

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 929 928**

51 Int. Cl.:

|                     |                              |           |
|---------------------|------------------------------|-----------|
| <b>A61K 45/00</b>   | (2006.01) <b>C12N 15/113</b> | (2010.01) |
| <b>A61K 31/4178</b> | (2006.01) <b>C12Q 1/68</b>   | (2008.01) |
| <b>A61K 31/7088</b> | (2006.01) <b>G01N 33/15</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 31/7105</b> | (2006.01) <b>G01N 33/50</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 31/713</b>  | (2006.01)                    |           |
| <b>A61K 45/06</b>   | (2006.01)                    |           |
| <b>A61K 48/00</b>   | (2006.01)                    |           |
| <b>A61P 31/12</b>   | (2006.01)                    |           |
| <b>A61P 43/00</b>   | (2006.01)                    |           |
| <b>C12N 15/09</b>   | (2006.01)                    |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2016 PCT/JP2016/082957**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17082202**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2016 E 16864163 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2022 EP 3395363**

54 Título: **Compuestos para usar en el tratamiento de afecciones relacionadas con el VHB y el VHC**

30 Prioridad:

**09.11.2015 JP 2015219183**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.12.2022**

73 Titular/es:

**PUROTECH BIO, INC. (100.0%)  
Ikeda Scientific Co., Ltd., 3 rd Floor 1-1-27  
Suehiro-cho  
Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, JP**

72 Inventor/es:

**HASHIMOTO, SHIN-ICHI;  
KANEKO, SHUICHI;  
HONDA, MASAO;  
SHIRASAKI, TAKAYOSHI y  
YAMASHITA, TARO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 929 928 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

Compuestos para usar en el tratamiento de afecciones relacionadas con el VHB y el VHC

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a compuestos para usar en el tratamiento de afecciones relacionadas con el VHB, así como a métodos de selección para aislar compuestos útiles en el tratamiento de afecciones relacionadas con el VHB.

10 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

**Antecedentes de la técnica**

15 Las enfermedades asociadas a infección viral, como la hepatitis viral, infección por gripe, infección por herpesvirus, SIDA y fiebre hemorrágica viral, son reconocidas como problemas médica y socialmente importantes. Para las enfermedades asociadas a la infección viral, se han estudiado ampliamente prevenciones mediante el uso de vacunas y similares, y terapias usando, por ejemplo, fármacos. No obstante, no se puede decir que tales vacunas y fármacos produzcan efectos suficientes, y además el esclarecimiento de sus mecanismos de acción *per se* puede ser difícil en algunos virus, por lo que aún no se puede iniciar el desarrollo de fármacos contra dichos virus. Además, dado que los rasgos de los virus son extremadamente diversos y los factores de transcripción, etc., involucrados en sus ciclos de vida también son variados, actualmente se están desarrollando fármacos para virus individuales.

25 El virus de la hepatitis B (en lo sucesivo abreviado como "VHB"), una de las causas de enfermedades asociadas a la infección por virus, se cree que afecta a más de 350 millones de personas en todo el mundo. El VHB causa hepatitis aguda o crónica después de la infección, y algunos de los casos de hepatitis progresan a cirrosis hepática o cáncer hepático. Actualmente, los interferones (IFN) y los análogos de nucleótidos se utilizan en el tratamiento de la hepatitis B causada por el VHB. No obstante, es difícil eliminar completamente el virus incluso en pacientes que reciben administración a largo plazo de dichos agentes y, además, existen problemas con los agentes, tales como la aparición de virus resistentes y exacerbaciones agudas en pacientes que reciben administración a largo plazo, aumento de la gravedad debido a la reagudización tras la finalización de la administración, y similares.

35 Después de que el VHB entra en un hepatocito, los genes virales se mueven hacia el núcleo del hepatocito y luego se convierten de ADN bicatenario circular incompleto en ADN circular covalentemente cerrado del virus de la hepatitis B (ADNccc del VHB). Se sabe que el ADNccc del VHB es ADN del VHB circular cerrado desnudo que está presente en el núcleo de los hepatocitos y actúa como un intermediario replicativo durante la replicación viral (Documento no de patente 1). En los hepatocitos, el ADNccc del VHB se comporta de la misma manera que el genoma humano y permanece en el núcleo. También se sabe que el ADNccc del VHB no se ve afectado directamente por un análogo de nucleótido antiviral y todavía permanece en los hepatocitos después de la terapia con análogos de nucleótidos. Es un hecho clínico que el genoma viral del VHB no puede eliminarse completamente de los hepatocitos con los agentes existentes y, por lo tanto, se cree que la curación radical de la infección por VHB es imposible (Documento no de patente 2).

45 Dado que el ADNccc del VHB tiene la propiedad de permanecer dentro de la célula después de la infección por VHB, ha llamado la atención en los últimos años como un marcador para la predicción del pronóstico a largo plazo de los fármacos antivirales y el grado de daño hepático. No obstante, aún no se ha dilucidado el mecanismo de retención del VHB después de la infección *in vivo*, y tampoco está claro el comportamiento del ADNccc del VHB. Como fármaco dirigido al ADNccc del VHB, se ha descrito una ADN nucleasa artificial que se dirige al propio ADNccc del VHB (Documento de patente 1).

50 Para la eliminación completa del VHB de los hepatocitos para prevenir o tratar la hepatitis B, existe una gran necesidad de dilucidar el mecanismo de retención del VHB, incluido el comportamiento del ADNccc y, por lo tanto, descubrir una o más moléculas nuevas que puedan ser una diana del fármaco anti-VHB.

**Documento(s) de la técnica anterior**

55

**Documento(s) de patente**

Documento de patente 1: JP 2015-002723 A

60 **Documento(s) no de patente**

Documento no de patente 1: Christoph Seeger, William S. Mason, Virology 479-480 (2015) 672.686

Documento no de patente 2: Tetsuya Ishikawa, "Recent topics on hepatitis B", Kenko Bunka N.º 47 (publicado en octubre de 2012) (<http://www.kenkobunka.jp/kenbun/kb47.html>)

65

## Sumario de la invención

Como resultado de estudios intensivos, los presentes inventores se centraron en los hechos de que los genes DOCK11, LIPG, DENND2A y HECW2 se expresan específicamente en hepatocitos positivos para el ARNm del VHB, y que la supresión de la expresión de estos genes disminuye la cantidad de ADNccc del VHB en los hepatocitos, y que estos genes pueden estar involucrados en los mecanismos de infección y proliferación de los virus en general, descubriendo que las sustancias capaces de suprimir la expresión o la actividad de las proteínas codificadas por estos genes pueden usarse como fármacos antivirales, completando de esta forma la presente invención.

La presente invención es como se expone en las reivindicaciones.

## Efecto de la invención

Se cree que el fármaco antiviral de la presente invención tiene un mecanismo de acción diferente al de los fármacos antivirales convencionales y actúa sobre la ruta de transporte a los núcleos después de que el virus atraviesa la membrana en la superficie de las células hospedadoras. Por consiguiente, se contempla que el fármaco antiviral de la presente invención muestre un efecto antiviral no sólo sobre el VHB sino también sobre varios virus. Asimismo, se contempla que el fármaco antiviral de la presente invención ejerza un efecto antiviral sinérgicamente en combinación con un fármaco antiviral convencional. Además, usando el gen diana de la presente invención como indicador, se puede seleccionar un fármaco antiviral basado en un mecanismo novedoso.

El fármaco antiviral de la presente invención puede reducir en gran medida la cantidad de ADNccc del VHB en los hepatocitos, por ejemplo, en comparación con los inhibidores de crecimiento convencionales para el virus de la hepatitis B, y también puede eliminarlo por completo. Además, el fármaco antiviral de la presente invención se puede usar en combinación con un inhibidor de crecimiento convencional para el virus de la hepatitis B para eliminar sinérgicamente el ADNccc del VHB y prevenir la reactivación del VHB. Por consiguiente, se contempla que el fármaco antiviral de la presente invención pueda contribuir a la curación completa de la infección por VHB.

## Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de la investigación de los efectos de varios ARNhc contra el gen DOCK11 introducido en células de hepatoma infectadas con el VHB en: el nivel de expresión del gen DOCK11 (A); la cantidad de ADN del VHB (B); y la cantidad de ADNccc del VHB (C). En el panel (A), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel de control como 1. (Ejemplo 2)

La Figura 2 muestra los resultados de la investigación de los efectos de varios ARNhc contra DENND2A introducido en células de hepatoma infectadas con el VHB en: el nivel de expresión del gen DENND2A (A); la cantidad de ADN del VHB (B); y la cantidad de ADNccc del VHB (C). En el panel (A), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel de control como 1. (Ejemplo 2)

La Figura 3 muestra los resultados de la investigación de los efectos de varios ARNhc contra el gen LIPG introducido en células de hepatoma infectadas con el VHB en: el nivel de expresión del gen LIPG (A); la cantidad de ADN del VHB (B); y la cantidad de ADNccc del VHB (C). En el panel (A), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel de control como 1. (Ejemplo 2)

La Figura 4 muestra los resultados de la investigación de los efectos de varios ARNhc contra el gen HECW2 introducido en células de hepatoma infectadas con el VHB en: el nivel de expresión del gen HECW2 (A); la cantidad de ADN del VHB (B); y la cantidad de ADNccc del VHB (C). En el panel (A), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel de control como 1. (Ejemplo 2)

La Figura 5 muestra los efectos de la introducción de un ARNhc contra el gen DOCK11 en: la cantidad de ADN del VHB (A); la cantidad de ADNccc del VHB (B); y el nivel de expresión del ARN pregenómico (en lo sucesivo denominado simplemente "ARN pg", que también se denomina "ARN preg") (C), que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos. En el panel (C), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel de control como 1. (Ejemplo 3)

La Figura 6 muestra los efectos de la introducción de un ARNhc contra el gen DENND2A en: la cantidad de ADN del VHB (A); la cantidad de ADNccc del VHB (B); y el nivel de expresión del ARN pg (C), que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos. En el panel (C), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel de control como 1. (Ejemplo 3)

La Figura 7 muestra los efectos de la introducción de un ARNhc contra el gen LIPG en: la cantidad de ADN del VHB (A); la cantidad de ADNccc del VHB (B); y el nivel de expresión del ARN pg (C), que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos. En el panel (C), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel de control como 1. (Ejemplo 3)

La Figura 8 muestra los efectos de la introducción de un ARNhc contra el gen HECW2 en: la cantidad de ADN del VHB (A); la cantidad de ADNccc del VHB (B); y el nivel de expresión del ARN pg (C), que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos. En el panel (C), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel de control como 1. (Ejemplo 3)

La Figura 9 muestra los efectos de la introducción de un ARNhc contra el gen DOCK11 en: el nivel de expresión del gen DOCK11 (A); la cantidad de ADNccc del VHB (B); y el nivel de expresión de ARNpg (C), que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos, en el que los hepatocitos se cultivaron durante un tiempo prolongado después de la introducción del ARNhc. En los paneles (A) y (C), los niveles de expresión se

expresan como valores relativos tomando el nivel en los hepatocitos infectados por VHB (cont. 1) en cada panel como 1. (Ejemplo 4)

La Figura 10 muestra los efectos de la introducción de un ARNhc contra el gen DENND2A en: el nivel de expresión del gen DENND2A (A); la cantidad de ADNccc del VHB (B); y el nivel de expresión del ARN pg (C), que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos, en el que los hepatocitos se cultivaron durante un tiempo prolongado después de la introducción del ARNhc. En los paneles (A) y (C), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel en los hepatocitos infectados por VHB (cont. 1) en cada panel como 1. (Ejemplo 4)

La Figura 11 muestra los efectos de la introducción de un ARNhc contra el gen LIPG en: el nivel de expresión del gen LIPG (A); la cantidad de ADNccc del VHB (B); y el nivel de expresión del ARN pg (C), que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos, en el que los hepatocitos se cultivaron durante un tiempo prolongado después de la introducción del ARNhc. En los paneles (A) y (C), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel en los hepatocitos infectados por VHB (cont. 1) en cada panel como 1. (Ejemplo 4)

La Figura 12 muestra los efectos de la introducción de un ARNhc contra el gen HECW2 en: el nivel de expresión del gen HECW2 (A); la cantidad de ADNccc del VHB (B); y el nivel de expresión del ARN pg (C), que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos, en el que los hepatocitos se cultivaron durante un tiempo prolongado después de la introducción del ARNhc. En los paneles (A) y (C), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel en los hepatocitos infectados por VHB (cont. 1) en cada panel como 1. (Ejemplo 4)

La Figura 13 muestra los resultados de medir la cantidad de ADNccc del VHB en células de hepatoma positivas para VHB (células KM) cuando se pasan 10 veces y cuando se pasan 32 veces. (Ejemplo de Referencia 1-2)

La Figura 14 muestra los efectos del silenciamiento del gen DOCK11 mediante la edición del genoma en: la cantidad de ADN del VHB (A); la cantidad de ADNccc del VHB (B); y el nivel de expresión del ARN pg (C), que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos. En el panel (C), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel de control como 1. (Ejemplo 5)

La Figura 15 muestra los efectos de la introducción de un ARNhc contra el gen DOCK11 en: el nivel de expresión del gen DOCK11 (A); la cantidad de ADNccc del VHB (B); y el nivel de expresión del ARN pg (C), que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos, en el que el ARNhc se introdujo después de la infección por VHB y los hepatocitos se cultivaron durante un tiempo prolongado después de la introducción del ARNhc. En los paneles (A) y (C), los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel de control (sh cont) en cada panel como 1. (Ejemplo 6)

La Figura 16 representa imágenes que muestran la localización de proteínas individuales investigadas por inmunotinción indirecta en una línea celular de carcinoma hepatocelular humano establecida a partir de un paciente positivo para hepatitis B con carcinoma hepatocelular. (Ejemplo 7)

La Figura 17 muestra los efectos de la introducción de ARNhc contra el gen DOCK11 y el posterior cultivo en: el nivel de expresión del gen DOCK11 (A); y la cantidad relativa de VHC (B), que se investigaron utilizando un sistema de infección por virus de la hepatitis C (VHC) en hepatocitos humanos. Los niveles de expresión se expresan como valores relativos tomando el nivel de control (Cont ARNhc) como 1. (Ejemplo 8)

La Figura 18 representa un diagrama que muestra una biblioteca de pirrol-imidazol poliamidas que se unen al ADN de manera selectiva de la secuencia.

La Figura 19 ilustra pirrol-imidazol poliamidas que pueden actuar como una sustancia capaz de suprimir la expresión o actividad de la proteína codificada por el gen diana de la presente invención.

La Figura 20 muestra los efectos del tratamiento con un inhibidor de LIPG sobre la cantidad de ADN del VHB y la cantidad de ADNccc del VHB, que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos. (Ejemplo de referencia 10) La Figura 21 muestra los efectos de la introducción de un ARNhc contra el gen Cdc42 en: la cantidad de ADN del VHB (A); y la cantidad de ADNccc del VHB (B), que se investigaron utilizando un sistema de infección por VHB en hepatocitos humanos. (Ejemplo de referencia 11)

La Figura 22 muestra el comportamiento de la nucleoproteína del virus de la gripe en células en las que se introdujo ARNhc contra el gen DOCK11 o Cdc42, que se investigó usando un sistema de infección de una línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 infectada con el virus de la gripe. (Ejemplo de referencia 12)

## Modo para realizar la invención

En primer lugar, los antecedentes de la realización de la presente invención se describirán a continuación.

Los presentes inventores han confirmado sorprendentemente que algunas células en una línea celular de carcinoma hepatocelular humano (CHC) establecida a partir de un paciente positivo para hepatitis B con carcinoma hepatocelular expresaban ARNm del VHB. Las células cultivadas que expresan ARNm del VHB establecidas hasta ahora se han preparado mediante infección transitoria con VHB de tipos limitados de células que puede infectar el VHB, y no existen modelos celulares que permitan una infección persistente. Por lo tanto, no se ha creído que las células que expresan ARNm del VHB pudieran establecerse como una línea celular a partir de cuerpos vivos. En la línea celular confirmada por los presentes inventores, aunque el número de células positivas para ARNm del VHB disminuye con los pases, mostrando unas pocas células positividad para el VHB, el ARNm aún permanecen después del subcultivo. Los

presentes inventores pensaron que un mecanismo para retener el ARNm del VHB podría estar funcionando en estas células positivas para ARNm del VHB, y que la investigación de las células positivas para ARNm del VHB podría conducir a la identificación del gen implicado en la retención del ARNm del VHB. Como resultado del análisis de las células de carcinoma hepatocelular humano establecidas a partir de un paciente positivo para hepatitis B con carcinoma hepatocelular, utilizando el método de análisis de expresión génica de una sola célula integral establecido por los presentes inventores (PCT/JP2015/60841), se confirmó que solo una célula entre aproximadamente 3.000 células expresó ARNm de VHB y que esta célula positiva para ARNm de VHB expresó altas cantidades de los genes DENND2A, LIPG, Dock11 y HECW2 en comparación con otras células. Además, mediante la introducción de ARNhc capaz de suprimir la expresión de estos genes diana en las células infectadas por el VHB, las cantidades de ADN del VHB y ADNccc del VHB disminuyeron drásticamente. Además, el ARNhc contra cada uno de los genes en combinación con entecavir redujo sinérgicamente las cantidades de ADN del VHB y ADNccc. De particular interés es que el uso combinado de ARNhc para el gen DENND2A o el gen Dock11 con entecavir redujo la cantidad de ADNccc a un nivel por debajo del límite de detección en cultivos a corto plazo, y que en cultivos a largo plazo durante 3 semanas, cada uno de los cuatro genes redujo la cantidad de ADNccc a un nivel por debajo del límite de detección cuando se usó solo. Estos resultados indican la posibilidad de que los genes LIPG, HECW2, DENND2A y Dock11 tengan una función importante para retener la latencia del VHB en las células, y se pensó que las sustancias que suprimen estos genes o sus proteínas podrían convertirse en nuevos fármacos anti-VHB.

Dado que los genes diana de la presente invención codifican proteínas tales como una proteína implicada en el citoesqueleto o una proteína que interactúa con la familia Rab funcionando como organizador de membrana, se prevé que los genes diana en la presente invención se convertirán en genes diana para fármacos antivirales no sólo contra el VHB sino también contra los virus en general. Los ejemplos de los virus incluyen el VHC y el virus de la gripe como se muestra en los Ejemplos. Por lo tanto, un fármaco que actúa sobre el gen diana en la presente invención puede seleccionarse como fármaco antiviral mediante cribado. El fármaco que actúa sobre el gen diana tiene la acción de suprimir la expresión del gen diana o la actividad de la proteína codificada por el gen diana. La supresión de la expresión del gen diana implica la inhibición del proceso en el que el gen diana expresa una proteína que codifica. Dado que se cree que la proteína codificada por el gen diana en la presente invención afecta a una actividad enzimática específica, el cribado de un fármaco que actúa sobre el gen diana se puede realizar fácilmente midiendo la actividad enzimática. Por ejemplo, ya que LIPG tiene una actividad enzimática, el cribado de un fármaco que actúa sobre el gen LIPG se puede realizar fácilmente midiendo la actividad enzimática.

El fármaco antiviral de la presente invención es un fármaco dirigido a un gen que tiene la acción de retener el ácido nucleico derivado del virus en una célula hospedadora y que contiene, como un principio activo, una sustancia capaz de suprimir la expresión del gen diana o la actividad de la proteína codificada por el gen diana. El gen diana es preferentemente uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en el gen DOCK11, gen LIPG, gen DENND2A, y gen HECW2. El gen que tiene la acción de retener el ácido nucleico derivado del virus en una célula hospedadora no es un gen derivado del genoma viral, sino un gen derivado del genoma de la célula hospedadora. Se cree que algún tipo de factores en la célula hospedadora están involucrados en la retención del virus en la célula hospedadora, además de la actividad y función del propio virus. El fármaco antiviral de la presente invención se dirige a uno o varios factores de este tipo en una célula hospedadora.

El fármaco antiviral de la presente invención tiene una acción antiviral. La acción antiviral significa una acción de supresión o inhibición de, por ejemplo, la infección vírica, la replicación, la producción de partículas y la reinfección. En concreto, el fármaco antiviral de la presente invención ejerce sus efectos para disminuir la cantidad de ADN viral en las células hospedadoras. Por ejemplo, por el hecho de que el fármaco antiviral de la presente invención ejerce un efecto de disminución de la cantidad de ADN del VHB, particularmente la cantidad de ADNccc del VHB, en los hepatocitos cuando se utiliza como fármaco anti-VHB, se cree que el fármaco afecta a la captación del ADN bicatenario circular incompleto del VHB en el núcleo de los hepatocitos y la estabilidad del ADNccc en el núcleo. No se han descrito fármacos antivirales que puedan ejercer el efecto de disminuir la cantidad de ADN viral al dirigirse a genes en las células hospedadoras. Tampoco se han descrito fármacos anti-VHB que puedan ejercer el efecto de disminuir la cantidad de ADNccc en el núcleo al dirigirse a genes en los hepatocitos. El fármaco antiviral de la presente invención ejerce su acción antiviral a través de un mecanismo novedoso. Dado que el fármaco antiviral de la presente invención se basa en un mecanismo novedoso, se puede usar en combinación con otros inhibidores del crecimiento viral para eliminar los virus con mayor eficacia. Por ejemplo, entecavir, un inhibidor del crecimiento del virus de la hepatitis B convencional, inhibe la producción de partículas de VHB al inhibir la transcripción inversa a ADN de cadena negativa que ocurre después de la transcripción de ADNccc a ARNm y la posterior generación de partículas centrales. Cuando el fármaco antiviral de la presente invención se utiliza como fármaco anti-VHB, se puede utilizar en combinación con otro(s) inhibidor(es) del crecimiento del virus de la hepatitis B, como entecavir, para eliminar el VHB con mayor eficacia.

En el ciclo de vida del VHB, el VHB primero interactúa con el proteoglicano sulfato de heparán (HSPG) en la superficie de la célula hepática y se une a la superficie celular para penetrar en la célula por endocitosis. Se sabe que el NTCP (polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio) presente en el lado basolateral de las células hepáticas actúa como un receptor para la entrada del VHB. Para la infección por VHB, hay sistemas independientes y dependientes de NTCP. Después de la entrada del VHB en las células, la membrana del VHB se fusiona con la membrana endosómica después de la maduración de los endosomas (vesículas), para liberar nucleocápsides compuestas por genoma viral y cápside que empaqueta el genoma en el citoplasma. Se cree que las nucleocápsides se transportan

dentro de la célula usando microtúbulos del citoesqueleto y entran al núcleo a través de la interacción con proteínas motoras. Al llegar a los complejos de poros nucleares, las nucleocápsides envían el ADN del VHB y la polimerasa del VHB al núcleo. Dentro del núcleo, el ADN circular relajado (ADNcr) se convierte en ADNccc, que luego sirve como plantilla para la transcripción (Journal of Gastroenterology and Hepatology, 31: 302-309 (2016). Doi: 10.1111/jgh.13175). Se cree que el mecanismo es común a todos los virus, en los que, después de la entrada del virus en una célula hospedadora, el genoma del virus se transporta dentro de la célula por medio del citoesqueleto, como los microtúbulos, y entra en el núcleo. Dado que las proteínas codificadas por los genes diana en la presente invención se relacionan con el citoesqueleto, se cree que el fármaco antiviral de la presente invención actúa sobre el transporte del virus desde la membrana celular hasta el núcleo y ejerce el efecto no sólo sobre el VHB sino sobre varios virus.

La aplicación del fármaco antiviral de la presente invención incluye usos *in vivo* y *ex vivo* y el aspecto del uso *in vivo* se describirá más adelante como una "composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención". El fármaco antiviral de la presente invención se puede administrar a cualquier animal que los virus puedan infectar. Por ejemplo, el fármaco antiviral se puede administrar a mamíferos humanos y no humanos como monos, ratón, rata, perro, conejo, bovinos y equinos, y en particular, se administra preferentemente a seres humanos. Los métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia no forman parte de la presente invención.

Los virus a los que se dirige el fármaco antiviral de la presente invención son el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C. Entre ellos, el virus de la hepatitis B es el más preferido.

DOCK11 (dedicador de citocinesis 11) es un gen que tiene la secuencia de bases que se muestra en el número de acceso de GenBank NM\_144658. El gen DOCK11 es un miembro de la familia Dock y se cree que tiene una función como factor de intercambio de guanil nucleótidos dirigido a la familia Rho GTPasa. La función del gen DOCK11 se puede confirmar midiendo la actividad de la Rho GTPasa diana. Se sabe que la familia Rho GTPasa tiene una acción de control del citoesqueleto. También se sabe que DOCK11 interactúa con Cdc42, y también es posible utilizar la acción y el fenotipo de Cdc42 como indicador. (J. Chem. Biol., 281: 35253-35262 (2006) y J. Chem. Biol., 286: 25341-25351 (2011))

El gen DENND2A (dominio DENN/MADD que contiene 2A) tiene la secuencia de bases que se muestra en el número de acceso de GenBank NM\_144658. El gen DENND2A codifica una proteína que contiene un dominio DENN/MADD en su lado C-terminal, y se cree que tiene una función como factor de intercambio de guanil nucleótidos que actúa específicamente sobre Rab. La función del gen DENND2A también se puede confirmar utilizando la función de Rab, que es una diana de este gen, como indicador. Rab es una proteína G pequeña que pertenece a la superfamilia Ras. Se sabe que las pequeñas G pequeñas que pertenecen a la superfamilia Ras regulan las vías de transporte en una célula y se cree que están involucradas en, por ejemplo, la formación de vesículas, la migración de vesículas y orgánulos, y la unión de vesículas a dianas (Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2, 107-117 (2001)).

El gen LIPG (lipasa, endotelial) tiene la secuencia de bases que se muestra en el número de acceso de GenBank NM\_006033. Se sabe que la lipasa endotelial vascular codificada por el gen LIPG es una enzima que hidroxila las HDL y otras lipoproteínas y que está distribuida ampliamente en el organismo.

El gen HECW2 (dominio HECT, C2 y WW que contiene la E3 ubiquitina proteína ligasa 2) tiene la secuencia de bases que se muestra en el número de acceso de GenBank NM\_020760. El gen HECW2 también se conoce como gen NEDL2. La proteína codificada por el gen HECW2 tiene actividad ligasa y se cree que actúa como una ubiquitina transferasa.

El fármaco antiviral de la presente invención puede comprender como principio activo una o más sustancias capaces de suprimir la expresión del gen diana o la actividad de la proteína codificada por el gen diana. El principio activo no está particularmente limitado siempre que pueda suprimir la expresión del gen diana o la actividad de la proteína codificada por el gen diana. La expresión "suprimir la expresión del gen diana o la actividad de la proteína codificada por el gen diana" es sinónimo de suprimir la expresión o actividad de la proteína codificada por el gen diana. La expresión "supresión de la expresión o actividad de la proteína" se refiere a cualquier aspecto en el que se suprime (o inhibe) la expresión funcional de la proteína e incluye, pero sin limitación, la supresión de la actividad (función) de la proteína, y la supresión de la expresión de la proteína (por ejemplo, supresión de la expresión génica, incluida la supresión de la transcripción del gen que codifica la proteína y la supresión de la traducción a la proteína).

Los aspectos en los que se suprime la actividad de la proteína incluyen, pero sin limitación, inhibición de la unión entre un receptor de proteína y un ligando o una molécula asociada, inhibición de la interacción entre proteínas intracelulares, inhibición de la activación de la proteína e inhibición de la actividad enzimática de la proteína. El fármaco antiviral de la presente invención puede ser un fármaco que inhiba la interacción entre la proteína codificada por el gen diana y un gen específico o una molécula tal como una proteína. El gen o proteína específico o similar puede ser uno que se haya revelado que interactúa con la proteína codificada por el gen diana, o puede ser uno que se confirmará con el que interactuará en el futuro.

El principio activo del fármaco antiviral de la presente invención es uno o más compuestos capaces de suprimir la expresión de la proteína codificada por el gen diana, como se expone en las reivindicaciones.

Ejemplos de compuestos capaces de suprimir la expresión de la proteína codificada por el gen diana incluyen ácidos nucleicos que pueden suprimir la expresión de la proteína codificada por el gen diana, como se expone en las reivindicaciones. Dichos ácidos nucleicos pueden suprimir la expresión o actividad de la proteína codificada por el gen diana mediante el reconocimiento de una secuencia de bases seleccionada de cualquiera de las siguientes:

- 5 - CCAACAGGGTGCTTACATATT (SEQ ID NO: 36)
- GTACTAGACACCATATCATTT (SEQ ID NO: 37)
- ACTAAATGAGCGGCTAATTAA (SEQ ID NO: 38)
- TGATGGCCATAACCCATTAAT (SEQ ID NO: 39)
- 10 - CCAGGCTACTTGAATCTGAAT (SEQ ID NO: 40)
- CTGAAGGGACTAGGCAATAAA (SEQ ID NO: 41)
- CCAATGAAGGAGAACCCTTAT (SEQ ID NO: 42)
- CCTAGTGCAGCCCTATTCTTT (SEQ ID NO: 43)
- CTAGTGCAGCCCTATTCTTTA (SEQ ID NO: 44)
- 15 - ACGATGTCTTGGGATCAATTG (SEQ ID NO: 45)
- ATGCAGGCAACTTCGTGAAAG (SEQ ID NO: 46)
- CCGTTGTAATAGCATTGGCTA (SEQ ID NO: 47)
- CGTCACCCTTTATGGCACTAA (SEQ ID NO: 48)
- TTACACGGATGCGGTCAATAA (SEQ ID NO: 49)
- 20 - GCCCAAACATTTCTTTGAGAT (SEQ ID NO: 50)
- CCAGGGAAGTTAAAGTTAATT (SEQ ID NO: 51)
- GCACAATACTTGGAGTCAATT (SEQ ID NO: 52)
- GCTTACAATGACAAGATTGTT (SEQ ID NO: 53)
- CCCTTATCTTAAGATGTCAAT (SEQ ID NO: 54)
- 25 - una secuencia de bases obtenida por sustitución, delección, adición y/o inserción de una a varias (preferentemente 5 o menos, más preferentemente 2 o menos) bases en una cualquiera de las secuencias de bases de los SEQ ID NO descritos anteriormente: 36 a 54.

El ácido nucleico descrito anteriormente capaz de suprimir la expresión de la proteína codificada por el gen diana incluye, pero sin limitación, moléculas de ARN que tienen una acción de interferencia de ARN (acción que se considera que se basa en la destrucción específica del ARNm derivado del gen diana), específicamente oligonucleótidos antisentido, ARNhc, ARNpi y ARNbc contra el gen diana o el producto de transcripción del mismo. El oligonucleótido antisentido es una molécula de ADN o ARN de cadena sencilla complementaria a la secuencia diana, y se une al ADN o ARN complementario para inhibir su expresión.

Las moléculas de ARN que tienen una acción de interferencia de ARN pueden diseñarse apropiadamente por un experto en la materia utilizando un método conocido basado en la información sobre la secuencia de bases del gen diana. La molécula de ARN puede ser preparada por un experto en la materia según un método conocido, y pueden obtenerse y utilizarse las que están distribuidas en el mercado. Como el ácido nucleico descrito anteriormente capaz de suprimir la expresión de la proteína codificada por el gen diana, se prefieren particularmente ARNip y ARNhc. Los ácidos nucleicos capaces de suprimir la expresión de la proteína codificada por el gen diana que se pueden utilizar incluyen, pero sin limitación, aquellos que tienen una actividad de inhibición de la transcripción o traducción del gen descrito anteriormente.

El ácido nucleico descrito anteriormente capaz de suprimir la expresión de la proteína codificada por el gen diana es un ácido nucleico que se une a una parte del gen diana y suprime la expresión de la proteína. La molécula de ARN o ADN capaz de unirse a una parte del gen diana puede introducirse en una célula mediante un método conocido *per se*.

Las moléculas de ARN o ADN descritas anteriormente se pueden introducir en una célula usando una molécula de ADN, como un vector, capaz de expresar estas moléculas, y el vector se puede preparar apropiadamente por un experto en la materia mediante un método conocido. Los ejemplos específicos de los vectores incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos, vectores lentivirales y vectores virales adenoasociados. Preferentemente, el vector es un vector lentivírico.

Como el ácido nucleico capaz de suprimir la expresión de la proteína codificada por el gen diana de la presente invención, se pueden usar uno o más ácidos nucleicos seleccionados de los ácidos nucleicos que tienen las secuencias de nucleótidos enumeradas a continuación:

(gen DOCK11)

- CCGGCCAACAGGGTGCTTACATATTCTCGAGAATATGTAAGCACCCCTGT  
TGGTTTTTTG (SEQ ID NO: 1)

- CCGGGTACTAGACACCATATCATTCTCTCGAGAAATGATATGGTGTCTAG  
TACTTTTTTG (SEQ ID NO: 2)

- CCGGACTAAATGAGCGGCTAATTA<sup>5</sup>ACTCGAGTTAATTAGCCGCTCATT  
AGTTTTTTTG (SEQ ID NO: 3)

- CCGGTGATGGCCATAACCCATTAATCTCGAGATTAATGGGTATGGCCA  
TCATTTTTTG (SEQ ID NO: 4)

- CCGGCCAGGCTACTTGAATCTGAATCTCGAGATTCAGATTCAAGTAGCC  
TGGTTTTTG (SEQ ID NO: 5)

10 (gen DENND2A)

- CCGGCTGAAGGGACTAGGCAATAAACTCGAGTTTATTGCCTAGTCCCTT  
CAGTTTTTTG (SEQ ID NO: 6)

- CCGGCCAATGAAGGAGAACCCTTATCTCGAGATAAGGGTTCTCCTTCAT  
TGGTTTTTTG (SEQ ID NO: 7)

15

- CCGGCCTAGTGCAGCCCTATTCTTTCTCGAGAAAGAATAGGGCTGCACT  
AGTTTTTTTG (SEQ ID NO: 8)

- CCGGCTAGTGCAGCCCTATTCTTTACTCGAGTAAAGAATAGGGCTGCAC  
TAGTTTTTTG (SEQ ID NO: 9)

20 (gen LIPG)

- CCGGACGATGTCTTGGGATCAATTGCTCGAGCAATTGATCCCAAGACAT  
CGTTTTTTTG (SEQ ID NO: 10)

- CCGGATGCAGGCAACTTCGTGAAAGCTCGAGCTTTCACGAAGTTGCCT  
GCATTTTTTG (SEQ ID NO: 11)

25

- CCGGCCGTTGTAATAGCATTGGCTACTCGAGTAGCCAATGCTATTACAA  
CGGTTTTTG (SEQ ID NO: 12)

- CCGGCGTCACCCTTTATGGCACTAACTCGAGTTAGTGCCATAAAGGGTG  
ACGTTTTTG (SEQ ID NO: 13)

- CCGGTTACACGGATGCGGTCAATAACTCGAGTTATTGACCGCATCCGTG  
TAATTTTTG (SEQ ID NO: 14)

(gen HECW2)

- CCGGGCCCAAACATTTCTTTGAGATCTCGAGATCTCAAAGAAATGTTTG  
GGCTTTTT (SEQ ID NO: 15)

- CCGGCCAGGGAAGTTAAAGTTAATTCTCGAGAATTAACCTTAACTTCCC  
TGTTTTT (SEQ ID NO: 16)

- CCGGGCACAATACTTGGAGTCAATTCTCGAGAATTGACTCCAAGTATTG  
TGCTTTTT (SEQ ID NO: 17)

- CCGGGCTTACAATGACAAGATTGTTCTCGAGAACAATCTTGTCATTGTA  
AGCTTTTT (SEQ ID NO: 18)

- CCGGCCCTTATCTTAAGATGTCAATCTCGAGATTGACATCTTAAGATAA  
GGTTTTT (SEQ ID NO: 19)

- una secuencia de bases que se obtiene por sustitución, delección, adición y/o inserción de una a varias (preferentemente 5 o menos, más preferentemente 2 o menos) bases en una cualquiera de las secuencias de bases de los SEQ ID NO descritos anteriormente: 1 a 19 y ejerce una acción de interferencia de ARN sobre cada gen.

En cada ARNhc, el terminal CCGG y TTTTTG o TTTTT son regiones que se van a dividir con una Dicer, y CTCGAG constituye una estructura de bucle en horquilla. La secuencia de bases entre CCGG y CTCGAG corresponde a la cadena con sentido diana, y la secuencia de bases entre CTCGAG y TTTTTG o TTTTT corresponde a la cadena antisentido. Por consiguiente, las secuencias de bases subrayadas en las cadenas sentido corresponden a los sitios de escisión en el gen diana, que son las secuencias de bases de las porciones del gen diana a las que se puede unir cada ARNhc o la secuencia complementaria del mismo. Los ácidos nucleicos capaces de suprimir la expresión de la proteína codificada por el gen diana que se pueden usar en la presente invención no se limitan a los ácidos nucleicos que tienen la secuencia de bases que se muestra en los SEQ ID NO: 1 a 19, y pueden ser ácidos nucleicos que pueden unirse a las secuencias de nucleótidos subrayadas y/o a las secuencias complementarias de las mismas y suprimir la expresión de la proteína codificada por el gen diana. Los ácidos nucleicos pueden comprender la sustitución, delección, adición y/o inserción de una a varias (preferentemente 5 o menos, más preferentemente 2 o menos) bases en cada una de las partes subrayadas, siempre que dichos ácidos nucleicos ejerzan una acción de interferencia de ARN sobre cada gen.

El fármaco antiviral de la presente invención se puede proporcionar como una composición farmacéutica que contiene dicho fármaco antiviral y es para el tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas a la infección por el virus de la hepatitis B o, el virus de la hepatitis C. La composición farmacéutica se puede formular según una técnica conocida. Los ejemplos específicos de las formulaciones incluyen, pero sin limitación, formulaciones sólidas tales como comprimidos, cápsulas, pastillas, polvos y gránulos, y formulaciones líquidas tales como soluciones, suspensiones, emulsiones e inyecciones. Dependiendo de la forma de la formulación, se pueden añadir vehículos y aditivos farmacéuticamente aceptables según sea apropiado. Los ejemplos específicos de los vehículos y aditivos incluyen, pero sin limitación, conservantes, estabilizantes, excipientes, cargas, aglutinantes, agentes humectantes, agentes saborizantes y agentes colorantes. Cuando la formulación es una formulación líquida, se puede utilizar un disolvente farmacéuticamente aceptable conocido, como una solución salina fisiológica o una solución que tenga una acción tamponadora.

La dosis de la composición farmacéutica no está particularmente limitada siempre que pueda producir un efecto antiviral del principio activo y pueda ser establecida apropiadamente por un experto en la materia. La dosis del principio activo puede ser, por ejemplo, de 0,01 a 1000 mg, preferentemente de 0,05 a 500 mg, más preferentemente de 0,1 a 100 mg por kg de peso corporal del paciente por dosis.

El método para administrar la composición farmacéutica no está particularmente limitado siempre que pueda producir el efecto antiviral y pueda ser establecido apropiadamente por un experto en la materia. Por ejemplo, un experto en la materia puede seleccionar un método de administración necesario según el estado de enfermedad específico. Los modos específicos del método de administración incluyen, pero sin limitación, inyecciones (como intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal e inyección en la parte afectada), oral, supositorios y administraciones transdérmicas (como una aplicación).

El fármaco antiviral de la presente invención se puede usar en combinación con otros agentes efectivos contra la infección viral. Pueden administrarse por separado durante el ciclo del tratamiento, o pueden administrarse en combinación con el fármaco antiviral de la presente invención, por ejemplo, en una sola forma farmacéutica tal como un comprimido, solución intravenosa o cápsula. Los otros agentes efectivos contra infecciones virales incluyen inhibidores del crecimiento viral. Los ejemplos de inhibidores del crecimiento de virus incluyen inhibidores del crecimiento del VHB tales como entecavir y tenofovir; e inhibidores del crecimiento del virus de la gripe tales como oseltamivir. Los inhibidores del crecimiento viral preferentemente usados en combinación con el fármaco antiviral de la presente invención son inhibidores de la transcriptasa inversa. Cuando el virus es el virus de la hepatitis B, el inhibidor del crecimiento viral usado en combinación con el fármaco antiviral de la presente invención es un inhibidor del crecimiento del VHB, incluyendo, en particular, interferón, peginterferón, lamivudina, adefovir, entecavir, tenofovir, telbivudina y clevudina, entre los cuales se prefiere el entecavir.

La presente invención incluye un método de cribado de un fármaco antiviral para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad asociada a la infección por el virus de la hepatitis B o el virus de la hepatitis C, comprendiendo el método las siguientes etapas (a) a (c) de:

- (a) poner una célula en contacto con una sustancia de prueba en un sistema en el que la célula expresa el gen diana;
- (b) medir el nivel de expresión del gen diana en la célula y comparar el nivel de expresión del gen diana en la célula en contacto con la sustancia de prueba con el nivel de expresión del gen diana en la célula no en contacto con la sustancia de prueba; y
- (c) seleccionar una sustancia de prueba que provoque una disminución en el nivel de expresión del gen diana en la célula como un componente del fármaco antiviral mediante el cribado basado en el resultado de la comparación de la etapa (b) anterior, en donde dicho gen diana es uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en el gen DOCK11, gen LIPG, gen DENND2A, y gen HECW2.

El sistema en el que una célula expresa el gen diana puede ser cualquier sistema siempre que la célula capaz de expresar el gen diana esté en presencia de un factor que potencie la expresión del gen diana, y no se impone ninguna limitación particular sobre el factor está presente intracelular o extracelularmente. Por ejemplo, el sistema puede ser una línea celular en la que se incorpora un promotor para expresar constitutivamente el gen diana.

"Células en las que se puede medir la expresión del gen diana o de la proteína codificada por el gen diana" se refiere a células en las que el nivel de expresión del producto del gen diana, tal como el producto de transcripción o el producto de traducción (es decir, proteína). Las células en las que se puede evaluar el nivel de expresión del producto del gen diana pueden ser células que pueden expresar de forma natural el gen diana o células en las que se puede realizar un ensayo de indicador para el dominio regulador de la transcripción del gen diana. Estas células pueden ser fácilmente identificadas por los expertos en la materia y, por ejemplo, se pueden usar células cultivadas primarias, líneas celulares derivadas de las células cultivadas primarias, líneas celulares comercializadas y líneas celulares disponibles en Cell Bank.

La sustancia de prueba mencionada anteriormente no está particularmente limitada siempre que pueda ser una sustancia candidata como un principio activo del fármaco antiviral. La sustancia de prueba mencionada anteriormente

puede ser un compuesto natural (por ejemplo, una sustancia obtenida de un organismo) o un compuesto sintético. Preferentemente, la sustancia de prueba mencionada anteriormente es una sustancia que es farmacéuticamente aceptable para usar en seres humanos. Los ejemplos específicos de la sustancia de prueba incluyen, pero sin limitación, compuestos de bajo peso molecular; proteínas tales como anticuerpos; ácidos nucleicos capaces de suprimir la expresión de proteínas (por ejemplo, ARNip, ARNhc, ARNbc, miARN); y cadenas de azúcar o carbohidratos complejos.

### Ejemplos

La presente invención se describirá en detalle con referencia a los Ejemplos de referencia y los Ejemplos siguientes, pero no se limita a los siguientes Ejemplos de referencia y Ejemplos. Los siguientes Ejemplos de referencia y Ejemplos se realizaron con la aprobación del comité de ética de la Universidad de Kanazawa.

(Ejemplo de referencia 1-1) Preparación de portaobjetos de polidimetilsiloxano (PDMS) para un análisis completo de la expresión génica unicelular

Según el método descrito en la Publicación Internacional WO2015/166768, se preparó un portaobjetos de PDMS para un análisis completo de la expresión génica unicelular. En primer lugar, la PCR en emulsión se llevó a cabo utilizando un enlazador de código de barras para preparar cuentas a las que se unieron los productos de amplificación por PCR y a continuación se purificaron las cuentas. Las cuentas obtenidas se trataron con enzimas de restricción, álcali y choque térmico, para preparar cuentas a cuya superficie se unieron varios millones de moléculas de oligonucleótidos que consisten en ADN monocatenario. Se adjudicaron diferentes secuencias de códigos de barras a las cuentas individuales, respectivamente. La secuencia de los enlazadores de código de barras es la siguiente, la cual se muestra en el SEQ ID NO: 20. Enlazadores de código de barras (SEQ ID NO: 20):

5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGCAGTGAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAANNNNNNNNNNNNNACATAGGCCGTCTTCAGCCGCTG  
AGACTGCCAAGGCACACAGGGGATAGG-3'

N = A o T o C o G

Las cuentas preparadas se colocaron una por una en pocillos de un portaobjetos de PDMS para preparar un portaobjetos de PDMS para un análisis completo de la expresión génica unicelular.

(Ejemplo de referencia 1-2) Selección de genes diana para fármacos anti-VHB

(1) Líneas celulares de hepatoma humano VHB positivas utilizadas

Una línea celular KM, que es una línea celular de carcinoma hepatocelular (CHC) humano establecida a partir de un paciente específico con hepatitis B positivo y carcinoma hepatocelular, se obtuvo del Primer Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario de Kanazawa. La línea celular KM se estableció mediante la obtención de una muestra de CHC humano de un paciente con hepatitis B positivo y carcinoma hepatocelular que se sometió a una operación radical en el Liver Center, Hospital de la Universidad de Kanazawa después de obtener el consentimiento informado, recoger tejido de CHC de la muestra y separar el tejido en células individuales en una suspensión inmediatamente después de la recogida.

Se llevó a cabo la detección del ADNccc del VHB, el ADN del VHB y el ARNm del VHB (es decir, ARNpg) en células KM después del establecimiento y las células KM se subcultivaron después del establecimiento. Además, se realizó una inmunotinción para el antígeno HBc, conocido como un marcador para el VHB, para observar las células positivas para HBc. Específicamente, la detección se llevó a cabo del modo siguiente.

(i) RTD-PCR cuantitativa

Los ARN totales se aislaron con el kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokio, Japón), y los ADNc se sintetizaron utilizando el kit High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

La RTD-PCR se llevó a cabo utilizando el 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores y sondas utilizados son los siguientes.

Cebadores para ARN pg: 5'GCTCTGTATCGGGAGGCCTTA3' (SEQ ID NO: 21), y  
5'TGAGTGCTGTATGGTGAGGAGAA3' (SEQ ID NO: 22)

Sonda para ARN pg: 5'FAM-AGTCTCCGGAACATT-MGB3' (SEQ ID NO: 23)

Cebadores para PreS/S: 5'ACCCCAACAAGGATCATTGG3' (SEQ ID NO: 24), y 5'CGAATGCTCCCGCTCCTA3' (SEQ ID NO: 25)

Sonda para PreS/S: 5'FAM-CAGAGGCAAATCAG-MGB3' (SEQ ID NO: 26)

Cebadores para HBx: 5' TGTC AACGACCGACCTTGAG3' (SEQ ID NO: 27), y 5' CCCAACTCCTCCCAGTCCTT3' (SEQ ID NO: 28)

Sonda para HBx: 5'FAM-CATACTTCAAAGACTGTTTGT-MGB3' (SEQ ID NO: 29)

(ii) Determinación de las cantidades de ADN del VHB y ADNccc del VHB mediante PCR cuantitativa

La cantidad de ADN del VHB intracelular se determinó utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) de acuerdo con el protocolo del producto. La cantidad de ADN del VHB en el medio se determinó utilizando el kit SMI TEST EX R&D (MLB) de acuerdo con el protocolo del producto. La cantidad de ADN del VHB se determinó mediante PCR cuantitativa utilizando 5'ACTCACCAACCTCCTGTCCT3' (SEQ ID NO: 30) y 5'GACAAACGGGCAACATACCT3' (SEQ ID NO: 31) como conjunto de cebadores, y 5'FAM-TATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGT-TAMRA3'(SEQ ID NO: 32) como sonda.

El ADN extraído (50 ng) se trató con 10 U de Plasmid safe DNase1 (Epicenter) a 37 °C durante 60 minutos y a continuación se trató a 70 °C durante 30 minutos para inactivar la ADNasa. La cantidad de ADNccc se determinó mediante PCR cuantitativa utilizando 5'CGTCTGTGCCTTCTCATCTGC3' (SEQ ID NO: 33) y 5'GCACAGCTTGAGGCTTGAA3' (SEQ ID NO: 34) como conjunto de cebadores, y 5'FAM-CTGTAGG41CATAAATTGGT-MGB3' (SEQ ID NO: 35) como sonda.

(iii) Tinción de inmunofluorescencia indirecta

La tinción de inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo utilizando un anticuerpo policlonal anti-HBcAg de conejo (un anticuerpo contra el antígeno HBc: Thermo Fisher Scientific Inc.). Las células cultivadas se fijaron con metanol-acetona (1:1) durante 10 minutos y luego se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,01 % (Merck) en solución salina tamponada con fosfato 10 mmol/l a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células se incubaron en solución salina tamponada con fosfato que contenía BSA al 5 % durante 30 minutos y a continuación se incubaron con anticuerpo policlonal anti-HBcAg de conejo diluido en solución salina tamponada con fosfato que contenía BSA al 3 % durante la noche a 4 °C. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 y luego se incubaron con anticuerpo secundario anti-cabra de burro conjugado con Alexa 488 y anticuerpo anti-conejo de burro conjugado con Alexa 594 (Life Technologies) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Dojindo Laboratories, Co., Ltd.). Se contó el número de células hepáticas y células hepáticas VHB positivas para analizar la proporción de células hepáticas VHB positivas.

Como resultado, en las primeras células KM después del establecimiento, se observaron ADNccc del VHB y ADN del VHB en niveles detectables, y también se observó expresión del ARNm del VHB. No obstante, las cantidades de ADNccc del VHB y ARNm del VHB en células KM se redujeron con el subcultivo. Por ejemplo, se confirmó que la cantidad de ADNccc del VHB en células KM pasadas 32 veces se redujo a menos de la mitad de la cantidad en células KM pasadas 10 veces (Figura 13). Además, cuando el antígeno HBc conocido como marcador del VHB fue inmunoteñido, las células positivas para HBc fueron menos del 0,1 % en el total de células.

(2) Análisis completo de la expresión génica unicelular utilizando el ARNm del VHB

Se llevó a cabo un análisis completo de la expresión génica unicelular de una línea celular de CHC humano establecida a partir de un paciente positivo para hepatitis B con carcinoma hepatocelular utilizando el portaobjetos de PDMS para el análisis completo de la expresión génica unicelular preparado en el Ejemplo de referencia 1-1.

En primer lugar, las células se colocaron en el portaobjetos de PDMS mencionado anteriormente para un análisis completo de la expresión génica unicelular. Después de dejar reposar durante 10 a 15 minutos, el portaobjetos se lavó con PBS y se cubrió con una membrana de diálisis (tubo de diálisis de celulosa regenerada de 12.000 a 14.000 MWCO, ancho plano de 25 mm, Fisher Scientific). Después, se añadió tampón de lisis (LiCl 500 mM en tampón TRIS 100 mM (pH 7,5) con dodecilsulfato de litio al 1 %, EDTA 10 mM y DTT 5 mM) desde el lado superior de la membrana de diálisis para extraer los ARNm en las células y después los ARNm fueron capturados por oligonucleótidos en cuentas. Después de recoger las cuentas, los ARNm unidos a las cuentas se sometieron a una reacción de transcripción inversa para sintetizar la primera cadena de ADNc. A continuación, la segunda cadena se sintetizó por PCR para obtener productos de amplificación. Los productos amplificados se secuenciaron utilizando un secuenciador de próxima generación HiSeq 2500 (Illumina Inc.).

El secuenciador de próxima generación secuenció aproximadamente 900 millones de lecturas, y los niveles de expresión del ARNm humano y del ARNm del VHB se analizaron utilizando las secuencias de código de barras. Como resultado, se reveló que sólo una célula de entre 3.000 células expresaba ARNm del VHB. Entre los genes expresados específicamente en células positivas para el ARNm del VHB, el gen LIPG, el gen DENND2A, el gen DOCK11 y el gen HECW2 se confirmaron como genes que muestran una alta expresión (Tabla 1).

[Tabla 1]

| Tabla 1 |                                            |                                                                      |                                                                    |           |                                                                                                                                                            |
|---------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gen     | Número de células positivas en 500 células | Nivel de expresión en una célula VHB positiva (/ millón de lecturas) | Nombre completo oficial                                            | Refseq    | Función en ontología génica                                                                                                                                |
| LIPG    | 10                                         | 210                                                                  | lipasa, endotelial                                                 | NM_06033- | actividad lipoproteína lipasa, actividad fosfatidilcolina 1-acilhidrolasa, actividad fosfolipasa                                                           |
| DENND2A | 3                                          | 203                                                                  | Dominio DENN/MADD que contiene 2A                                  | NM_015689 | Actividad factor de intercambio de guanil nucleótidos Rab Unión a Rho GTPasa, Actividad factor de intercambio de guanil nucleótidos Rho, unión a proteínas |
| DOCK11  | 2                                          | 96                                                                   | dedicador de citocinesis 11                                        | NM_144658 | actividad ligasa, actividad ubiquitina-proteína transferasa                                                                                                |
| HECW2   | 1                                          | 13                                                                   | HECT, dominio C2 y WW que contiene E3 ubiquitina proteína ligasa 2 | NM_020760 |                                                                                                                                                            |

(Ejemplo 2) Determinación de la función de ARNhc frente a cada gen diana

Se prepararon cinco ARNhc para el gen DOCK11 que se expresó específicamente en células de hepatoma humano VHB positivas, y se determinó el efecto de suprimir la expresión del gen DOCK11 por cada ARNhc.

Se infectaron células HepG2.2.15 con lentivirus que expresaban cada uno ARNhc contra el gen DOCK11 (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokio, Japón, TRCN0000369589, TRCN0000369590, TRCN0000369611, TRCN0000376430, TRCN0000123016; las secuencias N.º 1 a N.º 5 de cinco ARNhc se muestran a continuación) de acuerdo con un método convencional, y 72 horas después, se determinó la cantidad de ARNm del gen DOCK11, la cantidad de ADN del VHB y la cantidad de ADNccc del VHB. Las cantidades de ADN del VHB y ADNccc del VHB se midieron de la misma manera que en el Ejemplo de referencia 1-2. El ARNm del gen DOCK11 se cuantificó mediante PCR en tiempo real según un método convencional.

DOCK11 #1: CCGGCCAACAGGGTGCTTACATATTCTCGAGAATAT

GTAAGCACCCTGTTGGTTTTTG (SEQ ID NO: 1)

DOCK11 #2: CCGGGTACTAGACACCATATCATTTCTCGAGAAATG

ATATGGTGTCTAGTACTTTTTG (SEQ ID NO: 2)

DOCK11 #3: CCGGACTAAATGAGCGGCTAATTAAGTCGAGTTAAT

TAGCCGCTCATTTAGTTTTTTG (SEQ ID NO: 3)

DOCK11 #4: CCGGTGATGGCCATAACCCATTAATCTCGAGATTAAT

GGGTTATGGCCATCATTTTTG (SEQ ID NO: 4)

DOCK11 #5: CCGGCCAGGCTACTTGAATCTGAATCTCGAGATTCAG

ATTCAAGTAGCCTGGTTTTTTG (SEQ ID NO: 5)

Las células HepG2.2.15 son células que se han establecido mediante la transfección de células derivadas de hepatoma humano HepG2

con VHB y producen continuamente el virus (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84: 1005-1009 (1987), Journal of Virology, agosto de 1988, 62, 2836-2844). Las células HepG2.2.15 se mantuvieron en medio DMEM (Life Technologies, Carlsbad, CA) que contiene 10 % de suero bovino fetal (FBS), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin hasta su uso.

De manera similar, las funciones de los genes DENND2A, LIPG y HECW2 también se confirmaron usando lentivirus (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokio, Japón, TRCN0000179931, TRCN0000178923, TRCN0000184030, TRCN0000179932, TRCN0000372782, TRCN0000378899, TRCN0000050893, TRCN000005044894, TRCN0000372783, TRCN0000004789, TRCN0000004790, TRCN0000004791, TRCN0000004792, TRCN0000004793) que expresan respectivamente los ARNhc que se muestran en los SEQ ID NO: 6 a 19.

DENND2A #1: CCGGCTGAAGGGACTAGGCAATAAACTCGAGTTTA

TTGCCTAGTCCCTTCAGTTTTTTT (SEQ ID NO: 6)

DENND2A #2: CCGGCCAATGAAGGAGAACCCTTATCTCGAGATAA

GGGTTCTCCTTCATTGGTTTTTTT (SEQ ID NO: 7)

DENND2A #3: CCGGCCTAGTGCAGCCCTATTCTTTCTCGAGAAAG

AATAGGGCTGCACTAGGTTTTTTT (SEQ ID NO: 8)

DENND2A #4: CCGGCTAGTGCAGCCCTATTCTTTACTCGAGTAAA

GAATAGGGCTGCACTAGTTTTTTT (SEQ ID NO: 9)

LIPG#1: CCGGACGATGTCTTGGGATCAATTGCTCGAGCAATTGATC

CCAAGACATCGTTTTTTT (SEQ ID NO: 10)

LIPG #2: CCGGATGCAGGCAACTTCGTGAAAGCTCGAGCTTTCACG

AAGTTGCCTGCATTTTTTTT (SEQ ID NO: 11)

LIPG #3: CCGGCCGTTGTAATAGCATTGGCTACTCGAGTAGCCAAT

GCTATTACAACGGTTTTTTT (SEQ ID NO: 12)

LIPG #4: CCGGCGTCACCCTTTATGGCACTAACTCGAGTTAGTGCC

ATAAAGGGTGACGTTTTTTT (SEQ ID NO: 13)

LIPG #5: CCGGTTACACGGATGCGGTCAATAACTCGAGTTATTGAC  
CGCATCCGTGTAATTTTGG (SEQ ID NO: 14)

HECW2 #1: CCGGGCCCAAACATTTCTTTGAGATCTCGAGATCTCA  
AAGAAATGTTTGGGCTTTTT (SEQ ID NO: 15)

HECW2 #2: CCGGCCAGGGAAGTTAAAGTTAATTCTCGAGAATTAA  
CTTTAACTTCCCTGGTTTTT (SEQ ID NO: 16)

HECW2 #3: CCGGGCACAACTTGGAGTCAATTCTCGAGAATTGA  
CTCCAAGTATTGTGCTTTTT (SEQ ID NO: 17)

HECW2 #4: CCGGGCTTACAATGACAAGATTGTTCTCGAGAACAAAT  
CTTGTCATTGTAAGCTTTTT (SEQ ID NO: 18)

HECW2 #5: CCGGCCCTTATCTTAAGATGTCAATCTCGAGATTGAC  
ATCTTAAGATAAGGGTTTTT (SEQ ID NO: 19)

Los resultados se muestran en las Figuras 1 a 4. Se confirmó que las cantidades de ADN del VHB y ADNccc podrían reducirse mediante el uso de ARNhc contra los genes DOCK11, DENND2A, LIPG y HECW2.

(Ejemplo 3) Determinación de la función de ARNhc frente a la infección por VHB

Utilizando hepatocitos humanos frescos (células PHH) obtenidos de ratones PXB (PhoenixBio Co., Ltd., Hiroshima, Japón), se determinaron los efectos de los ARNhc contra cada gen en la infección de hepatocitos humanos con VHB. Los experimentos se llevaron a cabo cultivando células PHH como sigue. En primer lugar, el día 0 de cultivo, las células se infectaron con el lentivirus que expresaba el ARNhc contra cada uno de los genes mediante un método convencional. Un suero recogido de un ratón quimérico infectado con VHB infectado con VHB (genotipo C, 5 copias de ADN de VHB/célula) se añadió a las células como un inóculo de VHB el día 1 de cultivo. El día 2 de cultivo, las células se lavaron tres veces y se les añadió entecavir (ETV) (10 nM). El día 7 de cultivo, se recogieron las células y se determinó la cantidad de ADN del VHB, la cantidad de ADNccc del VHB y el nivel de ARNm de cada gen. Las cantidades de ADN del VHB, ADNccc del VHB y ARN pg se cuantificaron de la misma manera que en el Ejemplo de referencia 1-2. El nivel de ARNm de cada gen se cuantificó de la misma manera que en el Ejemplo 2. Se utilizaron ARNhc que tienen las secuencias de bases que se muestran en los SEQ ID NO: 2, 7, 14 y 17, respectivamente (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokio, Japón, lentivirus de expresión TRCN0000369590, TRCN0000178923, TRCN0000372783, TRCN0000004791) contra los genes respectivos. Se utilizó el medio dHCGM (Yamasaki C, *et al.*, J Hepatol. 2006, 44: 749-57) para el cultivo de hepatocitos humanos frescos (células PHH).

Los resultados se muestran en las Figuras 5 a 8. La cantidad de ADNccc disminuyó drásticamente por el ARNhc contra el gen DOCK11 o el gen DENND2A, y disminuyó por debajo de la sensibilidad de detección mediante el uso combinado de ETV. La cantidad de ADNccc disminuyó por el ARNhc contra el gen LIPG o el gen HECW2, y se observó un efecto sinérgico para disminuir el ADNccc mediante el uso combinado de ETV.

(Ejemplo 4) Determinación de la función del ARNhc contra la infección por VHB 2

De la misma manera que en el ejemplo 3 y utilizando células PHH, se determinaron los efectos de los ARNhc contra genes individuales en la infección de hepatocitos humanos con VHB cuando las células se cultivaban durante un período prolongado. Los experimentos se llevaron a cabo cultivando células PHH como sigue. En primer lugar, el día

0 de cultivo, las células se infectaron con el lentivirus que expresaba el ARNhc contra cada uno de los genes mediante un método convencional. Un suero recogido de un ratón quimérico infectado con VHB infectado con VHB (genotipo C, 5 copias de ADN de VHB/célula) se añadió a las células como un inóculo de VHB el día 1 de cultivo. Posteriormente, las células se cultivaron de acuerdo con los siguientes puntos (1) a (4).

(1) Se cultivaron células PHH infectadas con VHB durante 4 semanas.

(2) Se cultivaron células PHH infectadas con VHB durante 2 semanas, a continuación se lavaron tres veces, se trataron con ETV (10 nM) y se cultivaron durante 2 semanas.

(3) las células PHH se infectaron con el VHB, a continuación, en el día 2 de cultivo, las células se lavaron tres veces, se trataron con ETV (10 nM) y se cultivaron durante 2 semanas. Posteriormente, las células se lavaron tres veces para eliminar el ETV y se cultivaron durante 2 semanas.

(4) las células PHH se infectaron con el VHB, a continuación, en el día 2 de cultivo, las células se lavaron tres veces, se trataron con ETV (10 nM) y se cultivaron durante 4 semanas.

Después de realizar los cultivos (1) a (4) anteriores, se recogieron las células, y se determinó el nivel de ARNm de cada gen, la cantidad de ADNccc del VHB y la cantidad de ARN pg de la misma manera que en el Ejemplo de referencia 1-2 y el Ejemplo 2. Se utilizaron los ARNhc que tienen las secuencias de bases que se muestran en los SEQ ID NO: 2, 7, 14 y 17, respectivamente (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokio, Japón, lentivirus de expresión TRCN0000369590, TRCN0000178923, TRCN0000372783, TRCN0000004791) contra los genes respectivos.

Los resultados se muestran en las Figuras 9 a 12. En las Figuras 9 a 12, el último número de cada elemento en el eje horizontal indica las condiciones de cultivo (1) a (4) anteriores. Por ejemplo, "sh DOCK11 1" indica que se introdujo ARNhc contra el gen DOCK11 y las células se cultivaron en la condición (1) anterior. "Cont" es un resultado obtenido cuando las células se cultivaron sin la introducción de ARNhc de cada gen.

Se observó que los 4 genes redujeron la cantidad de ADNccc por debajo del límite de detección sin el uso combinado al llevar a cabo un cultivo a largo plazo durante 3 semanas o más.

(Ejemplo 5) Determinación de la acción del gen diana mediante edición del genoma

En las células HepG2.2.15, que se habían establecido mediante la transfección de células de hepatoma humano HepG2 con VHB, los genes DENND2A y Dock11 se silenciaron utilizando el sistema CRISPR/Cas 9. Las cantidades de ADN del VHB, ADNccc del VHB y ARN pg en las células HepG2.2.15 en las que se silenciaron los genes diana se determinaron de la misma manera que en el Ejemplo de referencia 1-2.

Los resultados se muestran en la Figura 14. Se confirmó que el silenciamiento del gen Dock11 disminuyó la cantidad de ADNccc del VHB en las células HepG2.2.15 hasta aproximadamente el 5 % del control en comparación. Así se demostró que el gen Dock11 juega un papel importante en la retención del ADNccc del VHB en las células hospedadoras.

(Ejemplo 6) Determinación de la función del ARNhc contra la infección por VHB 3

Se investigaron los efectos de un ARNhc en la proliferación del VHB cuando las PHH se infectaron con VHB y después se trataron con un ARNhc. Una semana después de que las PHH se infectaran con el VHB, se introdujo el ARNhc (SEQ ID NO: 2) contra el gen Dock11 y las células se cultivaron durante 3 semanas con cambios de medio de cultivo. Posteriormente, el nivel de expresión del ARNm del gen DOCK11, la cantidad de ADNccc del VHB y la cantidad de ARN pg en las PHH se determinaron de la misma manera que en el Ejemplo de referencia 1 y el Ejemplo 2.

Los resultados se muestran en la Figura 15. Se observó que el ARNhc contra el gen Dock11 hizo que el ADNccc y el ARNpg del VHB desaparecieran incluso en células en las que se había establecido la infección por VHB. Estos resultados sugirieron que el gen Dock11 contribuye a la retención del VHB en las células hospedadoras.

(Ejemplo 7) Localización intracelular del gen diana

Las localizaciones intracelulares de las proteínas expresadas por los respectivos genes diana en células KM se investigaron mediante tinción de inmunofluorescencia indirecta de la misma manera que en el Ejemplo de referencia 1-2. Además del anticuerpo policlonal anti-HbcAg de conejo, se utilizaron un anticuerpo monoclonal anti-HBc (Institute of Immunology; 2AHC21), un anticuerpo anti-LIPG producido en conejo (Sigma-Aldrich; HPA016966-100UL), un anticuerpo N-terminal anti-NEDL2 (HECW2) (Abcam; ab154888), un anticuerpo N-terminal anti-NEDL2 (Abcam; ab154888), y un anticuerpo anti-DOCKII (D-17) (SANTA CRUZ; sc-74610) se usaron como anticuerpos anti-VHB-core, LIPG, HECW2, DENND2A y DOCK11, respectivamente.

Los resultados se muestran en la Figura 16. Se descubrió que DOCK11 se localizaba en la misma posición que las proteínas del VHB.

(Ejemplo 8) Confirmación de la función del ARNhc contra el VHC

La actividad antiviral del ARNhc contra el gen Dock11 se evaluó utilizando un sistema de replicón para la cepa JFH1. El análisis de replicación del VHC se realizó transfectando células Huh 7.5 con ARN-JFH1 sintético. Las células en las que DOCK11 se silenció constitutivamente se prepararon introduciendo ARNhc DOCK11 N.º 2 en células Huh 7.5. Las células en las que se introdujo ARNhc cont se usaron como control. Las células Huh 7.5 en las que se había introducido cada ARNhc se transfectaron con 1 µg de ARN sintético (ARN-JFH1) usando el TransIT<sup>(R)</sup>-mRNA Transfection Kit (Mirus). Los ARN totales se aislaron 24, 48 y 72 horas después de la transfección con el High Pure RNA Isolation Kit (Roche), y los ADNc se sintetizaron con el High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). El ARN del VHC se detectó de la misma manera que se describe en Shirasaki, T. *et al.* J Infect Dis 202, 75-85, doi: 10.1086 / 653081 (2010). La expresión del gen DOCK11 se evaluó determinando el nivel de ARNm de la misma manera que en el Ejemplo 2.

Los resultados se muestran en la Figura 17. El nivel de expresión del gen DOCK11 en células Huh7.5 disminuyó por el ARNhc contra el gen DOCK11. También se observó que la replicación del VHC en células Huh7.5 fue suprimida por el ARNhc contra el gen DOCK11. Se observó que la replicación del ARN del VHC se suprimió de manera efectiva entre 1 y 3 días (24, 48 y 72 horas) después de la introducción del ARN del VHC.

(Ejemplo de referencia 9) Inhibición de la expresión del gen diana por pirrol-imidazol poliamida

A las células HepG2.2.15, que se establecieron mediante la transfección de células de hepatoma humano HepG2 con el VHB, se añade pirrol-imidazol poliamida capaz de unirse específicamente al gen diana a 5 µM desde el comienzo del cultivo y se observan cambios dependientes del tiempo. Tras un periodo de tiempo determinado, las células se recogen y el nivel de expresión de ARNm del gen DOCK11, y las cantidades de ADN del VHB, ADNccc y ARN pg del VHB se miden de la misma manera que en el Ejemplo de referencia 1-2 y el Ejemplo 2.

(Ejemplo de referencia 10) Determinación del efecto del inhibidor de LIPG sobre el VHB

Una construcción de expresión del VHB (VHB-C: proporcionada por el Dr. Yasuhito Tanaka en la Universidad de la ciudad de Nagoya) se introdujo en la línea celular Huh7. Cinco días después de la presentación, se añadió un inhibidor de LIPG (GSK264220A) de 1 µM a 100 µM y se cultivaron las células. Una semana después de la adición del inhibidor de LIPG, las cantidades de ADN del VHB y ADNccc del VHB se determinaron de la misma manera que en el Ejemplo de referencia 1-2 y el Ejemplo 2.

Los resultados se muestran en la Figura 20. Se confirmó que, dependiendo de la concentración del inhibidor de LIPG, las cantidades de ADN del VHB y ADNccc del VHB se redujeron y se inhibió la infección por VHB.

(Ejemplo de referencia 11) Determinación de la función del ARNhc contra el gen Cdc42

Se prepararon cinco ARNhc contra el gen Cdc42, que es un gen que codifica Cdc42 que se sabe que interactúa con DOCK11 aunque no se observó ninguna diferencia en su nivel de expresión para la retención del gen VHB, y se investigaron sus acciones antivirales contra el virus de la hepatitis B de la misma manera que en el Ejemplo 2.

Se infectaron células HepG2.2.15 con lentivirus que expresaban ARNhc individuales contra el gen Cdc42 (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokio, Japón, TRCN0000047631, TRCN0000047629, TRCN0000047628, TRCN0000047632, TRCN0000310772; las secuencias N.º 1 a N.º 5 de los cinco ARNhc se muestran a continuación) de acuerdo con un método convencional, y 1 semana después, se determinaron las cantidades de ADN del VHB y ADNccc del VHB. Las cantidades de ADN del VHB y ADNccc del VHB se midieron de la misma manera que en el Ejemplo de referencia 1-2.

CDC42 shRNA #1: CCGGCCAAGAACAAACAGAAGCCTACTCGAGT

AGGCTTCTGTTTGTCTTGGTTTTTG (SEQ ID NO: 55)

CDC42 shRNA #2: CCGGCGGAATATGTACCGACTGTTTCTCGAGA

AACAGTCGGTACATATTCCGTTTTTG (SEQ ID NO: 56)

CDC42 shRNA #3: CCGGCCCTCTACTATTGAGAACTTCTCGAGAA

GTTTCTCAATAGTAGAGGGTTTTTG (SEQ ID NO: 57)

CDC42 shRNA #4: CCGGCAGATGTATTTCTAGTCTGTTCTCGAGAA

CAGACTAGAAATACATCTGTTTTTG (SEQ ID NO: 58)

CDC42 shRNA #5: CCGGGACTCTGTAACAGACTAATTGCTCGAGC

AATTAGTCTGTTACAGAGTCTTTTTG (SEQ ID NO: 59)

5 Los resultados se muestran en la Figura 21. Se observó que las cantidades de ADN y ADNccc del VHB podían reducirse usando los ARNhc contra el gen Cdc42.

(Ejemplo de referencia 12) Determinación de la función del ARNhc contra la infección con el virus de la gripe

10 Se investigó el comportamiento de la nucleoproteína del virus de la gripe en células A549, una línea celular de adenocarcinoma de pulmón, cuando las células se infectaron con el virus de la gripe y después se introducía en las células ARNhc contra el gen DOCK11 o Cdc42.

15 En primer lugar, se sembraron células A549 en una placa de 10 cm. Después de la siembra, las células A549 se infectaron con lentivirus que comprenden uno cualquiera de los ARNhc cont, DOCK11 ARNhc N.º 2, y CDC42 ARNhc N.º 1 a N.º 5 de la misma manera que en el Ejemplo 2 y el Ejemplo de referencia 11. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se añadieron 5 µg/ml de puromicina. Posteriormente, las células se cultivaron durante 1 semana y luego se seleccionaron las células en las que se introdujo ARNhc. Las células seleccionadas se sembraron en un portaobjetos de cámara. Las células se infectaron con el virus de la gripe (cepa WSN) (obtenido del Dr. Masayoshi Enami en la Universidad de Kanazawa) aislado de células MDCK. Veinticuatro horas después de la infección con el virus de la gripe, las células se fijaron con acetona y metanol, y a continuación se inmunotifieron las nucleoproteínas (NP) del virus de la gripe usando el anticuerpo anti-HA del virus de la gripe A H1N1 (Thermo Fisher PA5-34929) y se observaron.

25 Los resultados se muestran en la Figura 22. Se confirmó que la localización de las nucleoproteínas del virus de la gripe en el núcleo de la célula hospedadora se suprimió cuando se introdujo el ARNhc para el gen DOCK11 o el gen Cdc42. Esto sugirió que DOCK11 está involucrado en la replicación del virus de la gripe.

### 30 **Aplicabilidad industrial**

El fármaco antiviral de la presente invención puede reducir en gran medida la cantidad de ADNccc del VHB en comparación con los inhibidores de crecimiento convencionales para el virus de la hepatitis B, y tiene el potencial de eliminarlo por completo. Se cree que el fármaco antiviral de la presente invención tiene un mecanismo de acción diferente al de los fármacos antivirales convencionales y actúa sobre la ruta de transporte a los núcleos después de que el virus atraviesa la membrana en la superficie de las células hospedadoras. Por consiguiente, se contempla que el fármaco antiviral de la presente invención muestre un efecto antiviral no sólo sobre el VHB sino también sobre varios virus. Asimismo, se contempla que el fármaco antiviral de la presente invención ejerza un efecto antiviral sinérgicamente en combinación con un fármaco antiviral convencional. Se espera que el fármaco antiviral de la presente invención permita la prevención de la infección viral y la remisión o curación radical de la infección viral, y que contribuya en gran medida al tratamiento de enfermedades debidas a la infección viral. Además, usando el gen diana de la presente invención como indicador, se puede seleccionar un fármaco antiviral basado en un mecanismo novedoso.

### 45 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> IDAC THERANOSTICS, INC.

<120> FÁRMACO ANTIVIRAL

<130> TEK/FP7379340

<140> EP16864163.7

<141> 07/11/2016

<150> PCT/JP2016/082957

<151> 07/11/2016

<150> JP2015-219183  
 <151> 09/11/2015  
 <160> 64  
 5 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 58  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNhc  
 15 <400> 1  
 ccggccaaca ggggtgcttac atattctcga gaatatgtaa gcacctgtt ggtttttg 58  
 <210> 2  
 20 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> ARNhc  
 <400> 2  
 ccgggtacta gacaccatat catttctcga gaaatgatat ggtgtctagt actttttg 58  
 <210> 3  
 30 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> ARNhc  
 <400> 3  
 ccggactaaa tgagcggcta attaactcga gttaattagc cgctcattta gttttttg 58  
 40 <210> 4  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> ARNhc  
 <400> 4  
 50 ccggtgatgg ccataacca ttaatctcga gattaatggg ttatggccat catttttg 58  
 <210> 5  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNhc  
 60 <400> 5  
 ccggccaggc tacttgaatc tgaatctcga gattcagatt caagtagcct ggtttttg 58  
 <210> 6  
 <211> 59  
 65 <212> ADN

|    |                                                                    |    |
|----|--------------------------------------------------------------------|----|
|    | <213> Secuencia artificial                                         |    |
|    | <220>                                                              |    |
|    | <223> ARNhc                                                        |    |
| 5  | <400> 6                                                            |    |
|    | ccggctgaag ggactaggca ataaactcga gtttattgcc tagtcccttc agtttttttg  | 59 |
| 10 | <210> 7                                                            |    |
|    | <211> 59                                                           |    |
|    | <212> ADN                                                          |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                         |    |
| 15 | <220>                                                              |    |
|    | <223> ARNhc                                                        |    |
|    | <400> 7                                                            |    |
|    | ccggccaatg aaggagaacc cttatctcga gataaggggtt ctccttcatt ggtttttttg | 59 |
| 20 | <210> 8                                                            |    |
|    | <211> 59                                                           |    |
|    | <212> ADN                                                          |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                         |    |
| 25 | <220>                                                              |    |
|    | <223> ARNhc                                                        |    |
|    | <400> 8                                                            |    |
|    | ccggcctagt gcagccctat tctttctcga gaaagaatag ggctgcacta ggtttttttg  | 59 |
| 30 | <210> 9                                                            |    |
|    | <211> 59                                                           |    |
|    | <212> ADN                                                          |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                         |    |
| 35 | <220>                                                              |    |
|    | <223> ARNhc                                                        |    |
|    | <400> 9                                                            |    |
| 40 | ccggctagtg cagccctatt ctttactcga gtaaagaata gggctgcact agtttttttg  | 59 |
|    | <210> 10                                                           |    |
|    | <211> 58                                                           |    |
|    | <212> ADN                                                          |    |
| 45 | <213> Secuencia artificial                                         |    |
|    | <220>                                                              |    |
|    | <223> ARNhc                                                        |    |
| 50 | <400> 10                                                           |    |
|    | ccggacgatg tcttgggatc aattgctcga gcaattgatc ccaagacatc gtttttttg   | 58 |
|    | <210> 11                                                           |    |
|    | <211> 58                                                           |    |
| 55 | <212> ADN                                                          |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                         |    |
|    | <220>                                                              |    |
|    | <223> ARNhc                                                        |    |
| 60 | <400> 11                                                           |    |
|    | ccggatgcag gcaacttcgt gaaagctcga gctttcacga agttgcctgc atttttttg   | 58 |
|    | <210> 12                                                           |    |
| 65 | <211> 58                                                           |    |

# ES 2 929 928 T3

|    |                                                                  |    |
|----|------------------------------------------------------------------|----|
|    | <212> ADN                                                        |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                       |    |
|    | <220>                                                            |    |
| 5  | <223> ARNhc                                                      |    |
|    | <400> 12                                                         |    |
|    | ccggccggttg taatagcatt ggctactcga gtagccaatg ctattacaac ggtttttg | 58 |
| 10 | <210> 13                                                         |    |
|    | <211> 58                                                         |    |
|    | <212> ADN                                                        |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                       |    |
| 15 | <220>                                                            |    |
|    | <223> ARNhc                                                      |    |
|    | <400> 13                                                         |    |
| 20 | ccggcgctcac cctttatggc actaactcga gttagtgcc taaagggtga cgtttttg  | 58 |
|    | <210> 14                                                         |    |
|    | <211> 58                                                         |    |
|    | <212> ADN                                                        |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                       |    |
| 25 | <220>                                                            |    |
|    | <223> ARNhc                                                      |    |
|    | <400> 14                                                         |    |
| 30 | ccggttacac ggatgcggtc aataactcga gttattgacc gcatccgtgt aatttttg  | 58 |
|    | <210> 15                                                         |    |
|    | <211> 57                                                         |    |
|    | <212> ADN                                                        |    |
| 35 | <213> Secuencia artificial                                       |    |
|    | <220>                                                            |    |
|    | <223> ARNhc                                                      |    |
| 40 | <400> 15                                                         |    |
|    | ccgggcccac acatttcttt gagatctcga gatctcaaag aaatgtttgg gctttttt  | 57 |
|    | <210> 16                                                         |    |
|    | <211> 57                                                         |    |
| 45 | <212> ADN                                                        |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                       |    |
|    | <220>                                                            |    |
|    | <223> ARNhc                                                      |    |
| 50 | <400> 16                                                         |    |
|    | ccggccaggg aagttaaagt taattctcga gaattaactt taacttccct ggttttt   | 57 |
|    | <210> 17                                                         |    |
| 55 | <211> 57                                                         |    |
|    | <212> ADN                                                        |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                       |    |
|    | <220>                                                            |    |
| 60 | <223> ARNhc                                                      |    |
|    | <400> 17                                                         |    |
|    | ccgggcacaa tacttggagt caattctcga gaattgactc caagtattgt gctttttt  | 57 |
| 65 | <210> 18                                                         |    |

|    |                                                                   |     |  |
|----|-------------------------------------------------------------------|-----|--|
|    | <211> 57                                                          |     |  |
|    | <212> ADN                                                         |     |  |
|    | <213> Secuencia artificial                                        |     |  |
| 5  | <220>                                                             |     |  |
|    | <223> ARNhc                                                       |     |  |
|    | <400> 18                                                          |     |  |
| 10 | ccgggcttac aatgacaaga ttgttctcga gaacaatctt gtcattgtaa gctttttt   | 57  |  |
|    | <210> 19                                                          |     |  |
|    | <211> 57                                                          |     |  |
|    | <212> ADN                                                         |     |  |
|    | <213> Secuencia artificial                                        |     |  |
| 15 | <220>                                                             |     |  |
|    | <223> ARNhc                                                       |     |  |
|    | <400> 19                                                          |     |  |
| 20 | ccggccctta tcttaagatg tcaatctcga gattgacatc ttaagataag gggttttt   | 57  |  |
|    | <210> 20                                                          |     |  |
|    | <211> 123                                                         |     |  |
|    | <212> ADN                                                         |     |  |
| 25 | <213> Secuencia artificial                                        |     |  |
|    | <220>                                                             |     |  |
|    | <223> Enlazador de código de barras                               |     |  |
| 30 | <220>                                                             |     |  |
|    | <221> misc_feature                                                |     |  |
|    | <222> (62)..(73)                                                  |     |  |
|    | <223> n es a, c, g o t                                            |     |  |
| 35 | <400> 20                                                          |     |  |
|    | ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag gcagtgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 60  |  |
|    | annnnnnnnn nnnacatagg ccgtcttcag ccgctgagac tgccaaggca cacaggggat | 120 |  |
|    | agg                                                               | 123 |  |
| 40 | <210> 21                                                          |     |  |
|    | <211> 21                                                          |     |  |
|    | <212> ADN                                                         |     |  |
|    | <213> Secuencia artificial                                        |     |  |
| 45 | <220>                                                             |     |  |
|    | <223> Cebador                                                     |     |  |
|    | <400> 21                                                          |     |  |
|    | gctctgtatc gggaggcctt a                                           | 21  |  |
| 50 | <210> 22                                                          |     |  |
|    | <211> 23                                                          |     |  |
|    | <212> ADN                                                         |     |  |
|    | <213> Secuencia artificial                                        |     |  |
| 55 | <220>                                                             |     |  |
|    | <223> Cebador                                                     |     |  |
|    | <400> 22                                                          |     |  |
| 60 | tgagtgcgtg atggtgagga gaa                                         | 23  |  |
|    | <210> 23                                                          |     |  |

|    |                              |    |  |
|----|------------------------------|----|--|
|    | <211> 15                     |    |  |
|    | <212> ADN                    |    |  |
|    | <213> Secuencia artificial   |    |  |
| 5  | <220>                        |    |  |
|    | <223> Sonda                  |    |  |
|    | <400> 23                     |    |  |
|    | <b>agtctccgga acatt</b>      | 15 |  |
| 10 | <210> 24                     |    |  |
|    | <211> 20                     |    |  |
|    | <212> ADN                    |    |  |
|    | <213> Secuencia artificial   |    |  |
| 15 | <220>                        |    |  |
|    | <223> Cebador                |    |  |
|    | <400> 24                     |    |  |
| 20 | <b>acccaacaa ggatcattgg</b>  | 20 |  |
|    | <210> 25                     |    |  |
|    | <211> 18                     |    |  |
|    | <212> ADN                    |    |  |
| 25 | <213> Secuencia artificial   |    |  |
|    | <220>                        |    |  |
|    | <223> Cebador                |    |  |
| 30 | <400> 25                     |    |  |
|    | <b>cgaatgctcc cgctccta</b>   | 18 |  |
|    | <210> 26                     |    |  |
|    | <211> 14                     |    |  |
| 35 | <212> ADN                    |    |  |
|    | <213> Secuencia artificial   |    |  |
|    | <220>                        |    |  |
|    | <223> Sonda                  |    |  |
| 40 | <400> 26                     |    |  |
|    | <b>cagaggcaaa tcag</b>       | 14 |  |
|    | <210> 27                     |    |  |
| 45 | <211> 20                     |    |  |
|    | <212> ADN                    |    |  |
|    | <213> Secuencia artificial   |    |  |
|    | <220>                        |    |  |
| 50 | <223> Cebador                |    |  |
|    | <400> 27                     |    |  |
|    | <b>tgtcaacgac cgaccttgag</b> | 20 |  |
| 55 | <210> 28                     |    |  |
|    | <211> 20                     |    |  |
|    | <212> ADN                    |    |  |
|    | <213> Secuencia artificial   |    |  |
| 60 | <220>                        |    |  |
|    | <223> Cebador                |    |  |
|    | <400> 28                     |    |  |
|    | <b>cccaactcct cccagtcctt</b> | 20 |  |
| 65 |                              |    |  |

|    |                                   |           |
|----|-----------------------------------|-----------|
| 5  | <210> 29                          |           |
|    | <211> 22                          |           |
|    | <212> ADN                         |           |
|    | <213> Secuencia artificial        |           |
|    | <220>                             |           |
| 10 | <223> Sonda                       |           |
|    | <400> 29                          |           |
|    | <b>catacttcaa agactgtttg tt</b>   | <b>22</b> |
|    | <210> 30                          |           |
|    | <211> 20                          |           |
| 15 | <212> ADN                         |           |
|    | <213> Secuencia artificial        |           |
|    | <220>                             |           |
|    | <223> Cebador                     |           |
|    | <400> 30                          |           |
| 20 | <b>actcaccaac ctcctgtcct</b>      | <b>20</b> |
|    | <210> 31                          |           |
|    | <211> 20                          |           |
|    | <212> ADN                         |           |
|    | <213> Secuencia artificial        |           |
| 25 | <220>                             |           |
|    | <223> Cebador                     |           |
|    | <400> 31                          |           |
|    | <b>gacaaacggg caacatacct</b>      | <b>20</b> |
|    | <210> 32                          |           |
| 30 | <211> 24                          |           |
|    | <212> ADN                         |           |
|    | <213> Secuencia artificial        |           |
|    | <220>                             |           |
|    | <223> Sonda                       |           |
| 35 | <400> 32                          |           |
|    | <b>tatcgctgga tgtgtctgcg gcgt</b> | <b>24</b> |
|    | <210> 33                          |           |
|    | <211> 21                          |           |
|    | <212> ADN                         |           |
| 40 | <213> Secuencia artificial        |           |
|    | <220>                             |           |
|    | <223> Cebador                     |           |
|    | <400> 33                          |           |
|    | <b>cgtctgtgcc ttctcatctg c</b>    | <b>21</b> |
| 45 | <210> 34                          |           |
|    | <211> 20                          |           |
|    | <212> ADN                         |           |
|    | <213> Secuencia artificial        |           |
|    | <220>                             |           |
| 50 | <223> Cebador                     |           |
|    | <400> 34                          |           |
|    | <b>gcacagcttg gaggcttgaa</b>      | <b>20</b> |
|    | <210> 34                          |           |
|    | <211> 20                          |           |
|    | <212> ADN                         |           |
| 55 | <213> Secuencia artificial        |           |
|    | <220>                             |           |
|    | <223> Cebador                     |           |
|    | <400> 34                          |           |
|    | <b>gcacagcttg gaggcttgaa</b>      | <b>20</b> |
| 60 | <210> 34                          |           |
|    | <211> 20                          |           |
|    | <212> ADN                         |           |
|    | <213> Secuencia artificial        |           |
|    | <220>                             |           |
| 65 | <223> Cebador                     |           |
|    | <400> 34                          |           |
|    | <b>gcacagcttg gaggcttgaa</b>      | <b>20</b> |
|    | <210> 34                          |           |
|    | <211> 20                          |           |
|    | <212> ADN                         |           |

|    |                                                                                                                |    |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5  | <210> 35<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> Sonda                    |    |
| 10 | <400> 35<br><b>ctgtaggcac aaattggt</b>                                                                         | 18 |
| 15 | <210> 36<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> Secuencia diana de ARNhc |    |
| 20 | <400> 36<br><b>ccaacagggt gcttacatat t</b>                                                                     | 21 |
| 25 | <210> 37<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> Secuencia diana de ARNhc |    |
| 30 | <400> 37<br><b>gtactagaca ccatatcatt t</b>                                                                     | 21 |
| 35 | <210> 38<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> Secuencia diana de ARNhc |    |
| 40 | <400> 38<br><b>actaaatgag cggctaatta a</b>                                                                     | 21 |
| 45 | <210> 39<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> Secuencia diana de ARNhc |    |
| 50 | <400> 39<br><b>tgatggccat aaccattaa t</b>                                                                      | 21 |
| 55 | <210> 40<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> Secuencia diana de ARNhc |    |
| 60 | <400> 40                                                                                                       |    |
| 65 | <400> 40                                                                                                       |    |

|    |                                                                                |    |
|----|--------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | ccaggctact tgaatctgaa t                                                        | 21 |
| 5  | <210> 41<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                |    |
| 10 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc<br><400> 41<br>ctgaagggac taggcaataa a | 21 |
| 15 | <210> 42<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                |    |
| 20 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc<br><400> 42<br>ccaatgaagg agaaccctta t | 21 |
| 25 | <210> 43<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                |    |
| 30 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc<br><400> 43<br>cctagtgcag ccctattctt t | 21 |
| 35 | <210> 44<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                |    |
| 40 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc<br><400> 44<br>ctagtgcagc cctattcttt a | 21 |
| 45 | <210> 45<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                |    |
| 50 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc<br><400> 45<br>acgatgtctt gggatcaatt g | 21 |
| 55 | <210> 46<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                |    |
| 60 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc<br><400> 46                            |    |
| 65 |                                                                                |    |

|    |                                                                 |           |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----------|
|    | <b>atgcaggcaa cttcgtgaaa g</b>                                  | <b>21</b> |
| 5  | <210> 47<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |           |
| 10 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                         |           |
|    | <400> 47<br><b>ccgttgtaat agcattggct a</b>                      | <b>21</b> |
| 15 | <210> 48<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |           |
| 20 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                         |           |
|    | <400> 48<br><b>cgtcacccctt tatggcacta a</b>                     | <b>21</b> |
| 25 | <210> 49<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |           |
| 30 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                         |           |
| 35 | <400> 49<br><b>ttacacggat gcggtcaata a</b>                      | <b>21</b> |
| 40 | <210> 50<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |           |
| 45 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                         |           |
|    | <400> 50<br><b>gccccaaacat ttctttgaga t</b>                     | <b>21</b> |
| 50 | <210> 51<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |           |
| 55 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                         |           |
|    | <400> 51<br><b>ccagggaagt taaagttaat t</b>                      | <b>21</b> |
| 60 | <210> 52<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |           |
|    | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                         |           |

|    |                                                                             |    |
|----|-----------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <400> 52<br>gcacaatact tggagtcaat t                                         | 21 |
| 5  | <210> 53<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |
| 10 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                                     |    |
|    | <400> 53                                                                    |    |
| 15 | gcttacaatg acaagattgt t                                                     | 21 |
|    | <210> 54<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |
| 20 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                                     |    |
| 25 | <400> 54<br>cccttatctt aagatgtcaa t                                         | 21 |
|    | <210> 55<br><211> 58<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |
| 30 | <220><br><223> ARNhc                                                        |    |
| 35 | <400> 55<br>ccggccaaga acaaacagaa gcctactcga gtaggcttct gtttgttctt ggtttttg | 58 |
| 40 | <210> 56<br><211> 58<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |
| 45 | <220><br><223> ARNhc                                                        |    |
|    | <400> 56<br>ccggcggaat atgtaccgac tgtttctcga gaaacagtcg gtacatattc cgtttttg | 58 |
| 50 | <210> 57<br><211> 58<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |
| 55 | <220><br><223> ARNhc                                                        |    |
|    | <400> 57<br>ccggccctct actattgaga aacttctcga gaagtttctc aatagtagag ggtttttg | 58 |
| 60 | <210> 58<br><211> 58<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |

|    |                                                                             |    |
|----|-----------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <220><br><223> ARNhc                                                        |    |
| 5  | <400> 58<br>ccggcagatg tatttctagt ctgttctcga gaacagacta gaaatacatc tgtttttg | 58 |
| 10 | <210> 59<br><211> 58<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |
| 15 | <220><br><223> ARNhc                                                        |    |
|    | <400> 59<br>ccgggactct gtaacagact aattgctcga gcaattagtc tgttacagag tctttttg | 58 |
| 20 | <210> 60<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |
| 25 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                                     |    |
|    | <400> 60<br>ccaagaacaa acagaagcct a                                         | 21 |
| 30 | <210> 61<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |
| 35 | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                                     |    |
| 40 | <400> 61<br>cggaatatgt accgactgtt t                                         | 21 |
| 45 | <210> 62<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |
|    | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                                     |    |
| 50 | <400> 62<br>ccctctacta ttgagaaact t                                         | 21 |
| 55 | <210> 63<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |
|    | <220><br><223> Secuencia diana de ARNhc                                     |    |
| 60 | <400> 63<br>cagatgtatt tctagtctgt t                                         | 21 |
| 65 | <210> 64<br><211> 21<br><212> ADN                                           |    |

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNhc

5

<400> 64

**gactctgtaa cagactaatt g**

**21**

## REIVINDICACIONES

1. Un fármaco antiviral para usar en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad asociada a la infección por el virus de la hepatitis B, que comprende como principio activo uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en oligonucleótido antisentido, ARNh<sub>c</sub>, ARN<sub>i</sub>p y ARN<sub>b</sub>c para un gen diana o un producto de transcripción del mismo, en donde dicho gen diana es uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en el gen DOCK11, gen LIPG, gen DENND2A y gen HECW2, preferentemente el gen DOCK11.
2. El fármaco antiviral para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el principio activo es uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en ARNh<sub>c</sub>, ARN<sub>i</sub>p y oligonucleótido antisentido para el gen diana o el producto de transcripción del mismo.
3. El fármaco antiviral para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el compuesto reconoce una secuencia de bases seleccionada de cualquiera de las siguientes:
- CCAACAGGGTGCTTACATATT (SEQ ID NO: 36)
  - GTACTAGACACCATATCATTT (SEQ ID NO: 37)
  - ACTAAATGAGCGGCTAATTAA (SEQ ID NO: 38)
  - TGATGGCCATAACCCATTAAT (SEQ ID NO: 39)
  - CCAGGCTACTTGAATCTGAAT (SEQ ID NO: 40)
  - CTGAAGGGACTAGGCAATAAA (SEQ ID NO: 41)
  - CCAATGAAGGAGAACCCTTAT (SEQ ID NO: 42)
  - CCTAGTGCAGCCCTATTCTTT (SEQ ID NO: 43)
  - CTAGTGCAGCCCTATTCTTTA (SEQ ID NO: 44)
  - ACGATGTCTTGGGATCAATTG (SEQ ID NO: 45)
  - ATGCAGGCAACTTCGTGAAAG (SEQ ID NO: 46)
  - CCGTTGTAATAGCATTGGCTA (SEQ ID NO: 47)
  - CGTCACCCTTTATGGCACTAA (SEQ ID NO: 48)
  - TTACACGGATGCGGTCAATAA (SEQ ID NO: 49)
  - GCCCAAACATTTCTTTGAGAT (SEQ ID NO: 50)
  - CCAGGGAAGTTAAAGTTAATT (SEQ ID NO: 51)
  - GCACAATACTTGGAGTCAATT (SEQ ID NO: 52)
  - GCTTACAATGACAAGATTGTT (SEQ ID NO: 53)
  - CCCTTATCTTAAGATGTCAAT (SEQ ID NO: 54)
  - una secuencia de bases obtenida por sustitución, delección, adición y/o inserción de una a cinco bases en una cualquiera de las secuencias de bases de los SEQ ID NO: 36 a 54 descritos anteriormente.
4. El fármaco antiviral para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto es un ARNh<sub>c</sub> que comprende una secuencia de bases seleccionada de cualquiera de las siguientes:
- CCGGCCAACAGGGTGCTTACATATTCTCGAGAATATGTAAGCACCCCTGT  
TGGTTTTTG (SEQ ID NO: 1)
  - CCGGGTACTAGACACCATATCATTTCTCGAGAAATGATATGGTGTCTAG  
TACTTTTTTG (SEQ ID NO: 2)
  - CCGGACTAAATGAGCGGCTAATTAAGTTCGAGTTAATTAGCCGCTCATTT  
AGTTTTTTTG (SEQ ID NO: 3)
  - CCGGTGATGGCCATAACCCATTAATCTCGAGATTAATGGGTTATGGCCA  
TCATTTTTTG (SEQ ID NO: 4)

- CCGGCCAGGCTACTTGAATCTGAATCTCGAGATTCAGATTCAAGTAGCC  
TGGTTTTTG (SEQ ID NO: 5)

- CCGGCTGAAGGGACTAGGCAATAAACTCGAGTTTATTGCCTAGTCCCTT  
CAGTTTTTTG (SEQ ID NO: 6)

- CCGGCCAATGAAGGAGAACCCTTATCTCGAGATAAGGGTTCTCCTTCAT  
TGGTTTTTTG (SEQ ID NO: 7)

- CCGGCCTAGTGCAGCCCTATTCTTTCTCGAGAAAGAATAGGGCTGCACT  
AGGTTTTTTG (SEQ ID NO: 8)

- CCGGCTAGTGCAGCCCTATTCTTTACTCGAGTAAAGAATAGGGCTGCAC  
TAGTTTTTTG (SEQ ID NO: 9)

- CCGGACGATGTCTTGGGATCAATTGCTCGAGCAATTGATCCCAAGACAT  
CGTTTTTTG (SEQ ID NO: 10)

- CCGGATGCAGGCAACTTCGTGAAAGCTCGAGCTTTCACGAAGTTGCCT  
GCATTTTTTG (SEQ ID NO: 11)

- CCGGCCGTTGTAATAGCATTGGCTACTCGAGTAGCCAATGCTATTACAA  
CGTTTTTTG (SEQ ID NO: 12)

- CCGGCGTCACCCTTTATGGCACTAACTCGAGTTAGTGCCATAAAGGGTG  
ACGTTTTTTG (SEQ ID NO: 13)

- CCGGTTACACGGATGCGGTCAATAACTCGAGTTATTGACCGCATCCGTG  
TAATTTTTG (SEQ ID NO: 14)

- CCGGGCCCAAACATTTCTTTGAGATCTCGAGATCTCAAAGAAATGTTTG  
GGCTTTTT (SEQ ID NO: 15)

- CCGGCCAGGGAAGTTAAAGTTAATTCTCGAGAATTAACTTTAACTTCCC  
TGGTTTTT (SEQ ID NO: 16)

- CCGGGCACAATACTTGGAGTCAATTCTCGAGAATTGACTCCAAGTATTG  
TGCTTTTT (SEQ ID NO: 17)

- CCGGGCTTACAATGACAAGATTGTTCTCGAGAACAACTTGTTCATTGTA  
AGCTTTTT (SEQ ID NO: 18)

- CCGGCCCTTATCTTAAGATGTCAATCTCGAGATTGACATCTTAAGATAA  
GGGTTTTT (SEQ ID NO: 19)

- una secuencia de bases obtenida por sustitución, delección, adición y/o inserción de una a cinco bases en una cualquiera de las secuencias de bases de los SEQ ID NO: 1 a 19 descritos anteriormente.

5. Un fármaco antiviral para usar en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad asociada aa la infección por el virus de la hepatitis C, que comprende como principio activo uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en oligonucleótido antisentido, ARNhc, ARNip y ARNbc para un gen diana o un producto de transcripción del mismo, en donde dicho gen diana es el gen DOCK11.

6. El fármaco antiviral para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se usa en combinación con un inhibidor del crecimiento viral.

7. Un método de cribado de un fármaco antiviral para usar en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad asociada aa la infección por el virus de la hepatitis B, que comprende las siguientes etapas (A) a (C) de:

- (A) poner una célula en contacto con una sustancia de prueba en un sistema en el que la célula expresa un gen diana;
- (B) medir el nivel de expresión del gen diana en la célula y comparar el nivel de expresión del gen diana en la célula en contacto con la sustancia de prueba con el nivel de expresión del gen diana en una célula que no está en contacto con la sustancia de prueba; y
- (C) seleccionar una sustancia de prueba que provoque una disminución en el nivel de expresión del gen diana en la célula como componente del fármaco antiviral mediante el cribado basado en el resultado de la comparación de la etapa (B) anterior;

en donde dicho gen diana es uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en el gen DOCK11, gen LIPG, gen DENND2A y gen HECW2.

8. Un método de cribado de un fármaco antiviral para usar en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad asociada aa la infección por el virus de la hepatitis C, que comprende las siguientes etapas (A) a (C) de:

- (A) poner una célula en contacto con una sustancia de prueba en un sistema en el que la célula expresa un gen diana;
- (B) medir el nivel de expresión del gen diana en la célula y comparar el nivel de expresión del gen diana en la célula en contacto con la sustancia de prueba con el nivel de expresión del gen diana en una célula que no está en contacto con la sustancia de prueba;
- (C) seleccionar una sustancia de prueba que provoque una disminución en el nivel de expresión del gen diana en

la célula como componente del fármaco antiviral mediante el cribado basado en el resultado de la comparación de la etapa (B) anterior;

en donde dicho gen diana es el gen DOCK11.

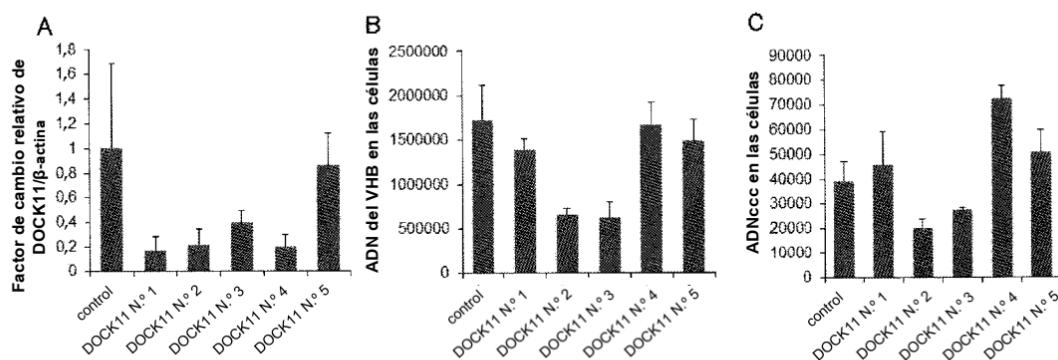


FIG.1

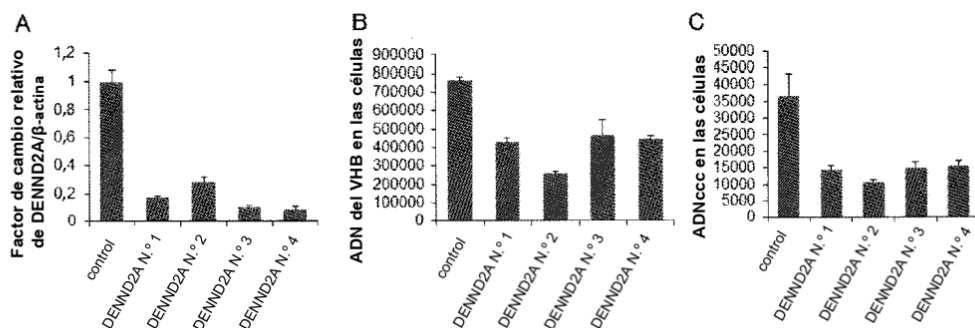


FIG.2

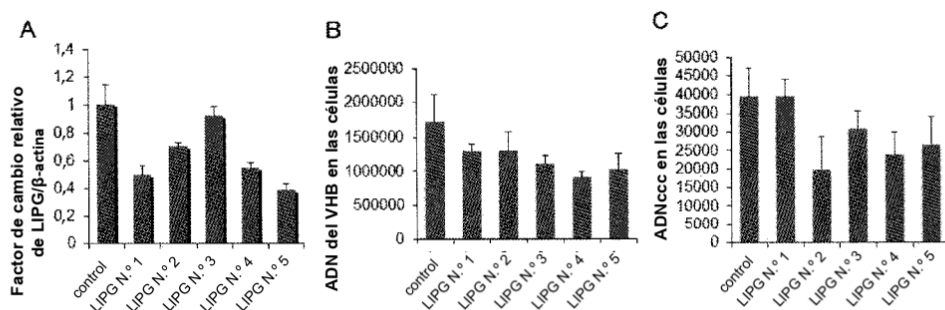


FIG.3

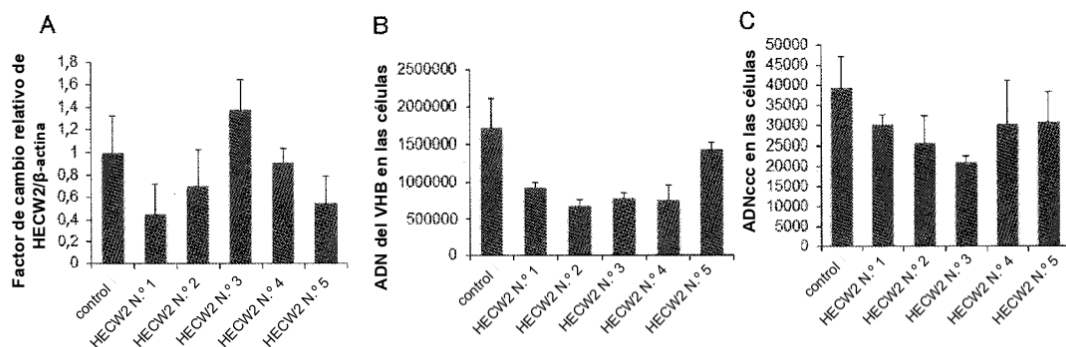


FIG.4

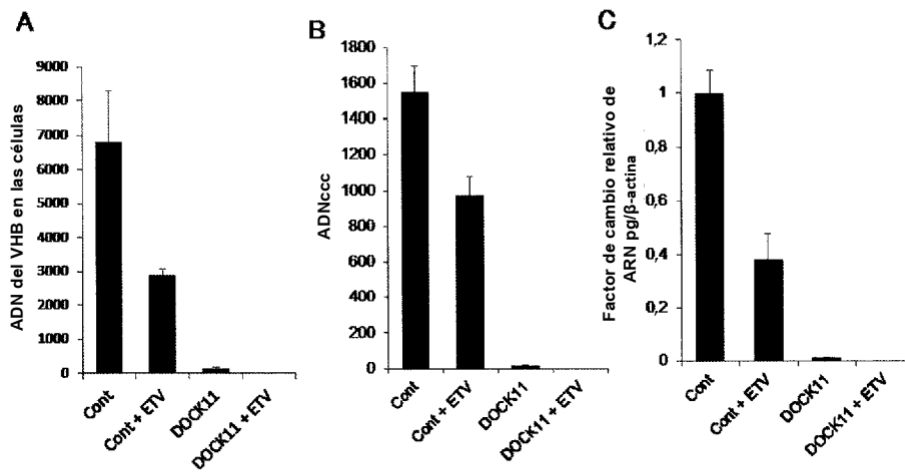


FIG.5

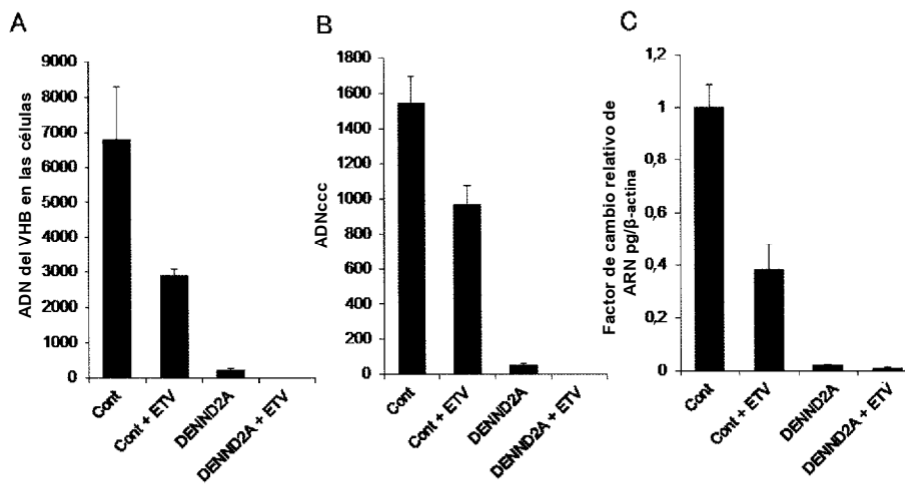


FIG.6

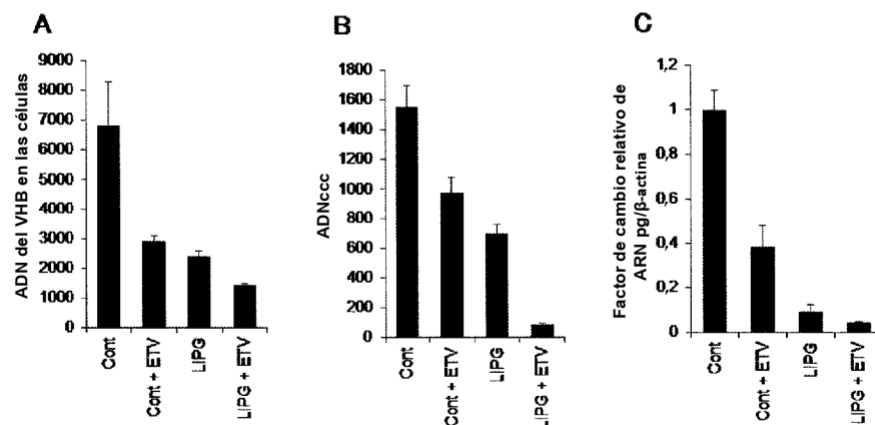


FIG.7

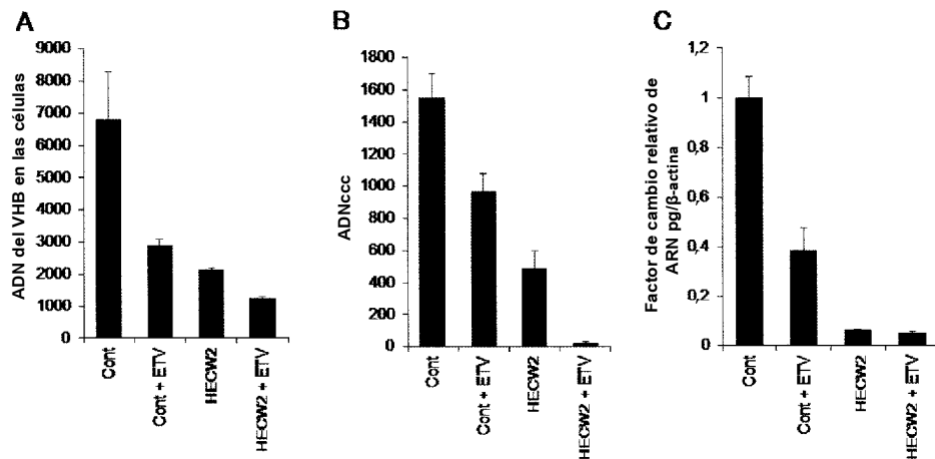


FIG.8

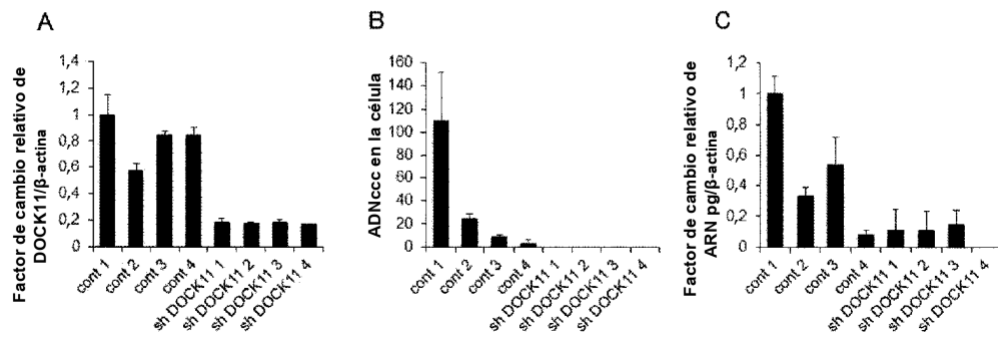


FIG.9

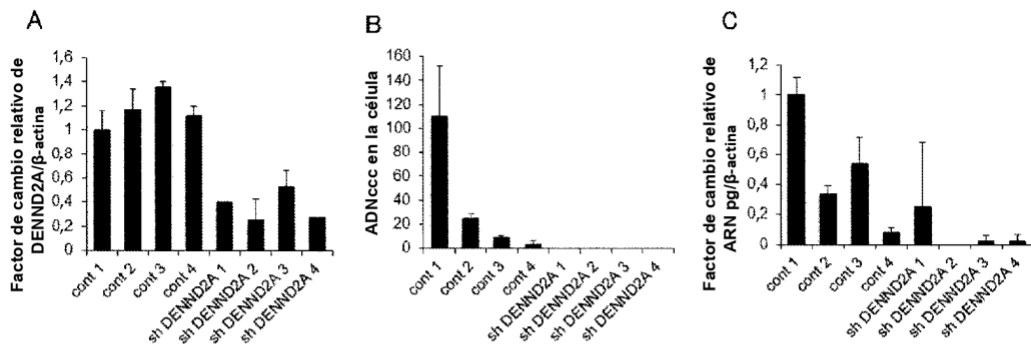


FIG.10

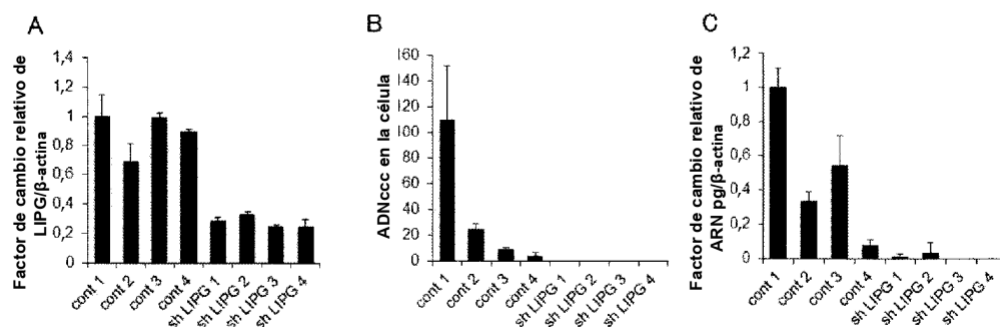


FIG.11

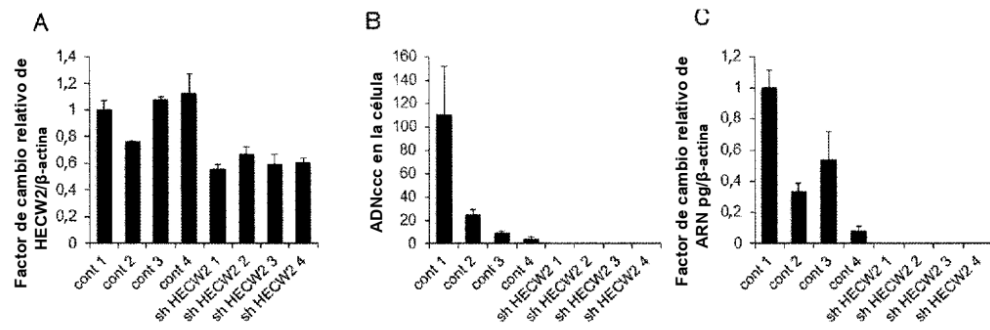


**FIG.12**

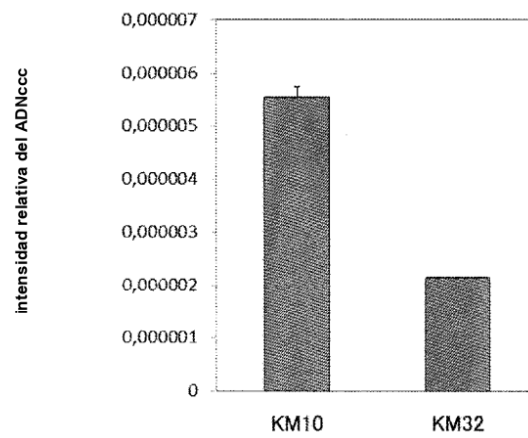


**FIG.13**

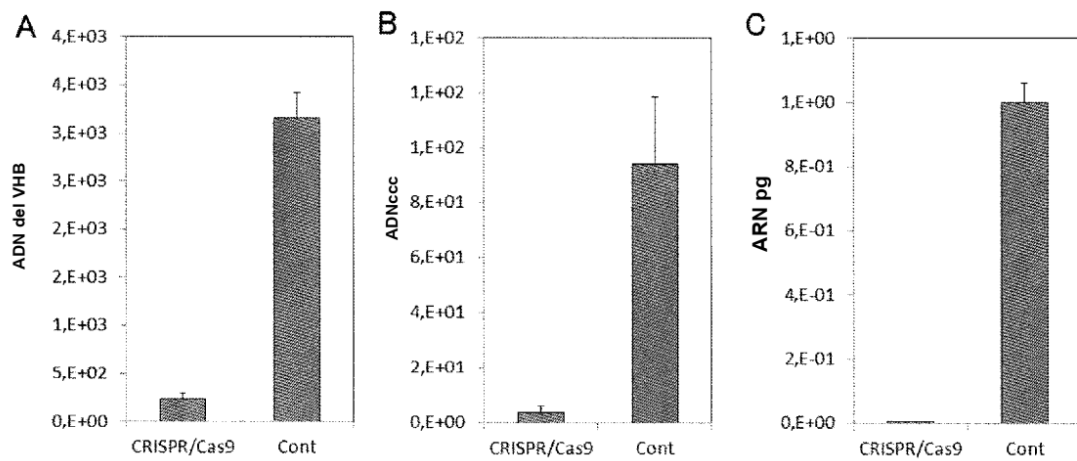


**FIG.14**

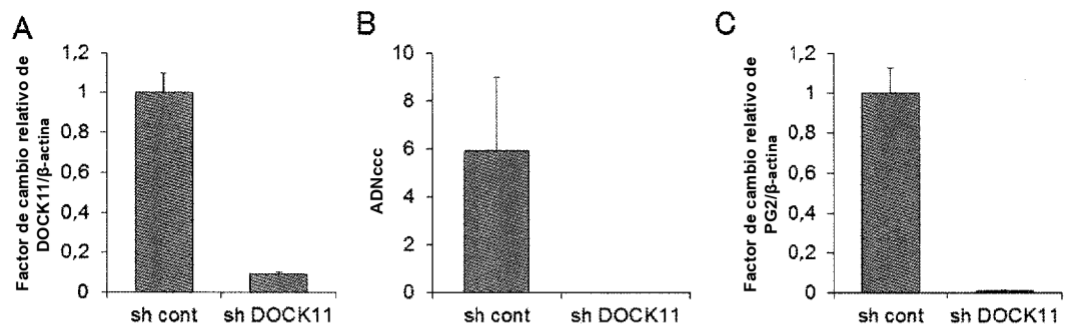


**FIG.15**

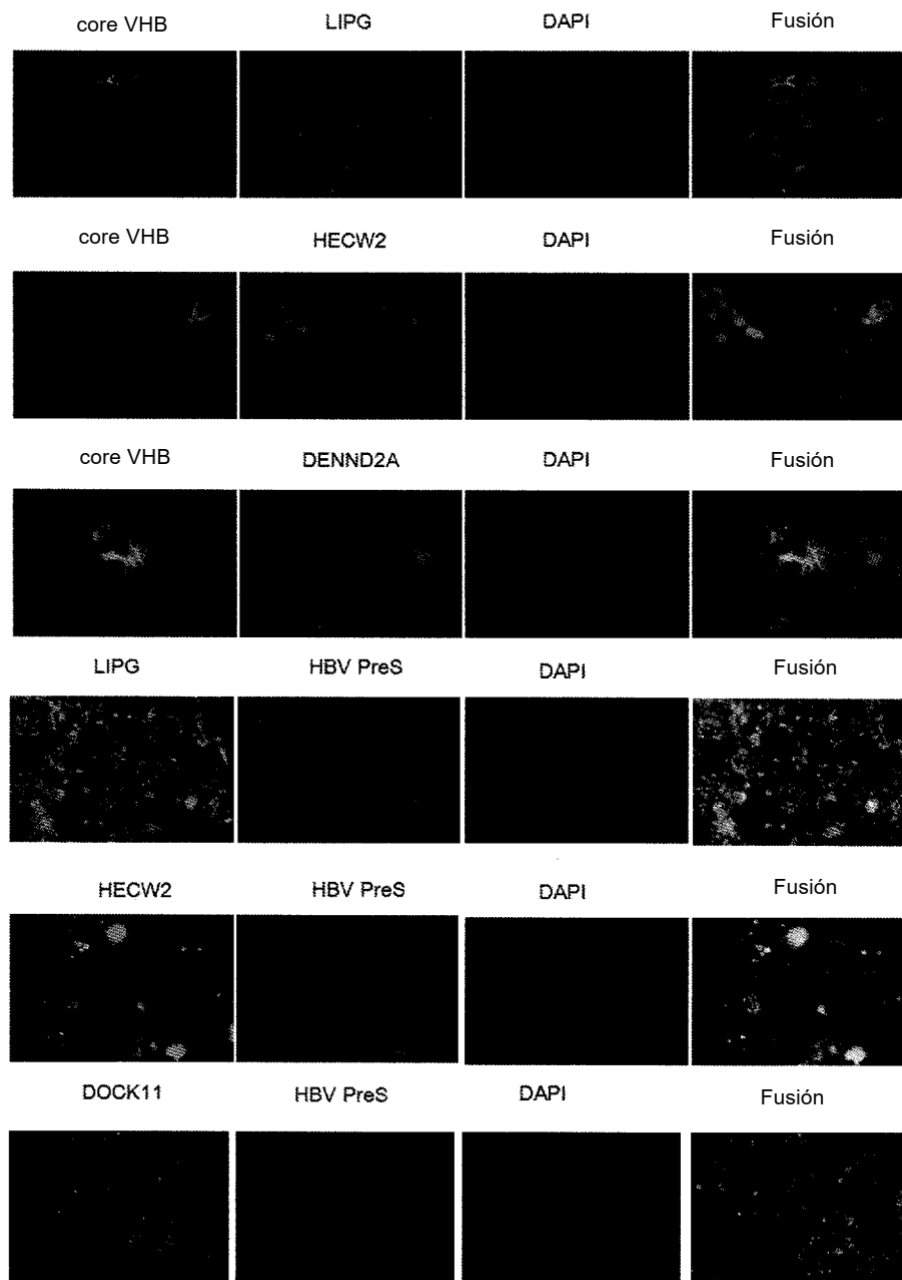


**FIG.16**

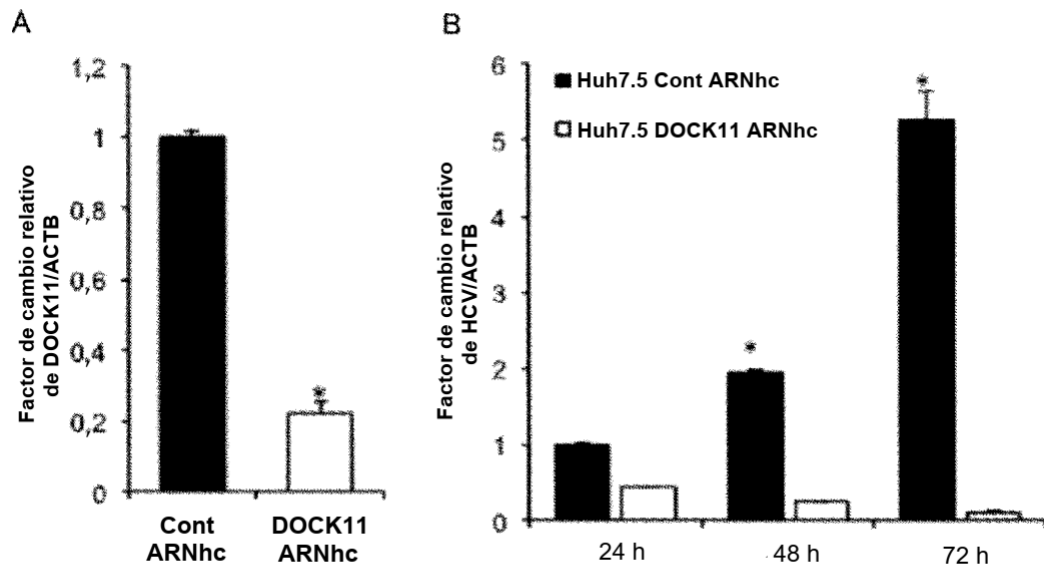


**FIG.17**

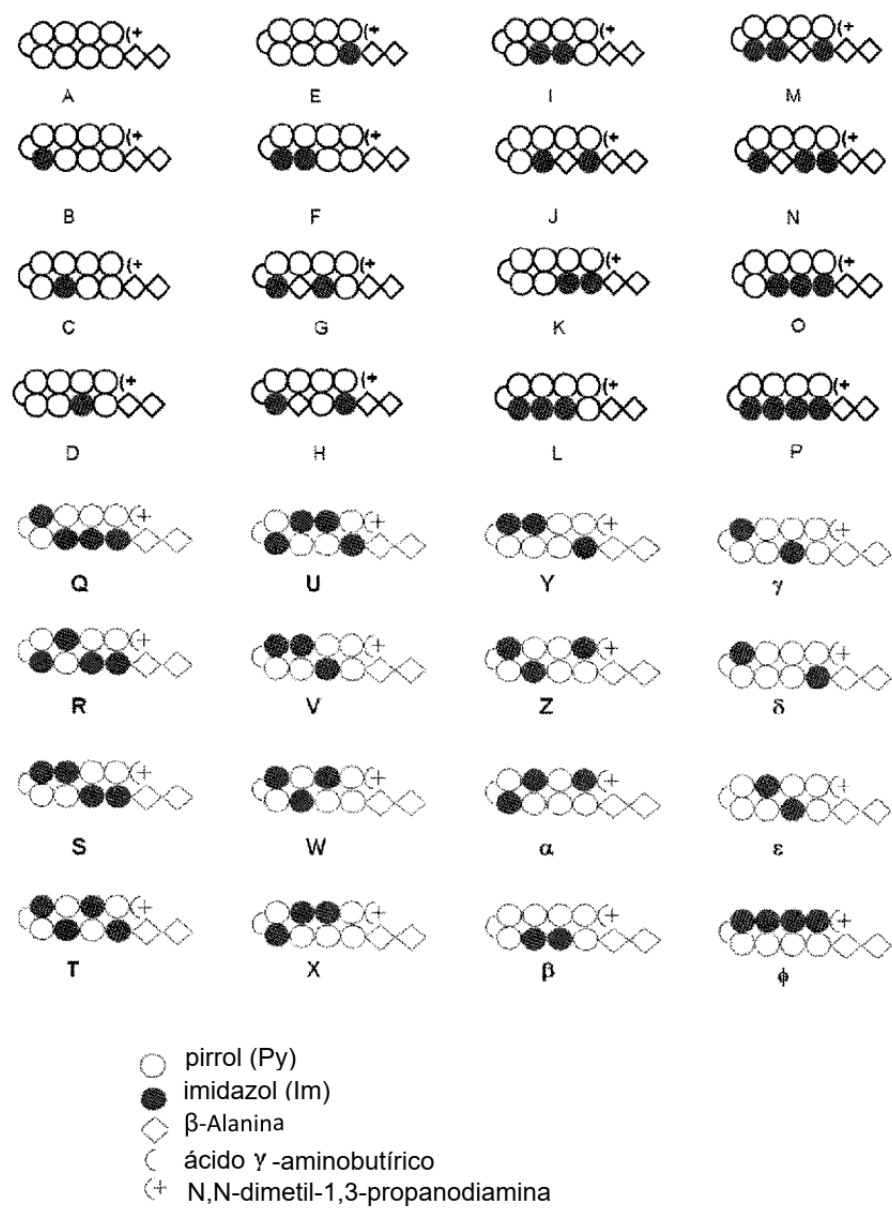


**FIG.18**

1. CCGGCCAACAGGGTGCTTACATATTCTCGAGAATATGTAAGCACCCCTGTTGGTTTTTG 6 sitios  
 WCWWW (B)  
 WWCWW (C)  
 WWWCW (D)  
 WWWCW (E)  
 WCWCGW (alfa)  
 WCGWWW (beta)
2. CCGGGTACTAGACACCATATCATTCTCGAGAAATGATATGGTGTCTAGTACTTTTTG 8 sitios  
 WCWWW (B)  
 WWCWW (C)  
 WWWCW (D)  
 WWWCW (E)  
 WWWCW (E)  
 WCWCCW (N)  
 WCWCGW (alfa)  
 WGWCCW (gamma)
3. CCGGACTAAATGAGCGGCTAATTAACCTCGAGTTAATTAGCCGCTCATTTAGTTTTTG 6 sitios  
 WWWWW (A)  
 WWWWW (A)  
 WCWWW (B)  
 WWWGW (B)  
 WWWCW (E)  
 WCWCGW (alfa)
4. CCGGTGATGGCCATAACCCATTAATCTCGAGATTAATGGGTTATGGCCATCATTTTTG 6 sitios  
 WWWWW (A)  
 WWWCW (E)  
 WCCCW (L)  
 WWCCCW (O)  
 WGGCCW (S)  
 WCWCGW (alfa)
5. CCGGCCAGGCTACTTGAATCTGAATCTCGAGATTCAGATTCAGTAGCCTGGTTTTTG 3 sitios  
 WGWWW (D)  
 WGGCWW (V)  
 WCWCGW (alfa)

**FIG.19**

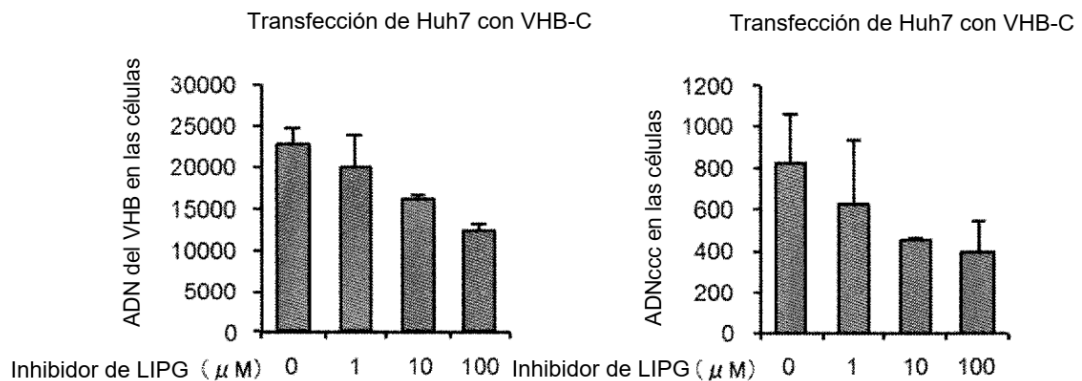


**FIG.20**

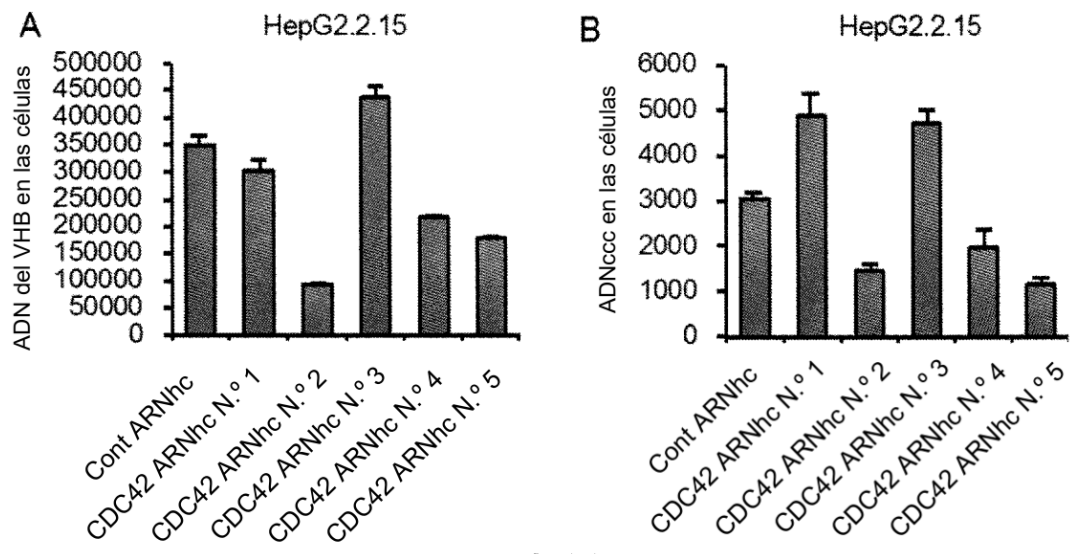


**FIG.21**

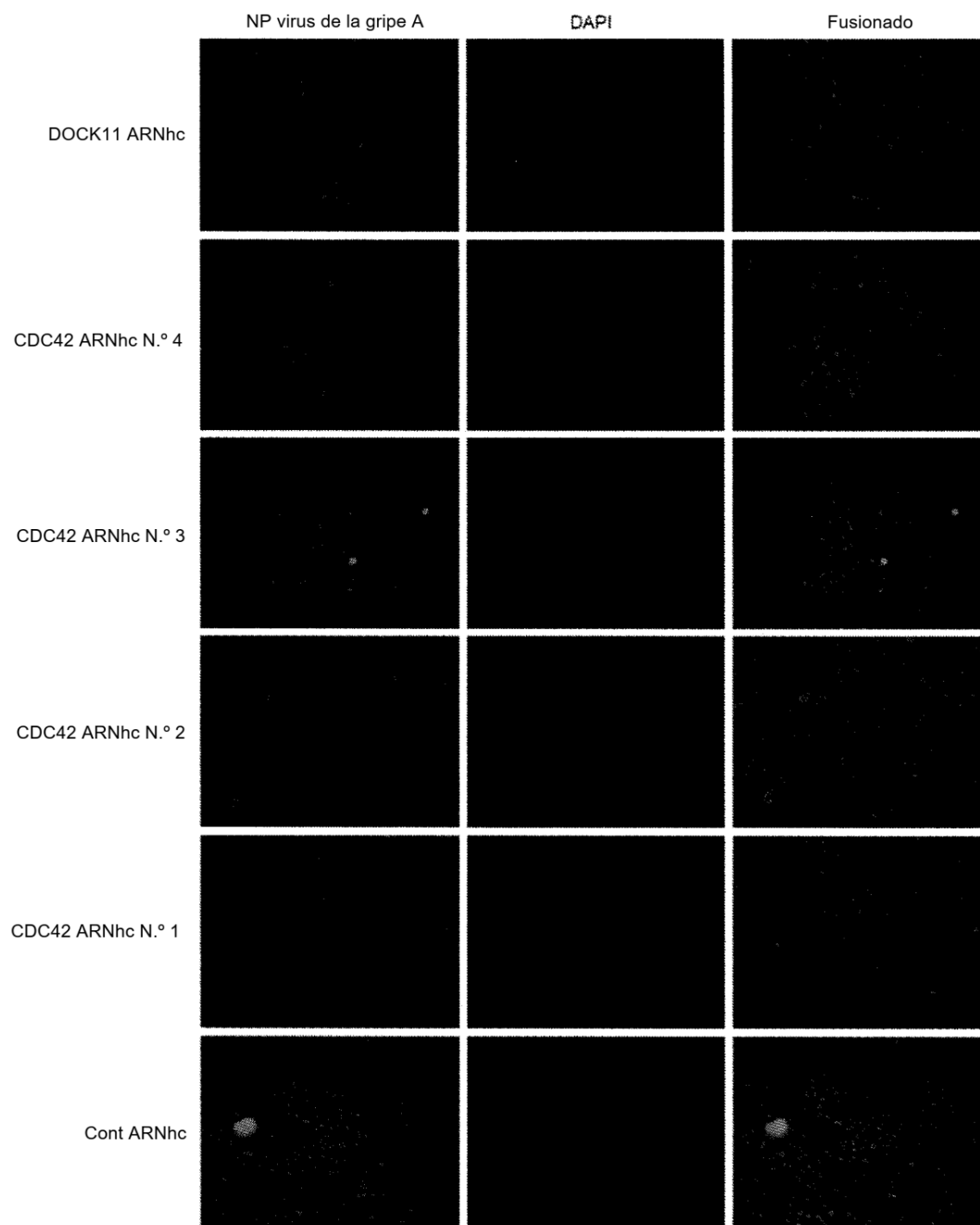


**FIG.22**