puede ser cualquier 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27; la tercera secuencia efectora puede ser cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27; y cualesquiera secuencias efectoras adicionales pueden ser cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27. Preferiblemente, cada secuencia efectora es al menos 17 nucleótidos contiguos.

50 **[0108]** Cada secuencia efectora también puede ser una variante de la SEQ ID NOS: 1-27, que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 variaciones de nucleótidos. Preferiblemente, las diferencias están presentes en los primeros y/o los últimos 5 nucleótidos, y al menos los 10-12 nucleótidos centrales son 100% complementarios a la transcripción predicha de una región del gen diana. Tales realizaciones son particularmente útiles para dirigir HBV mutantes de escape, así como diferentes genotipos virales o cuasi especies. En las realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9, y las secuencias efectoras primera y segunda son al menos 17 nucleótidos de longitud.

55 **[0109]** La primera, segunda y tercera secuencia efectora puede comprender cada una una secuencia seleccionada de cualesquiera 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27, o alternativamente, cada secuencia efectora también puede ser una variante de la SEQ ID NOS: 1-27, que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 variaciones de nucleótidos. Aún en una mayor forma de realización, cada secuencia efectora puede constar de 22 nucleótidos, de los cuales 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos son nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27. En las realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuestos en la SEQ ID NO: 9. Cuando haya múltiples secuencias efectoras, pueden representar una

combinación de los 3 tipos descritos arriba. Además, en la estructura de horquilla larga o la estructura de horquilla múltiple el agente ddRNAi puede incluir secuencias efectoras adicionales y las correspondientes secuencias complementarias de acuerdo con una de las siguientes fórmulas:

5 Horquilla larga:
 • [Secuencia efectora]₁₋₁₀ [Secuencia de complemento efector]₁₋₁₀

10 Horquilla múltiple
 • [Secuencia de efector-secuencia de complemento efector]₁₋₁₀

15 **[0110]** Preferiblemente, en la fórmula de horquilla larga, el número de secuencias efectoras es igual al número de secuencias de complemento efector. Típicamente, hay 2, 3, 4 o 5 secuencias efectoras, y por consiguiente, 2, 3, 4 o 5 secuencias de complemento efector, respectivamente.

20 **[0111]** Cuando el agente ddRNAi contiene más de una secuencia efectora, las secuencias efectoras pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, si un agente ddRNAi tiene 3 secuencias efectoras, 2 secuencias efectoras pueden tener la misma secuencia, mientras que 1 es diferente. Alternativamente, todas las 3 secuencias efectoras pueden ser diferentes. Preferiblemente, las secuencias efectoras son cualesquiera 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27, o variantes de las secuencias de SEQ ID NOS: 1-27 que tienen 1, 2, 3, 4 o 5 variaciones de nucleótidos. Preferiblemente, las diferencias están presentes en los primeros y/o los últimos 5 nucleótidos, y al menos los 10-12 nucleótidos centrales son 100% complementarias a la transcripción predicha de una región del gen diana.

25 **[0112]** Cuando el objetivo es una única región de una secuencia diana que tiene variantes naturales (por ejemplo, diferentes genotipos o cuasi especies), mutantes de escape, o polimorfismos de nucleótido único (SNP), es preferible que al menos una secuencia efectora se selecciona de entre cualesquier 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27, mientras que otras secuencias efectoras son variantes de esa secuencia elegida. Por ejemplo, una primera secuencia de efector puede comprender 20 nucleótidos de SEQ ID NO: 1; la segunda secuencia efectora, por lo tanto, debe ser una variante de la SEQ ID NO: 1.

30 **[0113]** En todos los casos, en las realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualesquier 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9, y las secuencias efectoras primera y segunda son por lo menos 17 nucleótidos de longitud.

Estructuras de horquilla

40 **[0114]** En las realizaciones anteriores, la secuencia efectora se hibrida con su secuencia efectora complementaria correspondiente para formar una estructura de horquilla. Al final de la horquilla, dos o más nucleótidos no unidos forman la 'bisagra' o 'bucle'. En una realización, los nucleótidos no unidos son parte de la secuencia efectora y la secuencia de complemento efector, de tal manera que sólo una parte de los al menos 17 nucleótidos de la secuencia efectora formará un dúplex con su correspondiente secuencia de complemento efector. Por ejemplo, cuando la secuencia efectora y su complemento son ambos 22 nucleótidos de largo, 19 de los nucleótidos puede emparejarse para formar una región de doble cadena, dejando un total de 6 nucleótidos (3 de cada hebra) para formar un único bucle de cadena y unirse a la secuencia efectora y su secuencia de complemento efector.

50 **[0115]** En una realización alternativa, una secuencia adicional que no es complementaria a sí misma, la secuencia diana, la secuencia efectora o la secuencia complementaria a la secuencia efectora pueden ser incluidas en la ddRNAi. Como tal, en otra realización más de la invención, el agente ddRNAi incluye además una secuencia de 2 a 100 nucleótidos desapareados capaces de formar un bucle, más preferiblemente, de 2 a 10 nucleótidos no apareados. En una realización preferida, el bucle incluye la secuencia de nucleótidos AA, UU, UUA, UUAG, UUACAA, CAAGAGA o N1AAN2, Donde N1 y N2 son cualesquiera de C, G, U y A y pueden ser iguales o diferentes.

55 **[0116]** Puede haber uno o más bucles en función de la estructura del agente ddRNAi. Cuando un agente ddRNAi tiene una larga estructura de horquilla basada en fórmula [secuencia efectora]₁₋₁₀ [Secuencia de complemento efector]₁₋₁₀ secuencia no auto-complementaria adicional para dar lugar a una única estructura de bucle está contenida entre la última secuencia efectora y la secuencia de complemento efector de esa última secuencia efectora, tal como se ilustra en la Figura 1D. En esta realización, por lo tanto, se proporciona un agente dirigido por ADN de interferencia ARN (ddRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias dianas en un virus del gen de hepatitis B (VHB), el agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', al menos:

65 una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
 una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
 una secuencia de 2 a 100 nucleótidos no auto-complementaria;

una segunda secuencia de complemento efector; y
una primera secuencia de complemento efector

en donde cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana. En todas las realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualesquiera de 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

[0117] Cuando el agente ddRNAi tiene una estructura de horquilla múltiple basada en fórmula [secuencia efectora-secuencia de complemento efector]¹⁻¹⁰ secuencia adicional no auto-complementaria está contenida entre cada secuencia efectora y su secuencia complementaria para dar lugar a una estructura de bucle, como se ilustra en la Figura 1E y F (dependiendo del tipo de casete de expresión que utiliza para expresarlo (véase más adelante en la especificación). En esta realización, se proporciona un agente de ADN dirigido a ARN de interferencia (ddRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en un gen de virus Hepatitis B (VHB), el agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', al menos:

una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
una secuencia de 2 a 100 nucleótidos no auto-complementaria;
una primera secuencia de complemento efector;
una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
una secuencia de 2 a 100 nucleótidos no auto-complementaria; y
una segunda secuencia de complemento efector

en donde cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana.

[0118] En esta forma de realización donde hay más de dos secuencias efectoras y dos del complemento efector, y, por lo tanto, más de dos estructuras de horquilla, la longitud de la secuencia adicional no auto-complementaria que forma cada estructura de bucle no tiene que ser igual. Por ejemplo, una estructura de bucle puede tener 5 nucleótidos, mientras que otra estructura de bucle puede tener 9 nucleótidos. En todas las realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

2 agentes hebra ddRNAi

[0119] Como se apreciará por un experto en la técnica, no es necesario que todo el agente ddRNAi se exprese como una secuencia. Por ejemplo, también se describe que la primera secuencia de efector puede ser generada (por ejemplo, transcribirse por una secuencia de ADN), y la primera secuencia de complemento efector puede generarse (por ejemplo, transcribirse a partir de una secuencia separada de ADN). Opcionalmente, una secuencia de bucle puede estar unida a cualquiera de transcripción o una parte del bucle unido al 3' final de una transcripción y el extremo 5' de la otra transcripción. Dentro de la célula, las dos transcripciones forman entonces el agente ddRNAi al hibridarse a través de recocido entre la secuencia de efector/es y su complemento/s.

Agentes ddRNAi expresados in vitro o agentes siRNA sintetizados químicamente

[0120] Si bien se prevé que el tratamiento eficaz de la infección crónica por HBV requerirá que los agentes ddRNAi se expresen in vivo de constructos ddRNAi (como se describe a continuación), puede haber circunstancias en las que es deseable administrar agentes ddRNAi que se expresan *in vitro* o administrar siRNAs que se sintetizan químicamente, funcionando de ese modo más como una terapia transitoria. La infección por VHB aguda, por ejemplo, se puede beneficiar de un tratamiento a corto plazo con siRNAs que no se integran y se replican en las células.

[0121] Por tanto, los agentes ddRNAi de la invención pueden ser expresados *in vitro* y luego administrados a las células diana. Alternativamente, siRNAs pueden sintetizarse químicamente y luego administrarse a las células diana. A la luz de esto, un pequeño agente de interferencia de ARNi (agente de siRNA) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en un gen de virus de la hepatitis B (HBV), comprendiendo el siRNA

una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; y
una primera secuencia de complemento efector;

en donde se describe la secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana.

[0122] De manera similar a los agentes ddRNAi descritos anteriormente, el agente de siRNA puede también incluir más de una secuencia efectora para la orientación múltiple. Las secuencias efectoras se dirigen preferentemente a un gen de la polimerasa del VHB, y más preferiblemente, se seleccionan de cualquiera 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27.

[0123] Es posible considerable flexibilidad en el diseño de siRNAs. Típicamente siRNAs consisten en moléculas de ARNbc con 5'-fosfato y los residuos 3'-hidroxilo, longitudes de hebra pueden variar de 21-29 nucleótidos y pueden opcionalmente estar diseñadas para incluir 2 nucleótidos 3' salientes. En algunas realizaciones cada hebra puede sintetizarse como N19-27TT (donde TT puede ser desoxirribonucleótidos). siRNAs pueden ser fácilmente diseñados en base a las regiones de SEQ ID NOS: 1-27 como se describe

anteriormente y se pueden utilizar terapéuticamente como secuencias individuales o en cualquier combinación. Alternativamente agentes siRNA pueden consistir de moléculas de ARN individuales que contienen secuencias efectoras y el complemento efector similares o idénticas a las expresadas a partir de casetes de expresión de ddRNAi. Estas secuencias se pueden basar en SEQ ID NOS: 1-27 y se pueden utilizar terapéuticamente como secuencias individuales o en cualquier combinación. Los siRNAs pueden ser sintetizados químicamente con fosoramiditas de ribonucleósido apropiadamente protegidas y un sintetizador convencional y por lo tanto están ampliamente disponibles comercialmente y capaces de ser diseñadas y sintetizadas de acuerdo con métodos rutinarios en la técnica. En realizaciones preferidas, los siRNAs tienen las secuencias de cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de una o más de las SEQ ID NOS: 1-27.

[0124] Un número de reactivos de transfección se han utilizado para la entrega de siRNA en diferentes líneas celulares. Lipofectamina 2000 y Oligofectamina se utilizan habitualmente para la entrega de siRNA. siRNAs desnudos también se han entregado por métodos de transfección hidrodinámicos. Otros métodos de entrega serían conocidos por la persona experta.

Casetes de expresión del agente ddRNAi

[0125] Como se ha explicado anteriormente, los agentes ddRNAi de la invención y como se describe se expresan a partir de expresión de casetes de ADN insertados en cualquier vector adecuado o constructo ddRNAi. Casetes de expresión de ddRNAi comprenden (sin orden particular):

- una o más secuencias promotoras
- secuencias de uno o más ADN que codifican para una o más secuencias efectoras
- una o más secuencias de ADN que codifican para una o más secuencias de complemento efector;
- una o más secuencias terminadoras y opcionalmente
- secuencias de uno o más ADN que codifican para secuencias de bucle
- una o más secuencias potenciadoras.

[0126] En una realización descrita, se proporciona un casete de expresión de interferencia ARN (ddRNAi) dirigido por ADN para expresar un agente ddRNAi, donde el agente ddRNAi inhibe la expresión de una o más secuencias diana en genes de virus de la hepatitis B (HBV), comprendiendo el casete de expresión ddRNAi, en una dirección 5' a 3':

una secuencia promotora

una secuencia de ADN que codifica para una primera secuencia de efector

opcionalmente una secuencia que codifica para la secuencia capaz de formar un bucle

una secuencia de ADN que codifica para una primera secuencia de complemento efector; y

una secuencia terminadora.

[0127] La secuencia de ADN que codifica para la primera secuencia efectora es preferiblemente un ADN que codifica para 10 o más, preferiblemente 17 o más, nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de una cualquiera de SEQ ID NOS: 1-27. En particular

una forma de realización preferida, la primera secuencia de efector comprende cualesquiera 10 o más, preferiblemente cualesquiera 17 o más, nucleótidos contiguos dentro de las secuencias capaces de inhibir la expresión de una región del gen diana en por lo menos 70%. Preferiblemente, en esta forma de realización, la primera secuencia efectora se selecciona entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23.

[0128] Alternativamente, como se describe anteriormente en relación con el propio agente ddRNAi, la secuencia que codifica para la secuencia efectora puede codificar una secuencia efectora que varía por 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de SEQ ID NOS: 1-27 sin que afecta a la capacidad de la secuencia efectora codificada a par de bases con la

secuencia diana e inhibir la expresión de la secuencia diana. En realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualesquier 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

5 **[0129]** La persona experta apreciará que una secuencia de ADN que codifica cualquier secuencia de ARN dada es la misma secuencia que el ARN, pero que tiene las bases de timina (T) en lugar de bases de uracilo (U).

[0130] Los casetes de expresión ddRNAi de la divulgación y la invención de codificación de agentes ddRNAi que tienen más de una secuencia efectora en una estructura de horquilla larga comprenden, en una dirección 5' a 3':

- 10 una secuencia promotora;
- una secuencia de ADN que codifica para una primera secuencia de efector;
- 15 una secuencia de ADN que codifica para una segunda secuencia de efector;
- opcionalmente una secuencia que codifica para la secuencia capaz de formar un bucle;
- una secuencia de ADN que codifica para una segunda secuencia de complemento efector;
- 20 una secuencia de ADN que codifica para una primera secuencia de complemento efector; y
- una secuencia terminadora.

25 **[0131]** Preferiblemente, las secuencias de ADN codifican las secuencias de efector primera y segunda seleccionadas de cualesquiera 10 o más y preferiblemente, cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27. Preferiblemente, la primera y segunda secuencia efectora se selecciona entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23. Alternativamente, las secuencias de ADN codifican para una secuencia efectora que varía de lad SEQ ID NOS: 30 1-27 por 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos sin afectar a la capacidad de la secuencia efectora codificados a pares de bases con la secuencia diana e inhibir la expresión de la secuencia diana. En realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualquiera de los 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9, y las secuencias efectoras primera y segunda son al menos 17 nucleótidos de longitud.

35 **[0132]** Cuando el agente ddRNAi tiene más de una secuencia efectora y una estructura de horquilla múltiple basada en la fórmula [Secuencia de efector-secuencia de complemento efector]¹⁻¹⁰ expresión de cada par [secuencia de efector-secuencia de complemento efector] puede ser controlada por un único promotor, o, alternativamente, por un promotor separado. Cuando se contemplan promotores separados, el casete de expresión ddRNAi comprende, en una dirección 5' a 3':

- 40 una secuencia promotora
- una secuencia de ADN que codifica para una primera secuencia de efector
- 45 una secuencia de ADN que codifica para una primera secuencia de complemento efector;
- opcionalmente, una secuencia terminadora;
- una secuencia promotora;
- 50 una secuencia de ADN que codifica para una segunda secuencia de efector;
- una secuencia de ADN que codifica para una segunda secuencia de complemento efector; y
- 55 una secuencia terminadora.

[0133] Cuando se contempla un único promotor, el casete de expresión ddRNAi comprende, en una dirección 5' a 3':

- 60 una secuencia promotora
- una secuencia de ADN que codifica para una primera secuencia de efector
- una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de complemento efector a la primera secuencia efectora;
- 65 una secuencia de ADN que codifica para una segunda secuencia de efector;

una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de complemento efector a la segunda secuencia efectora; y

una secuencia terminadora.

[0134] De manera similar a las realizaciones anteriores, las secuencias de ADN codifican preferiblemente las secuencias de efector primera y segunda seleccionadas de cualesquier 10 o más y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27, o. secuencias efectoras que varían en secuencia de las SEQ ID NOS: 1-27 por 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos. Preferiblemente, la primera y segunda secuencia efectora se selecciona entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23.

[0135] En realizaciones de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende cualesquiera de 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9, y las secuencias efectoras primera y segunda son al menos 17 nucleótidos de longitud.

[0136] El casete de expresión de ddRNAi puede alternativamente describirse por referencia a la longitud total del agente de expresado ddRNAi, que es un producto de la longitud total de la secuencia entre el promotor y el terminador. Por ejemplo, cuando la longitud de la secuencia efectora en un único efector ddRNAi consta de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos, el casete de expresión ddRNAi tendrán una longitud de 34 a 60 nucleótidos entre el promotor y el terminador. Esta longitud puede incluir además de 2 a 100 nucleótidos de "bucle" o una secuencia "bisagra", dando una longitud de entre 36 a 160 nucleótidos. Para los agentes ddRNAi que tienen múltiples secuencias efectoras, donde cada secuencia efectora consiste en 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos, se incrementa la longitud total proporcionalmente.

[0137] Una forma útil de diseñar casetes de expresión de ddRNAi de la invención es asumir cortes Dicer cada 22 nucleótidos (también conocidos como phasing 22nt), y procesos de la base de la shRNA. Por lo tanto, las secuencias de ADN que codifican secuencias efectoras pueden diseñarse para codificar cualesquier 10 o más, y preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-27, junto con espaciadores apropiados y otros requisitos de secuencia para el promotor apropiado. Por ejemplo, algunas de las secuencias enumeradas en las SEQ ID NOS: 1-27 son mayores que 22 nucleótidos; en estos casos solamente una porción de la secuencia debe ser unida operativamente a un promotor.

[0138] Agentes dirigidos a diferentes sitios de mRNA son apropiados para la construcción de shRNA, ya que pueden evitar la influencia de las estructuras secundarias de ARNm, y así realizar sus funciones independientemente.

[0139] Cuando se utiliza un promotor U6, es preferible que la secuencia de ADN unida operativamente al promotor se inicia con una base guanina (G); cuando se utiliza un promotor H1, es preferible que la secuencia de ADN unida operativamente al promotor comienza con una base de adenina (A). Por tanto, la secuencia efectora de codificación puede ser modificada en consecuencia. Para algunas secuencias de SEQ ID NOS: 1-27, secuencias efectoras son más cortas que 22nts; en estos casos es preferible incluir secuencias de HBV adyacentes a los sitios diana de HBV. Esto serviría para maximizar la homología de secuencias efectoras al VHB mRNAs y también podría permitir la inclusión de residuos de A o G para permitir la iniciación de la transcripción eficiente de los promotores U6 o H1 como se describe anteriormente. Por otra parte, para la transcripción de Estados Unidos en particular, la secuencia efectora es deseablemente colocada 3' del bucle para evitar la 5' G necesaria para la transcripción U6 eficiente.

[0140] En algunos casos, puede ser deseable evitar la secuencia de ADN TTTT dentro de efector, complemento efector o secuencias de bucle ya que estos pueden actuar como terminadores de la transcripción en las construcciones de expresión que utilizan promotores Pol III tales como U6 o H1. El diseño shRNA también debe tomar en cuenta que se espera que la terminación U6 añadida un UU al extremo 3' a la shRNA. En el diseño de ARN de horquilla larga, a veces es ventajoso modificar la elección precisa de secuencias efectoras (ya sea el uso de secuencias de, o adyacentes a la SEQ ID NOS: 1-27) para maximizar la probabilidad de que secuencias efectoras Dicer procesadas incluyan un 5'U o A, alentando de este modo la incorporación en AGO2.

[0141] La elección de si se controla la expresión de cada par [secuencia efectora-secuencia de complemento efector] depende de una serie de factores. Un único promotor puede ser utilizado para minimizar la interferencia entre promotores. Un constructo ddRNAi ; con sólo un único promotor es también más pequeño en tamaño, que puede ser importante en algunos casos para la estabilidad de la construcción, tanto durante la producción (por ejemplo, la replicación en *E. coli*) como la entrega. Además, el uso de un único promotor evita la posibilidad de cualquier recombinación homóloga entre promotores.

[0142] En circunstancias donde se requiere un grado de regulación de la expresión de cada secuencia o complemento efector, es ventajoso diseñar un constructo de ddRNAi que tenga múltiples promotores, por lo que la expresión de cada par de [secuencia efector - secuencia complementaria efector] se controla mediante un promotor independiente. En circunstancias donde las secuencias efectoras son de una secuencia diferente, la naturaleza de la

secuencia puede significar que una secuencia se expresa a niveles de expresión más altos. Cuando se desea garantizar niveles de expresión más iguales de cada secuencia de efector, la secuencia de efector más expresada puede emparejarse con un promotor más débil y viceversa. Además, se puede lograr una expresión más eficiente ya que la longitud de cualquier secuencia a transcribir es más corta. Cuando se usan múltiples promotores, es preferible que no todos los promotores sean iguales para minimizar el riesgo de cualquier recombinación homóloga entre ellos. En el caso de 2 promotores, cada uno es preferiblemente diferente. En el caso de 3 promotores, al menos 2 y opcionalmente los 3 son diferentes entre sí.

[0143] La secuencia de ADN que codifica la secuencia efectora está unido operativamente a la secuencia promotora. Una secuencia está "unida operativamente" a otra secuencia de nucleótidos cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, si una secuencia de codificación está unida operativamente a una secuencia promotora, esto generalmente significa que el promotor promueve la transcripción de la secuencia de codificación. Operativamente enlazado significa que las secuencias de ADN que se enlazan son típicamente contiguas y, cuando sea necesario para unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en el marco de lectura. Sin embargo, dado que los potenciadores pueden funcionar cuando están separados del promotor por varias kilobases y las secuencias intrónicas pueden tener una longitud variable, algunas secuencias de nucleótidos pueden estar operativamente unidas pero no son contiguas.

[0144] Un "promotor" o "secuencia promotora" o "elemento promotor" es generalmente una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de un polinucleótido o polipéptido secuencia codificante tal como ARNm o cualquier tipo de ARN transcrito por cualquier clase de cualquier ARN polimerasa. El promotor y el terminador pueden tomarse de diferentes genes, pero típicamente están emparejados entre sí; es decir, las secuencias o elementos del promotor y del terminador se toman del mismo gen en el que ocurren naturalmente. Los promotores también pueden o no modificarse utilizando técnicas moleculares, o de otro modo, por ejemplo, mediante la mutación de elementos reguladores tales como potenciadores, para alcanzar niveles más altos o más bajos de transcripción.

[0145] El término "constitutivo" cuando se hace en referencia a un promotor significa que el promotor es capaz de dirigir la transcripción de una secuencia de ácido nucleico unida operativamente en presencia o ausencia de un estímulo específico (por ejemplo, choque térmico, sustancias químicas, luz, etc.).

[0146] Típicamente, los promotores constitutivos son capaces de dirigir la expresión de una secuencia codificante en sustancialmente cualquier célula y cualquier tejido. Los promotores utilizados en los casetes de expresión para transcribir los agentes de ddRNAi son preferiblemente promotores constitutivos, tales como los promotores para los genes de ubiquitina, CMV, CMV^- actina, histona H4, EF-1alfa o pgk cuya expresión está controlada por la ARN polimerasa II que se une al promotor, o elementos promotores que están unidos por la ARN polimerasa I. En otras realizaciones, se emplea un promotor Pol II tal como CMV, SV40, hAAT, U1, U1^- actina o un promotor híbrido Pol II. En otras realizaciones, se utilizan elementos promotores unidos por la ARN polimerasa III, como los promotores U6 (U6-1, U6-8, U6-9, por ejemplo), el promotor H1, el promotor 7SL, los promotores Y humanos (hY1, hY3, hY4 (ver Maraia, et al., Nucleic Acids Res 22 (15): 3045-52 (1994)) y hY5 (ver Maraia, et al., Nucleic Acids Res 24 (18): 3552-59 (1994)), el promotor MRP-7-2 humano, el promotor VA1 del adenovirus, los promotores del ARNt humano, los promotores del ARN ribosomal 5S, así como los híbridos funcionales y las combinaciones de cualquiera de estos promotores. También se pueden utilizar variantes de estos promotores, en donde el promotor se modifica para disminuir o aumentar su actividad. Por ejemplo, si un promotor fuerte causa demasiada expresión de la secuencia operativamente vinculada a él, puede modificarse para disminuir su actividad.

[0147] Cuando se usa un promotor U6, es preferible que la secuencia de ADN unida operativamente al promotor comience con una base de guanina (G); cuando se usa un promotor H1, es preferible que la secuencia de ADN unida operativamente al promotor comience con una base de adenina (A). Las secuencias de los ácidos nucleicos pueden por lo tanto favorecer el uso de un promotor sobre otro.

[0148] Como alternativa, en algunas realizaciones, puede ser óptimo seleccionar promotores que permitan la expresión inducible de los múltiples agentes de ddRNAi expresados a partir de la construcción de ddRNAi. Se conocen en la técnica varios sistemas para la expresión inducible que usan dichos promotores, que incluyen, entre otros, el sistema sensible a la tetraciclina y el sistema represor-operador lac (ver la publicación WO 03/022052 A1 y la publicación de patente de EE.UU. 2002/0162126 A1), el sistema regulado por ecdisona, o los promotores regulados por glucocorticoides, progestinas, estrógenos, RU-486, esteroides, hormonas tiroideas, AMP cíclicas, citoquinas, la familia de reguladores del calciferol o el promotor de la metalotioneína (regulado por metales inorgánicos).

[0149] Los promotores útiles en algunas realizaciones de la presente invención pueden ser específicos de tejido o específicos de célula. El término "específico del tejido", como se aplica a un promotor, se refiere a un promotor que es capaz de dirigir la expresión selectiva de una secuencia de nucleótidos de interés para un tipo específico de tejido en la ausencia relativa de expresión de la misma secuencia de nucleótidos de interés en un tipo diferente de tejido (por ejemplo, el cerebro). El término "específico de la célula" tal como se aplica a un promotor se refiere a un promotor que es capaz de dirigir la expresión selectiva de una secuencia de nucleótidos de interés en un tipo

específico de célula en la ausencia relativa de expresión de la misma secuencia de nucleótidos de interés en una Diferentes tipos de células dentro del mismo tejido. El término "específico de la célula" cuando se aplica a un promotor también significa un promotor capaz de promover la expresión selectiva de una secuencia de nucleótidos de interés en una región dentro de un solo tejido. Alternativamente, los promotores pueden ser constitutivos o regulables. Además, los promotores pueden ser modificados para que posean diferentes especificidades.

[0150] En el caso de la infección por VHB, promotores específicos de hígado pueden ser utilizados. Ejemplos de promotores específicos de hígado son el promotor alfa de antitripsina alfa (hAAT), la apolipoproteína H (ApoH) y el promotor de acetil transferasa de lecitina y colesterol (LCAT). Alternativamente, se puede utilizar la transtiretina o el promotor TTR. El promotor TTR se deriva del gen de prealbúmina de ratón y también se conoce como prealbúmina. El promotor de TTR de longitud completa normalmente controla la expresión de la proteína de unión a la tiroxina sérica, que es producida por los hepatocitos y por el epitelio del plexo coroideo en adultos. En una realización, un promotor de TTR preferido es un promotor de TTR en el que la región que controla la expresión del plexo coroideo se elimina, pero retiene las regiones que dirigen la expresión específica del hígado. Véanse, por ejemplo, los documentos WO2007/120533 y US20060189561.

[0151] Como se señaló anteriormente, elementos potenciadores se incluyen opcionalmente en las construcciones ddRNAi de la invención. Un elemento potenciador preferido es ApoE. El elemento potenciador ApoE consta de aproximadamente 155 pb derivados de la apolipoproteína E (ApoE). ApoE media la unión, la internalización y el catabolismo de las partículas de lipoproteínas y es un ligando para el receptor de lipoproteínas de baja densidad (ApoB/E) y para el receptor ApoE de los tejidos hepáticos. El potenciador genético asociado con el gen ApoE es un elemento de control eucariota que puede aumentar la transcripción de un ácido nucleico específicamente en el hígado. El potenciador de ApoE puede ubicarse hasta 2000 nucleótidos corriente arriba o corriente abajo de un promotor específico del hígado, y puede estar presente en más de una copia. Una ApoE/hAAT es una combinación de potenciador/promotor preferida.

[0152] Alternativamente, se puede usar un potenciador sintético (SynEnh), como el descrito en el documento US20060189561.

[0153] Cuando el casete o construcción de expresión ddRNAi contiene más de una secuencia o elemento terminador, las secuencias o elementos terminadores pueden ser iguales o diferentes, o puede haber una combinación de elementos de terminación representados solo una vez y los elementos de terminación representados dos veces o más dentro de cualquier casete. Independientemente de las secuencias o elementos terminadores que se utilicen, deben seleccionarse para garantizar que funcionen adecuadamente con el promotor específico del hígado utilizado. En los casos en que se usan los promotores Pol I, Pol III o Pol III, se deben emplear las secuencias de terminación apropiadas. Los elementos de terminación útiles en la presente invención incluyen la secuencia de terminación U1 (caja U1), el terminador sintético polyA y el llamado terminador mínimo PolyA. Los sitios de pausa transcripcional, como MAZ1 y MAZ2, (ver Ashfield et al. EMBO J 1994 Vol13 No 23 5656 pp y Yonaha y Proudfoot EMBO J. 2000 jul. 17; 19 (14): 3770-7) pueden insertarse aguas arriba del terminadores de poliA para ayudar en el acoplamiento de la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Para los promotores Pol III, las secuencias TTTT, TTTTT o TTTTTT se usan comúnmente como terminadores. En estos casos, las transcripciones suelen terminar en la secuencia UU.

Entrega de los constructos de ddRNAi - constructos de ddRNAi basados en virus

[0154] Un reto en el desarrollo de cualquier terapéutica VHB es que prácticamente todos los hepatocitos en los pacientes están infectados. Como tal, se requiere un medio para lograr una transducción eficiente y uniforme de todas las células hepáticas con el agente ddRNAi de la invención para proporcionar una terapia génica eficaz para la infección crónica por VHB. Además, para el tratamiento in vivo efectivo de la infección por VHB, el casete de expresión de ddRNAi de la invención debe poder transfectarse en células primarias, células madre y células no divisorias.

[0155] Para superar esta limitación, los casetes de expresión ddRNAi de la invención se introducen en un vector de administración, preferiblemente derivados de virus para asegurar la compatibilidad con la entrega viral, para generar ddRNAi constructos. Como se señaló anteriormente, el esqueleto del vector puede servir para el doble propósito de ser un vector de expresión así como un vector de administración. La generación del constructo se puede lograr usando cualquier técnica de ingeniería genética adecuada bien conocida en la técnica, incluyendo, sin limitación, las técnicas estándar de PCR, síntesis de oligonucleótidos, síntesis de ADN, digestión con endonucleasas de restricción, ligación, transformación, purificación de plásmidos y secuenciación de ADN. La construcción comprende preferiblemente, por ejemplo, las secuencias necesarias para empaquetar la construcción de ddRNAi en partículas víricas y/o secuencias que permiten la integración de la construcción de ddRNAi en el genoma de la célula diana. La construcción viral también puede contener genes que permiten la replicación y propagación del virus, aunque en realizaciones preferidas, dichos genes se suministrarán en *trans*. Además, la construcción ddRNAi puede contener genes o secuencias genéticas del genoma de cualquier organismo conocido incorporado en forma nativa o modificada. Por ejemplo, la construcción viral preferida comprende secuencias útiles para la replicación de la construcción en bacterias.

[0156] El esqueleto del vector viral puede seleccionarse de lentiviral, adenoviral (Adv), y vectores virales (AAV) adeno-asociados. Los vectores virales no integradores se pueden usar para la expresión transitoria en células en división de los agentes de ddRNAi de la invención o para la expresión estable a más largo plazo en células no en división. Los vectores virales integradores, como los vectores lentivirales, median la expresión estable a largo plazo tanto en las células en división como en las no en división.

[0157] Alternativamente, minicircles tales como los descritos en US20040214329 puede usarse para entregar los casetes de expresión ddRNAi. Los minicircles proporcionan niveles persistentemente altos de transcripción de ácido nucleico, y se caracterizan por carecer de secuencias bacterianas que silencian la expresión.

[0158] Los vectores de AAV son no patógenos y menos inmunogénicos en comparación con otros vectores virales. La capacidad de los vectores AAV para infectar células tanto divididas como no divididas, y para dirigir la expresión génica a largo plazo en estos tejidos hace que sea un vehículo útil para la terapia génica. Además, el AAV tiene una variedad de pseudotipos con diferentes tropismos tisulares. Un vector de AAV preferido es el pseudotipo 8 de doble cadena de AAV (dsAAV8).

[0159] Típicamente, el genoma de AAV contiene solo dos genes. El gen "rep" codifica para al menos cuatro proteínas separadas utilizadas en la replicación del ADN. El producto del gen "cap" se empalma diferencialmente para generar las tres proteínas que comprenden la cápside del virus. Al empaquetar el genoma en un virus naciente, solo las repeticiones terminales invertidas (ITR) son secuencias obligadas; rep y cap pueden eliminarse del genoma y reemplazarse con secuencias heterólogas de elección. Sin embargo, para producir las proteínas necesarias para replicar y empaquetar la construcción heteróloga basada en AAV en viriones nacientes, las proteínas rep y cap deben proporcionarse en *trans*. Las funciones auxiliares normalmente proporcionadas por la coinfección con el virus auxiliar, como el adenovirus o el herpesvirus, también pueden proporcionarse en *trans* en forma de uno o más plásmidos de expresión de ADN. Dado que el genoma normalmente codifica solo dos genes, no es sorprendente que, como vehículo de entrega, el AAV esté limitado por una capacidad de empaquetamiento de 4.5 kilobases de cadena simple (kb). Sin embargo, aunque esta restricción de tamaño puede limitar los genes que pueden administrarse para terapias genéticas de reemplazo, no afecta negativamente el empaquetamiento y la expresión de secuencias más cortas como los vectores ddRNAi.

[0160] Por consiguiente, en otro aspecto de la invención, se proporciona una construcción de ddRNAi que comprende un vector viral en el que se inserta un casete de expresión de ddRNAi de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el casete de expresión codifica múltiples agentes de ARNi, como estructuras de horquilla largas o estructuras de horquilla múltiples. En una realización, el vector viral es un vector AAV.

[0161] Después de la generación de la construcción ddRNAi basado viral, el constructo está empaquetado en partículas víricas. Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para producir partículas virales infecciosas cuyo genoma comprende una copia del constructo de ddRNAi viral. Un método utiliza células de empaquetamiento que expresan establemente en *trans* las proteínas virales que se requieren para la incorporación del constructo de ddRNAi viral en partículas virales, así como otras secuencias necesarias o preferidas para un sistema de administración viral particular (por ejemplo, secuencias necesarias para la replicación), proteínas estructurales y ensamblaje viral) y ligandos derivados de virus o artificiales para la entrada de tejido. Después de la transfección de la construcción de ddRNAi viral en células empaquetadoras, las células de empaquetamiento luego replican secuencias virales, expresan proteínas virales y empaquetan las construcciones de expresión de ddRNAi en partículas virales infecciosas. La línea celular de empaquetamiento puede ser cualquier línea celular que sea capaz de expresar proteínas virales, incluidas, entre otras, 293, HeLa, A549, PerC6, D17, MDCK, BHK, bing cherry, phoenix, Cf2Th o cualquier otra línea conocida o desarrollada por los expertos en la técnica. Una línea celular de envasado se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 6.218.181.

[0162] Alternativamente, una línea celular que no expresa de manera estable las proteínas virales necesarias pueden ser co-transfectadas con una o más construcciones de lograr una producción eficiente de partículas funcionales. Una de las construcciones es la construcción ddRNAi basada en virus; la otra construcción comprende ácidos nucleicos que codifican las proteínas necesarias para permitir que las células produzcan virus funcionales, así como otras funciones auxiliares.

[0163] La línea celular de empaquetamiento o la replicación y la construcción de empaquetado puede no expresar productos de genes de la envoltura. En estas realizaciones, el gen que codifica el gen de la envoltura puede proporcionarse en una construcción separada que se cotransfecta con la construcción de ddRNAi basada en virus. Como la proteína de la envoltura es responsable, en parte, del rango del huésped de las partículas virales, los virus pueden ser pseudotipados. Como se describe más arriba, un virus "pseudotipado" es una partícula viral que tiene una proteína de la envoltura que proviene de un virus distinto del virus del que se deriva el genoma. Un experto en la técnica puede elegir un pseudotipo adecuado para el sistema de administración viral utilizado y la célula a la que debe dirigirse. Además de conferir un rango de huésped específico, un pseudotipo elegido puede permitir que el virus se concentre a un título muy alto. Alternativamente, los virus pueden ser pseudotipados con proteínas de la envoltura ecotrópica que limitan la infección a una especie específica (p. ej., Las envolturas ecotrópicas permiten la infección, por ejemplo, solo de células murinas, donde las envolturas anfotrópicas permiten la infección, por ejemplo,

de células humanas y murinas). Además, los ligandos modificados genéticamente pueden usarse para la orientación específica de la célula, como la asialoglicoproteína para hepatocitos, o la transferrina para la unión mediada por receptores.

- 5 **[0164]** Después de la producción en una línea celular de empaquetamiento, las partículas virales que contienen los casetes de expresión ddRNAi se purifican y cuantificado (tituló). Las estrategias de purificación incluyen la centrifugación en gradiente de densidad o, preferiblemente, los métodos cromatográficos en columna.

Metodos de tratamiento

10 **[0165]** La administración de agentes de ddRNAi, construcciones de ddRNAi o agentes de siRNA de la invención inhibe la expresión de genes de HBV expresados en una célula infectada con HBV. Por consiguiente, un método para tratar la infección por VHB en un sujeto que comprende proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de ddRNAi a un paciente que necesita tratamiento, en el que el agente de ddRNAi inhibe la expresión de una o más secuencias diana en un gen del virus de la hepatitis B (HBV) Preferiblemente, se describe el gen de polimerasa de HBV. El agente ddRNAi que se administrará al paciente puede ser uno o más de:

- 20 • un agente ddRNAi que comprende una primera secuencia efectora; y una primera secuencia de complemento efectora; en donde la secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana
- 25 • el agente ddRNAi comprende, en una dirección 5' a 3', una primera secuencia efectora; una segunda secuencia efectora; una segunda secuencia de complemento efectora; y una primera secuencia de complemento de efector, en la que cada secuencia de efector está sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana
- 30 • un agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', una primera secuencia efectora; una segunda secuencia efectora; una tercera secuencia efectora; una tercera secuencia de complemento efector; una segunda secuencia de complemento efectora; y una primera secuencia de complemento efectora en la que cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana
- 35 • un agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', una primera secuencia efectora; una primera secuencia de complemento efectora; una segunda secuencia efectora; y una segunda secuencia de complemento efectora en la que cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana
- 40 • un agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', una primera secuencia efectora; una primera secuencia de complemento efectora; una segunda secuencia efectora; una segunda secuencia de complemento efector; una tercera secuencia efectora; y una secuencia complementaria del tercer efector; en donde cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana
- 45 • un agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', una primera secuencia efectora; una segunda secuencia efectora; una secuencia de 2 a 100 nucleótidos no auto-complementarios; una segunda secuencia de complemento efectora; y una primera secuencia de complemento efectora en la que cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana.
- 50 • un agente ddRNAi que comprende, en una dirección 5' a 3', una primera secuencia efectora; una secuencia de 2 a 100 nucleótidos no auto-complementarios; una primera secuencia de complemento efectora; una segunda secuencia efectora; una secuencia de 2 a 100 nucleótidos no auto-complementarios; y una segunda secuencia de complemento efectora en la que cada secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana.

55 **[0166]** Como se entenderá por un experto en la técnica, y como se ilustra en las figuras, cualquier secuencia efectora particular puede ser intercambiado en posición con su complemento en el agente. En formas particulares de cada una de las realizaciones descritas anteriormente, cada secuencia efectora tiene una longitud de al menos 17 nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en 10 o más y preferiblemente 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-27. Las secuencias efectoras pueden ser todas iguales, o pueden ser todas diferentes, o pueden ser una combinación, por ejemplo, 2 secuencias efectoras de al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 y 1 secuencia efectora de al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 4.

- 5 [0167] Preferiblemente, la secuencia efectora se selecciona del grupo que consiste en cualquier 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos contiguos dentro de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-27, y lo más preferiblemente 17 o más nucleótidos contiguos dentro de cualquiera de SEQ ID NOS: 1-27. Típicamente, el complemento efector será la misma longitud, o aproximadamente la misma longitud (es decir, 6 15% de nucleótidos de longitud) como su secuencia efectora correspondiente.
- 10 [0168] La invención proporciona un agente ddRNAi, o una construcción de expresión ddRNAi de la invención, para su uso en el tratamiento de la infección aguda o crónica por VHB en un sujeto, para el uso en la reducción de la carga viral del VHB en un sujeto, para el uso en la reducción de la gravedad de los síntomas asociados con la infección por VHB en un sujeto, o por el uso en la reducción de la infectividad del VHB.
- 15 [0169] Cada uno de los agentes ddRNAi de la invención o como se describe pueden administrarse a través de un casete de expresión ddRNAi en una construcción de ddRNAi, como se describe en las secciones anteriores de la especificación. Se puede lograr una selección múltiple entregando dos o más casetes o construcciones de expresión de ddRNAi, cada uno capaz de expresar un único agente de ddRNAi, o alternativamente, entregando uno o más casetes o construcciones de expresión de ddRNAi, cada uno capaz de expresar más de un agente de ddRNAi.
- 20 [0170] En realizaciones alternativas, cada una de las secuencias de efector puede ser 100% complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana, o únicamente puede variar de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos.
- 25 [0171] El método de tratamiento de la infección por VHB puede incluir opcionalmente una etapa preliminar de la identificación de un individuo que tiene infección por HBV incluyendo la identificación del serotipo del aislado de HBV.
- 30 [0172] Para más largo plazo o suministro estable de los agentes ddRNAi de la invención o como se describe, el agente ddRNAi se proporciona a través de un constructo ddRNAi de la invención o como es decir, la expresión descrita *in vivo* del agente ddRNAi de un casete de expresión ddRNAi insertado en un vector adecuado entregado a la célula. El casete de expresión ddRNAi comprende:
- 35 • una o más secuencias promotoras
 - una o más secuencias de ADN seleccionadas del grupo que consiste en secuencias que codifican 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de SEQ ID NOS: 1-27;
 - una o más secuencias de ADN que codifican una o más secuencias complementarias efectoras;
 - una o más secuencias terminadoras y opcionalmente
 - 40 • Una o más secuencias de ADN que codifican secuencias de bucle.
 - una o más secuencias potenciadoras.
- 45 [0173] Los casetes de expresión de la invención codifican los agentes ddRNAi de la invención.
- [0174] Como se describió anteriormente en la especificación, estos componentes del casete de expresión ddRNAi pueden tener diferentes disposiciones de 5' a 3', todas las cuales son adecuadas para uso en los métodos de la invención.
- 50 [0175] En los métodos descritos, el gen diana del VHB es el gen al menos de la polimerasa (P), y potencialmente el antígeno de superficie o gen X cuando la secuencia diana está contenida dentro de la superposición de marcos de lectura abiertos, y el agente ddRNAi comprende secuencias efectoras ddRNAi de 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de SEQ ID NOS: 1-27 enumerada en la Tabla 1. Alternativamente, como se detalló anteriormente, la secuencia que codifica la secuencia efectora o la secuencia complementaria de la primera secuencia efectora puede variar de la SEC. ID NOS: 1-27 por 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos sin afectar la capacidad de la secuencia codificada para formar un par de bases con la secuencia diana e inhibir la expresión de la secuencia diana del VHB.
- 55 [0176] Típicamente, cada secuencia efectora forma una región de doble hebra con la secuencia de complemento efector correspondiente.
- 60 [0177] En una realización alternativa, el método de tratamiento de la infección por VHB en un individuo comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un constructo ddRNAi que codifica un agente ddRNAi tener más de una secuencia efectora, tales como los enumerados anteriormente.

[0178] La infección por el VHB a tratar puede ser una infección crónica por VHB. Por "crónica" se entiende que la infección por VHB es de larga duración o persistente. El término crónico describe el curso de la enfermedad, o su tasa de aparición y desarrollo. Cuando se trata la infección crónica por VHB, es preferible que la construcción de ddRNAi se administre y se mantenga estable o se integre en la célula diana para asegurar una expresión a más largo plazo del agente de ddRNAi. Como se detalló anteriormente, esto se puede lograr con el uso de un constructo de ddRNAi que tenga un esqueleto de vector viral. De acuerdo con esto, se describe un método para tratar la infección crónica por VHB en un individuo que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un constructo de ddRNAi como se describe a un paciente que necesita tratamiento. El constructo ddRNAi de la invención para tratar la infección crónica por VHB forma parte de la invención.

[0179] El tratamiento de la infección crónica por VHB tiene como objetivo reducir la infectividad del virus al interferir con la replicación viral. Esto, a su vez, reduce el riesgo de transmisión y propagación del VHB. Por lo tanto, se describe un método para reducir la infectividad del VHB en un individuo infectado con VHB, que comprende administrar al individuo un constructo de ddRNAi de la invención para dirigirse a un gen del VHB, preferiblemente el gen de la polimerasa. Los criterios de valoración clínicos utilizados en el tratamiento de la hepatitis B crónica diferirán entre los pacientes con hepatitis B compensada (donde la eliminación viral sostenida, la respuesta serológica, la mejora histológica, la normalización de las pruebas de función hepática y la progresión no clínica son criterios de valoración clave) y los pacientes con hepatitis descompensada B. En pacientes con enfermedad descompensada, el hígado tiene cicatrices extensas y fibróticas y la prevención/reversión del daño hepático y la prevención de la progresión de la enfermedad y la eliminación del trasplante de hígado son los principales objetivos de la terapia. Los puntos finales para la hepatitis B compensada son la reducción de la carga viral con mejoría serológica y bioquímica, mejoría histológica, medida de insuficiencia hepática y enfermedad hepática en etapa terminal, complicaciones, trasplante y mortalidad.

[0180] En otra realización, un método para minimizar la progresión de la enfermedad hepática en un sujeto como resultado de la infección por VHB, que comprende administrar al individuo un constructo ddRNAi de la invención para dirigirse a un gen de VHB, se da a conocer preferentemente el gen de la polimerasa.

[0181] En aún otra realización de la invención, un método para minimizar los síntomas asociados con la infección por VHB en un sujeto, que comprende administrar al individuo un constructo ddRNAi de la invención para dirigirse a un gen de HBV, de preferencia se da a conocer el gen de la polimerasa.

[0182] El estado o gravedad de la infección por VHB de un individuo se pueden evaluar mediante la determinación de su carga viral. Por "carga viral" se entiende la cantidad de virus en un fluido corporal involucrado. Por ejemplo, se puede administrar en copias de ARN por mililitro de plasma sanguíneo. Se considera que las personas que tienen una carga viral alta tienen una infección por VHB más grave. Alternativamente, la carga viral es un indicador de la capacidad de respuesta de un individuo a un tratamiento particular. Si un tratamiento está funcionando y mantener bajos los niveles de virus, es indicativo de un tratamiento exitoso. Por lo tanto, es un objetivo del tratamiento reducir la carga viral de un individuo. Por consiguiente, también se describe un método para disminuir la carga viral de un individuo con una infección por VHB, que comprende administrar al individuo una construcción de ddRNAi de la invención para apuntar a un gen del VHB, preferiblemente el gen de la polimerasa. El seguimiento posterior de la carga viral en el individuo que ha recibido tratamiento con un constructo ddRNAi de la invención es, por lo tanto, un indicador fenotípico de la efectividad del constructo ddRNAi y el agente ddRNAi de la invención.

[0183] Alternativamente, el tratamiento de la infección aguda por VHB puede no requerir un tratamiento a largo plazo, y de hecho se puede preferir confiar en la presencia transitoria de un agente de ddRNAi o un agente de ARNip en oposición a la expresión a largo plazo de agentes de ddRNAi de construcciones ddRNAi integradas o establemente mantenidas. Por "aguda" se entiende que la infección por VHB tiene un inicio rápido y/o una duración corta.

[0184] Un método de tratamiento de la infección aguda por VHB en un individuo que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente ddRNAi sintetizado o químicamente sintetizado *in vitro* a un paciente en necesidad de tratamiento, para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en un gen del virus de la hepatitis B (VHB), el agente ddRNAi que comprende al menos:

una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud seleccionada de 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-27; y

una primera secuencia de complemento efectora;

en donde la secuencia efectora es sustancialmente complementaria a la transcripción predicha de una región del gen diana que se describe. En esta realización descrita, el agente de ddRNAi de la invención se produce *in vitro* o se sintetiza químicamente y se proporciona a la célula.

[0185] Cualquiera de los agentes de siRNA o ddRNAi como se describe o de la invención descrita a lo largo de la memoria descriptiva es adecuado para la expresión y administración *in vitro* a la célula.

[0186] Preferiblemente, el gen diana del VHB es de al menos el gen de la polimerasa (P), y potencialmente el antígeno de superficie, antígeno del núcleo o gen X cuando la secuencia diana está contenida dentro de la superposición de marcos de lectura abiertos. Por consiguiente, en una realización descrita, el agente ddRNAi inhibe la expresión de una o más secuencias diana en un gen de la polimerasa del virus de la hepatitis B (VHB). La primera secuencia efectora se selecciona preferiblemente de entre 10 o más y preferiblemente 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia de las secuencias efectoras SEQ ID NOS: 1-27 enumeradas en la Tabla 1. Alternativamente, la secuencia efectora puede variar de la SEQ ID NOS: 1-27 por 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos sin afectar la capacidad de la secuencia efectora para emparejarse con la secuencia diana e inhiben expresión del gen de polimerasa HBV.

[0187] En una realización alternativa descrita, un agente siRNA se puede administrar. Preferiblemente, los agentes de siRNA, al igual que el agente de ddRNAi, se dirigen al gen de la polimerasa de HBV, y pueden tener una secuencia seleccionada entre 10 o más y preferiblemente 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia del grupo que consiste en la SEQ ID NOS: 1- 27, o puede variar de la SEQ ID NOS: 1-27 por 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos sin afectar la capacidad de la secuencia efectora para un par de bases con la secuencia diana e inhibir la expresión del gen de la polimerasa del VHB.

[0188] La administración de un agente de ddRNAi o un agente de ARNip como se describe o de la invención a un individuo con una infección aguda por VHB también puede disminuir una carga viral, reducir la gravedad de los síntomas asociados con la infección aguda y reducir la infectividad del VHB.

[0189] Se describe el uso de constructos de ddRNAi, agentes ddRNAi o agentes ARNsi de la invención en la preparación de medicamentos para el tratamiento de la infección por VHB, preferiblemente infección por VHB crónica, la reducción de la carga viral del VHB, la reducción de la severidad de los síntomas asociados con la infección por VHB y la reducción de la infectividad del VHB.

[0190] La invención proporciona construcciones de ddRNAi o agentes de ddRNAi para su uso en el tratamiento de la infección por VHB, preferiblemente infección aguda o crónica por VHB, reduciendo la carga viral del VHB, reduciendo la gravedad de los síntomas asociados con la infección por VHB y reduciendo la infectividad del VHB.

[0191] En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición que comprende construcciones de ddRNAi o agentes de ddRNAi como un ingrediente activo para tratar la infección por VHB, preferiblemente infección aguda o crónica por VHB, que reduce la carga viral del VHB, reduciendo la gravedad de los síntomas asociados con la infección por VHB, y reduciendo la infectividad del VHB.

[0192] Una o más secuencias efectoras de constructos ddRNAi, agentes ddRNAi o agentes siRNA usados en los métodos descritos comprenden cualesquiera 10 o más, preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de las secuencias capaces de inhibir la expresión del gen diana del VHB región en al menos el 70%. Preferiblemente, una o más secuencias efectoras se seleccionan de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23. En las construcciones de ddRNAi y los agentes de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

Composiciones farmacéuticas

[0193] Los agentes ddRNAi, los agentes siRNA o los vectores que comprenden casetes de expresión ddRNAi como se describe o de la invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas mediante la combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables, adecuados o diluyentes. Por consiguiente, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente de ddRNAi, un casete de expresión de ddRNAi, una construcción de ddRNAi de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0194] En formas de dosificación farmacéuticas, los agentes o los vectores que comprenden los casetes de expresión ddRNAi pueden administrarse solos o en asociación o combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos. Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán fácilmente que los niveles de dosis para agentes o vectores que comprenden los casetes de expresión de ddRNAi variarán en función de la naturaleza del vehículo de suministro, la relativa facilidad de transducción de las células diana, el nivel de expresión del RNAi. Agentes en las células diana y similares.

[0195] Los agentes ddRNAi o los vectores que comprenden ddRNAi casetes de expresión de la invención pueden formularse en preparaciones para inyección o administración por disolución, suspensión o emulsión de los mismos en un disolvente acuoso o no acuoso, tales como aceites, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

[0196] Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables contemplados por la invención incluyen cualquier diluyente, portador, excipiente y estabilizante que no sea tóxico para los receptores en las dosis y concentraciones

empleadas, e incluye tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenol, butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol) ; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como la albúmina plasmática, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; Contraiones formadores de sal como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

[0197] La composición farmacéutica se puede preparar por diversas rutas y tipos de administración. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el ingrediente activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y si es necesario, dando forma al producto. La formulación puede realizarse mezclando a temperatura ambiente al pH apropiado, y al grado deseado de pureza, con vehículos fisiológicamente aceptables, es decir, vehículos que no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas.

[0198] Una o más secuencias efectoras de constructos ddRNAi, agentes ddRNAi o agentes ARNsi utilizados en las composiciones descritas anteriormente comprenden cualesquiera 10 o más, preferiblemente cualesquiera 17 o más nucleótidos contiguos dentro de las secuencias capaces de inhibir la expresión de la diana del VHB región génica en al menos un 70%. Preferiblemente, una o más secuencias efectoras se seleccionan de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23. En las construcciones de ddRNAi y los agentes de la invención, al menos una de las secuencias efectoras comprende 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.

EJEMPLOS

[0199] Los siguientes ejemplos son de naturaleza ilustrativa y de ninguna manera pretenden ser limitativos.

Ejemplo 1: Producción de una biblioteca completa de ARNip diana (EsT)

[0200] La longitud total HBV dependiente de ARN del gen de ADN polimerasa de HBV Adr-1 (adhesión M38454) fue subclonado y utilizado para generar una biblioteca entera siRNA diana (EST). Se secuenciaron 5000 clones, de los cuales se identificó que 642 tenían secuencias no repetitivas que oscilaban entre 19-23 pb. Las secuencias, que representan dianas potenciales para los agentes de ddRNAi de la invención, se distribuyeron a lo largo del gen diana (Figura 2).

Ejemplo 2: Resultados de detección a gran escala utilizando SEC con ϵ 50% knockout

[0201] Para identificar las secuencias de siRNA más eficaces que luego podrían ser utilizadas para preparar los agentes ddRNAi de la invención, los casetes de expresión siRNA (segundos) amplificados por PCR fueron transfectadas en células HepG2 células 2.2.15. Se evaluaron los efectos sobre los niveles de expresión de ARNm de polimerasa de VHB para identificar secuencias de ARNip funcionales.

[0202] Se sintetizaron químicamente y se transfectaron 40 ARNsi que correspondían a las primeras SEC examinadas en células HepG2 2.2.15 para validar los niveles de eliminación de ARNm de la polimerasa original. HepG2 2.2.15 es una línea celular estable que contiene un dímero tándem integrado del genoma del VHB (Genebank Accession #: U95551), y puede expresar de manera estable antígenos del VHB y partículas HBV Dane. Los resultados de la correlación se muestran en la Figura 3.

[0203] Como se puede ver en la Figura 3, cuando la inhibición de la expresión de la polimerasa por parte de las SEC fue $> 50\%$, la mayoría de las secuencias de ARNip sintéticas correspondientes dieron un 70% de reducción del ARNm del VHB, y solo 2/23 dieron niveles de reducción por debajo de 50 %. En contraste con las SEC con $< 50\%$, la eficiencia de silenciamiento, solo el 18% (3/17) de los correspondientes ARNsi sintéticos produjo $> 70\%$ knockout (p $< 0,05$ - prueba chisquare de Pearson, | t Stat | = 4,29 $> 1,68$) . Además, un ARNip sintético (**se necesita una explicación de esto**) que produjo $> 90\%$ de desactivación correspondió a un clon SEC que dio $> 65\%$ knock down. A partir de esto, se concluyó que existía una correlación razonable entre la eliminación del ARNm del VHB por el ARNsi de las SEC y la producida por los ARNip sintéticos, hasta un valor de corte de ϵ 50% por las SEC. Este valor de corte se utilizó para el resto de la selección de las SEC.

Ejemplo 3: Selección de dianas mediante casetes de expresión de ARNip (SEC).

[0204] La Figura 4 muestra los resultados de la exploración a gran escala *in vitro* para la inhibición de la acumulación de ARNm de VHB (501 agentes de ARNip no repetidos). De esas secuencias analizadas, 100 secuencias de ARNip fueron efectivas para eliminar el ARNm del VHB en ϵ 50%, 14 de las cuales resultaron en una

reducción de >70% (Tabla 2). La distribución de los 100 objetivos principales de ARNsi en el gen de la polimerasa del VHB se muestra en la Figura 5A; cualquier secuencia puede a su vez ser mapeada en la polimerasa. La Figura 5B, por ejemplo, mapea las primeras 3 secuencias.

5

Tabla 2:

10

15

20

25

SEQ ID NO	Secuencia efectora de RNAi ^a	Longitud (pb)	Expresión relativa de ARNm
1	GAUUGACGAUAAGGGAGA	18	0,1
2	UUGAAGUCCCAAUCUGGAU	19	0,14
3	GCCGGGCAACGGGGUAAAGGUUC	23	0,19
4	UAUUUGCGGGAGAGGACAACAGAGUUAUC	29	0,25
5	UCCUGAUGUGAUGUUCUCCAUGU	23	0,25
6	AAGCCUCCGUGCGGUGGGG	20	0,26
7	GGUAUUGUUACACAGAAAGGC	22	0,26
8	GAUGUGUUCUUGUGGCAAG	19	0,27
9	GGGAAAGCCCUACGAACCACU	21	0,27
10	GUGGAGACAGCGGGGUAGGC	20	0,28
11	GAGGACAACAGAGUUAUC	18	0,29
12	GCCCACUCCCAUAGGAAUUUUC	23	0,29
13	GGAUCUUGCAGAGUUUGG	18	0,29
14	CGUUGCCGGCAACGGGGUA	20	0,29

30

35

[0205] Se midió la expresión de ARNm relativa (por un método de RT-PCR cuantitativo de una sola etapa usando SensiMix SYBR Kit One-Step (Bioline, EE.UU.) de acuerdo con las directrices del fabricante) en HepG2 transfectadas células 2.2.15 con relación a un control de vector vacío cuyo nivel fue arbitrariamente establecido en 1.0. Los cebadores específicos para el gen de la polimerasa del VHB fueron el cebador directo 5'-TGTGTTATCCTGCGTTAATG-3' 'Cebador inverso 5'-GCGTCAGCAAACACTTGG-3', el producto de la PCR fue 158 pb de largo. Se utilizó snRNA U6 (cebador directo 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' cebador inverso 5'-AACGCTTAC-GAATTTGCGT-3') como control interno, el producto de la PCR tenía una longitud de 94 pb. El nivel relativo de expresión de gen de la polimerasa se normalizó utilizando el método de análisis $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los experimentos se realizaron utilizando transducciones independientes cuádruplicadas.

Ejemplo 4: Confirmación de la actividad utilizando ARNsi sintetizados

40

45

[0206] La primera ronda de selección utiliza un vector con los promotores opuestos (pU6H1-GFP). En construcciones que expresan shRNA, el shRNA está bajo el control de un solo promotor. Por consiguiente, para confirmar la eficacia de las 14 secuencias de ARNip superiores mostradas en la Tabla 2 antes de desarrollar construcciones de expresión de ARNh basadas en ellas, se transfectaron células HepG2 2.2.15 con cada ARNsi y se analizó la inhibición de la replicación del VHB para determinar los niveles de ARNm de la polimerasa del VHB.

50

[0207] Los 14 siRNAs se sintetizaron químicamente con voladizo de dTdT 3'. siRNA-GL3 marcado con 5'- FAM (Vector Reportero de Luciferasa pGL3 con secuencia de siRNA no relacionada) sirvió como control negativo. Los ARNip se disolvieron en 100 uM en agua tratada con DEPC, se dividieron en partes alícuotas y se almacenaron a -20°C. Además, la SEQ ID NO: 4, que tiene una longitud de 29 bp, se rediseñó en 8 siRNA (SEQ ID NOS: 20 a 27), cada uno de 22 bp formado por una secuencia superpuesta de la SEQ ID NO: 4 (Tabla 3 a continuación):

Tabla 3:

55

60

65

SEQ ID NO	Secuencia efectora de RNAi
4	UAUUUGCGGGAGAGGACAACAGAGUUAUUCTT
20	GGGAGAGGACAACAGAGUUAUUCTT
21	CGGGAGAGGACAACAGAGUUAUTT
22	GCGGGAGAGGACAACAGAGUUAUTT
23	UGC GGAGAGGACAACAGAGUUTT
24	UUGCGGGAGAGGACAACAGAGUTT
25	UUUGCGGGAGAGGACAACAGAGTT
26	AUUUGCGGGAGAGGACAACAGATT
27	UAUUUGCGGGAGAGGACAACAGTT

[0208] Optimización de transfección se realizó mediante la variación de 5' marcado con FAM siRNA-GL3 y Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células se mantuvieron en DMEM (GIBCO, EE.UU.) suplementado con 10% de PBS (Excellbio, China) y 200 mg/ml G418 (Sangon, China) a 37 ° C, 5% de CO₂.

5 **[0209]** Células HepG2 2.2.15 fueron transfectadas con siRNAs utilizando el protocolo optimizado y cosechado 72h después de la transfección. El ARN total se aisló utilizando Trizol (Invitrogen) y se cuantificó en un método de RT-PCR cuantitativa de un solo paso utilizando el kit de un solo paso SensiMix SYBR (Bioline, EE.UU.) De acuerdo con las pautas del fabricante como se detalla en el Ejemplo 3.

10 Resultados

[0210] Los resultados se expresan como media ± STDV (Tabla 4 y Figura 9).

SEQ ID NO	Nivel de ARNm de polimerasa					
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	PROMEDIO	DES EST
1	0,39	0,52	0,51	0,72	0,54	0,1373
2	0,79	0,24	0,18	0,43	0,41	0,2722
3	0,58	0,27	0,18	0,14	0,29	0,2014
4		0,41	0,34	0,22	0,33	0,0928
5	0,34	0,35	0,44	0,37	0,37	0,0450
6	0,36	0,32	0,26	0,54	0,37	0,1190
7	0,45	0,30	0,26	0,63	0,41	0,1702
8	0,48	0,46	0,33	0,72	0,50	0,1653
9	0,45	0,26	0,20	0,28	0,30	0,1068
10	0,17	0,40	0,43	0,67	0,42	0,2053
11	0,32	0,33	0,30	0,30	0,31	0,0178
12	0,32	0,28	0,16	0,26	0,25	0,0704
13	0,23	0,25	0,23	0,26	0,24	0,0152
14	0,36	0,34	0,38	0,36	0,36	0,0180
20	0,43	0,23	0,19	0,30	0,29	0,1027
21	0,33	0,40	0,24	0,19	0,29	0,0915
22	0,37	0,51	0,84	0,27	0,50	0,2453
23	0,18	0,29	0,20	0,32	0,25	0,0648
24	0,31	0,38	0,46	0,45	0,40	0,0686
25	0,50	0,33	0,54	0,25	0,41	0,1400
26	0,43	0,41	0,32	0,43	0,40	0,0518
27	0,38	0,44	0,33	0,31	0,37	0,0585
siNC	0,72	0,73	0,69	0,78	0,73	0,0398
Normal	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,0000

siNC = control negativo; Normal = células no transfectadas

45 **[0211]** De los 22 ARNip analizados, todos mostraron al menos aproximadamente el 50% de inhibición, y la mayoría exhibió del 60 al 70% de inhibición. A pesar de la alta similitud de secuencia entre las variantes de 22 pb SEQ ID NO: 20 a 27 de SEQ ID NO: 4, la capacidad para inhibir la expresión de su secuencia varió de 50 a 71%. Sobre la base de estos resultados, SEQ ID NOS: 3, 9, 12, 13 y 23 se seleccionaron para un mayor desarrollo. Si bien todas esas SEQ ID NOS se dirigen al gen de la polimerasa, estas secuencias también se seleccionaron en función de su propagación a lo largo del mRNA del gen de la polimerasa (consulte la columna "Sitios objetivo del VHB" en la Tabla 1).

Ejemplo 5: diseño y construcción de shRNA

55 **Paso 1 - Diseño de la secuencia del efector**

60 **[0212]** Las construcciones de expresión de shRNA se diseñaron según la SEQ ID NO: 3, 9, 12, 13 y 23. Las construcciones se pueden sintetizar fácilmente utilizando una variedad de promotores, incluidas diferentes versiones de promotores U6 humanos con diferentes actividades intrínsecas (Domitrovich, AM y Kunkel, GR (2003) Múltiples genes de ARN nuclear pequeño U6 humano dispersos con variadas eficiencias transcripcionales (Nucleic Acids

Research 31: 2344-2352) o varios promotores pol II. En el diseño de estos constructos, se aplicaron las siguientes consideraciones:

- 5 • Procesos de dicer a partir de la base de los shRNAs.
- El procesamiento de Dicer es impreciso, pero se espera que corte cada 22 nucleótidos
- Se espera que la terminación U6 agregue una UU al extremo 3' del shRNA
- 10 • La secuencia de efector procesada deseablemente contiene una 5' U o A para facilitar la carga eficiente de Ago 2.
- La secuencia del efector se coloca en 3 'del bucle para evitar la 5' G preferida para la transcripción máxima de U6
- 15 • Los residuos 5' A o U pueden incorporarse en las secuencias de los efector de shRNA incorporando las secuencias 2 o 3 nucleótidos en sentido ascendente o descendente de las secuencias seleccionadas por el agente de ARNi; esto se conoce como secuencias "deslizantes" 1, 2 o 3 nucleótidos, es decir, la secuencia efectora para los ARNsh puede basarse en las secuencias 1, 2 o 3 nucleótidos 5' o 3' en relación con el extremo 5' de la secuencia efectora del ARNsi.
- 20

[0213] Cuando se aplica a los 5 ARNsi basados en las SEQ ID NO: 3, 9, 12, 13 y 23:

- 25 i) Para un shRNA basado en SEQ ID NO: 3: gccgggcaacgggguaaagguucTT
"Mejor" secuencia de efector shRNA (minimizar 5' GC secuencias, deslice "hacia abajo" 3 nts)
GGGCAACGGGUUAUAGGUUCuu (uu de la terminación pol III)
- 30 ii) Para un shRNA basado en SEQ ID NO: 9: gggaaagcccuacgaaccacuTT
"Mejor" secuencia de efector shRNA (minimizar 5' Gs, deslice hacia abajo 3 nts a 5' A, agregue GA a 3 '(desde el genoma del VHB hasta maximizar homología) AAAGCCCUACGAACCACUGAuu
- 35 iii) Para un shRNA basado en SEQ ID NO: 12: gcccacuccauaggaauuuuccTT
"Mejor" secuencia de efector shRNA subir 2 nts para evitar UUUU (causará terminación prematura) en cadena antisentido, agregue AG de secuencia HBV, que incorpora fortuitamente un 5' A.
AGGCCACUCCCAUAGGAAUU
- 40 iv) Para un shRNA basado en SEQ ID NO: 13: ggaucuugcagaguuggTuggTT
"Mejor" secuencia de efector shRNA (aumentar la longitud a 20 nts, deslice hacia arriba 2 nts, agregue TG de la secuencia HBV, lo que resulta en un 5' T (es decir, U)
TGGAUCUUGCAGAGUUUGGuu
- 45 v) Para un shRNA basado en SEQ ID NO: 23: ugccgggagaggacaagagaguTT
"Mejor" secuencia de efector de shRNA reducir el tamaño en el extremo 3' en 2 nts
UGCGGGAGAGACAACAGAGUU

Paso 2 - Casete de expresión

50 **[0214]** Los casetes de shRNA U6 (Genscript) basados en las secuencias efectoras diseñadas en la etapa (a) se prepararon y clonaron en pUC57.

[0215] Los insertos de los casetes de expresión, que incluyeron algunos sitios de restricción que flanquean para manipulación posterior, tenían las siguientes secuencias:

55 U6.HBVshRNA 3

60

5
GGGACCCGGTACCTCGAGAGATCTGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTC
CTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGA
CTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTG
GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAAC
10
TTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGA
ACCTTTACCCCGTTGCCCGCAAGAGACCGGGCAACGGGGTAAAGGTTCTTTTTT
GTTAACGAATTC(SEQ ID NO: 28)

U6.HBVshRNA 9

15
GGGACCCGGTACCTCGAGAGATCTGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTC
CTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGA
20
CTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTG
GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAAC
TTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGT
25
CAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCAAGAGAGGAAAGCCCTACGAACCACTGATTTTTT
GTTAACGAATTC(SEQ ID NO: 29)

U6.HBVshRNA 12

30
GGGACCCGGTACCTCGAGAGATCTGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTC
CTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGA
35
CTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTG
GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAAC
TTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGA
40
TTCCTATGGGAGTGGGCCTCACAAGAGATGAGGCCCACTCCCATAGGAATTTTTT
GTTAACGAATTC (SEQ ID NO: 30)

U6.HBVshRNA 13

45
GGGACCCGGTACCTCGAGAGATCTGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTC
CTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGA
50
CTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTG
GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAAC
TTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGC
55
CAAACCTCTGCAAGATCCCAGACAAGAGATCTGGGATCTTGCAGAGTTTGGTTTTT
GTTAACGAATTC(SEQ ID NO: 31)

U6.HBVshRNA 23

GGGACCCGGTACCTCGAGAGATCTGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTC
 5 CTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGA
 CTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTG
 TTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGC
 10 TCTGTTGTCCTCTCCCGCAAACAAGAGATTTGCGGGAGAGGACAACAGAGTTTTTTT
 GTTAACGAATTC (SEQ ID NO: 32)

[0216] El shRNA expresado correspondiente para cada uno de estos casetes de expresión se muestra en las Figuras 6 (como SEQ ID NOS: 36 a 40). El símbolo "э" y "(" indican los posibles sitios de procesamiento de shRNA, resultantes de la iniciación/terminación de la transcripción o el procesamiento de Dicer con una fase de 22 nt y un saliente 2nt 3', la secuencia de efectos predicha asumiendo que dicho procesamiento se muestra a continuación.

Ejemplo 6: Generación de células de expresión de shRNA estables utilizando construcciones de secuencias múltiples

[0217] Como se indica anteriormente, una manera útil de diseñar ddRNAi casetes de expresión de la invención es asumir Dicer corta cada 22 nucleótidos (también conocidos como phasing 22nt). Las secuencias de ADN que codifican secuencias efectoras pueden, por lo tanto, diseñarse para codificar cualquier 10 o más, y preferiblemente cualquier 17 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-27, junto con los espaciadores apropiados y otras secuencias - Condiciones para el promotor y/o terminador.

[0218] Las construcciones de ddRNAi se generarán con las siguientes estructuras (utilizando secuencias ejemplares no limitativas):

i) Casete de expresión de horquilla única

Como se mencionó anteriormente, la Figura 6 ilustra el casete de expresión, el agente de ARNi de horquilla expresado y la secuencia efectora teórica procesada por Dicer (suponiendo una fase de 22 nucleótidos) basada en la SEQ ID NO: 3 (Figura 6A), la SEQ ID NO: 9 (Figura 6B) y SEQ ID NO: 12 (Figura 6C), SEQ ID NO: 13 (Figura 6D) y SEQ ID NO: 23 (Figura 6E). En el casete de la Figura 6A y 6B, se codifican 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 3 y 9, respectivamente; en el casete de la Figura 6C a 6E, se codifican 21 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 12, 13 y 23, respectivamente. Las flechas en el agente RNAi de horquilla indican dónde se espera que corte Dicer para producir la secuencia efectora que se muestra debajo.

La secuencia de los casetes de expresión de las Figuras 6A a 6E ya se ha proporcionado anteriormente (SEQ ID NO: 28 a 32).

ii) Casete de expresión de horquilla múltiple

La Figura 7 ilustra el casete de expresión, el agente de ARNi de horquilla expresada (SEQ ID NO: 41 a 43 y la secuencia del efector teórico procesada por Dicer (asumiendo la eliminación de 22 nucleótidos) en función de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 cuando se disponen dentro del casete para dar lugar a la expresión de agentes RNAi de horquilla individuales (Figura 7A) o un único RNA que contiene los 3 agentes RNAi de horquilla antes del procesamiento (Figura 7B). SEQ ID NO: 1, 4 y 6 son iguales a los descritos anteriormente en relación con el casete de expresión de horquilla única. Los símbolos "э" y "(" en la horquilla agente ARNi indican donde se espera Dicer para cortar para producir la secuencia efectora se muestra debajo.

El casete de expresión de la Figura 7A tiene una secuencia de ADN de

TACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAAT
 TATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTT
 5 GGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGTCTCCCTTATCGTCAATCTTCA
 AGAGAAAGATTGACGATAAGGGAGATTTTTTTTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTA
 ATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATG
 10 CTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGA
 CGAAACACCGATAACTCTGTTGTCTCTTTCAAGAGAAGAGGACAACAGAGTTATC
 TTTTTTTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTT
 TAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGA
 15 TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGCCCCACCGCACGGAG
 GCCTTTTCAAGAGAAAGGCCTCCGTGCGGTGGGGTTTTTTTT (SEQ ID NO: 33).

En el casete de la Figura 7A, cada complemento efector está unido operativamente a una secuencia promotora, y la secuencia efectora correspondiente está unida operativamente a elementos o secuencias de terminación. En contraste, en el casete de expresión de la Figura 7B, el primer complemento del efector (compilación del efector 1) está operativamente vinculado a un promotor y el último efector (efector 6) está operativamente vinculado a un elemento o secuencia de terminación, las flechas indican los sitios anticipados para el procesamiento de Dicer. Este casete está diseñado para expresar una única molécula de ARN (SEQ ID NO: 44) y tiene una secuencia de ADN de

TACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAAT
 TATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTT
 30 GGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGTGTCTGTTGACAGTGAGCGTCT
 CCCTTATCGTCAATCTTCAAGAGAAAGATTGACGATAAGGGAGATGCCTACTGCCT
 35 CGGATTCTGCTGTTGACAGTGAGCGGTTGTCTCTCCCGCAAATACAAGAGATATT
 TGCGGGAGAGGACAACACTGCCTACTGCCTCGGATTCTGCTGTTGACAGTGAGCGCC
 CCACCGCACGGAGGCCTTCAAGAGAAAGGCCTCCGTGCGGTGGGGTGCTGTTGA
 40 CAGTGAGCGTTTTTTTT (SEQ ID NO: 34).

iii) Casete de expresión de horquilla larga

La Figura 8 ilustra el casete de expresión, el agente de ARNi de horquilla expresada (SEQ ID NO: 45) y la secuencia efectora teórica procesada por Dicer (suponiendo una eliminación de 22 nucleótidos) basada en (en este orden) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 4. En el casete de la Figura 8, se codifican 17 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 y 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 6 según los ejemplos anteriores, pero a diferencia de los casetes de las Figuras 7 y 8, solo 18 contiguos. Los nucleótidos de la SEQ ID NO: 4 están codificados para. Las flechas en el agente RNAi de horquilla indican dónde se espera que corte Dicer para producir la secuencia efectora que se muestra debajo. El casete de expresión de la Figura 8 tiene una secuencia de ADN de

TACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAAT
 TATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTT
 55 GGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGCTCCCTTATCGTCAATCTTCA
 CCCCACCGCACGGAGGCCTTCTGATGTCTCTCCCGCAAATACAAGAGATATTTG
 CGGGAGAGGACAACAGAAGGCCTCCGTGCGGTGGGGTGAAAGATTGACGATAAG
 60 GGAGATTTTTTTT (SEQ ID NO: 35).

Ejemplo 7: Evaluación de la efectividad de los agentes de ddRNAi *in vitro*

[0219] Para ensayar la eficacia de los agentes de ddRNAi, se pueden transfectar células y líneas celulares apropiadas con los agentes de ARN de la invención y se puede analizar la inhibición de la replicación del VHB.

5 [0220] Para analizar la eficacia de las construcciones de ddRNAi de la invención, los ADN plasmídicos se basan en el pGL3 Luciferase Reporter Vector fueron contruidos. El primero "pGL3 multi" contiene copias individuales de la
 10 secuencia en las regiones no traducidas 3'(UTR) de la luciferasa de luciérnaga que expresa el plásmido pGL3, que codifica los sitios diana para el ARNsi o ARNhc 3, 9, 12, 13 y 23, según la SEC ID. NOS: 3, 9, 12, 13 y 23 respectivamente. El segundo "pGL3-23" contiene una repetición triple de shRNA 23, basado en la SEQ ID NO: 23. Los sitios diana del VHB en estos plásmidos corresponden a las secuencias sensoriales del VHB reconocidas por
 15 siRNA o shRNA particulares e incluyen 10nts adicionales de secuencia de VHB en sentido ascendente y descendente de los sitios diana.

[0221] La siguiente información se refiere a los experimentos realizados utilizando el constructo pGL3-23.

15 [0222] Por conveniencia, decidimos realizar una prueba inicial utilizando pruebas de luciferasa dual con pruebas transitorias en células HEK293. Las células se colocaron en placas de 96 pocillos (0,1 ml de medio/pocillo) para alcanzar aproximadamente el 50% de confluencia antes de la transfección. Los ADN plasmídicos y los ARNsi sintetizados (o vectores de ARN shc) se cotransfectaron en células HEK293 con Lipofectamine™ 2000 utilizando el
 20 protocolo del fabricante (Invitrogen). Las construcciones de prueba se utilizaron junto con una construcción que expresaba luciferasa de *Renilla* (pRL-TK, Promega) que actúa como un control interno para la eficiencia de la transfección.

25 [0223] Si los siRNA sintetizados químicamente, o shRNA expresados a partir de vectores son efectivos para silenciar la secuencia diana, los niveles de luciferasa en las células transfectadas disminuirán ya que las secuencias diana están unidas operativamente al gen de la luciferasa.

30 [0224] Por consiguiente, diversas cantidades de siRNA sintetizados químicamente o vectores de expresión de shRNA se cotransfectaron con cantidades constantes de pGL3-23 y plásmidos de control (ver Tablas a continuación).

Tabla 5: Prueba de siRNA23 contra pGL3-23

pGL3-23 (ng)	pRL-TK (ng)	siRNA (pmol)		siNC (pmol)
20	2	siNC	0	10,0
		HBV-siRNA23	0,5	9,5
			1,0	9,0
			2,5	7,5
			5,0	5,0
			10,0	0,0
		siRNA-GL3	5,0	5,0

45 [0225] Las células fueron transfectadas con cantidades indicadas de plásmidos pGL3-23 y control (pRL-TK) y cantidades variables de siRNAs basado en SEQ ID NO: 23 (HBV-siRNA23). SiNC, un ARNip no relacionado sin
 50 secuencias diana conocidas en el VHB, se usó como control negativo y para ajustar las cantidades totales de ARNsi agregados a las células para evitar artefactos potenciales debido a una transfección desigual. siRNA GL3 se utilizó como control positivo, de modo que es un siRNA dirigido al gen de la luciferasa.

Tabla 6: Prueba de shRNA23 contra pGL3-23

pGL3-23 (ng)	pRL-TK (ng)	shRNA (ng)		pUC57 (ng)
20	2	pUC57	0	100
		HBV shRNA23	2	98
			5	95
			10	90
			20	80
			50	50
			100	0
		U6 shRNA-GL3	50	50

5 **[0226]** Las células fueron transfectadas con cantidades indicadas de plásmidos pGL3-23 y control (pRL-TK) y cantidades variables de plásmido de ensayo para la expresión de shRNA basado en SEQ ID NO: 23 (VHB shRNA23). El pUC57 se usó como control negativo y para ajustar las cantidades totales de ADN plasmídicos agregados a las células para evitar artefactos potenciales debido a la transfección desigual. Se utilizó un plásmido que expresaba un ARNsh de luciferasa basado en ARNsi de GL3 como control positivo.

10 **[0227]** Las muestras para la prueba se transfectaron en 4 pocillos individuales y de luciérnaga y *Renilla*. Las actividades de luciferasa se determinaron 48 h después de la transfección utilizando el Sistema Dual-Luciferase Assay (Promega) y un lector de microplacas de luminiscencia Synergy™ 2 (Biotek) de acuerdo con el protocolo del fabricante respectivo. Las proporciones de actividad de luciérnaga/*Renilla* se determinaron para cada pocillo, y la eficacia de inhibición de siRNA o shRNAs se calculó normalizando a los controles respectivos.

Resultados

15 **[0228]** Los gráficos de la Figura 10A y B muestran las actividades de luciferasa (+/- SD; n = 4) en células transfectadas con cantidades variables de síntesis química siRNA23 (A) o shRNA23 construcciones de expresión (B) de orientación pGL3-23 usando las condiciones de enumerados en las Tablas 5 y 6. Incluso en las concentraciones más bajas, el siRNA y el shRNA que se basan en la SEQ ID NO: 23 están regulados por disminución en relación con el control negativo (siNC o shNC, establecido arbitrariamente en 1).

20 **[0229]** El control de la luciferasa positiva siRNA y shRNA también se regularon hacia abajo niveles de expresión de luciferasa de pGL3-23.

Ejemplo 8: Evaluación de la efectividad de los agentes de ddRNAi *in vivo*

25 **[0230]** Hay disponibles modelos de ratón para el VHB, como los ratones NOD/SCID infectados por el VHB (Yang et al. 2002; Ketzinel-Gilad et al. 2006), así como líneas de ratones transgénicos que expresan el VHB, cualquiera o ambos podrían ser utilizado para estos experimentos.

30 **[0231]** La inyección de agentes de ddRNAi en las venas de la cola del ratón se utilizará para administrar los agentes al hígado. La inhibición de la replicación del VHB puede monitorizarse en varios puntos de tiempo utilizando los ensayos de qRT-PCR para determinar los niveles de ARNm pol de VHB en tejidos hepáticos o cuantificando los niveles de HBsAg y HBeAg circulantes en animales tratados con los agentes ddRNAi de la invención en comparación con los animales de control apropiados. tales como ratones inyectados con secuencias revueltas o ADN irrelevantes, como se describió anteriormente.

35 **[0232]** Constructos de expresión adecuados para la expresión estable de los agentes ddRNAi incluyen vectores lentivirales.

40 Ejemplo 9: prueba in vivo del candidato preclínico en un modelo de ratón normal

45 **[0233]** Un sistema de entrega previsto el ensayo in vivo del candidato preclínico en un modelo de ratón normal es AAV. Para AAV, las construcciones de ddRNAi se empaquetarán *in vitro* utilizando estrategias bien conocidas por los expertos en la técnica y se inyectarán por vía intravenosa en ratones NOD/SCID infectados con HBV y/o ratones transgénicos HBV. La inhibición de la replicación del VHB se controlará como se describe anteriormente.

50 **[0234]** Se entenderá que la invención descrita y definida en esta especificación se extiende a todas las combinaciones alternativas de dos o más de las características individuales mencionadas o evidentes a partir del texto o los dibujos. Todas estas combinaciones diferentes constituyen diversos aspectos alternativos de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un agente de interferencia de ARN dirigido por ADN (ddRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en uno o más genes del virus de la hepatitis B (VHB), comprendiendo el agente ddRNAi, en una dirección de 5' a 3':
- una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
 una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
 una segunda secuencia de complemento efectora; y
 10 una primera secuencia de complemento efectora;
- en donde cada secuencia efectora es al menos 85% complementaria a la transcripción predicha de una secuencia diana, y en donde al menos una de las secuencias efectoras comprende 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.
- 15 **2.** Un agente de interferencia de ARN dirigido por ADN (ddRNAi) para inhibir la expresión de una o más secuencias diana en uno o más genes del virus de la hepatitis B (HBV), el agente de ddRNAi que comprende, en una dirección de 5' a 3':
- 20 una primera secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud;
 una primera secuencia de complemento efectora;
 una segunda secuencia efectora de al menos 17 nucleótidos de longitud; y
 una segunda secuencia complementaria efectora;
- 25 en donde cada secuencia efectora es al menos 85% complementaria a la transcripción predicha de una secuencia diana, y en donde al menos una de las secuencias efectoras comprende 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.
- 30 **3.** El agente ddRNAi de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos una de las secuencias efectoras comprende 17 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.
- 4.** El agente ddRNAi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia efectora que comprende 10 o más nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9 es la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.
- 35 **5.** El agente ddRNAi según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una tercera secuencia efectora y una tercera secuencia complementaria efectora.
- 6.** El agente ddRNAi de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que al menos una de las otras secuencias efectoras se selecciona del grupo que consiste en 10 o más nucleótidos contiguos dentro de una secuencia establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 8 o 10 a 27.
- 40 **7.** El agente ddRNAi de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos una de las otras secuencias efectoras es una secuencia seleccionada de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 1 a 8 o 10 a 27.
- 45 **8.** El agente ddRNAi de acuerdo con la reivindicación 7, en el que al menos una de las otras secuencias efectoras es una secuencia seleccionada de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 3, 12, 13 y 23.
- 9.** Un casete de expresión de ddRNAi para expresar un agente de ddRNAi de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el casete de expresión:
- 50 una o más secuencias promotoras;
 una o más secuencias de ADN que codifican para una o más secuencias efectoras del agente ddRNAi de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;
 55 una o más secuencias de ADN que codifican una o más secuencias complementarias efectoras del agente ddRNAi según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;
 una o más secuencias terminadoras; y opcionalmente
 una o más secuencias de ADN que codifican secuencias de bucle; y opcionalmente una o más secuencias potenciadoras.
- 60 **10.** Una construcción de expresión de ddRNAi que comprende un casete de expresión de ddRNAi de acuerdo con la reivindicación 9.
- 11.** Un agente de ddRNAi de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un casete de expresión de ddRNAi de acuerdo con la reivindicación 9 o un constructo de expresión de ddRNAi de acuerdo con la reivindicación
- 65

10 para uso en el tratamiento de infección aguda o crónica por VHB en un sujeto o para uso en la reducción de la gravedad de los síntomas asociados con la infección por VHB en un sujeto.

5 **12.** Un agente de ddRNAi según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un casete de expresión de ddRNAi según la reivindicación 9 o un constructo de expresión de ddRNAi según la reivindicación 10 para uso en la reducción de la carga viral de VHB en un sujeto.

10 **13.** Un agente de ddRNAi según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un casete de expresión de ddRNAi según la reivindicación 9 o un constructo de expresión de ddRNAi según la reivindicación 10 para uso en la reducción de la infectividad del VHB en un sujeto.

15 **14.** Un agente de ddRNAi o un casete de expresión de ddRNAi o un constructo de expresión de ddRNAi para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el agente de ddRNAi o el casete de expresión de ddRNAi o el constructo de expresión de ddRNAi inhibe la expresión de al menos el gen de la polimerasa de HBV.

15. Una composición farmacéutica que comprende un agente de ddRNAi según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un casete de expresión de ddRNAi según la reivindicación 9 o un constructo de expresión de ddRNAi según la reivindicación 10 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20

Figura 1A

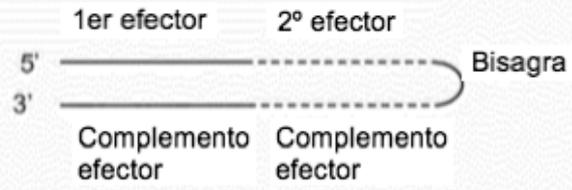


Figura 1B

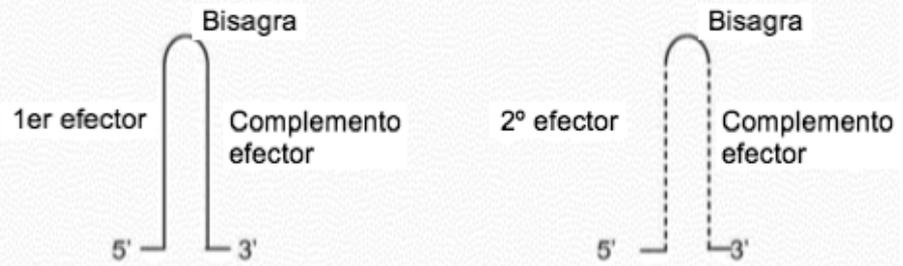


Figura 1C

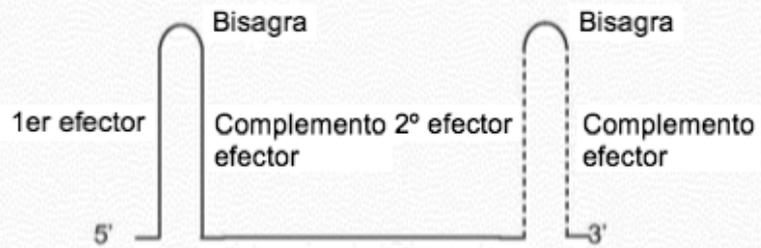


Figura 1D

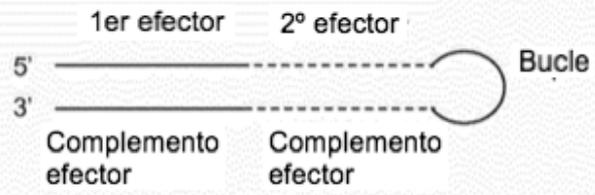


Figura 1E

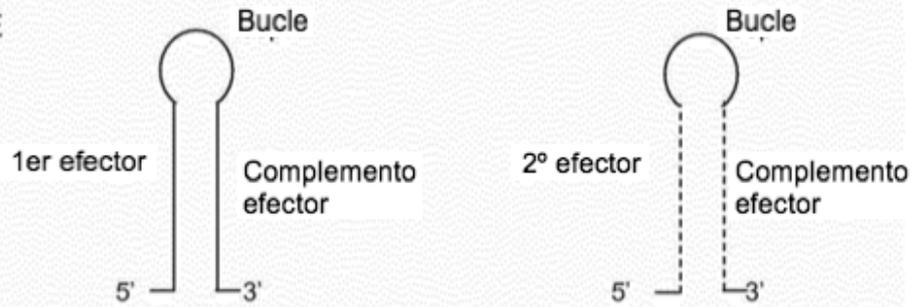
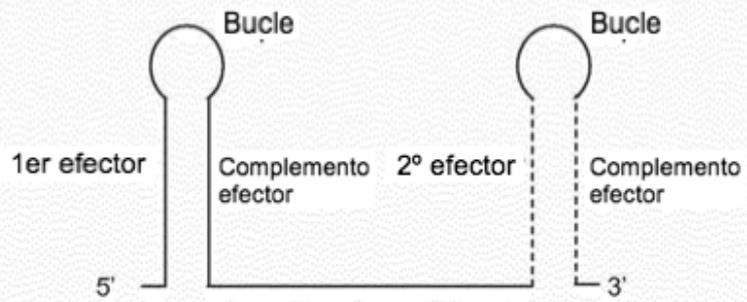
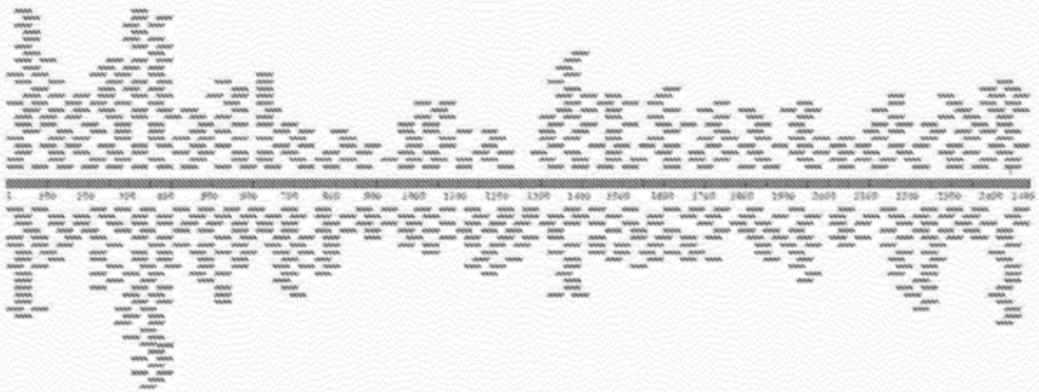


Figura 1F



Virus siRNA de hepatitis B
Dominio de polimerasa (2499bp):



Clones 642 Est

Figura 2

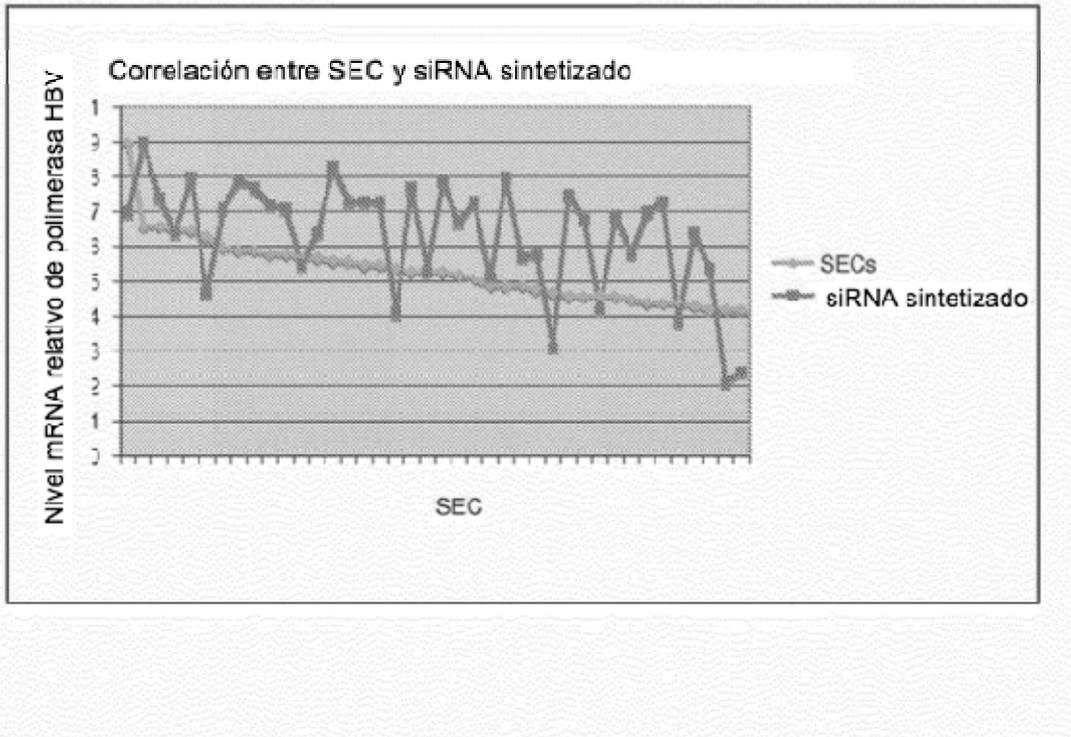


Figura 3

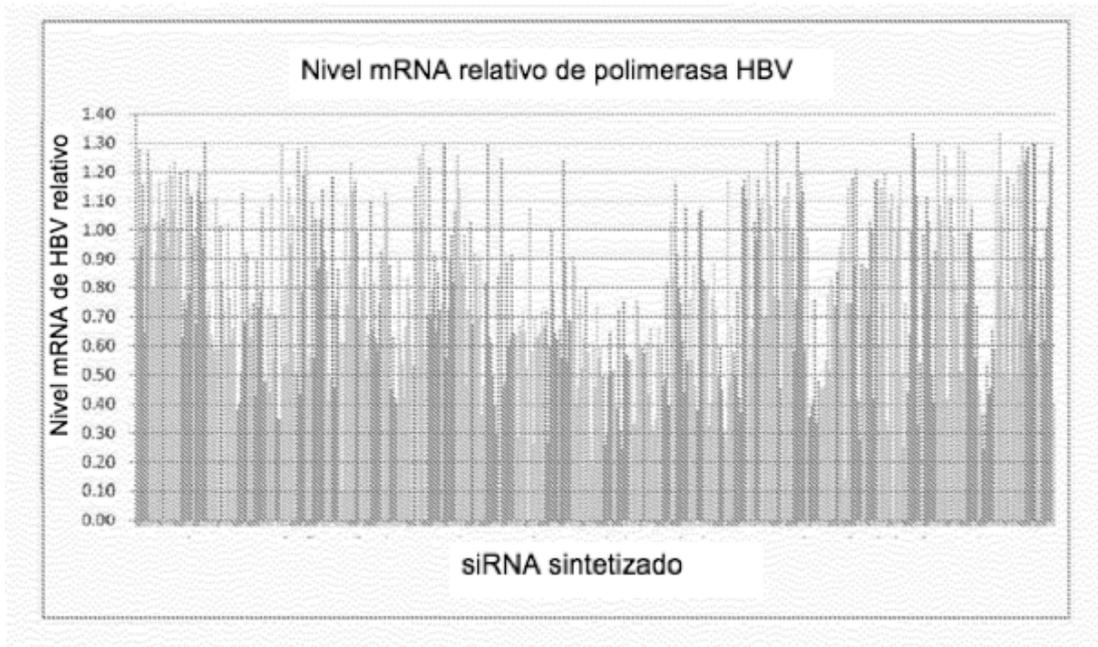


Figura 4

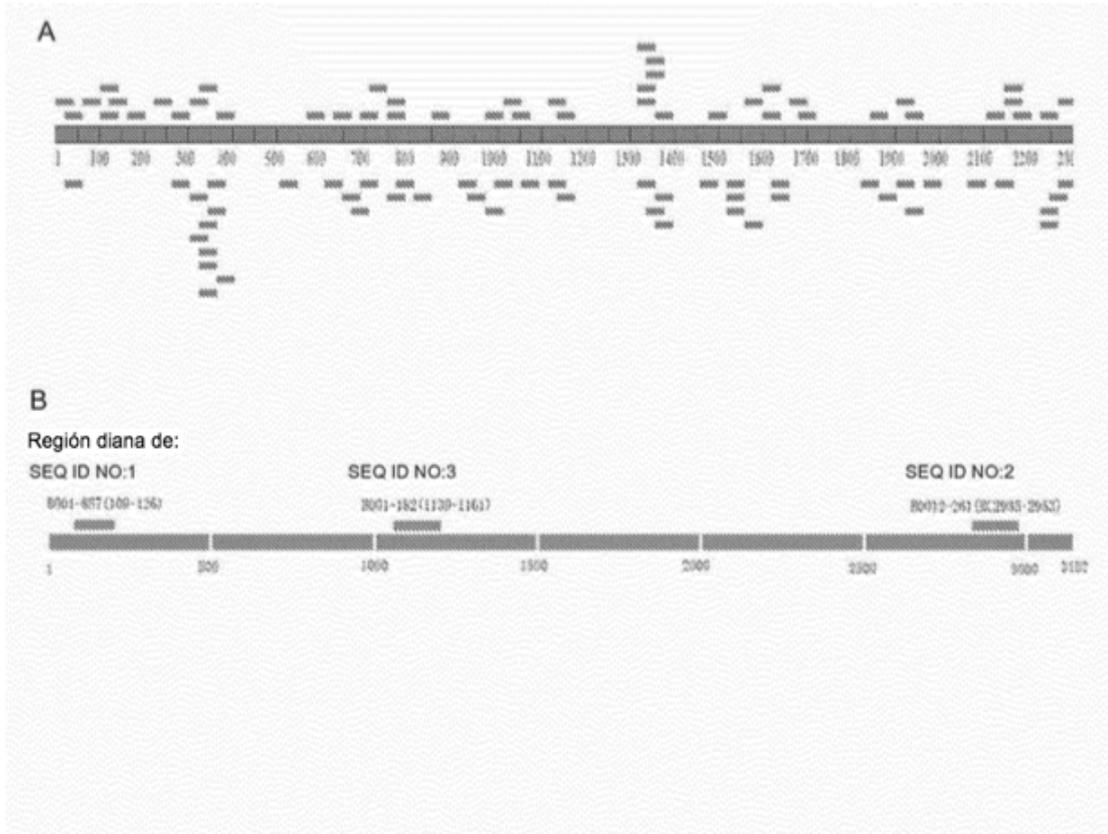
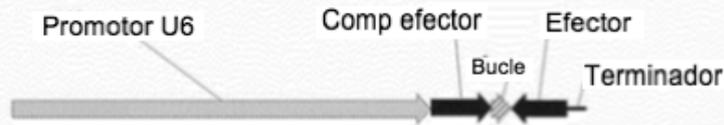


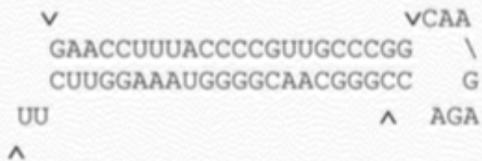
Figura 5

Casete de expresión - estructura general



Agente RNAi expresado (estructura de horquilla) y secuencia efectora procesada de hebra única (con fase 22nt):

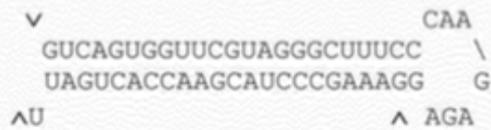
A) shRNA3 (SEQ ID NO: 36)



5'-GGGCAACGGGGUAAAGGUUCuu-3'

(SEQ ID NO:3 (4 a 23), con nucleótidos uu en el extremo 3')

B) shRNA 9 (SEQ ID NO: 37)



5'-AAAGCCCUACGAACCACUGAuu-3'

(SEQ ID NO:9(4 a 21), con nucleótidos GAuu en el extremo 3')

C) shRNA12 (SEQ ID NO: 38)



5'-AGGCCACUCCCAUAGGAAUU-3'

(SEQ ID NO:12(1 a 19), con nucleótidos 5' AG)

Figura 6

D) shRNA 13 (SEQ ID NO: 39)

```

                                vCAA
GCCAAACUCUGCAAGA UCC CAGA \
UGGUUUGAGACGUUCUAGGGUCU  G
^U                               ^ AGA
    
```

5'-UGGGAUCUUGCAGAGUUUGGUu-3'

(SEQ ID NO:13_(1 a 18), con nucleótidos UG en el extremo 3' y Uu en el extremo 3')

E) shRNA 23 (SEQ ID NO: 40)

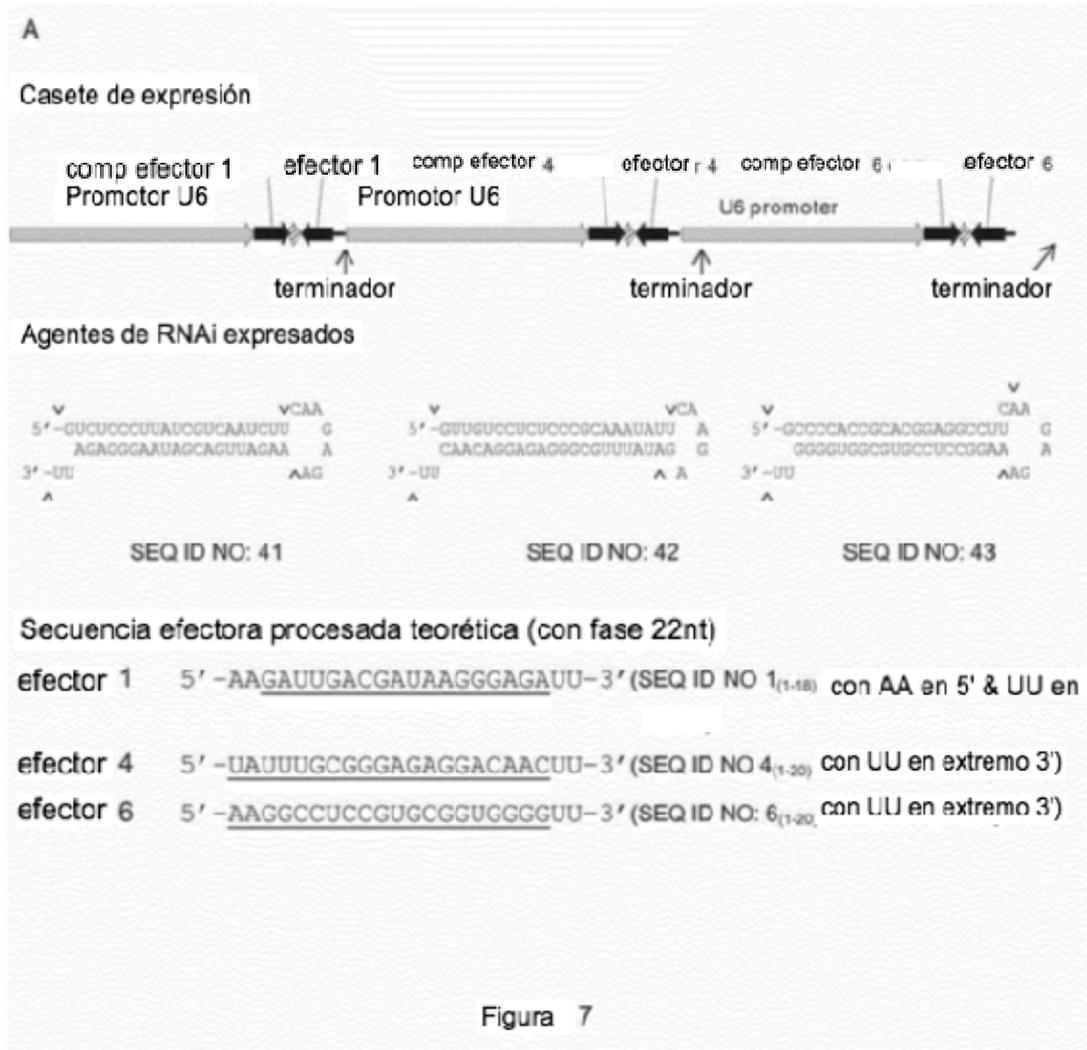
```

                                vCAA
GCUCUGUUGUCCUCUCCCGCAA \
UGAGACAACAGGAGAGGGCGUUU  G
^U                               ^ AGA
    
```

5'-UGCGGGAGAGGACAACAGAGUu-3'

(SEQ ID NO:23, con nucleótido u en el 3')

Figura 6 continuada



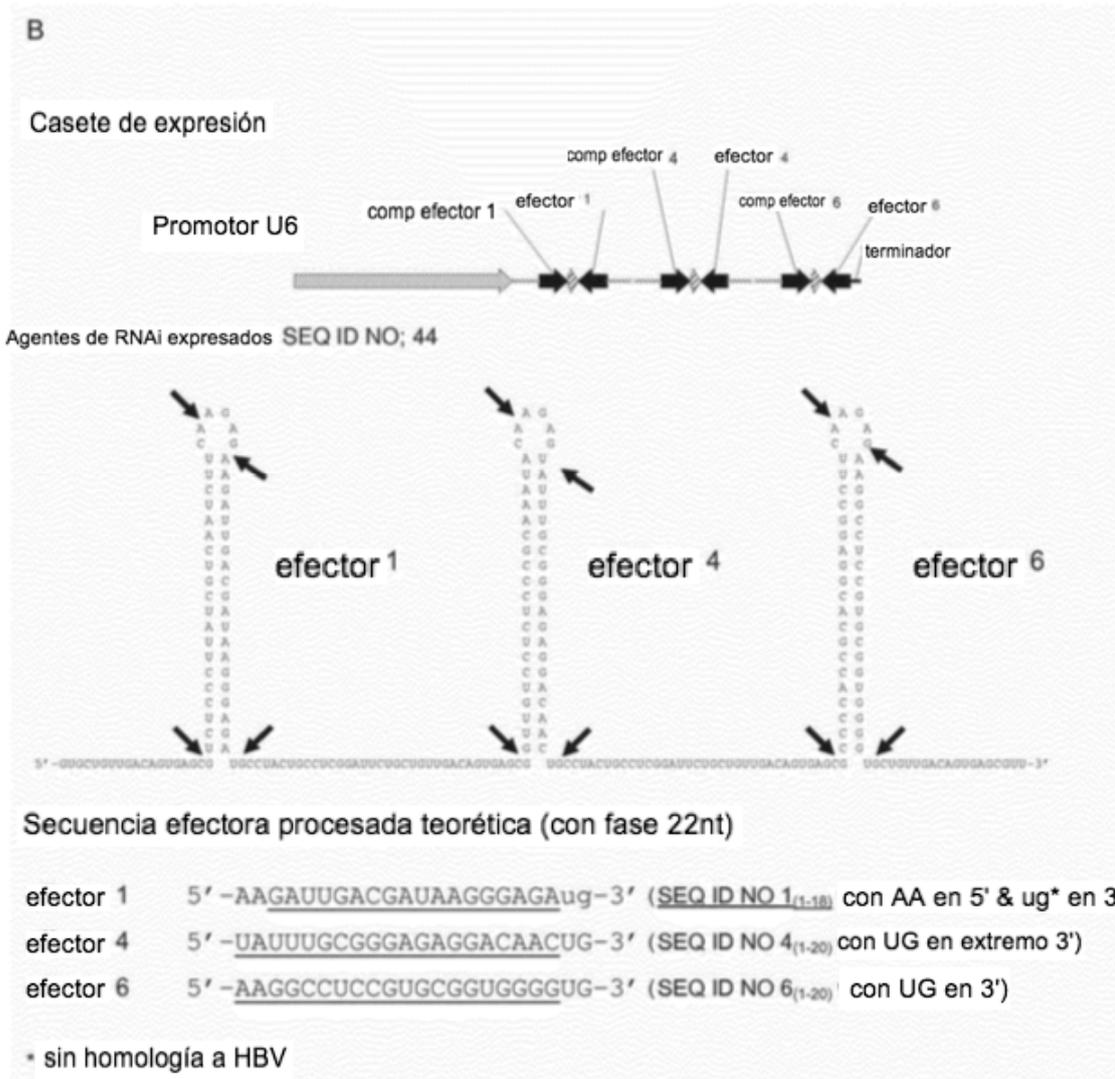
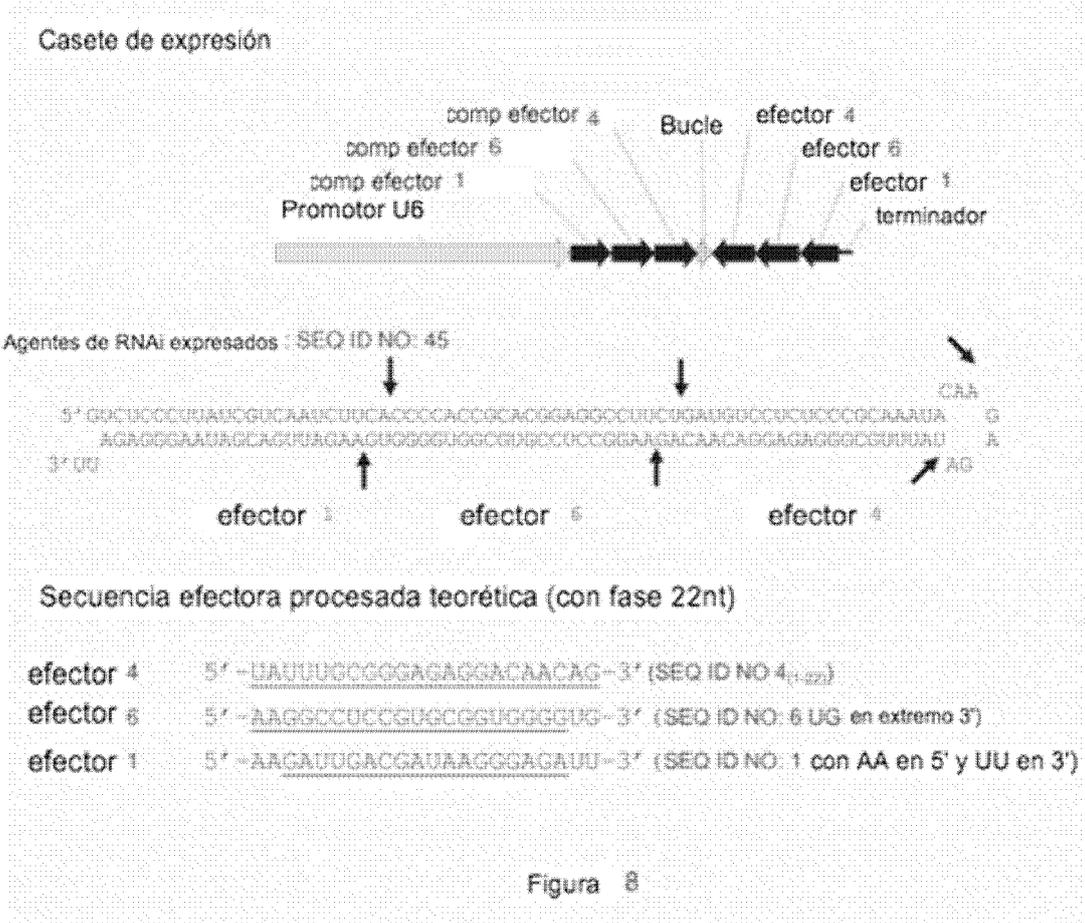


Figura 7 continuada



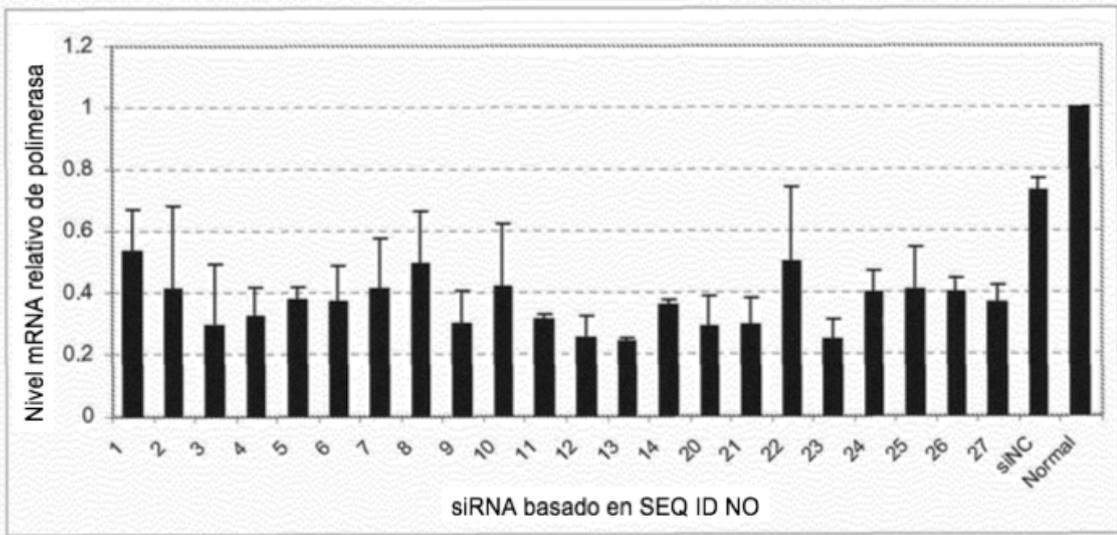


Figura 9

