

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
20 de Octubre de 2005 (20.10.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/097991 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 15/11

CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ SERRANO, 117, E-28006 MADRID (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/070034

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): ROMERO

(22) Fecha de presentación internacional:
23 de Marzo de 2005 (23.03.2005)

LÓPEZ, Cristina [ES/ES]; Insto. de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (GRANADA) (ES). BARROSO DEL JESUS, Alicia [ES/ES]; Insto. de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (GRANADA) (ES). PUERTA FERNÁNDEZ, Elena [ES/ES]; Insto. de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (GRANADA) (ES). BERZAL HERRANZ, Alfredo

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

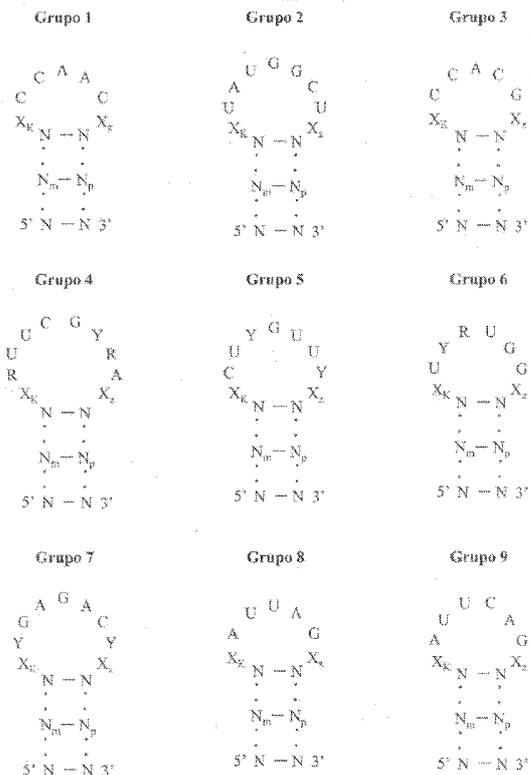
(30) Datos relativos a la prioridad:
P200400734 25 de Marzo de 2004 (25.03.2004) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: RNA SEQUENCE, RNA AND DNA CONSTRUCTION, PHARMACEUTICAL COMPOSITION THAT INHIBITS THE PROLIFERATION OF THE VIRUS THAT CAUSES TYPE C HEPATITIS (HCV), AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Título: SECUENCIA DE RNA, CONSTRUCCIÓN DE RNA Y DNA, Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA INHIBIDORAS DE LA PROLIFERACIÓN DEL VIRUS CAUSANTE DE LA HEPATITIS TIPO C (VHC), Y SUS APLICACIONES



GRUPO = GROUP

(57) Abstract: The invention relates to: an RNA sequence that inhibits the replication of the HCV virus by binding to the IRES region, RNA and DNA constructions, pharmaceutical compositions containing same, and the application thereof in methods for the prevention and treatment of infections caused, in particular, by the HCV. The aforementioned RNA sequences are advantageous in that it is a product that is synthesised naturally by cells and, as such, does not produce any type of toxic effect. In addition, the fact that the IRES region is highly conserved between the different HCV strains makes possible the development of more effective therapeutic tools against said viruses which have a good mutagenesis capacity, thereby enabling same to evade antiviral treatments.

(57) Resumen: La invención proporciona una secuencia de RNA inhibidora de la replicación del virus VHC por su unión a la región IRES, así como construcciones de RNA y DNA, composiciones farmacéuticas que las contienen, y su aplicación en procedimientos de prevención y tratamiento de infecciones producidas, preferentemente por el VHC. La ventaja de dichas secuencias de RNA es que es un producto que sintetizan las células de forma natural, por lo que no se prevé ningún tipo de efecto tóxico. Además, el hecho que esta región IRES esté altamente conservada entre las distintas cepas de VHC permitirá el desarrollo de herramientas terapéuticas más eficaces frente a estos virus que presentan una gran capacidad de mutagénesis, que les capacita el escape a tratamientos antivirales.

WO 2005/097991 A1



[ES/ES]; Insto. de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (GRANADA) (ES).

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

(84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO

(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

SECUENCIA DE RNA, CONSTRUCCIÓN DE RNA Y DNA, Y COMPOSICION FARMACÉUTICA INHIBIDORAS DE LA PROLIFERACIÓN DEL VIRUS CAUSANTE DE LA HEPATITIS TIPO C (VHC), Y SUS APLICACIONES

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La invención proporciona nuevos productos para la inhibición específica del IRES del VHC y en consecuencia tiene una gran incidencia en las áreas de Biomedicina, Salud humana y animal, así como Investigación Básica y Biotecnología por la posibilidad del desarrollo de sistemas de modulación de la expresión génica de interés industrial, agroalimentario, etc., controlados por la actividad del IRES. De las posibles aplicaciones, la más inmediata puede ser el uso como agentes terapéuticos frente a la infección por el VHC, aunque tiene proyecciones adicionales para su utilización como inhibidores de otros virus de interés en explotaciones ganaderas y agrícolas.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

El virus C de la hepatitis (VHC) es el principal responsable de las hepatitis de origen postransfusional. La infección crónica por este virus es una enfermedad progresiva que puede acabar en cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (Seef, 1997. Natural History of hepatitis C. Hepatology 26, Supp. 1, 21-28). Es el principal causante de las enfermedades hepáticas en el mundo, con más de 170 millones de infectados, la mayoría de ellos se encuentran en África y Asia, y afecta a un 2% de la población del mundo occidental (WHO report, 2000 www.cdc.gov). No existe vacuna para esta enfermedad y el agente terapéutico que ofrece mejores resultados es el interferón alpha (agente antivírico no específico) usado en combinación con la ribavirina, pero la eficacia de estos tratamientos actuales es baja, consiguiéndose tan sólo tasas globales de respuesta mantenida inferiores al 50%, siendo especialmente bajos para los pacientes infectados con el VHC del genotipo 1b (McHutchinson et al., 1998. Interferon alpha-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. N England J Med 339, 1485-1492; Neumann et al., 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha

20

25

30

therapy. *Science* 282, 103-107; Poynard et al., 1998. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT).
5 *Lancet* 352, 1426-1432).

El genoma del virus consiste en una molécula de RNA de polaridad positiva de 9.400 nucleótidos. Este RNA es a su vez genoma y mensajero del virus siendo traducido en una de las etapas más tempranas de la infección viral, a una única poliproteína, que es posteriormente procesada por la acción
10 de proteasas virales y celulares. En el extremo 5' del genoma viral existe una región de 341 nucleótidos no codificante (Purcell, 1997. *The hepatitis C: Overview. Hepatology* 26, Supp. 1, 11-14). Esta región precede a la pauta abierta de lectura de la poliproteína viral, y es suficiente para dirigir la traducción de la misma de una manera independiente de Cap, indicando que
15 en esta región existe un sitio interno de entrada del ribosoma, conocido por IRES ("internal ribosome entry site") que se extiende hasta 30 nucleótidos en 3' del codón de iniciación (Wang et al., 1993. *Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. J. Virol.* 67, 3338-3344; Reynolds et al., 1995. *Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. EMBO J.* 14, 6010-6020).
20

Al igual que otros virus tipo RNA el VHC presenta una gran variabilidad génica, siendo la región 5' no codificante la más conservada del genoma. A su vez esta región presenta una estructura compleja y especialmente estable que es esencial para su función biológica, y por tanto para la viabilidad del virus. La
25 estructura consta de cuatro dominios de doble cadena cerrados por fragmentos de cadena sencilla (estructuras tipo tallo-lazo I a IV en fig.1; Gallego y Varini, 2002. *The hepatitis C virus internal ribosome-entry site: a new target for antiviral research. Biochemical Society Transactions* 30, 140-145); además se han identificado interacciones terciarias que definen otros motivos estructurales
30 (Lyons et al., 2001. *Hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA contains a tertiary structural element in a functional domain of stem-loop II.* 29, 2535-2541; Spahn et al., 2001. *Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit. Science* 291, 1959-1962). En la

Figura 1 se muestra una representación esquemática de las estructuras secundaria y terciaria propuesta para el dominio IRES del VHC. Los distintos dominios y subdominios se identifican por I, II, IIIa, b, c, d, e, f y IV. AUG representa el sitio de inicio de la traducción (Figura adaptada de Honda et al., 1999. Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site. J. Virol 73, 4941-51).

La falta de eficiencia de las terapias disponibles actualmente hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias antivirales, de un lado se trabaja en el desarrollo de fármacos que actúen sobre las actividades esenciales del ciclo vital del virus (proteasas virales, helicasa, polimerasa) y de otro en el desarrollo de estrategias que permitan la actuación directa sobre el genoma viral. En los últimos años se han publicado varios trabajos que describen el uso de ácidos nucleicos como inhibidores virales:

1.- Oligonucleótidos antisentido, existe una solicitud de patente del diseño, síntesis y uso de oligonucleótidos antisentido como inhibidores de la actividad del virus de la hepatitis C. (Anderson, K.P.; Hanecak, R.C., Nozaki, C., Dorr, F.A., Kwoh, T.J. Compositions and methods for treatment of hepatitis C virus-associated diseases. US Patent Application, 11 de Septiembre 2003).

Los oligonucleótidos antisentido se definen como ácidos nucleicos de longitud variable y secuencia perfectamente complementaria a la diana (DNA o RNA) contra la que se dirigen.

2.- Ribozimas: Son moléculas de RNA dotadas de actividad catalítica (Welch et al., 1996. A potential therapeutic application of hairpin ribozymes: in vitro and in vivo studies of gene therapy for hepatitis C virus infection. Gene Therapy 3, 994-1001; Sakamoto et al., 1996. Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. J Clin. Invest. 98, 2720-2728; Lieber et al., 1996. Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. J. Virol. 70, 8782-8791; Macejak et al., 2000. Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. Hepatology 31, 769-776), en todos estos trabajos se utiliza la capacidad de ciertas

moléculas de RNA de cortar otras moléculas de RNA o dianas de las mismas.

3.- Aptámeros: Ácidos nucleicos que son capaces de unirse eficientemente a otra molécula bien un ácido nucleico, proteína, etc, y cuya actividad está determinada por la estructura que presentan los mismos y la presencia de nucleótidos concretos en posiciones específicas a través de los cuales se lleva a cabo la interacción con la diana. Recientemente se ha publicado el uso de aptámeros de RNA que se unen específicamente al dominio II del IRES del VHC (Kikuchi, et al., 2003. RNA aptamers targeted to domain II of Hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. J. Biochem. 133, 263-270).

Estas estrategias se han combinado con la inclusión de modificaciones químicas en las moléculas de RNA que les confieren una mayor estabilidad y con ello una mayor eficacia. Existe una patente de un producto que actúa como inhibidor del VHC consistente en una molécula de RNA que porta una ribozima dirigida frente a la región IRES y un segundo dominio que se une específicamente a la proteasa viral NS3 (Nishikawa, R., Fukuda, K., Nishikawa, F., Uragami, S. and Funaji, K. RNA molecule targeting IRES and NS3 protease of hepatitis C virus. JP2002165594. 11 de Junio de 2002).

Las estrategias actuales con interferón dirigidas a frenar la infección por VHC han resultado inefectivas. Son tratamientos tremendamente agresivos para el paciente por los efectos secundarios que conllevan, además son muy costosos para la sanidad, lo cual ha impulsado la necesidad de desarrollar tratamientos alternativos.

En el contexto de uso de ácidos nucleicos como inhibidores del VHC se enmarca la presente invención, moléculas de RNA seleccionadas para su unión específica a la región IRES del virus, y que inhiben específicamente la actividad del mismo y en consecuencia la traducción viral. Estas moléculas presentan una estructura definida necesaria para su actividad y requieren de la presencia de una serie de nucleótidos en posiciones concretas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

- Descripción breve

La invención proporciona una secuencia de RNA inhibidora de la replicación del virus VHC por su unión a la región IRES, así como construcciones de RNA que la contiene, construcciones de DNA que permiten la expresión de dicha secuencia de RNA, composiciones farmacéuticas que las contienen, y su aplicación en procedimientos de prevención y tratamiento de infecciones producidas, preferentemente por el VHC.

La ventaja de dichas secuencias de RNA es que es un producto que sintetizan las células de forma natural, por lo que no se prevé ningún tipo de efecto tóxico por su administración para las células no infectadas que las eliminarán como cualquier otro RNA derivado de su propia actividad génica. Además, el hecho que esta región IRES esté altamente conservada entre las distintas cepas de VHC, así como en otros virus relacionados, por ejemplo, el virus de la diarrea bovina o incluso de la peste porcina clásica, permitirá el desarrollo de herramientas terapéuticas más eficaces frente a estos virus que presentan una gran capacidad de mutagénesis, que les permiten escapar a tratamientos antivirales.

20 - Descripción detallada de la invención

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar nuevos compuestos farmacéuticos eficaces y seguros frente al virus causante de la hepatitis C (VHC).

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han observado que es posible la inhibición de la replicación del VHC mediante el uso de una molécula de RNA de secuencia concreta que se une específicamente a regiones muy conservadas del dominio 5' no traducible del genoma del virus, la región IRES del VHC implicada en el inicio de la traducción. Esta secuencia de RNA puede ser utilizada, por ejemplo, con fines terapéuticos, por ejemplo, como compuesto terapéutico en la elaboración de composiciones farmacéuticas para proteger a mamíferos, preferentemente humanos, de la infección causada por virus, preferentemente el VHC.

Las secuencias de RNA inhibidoras de la presente invención, de

aproximadamente unos 25 nucleótidos de longitud, se han seleccionado específicamente por su unión a la región IRES del VHC, y se ha probado que bloquean o inhiben la actividad biológica del virus y en consecuencia su capacidad de proliferar. Por otra parte, presentan la ventaja de que al ser moléculas de RNA es un producto que sintetizan las células de forma natural, por lo que no se prevé ningún tipo de efecto tóxico para las células no infectadas que las eliminarán como cualquier otro RNA derivado de su propia actividad génica. Además, el hecho que esta región IRES esté altamente conservada entre las distintas cepas de VHC (Martell et al., 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. J Virol, 66 (5): 3225-9) así como en otros virus relacionados, por ejemplo, el virus de la diarrea bovina o incluso de la peste porcina clásica, permite, por un lado, el desarrollo de herramientas terapéuticas más eficaces frente a estos virus que presentan una gran capacidad de mutagénesis, que les permiten escapar a tratamientos antivirales; y por otro lado, estas secuencias serán de utilidad en farmacología para el uso como cabezas de serie para el desarrollo de nuevos antivirales frente al VHC u otros virus que comparten con el VHC la existencia de una región IRES esencial para su viabilidad (Brown et al., 1992. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. Nucleic Acids Res. 20 (19): 5041-5).

Igualmente, los productos descritos en la invención podrán ser utilizados para bloquear la actividad del IRES del VHC en aplicaciones de interés biotecnológico, o de investigación básica, procesos en los que se expresa un gen de interés bajo el control del IRES.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención lo constituye una secuencia de RNA (también denominada aptámero) inhibidora de la proliferación del virus causante de la hepatitis tipo C (VHC), en adelante secuencia de RNA de la invención, caracterizada porque está constituida por una secuencia de RNA que se une específicamente a regiones del dominio 5' no traducible del genoma del virus, la región IRES (Internal Ribosome Entry Site) del VHC y porque se encuentra formando una estructura definida por una región de doble cadena que deja expuestos nucleótidos en cadena sencilla de

RNA, a través de los cuales se une específicamente al RNA de la región IRES del VHC.

El término "VHC", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las diferentes cepas de VHC pertenecientes a cualquiera de los genotipos (a título ilustrativo, ver Simmonds, P. 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol.* 74 (11): 2391-9). Asimismo, se refiere a la cuasiespecie que infecta a un individuo (Martell et al., 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol*, 66 (5): 3225-9).

Tal como se utiliza en la presente invención el término "IRES" se refiere a la secuencia de RNA del VHC (NC_004102), así como a secuencias con esta misma función (Gallego, J. 2002. Internal initiation of translation by viral and cellular IRESs: a new avenue for specific inhibition of protein synthesis? *Curr Opin Drug Discov Devel.* 5(5): 777-84).

Un objeto particular de la presente invención lo constituye la secuencia de RNA de la invención caracterizada porque pertenece, entre otras, a una de las siguientes familias de secuencias definidos en función de unos dominios consenso de la secuencia de unión al IRES definida:

- 20 Familia 1: 5' (N)_mX_kCCAACX_z(N)_p3'
 Familia 2: 5' (N)_mX_kUAUGGCUX_z(N)_p 3'
 Familia 3: 5' (N)_mX_kCCACGX_z(N)_p 3'
 Familia 4: 5' (N)_mX_kRUUCGYRAX_z(N)_p3'
 Familia 5: 5' (N)_mX_kCUYGUUYX_z(N)_p3'
 25 Familia 6: 5' (N)_mX_kUYRUGGX_z(N)_p3'
 Familia 7: 5' (N)_mX_kYGAGACYX_z(N)_p3'
 Familia 8: 5' (N)_mX_kAUUAGX_z(N)_p3'
 Familia 9: 5' (N)_mX_kAUUCAGX_z(N)_p3'

30 Donde: A, Adenina
 C, Citosina
 G, Guanina
 U, Uracilo
 N y X es cualquier nucleótido

R, nucleótido de purina (Adenina o Guanina)

Y, nucleótido de pirimidina (Citosina o Uracilo)

m, p, k y z cualquier número entero desde 0 en adelante.

Las secuencias (N), de longitud m en 5' interaccionarán con las
5 secuencias (N) de longitud p en 3' formando una región de doble cadena (no
necesariamente perfecta) que deja expuestas en una región de cadena sencilla
las secuencias consenso de cada uno de los grupos.

Por otro lado, forman parte de la invención las realizaciones particulares de la
secuencia de RNA de la invención, que perteneciendo a alguno de las familias
10 anteriores, pertenecen, entre otras, a título ilustrativo y sin que limite el alcance
de la presente invención, al siguiente grupo:

SEQ ID NO	Nº AP	Familia	Secuencia de RNA
SEQ ID NO 6	<u>AP1</u>	1	GGCUCGUUCAAGUGUCCCAACCACC
SEQ ID NO 7	<u>AP2</u>	1	GGAACGAUCAGAGCAACCAACUGCC
SEQ ID NO 8	<u>AP3</u>	1	GGAUGCAAUCUUGAGACCAACCUC
SEQ ID NO 9	<u>AP10</u>	4	UUCUGAGUGAUUCGUAAUCCUAC
SEQ ID NO 10	<u>AP13</u>	1 6 7	GGUACCAGCGCGAGUCCCAACACC
SEQ ID NO 11	<u>AP14</u>	2	GGAUUUGGCUACGCUAAAACCC
SEQ ID NO 12	<u>AP15</u>	1 6 3	GGAGCCUCCACCGGUAACCAACUCC
SEQ ID NO 13	<u>AP16</u>	3	CUCGUUUCACGACCUCACGAGACC
SEQ ID NO 14	<u>AP17</u>	7	CGUCGCCACAUGAGACUUUACCCAC
SEQ ID NO 15	<u>AP18</u>	8	GGAUUAGCUUCGGAUUAUGGCUGCC
SEQ ID NO 16	<u>AP21</u>	2 6 3	AUGGCUAGCCUCAAUCCCACGGCC
SEQ ID NO 17	<u>AP22</u>	2	AUGGCUCGCCUUCCCUCACCAACCC
SEQ ID NO 18	<u>AP23</u>	2	UCCUAAGUAUGGCUAUUAGGCAACC
SEQ ID NO 19	<u>AP24</u>	1	GCCGUCCGAGCAGGUCCCAACACC
SEQ ID NO 20	<u>AP26</u>	1 6 3	GCGUGACCAACCACGCUACCAACC
SEQ ID NO 21	<u>AP31</u>	2	UAGAAGGUAUGGCUCUUCUUGCC
SEQ ID NO 22	<u>AP32</u>	1 6 4	GCAUUCGCGAUUGGUAACCAACUAC
SEQ ID NO 23	<u>AP33</u>	3	UGCUCUUCACCGCCCGAUCCACGC
SEQ ID NO 24	<u>AP34</u>	2	UGGACCAGCAUGGCUAACUCCUCCC
SEQ ID NO 25	<u>AP36</u>	1	GGUUCUACCUGGUGUCCCAACCACC
SEQ ID NO 26	<u>AP37</u>	2	UCCUAAGUAUGGCUAUUAGGCAACC
SEQ ID NO 27	<u>AP38</u>	6	GGCACACCUAUUGUCGUGAACCUGC
SEQ ID NO 28	<u>AP44</u>	1 6 3	UGUGACCAACCACAUAAACCACCC
SEQ ID NO 29	<u>AP45</u>	1 6 4	GUGUUCGCAAGCUAACCAACUAG
SEQ ID NO 30	<u>AP47</u>	1	ACACUGCCCAACCGGUGUAUGCC
SEQ ID NO 31	<u>AP48</u>	1	GGCUUGACACUGACCAACCAGUGC
SEQ ID NO 32	<u>AP49</u>	1	GCGGUCCGACAGUUUCCCAACGGC
SEQ ID NO 33	<u>AP50</u>	5 6 6	GCUUGUUCUACAUCAUGGGUAGAGC
SEQ ID NO 34	<u>AP53</u>	9	GUGAUUCAGCUUUUCUUCCCACGCC
SEQ ID NO 35	<u>AP59</u>	2	CGAGAUGUAUGGCUCUCUUGAGGUC
SEQ ID NO 36	<u>AP60</u>	1	GGGUCUCUCCUCUGUAACCAACUAC

y, más preferentemente, al siguiente grupo:

SEQ ID NO	Nº AP	Grupo	Secuencia de RNA
SEQ ID NO 19	<u>AP24</u>	1	GCCGUCCGAGCAGGUCCCAACACC
SEQ ID NO 21	<u>AP31</u>	2	UAGAAGGUAUGGCUCUUCUUGCC
SEQ ID NO 13	<u>AP16</u>	3	CUCGUUCCACGACCUCACGAGACC
SEQ ID NO 9	<u>AP10</u>	4	UUCUGAGUGAUUCGUAUCCUAC
SEQ ID NO 33	<u>AP50</u>	5 ó 6	GCUUGUUCUACAUCAUGGGUAGAGC
SEQ ID NO 14	<u>AP17</u>	7	CGUCGCCACAUGAGACUUUACCCAC
SEQ ID NO 15	<u>AP18</u>	8	GGAUUAGCUUCGGAUUAUGGCUGCC

Otro objeto de la presente invención lo constituye una construcción de RNA, en adelante construcción de RNA de la invención, caracterizada porque está constituida además de la propia secuencia de RNA de unión al IRES de la invención por una secuencia de nucleótidos que permita la adición o incremento de la actividad inhibitoria de la replicación del VHC de la secuencia de RNA de la invención. Tal como se refiere en la presente invención el término "construcción genética de RNA" se refiere, entre otras posibilidades, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, a construcciones que contengan, además de la secuencia RNA de la invención, un oligonucleótido antisentido (Anderson, K.P.; Hanecak, R.C., Nozaki, C., Dorr, F.A., Kwoh, T.J. Compositions and methods for treatment of *hepatitis C* virus-associated diseases. US Patent Application, 11 de Septiembre 2003), una ribozima (Welch et al., 1996. A potential therapeutic application of hairpin ribozymes: in vitro and in vivo studies of gene therapy for hepatitis C virus infection. *Gene Therapy* 3, 994-1001; Sakamoto et al., 1996. Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. *J Clin. Invest.* 98, 2720-2728; Lieber et al., 1996. Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J. Virol.* 70, 8782-8791; Macejak et al., 2000. Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology* 31, 769-776) o un aptámero (Kikuchi, et al., 2003. RNA aptamers

targeted to domain II of Hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. J. Biochem. 133, 263-270). Una realización particular de la presente invención lo constituye una construcción de RNA de la invención constituida por la secuencia de RNA de la invención y la ribozima 363 (ver Ejemplo 2) capaz de
5 inhibir la traducción del VHC y perteneciente, entre otras, al siguiente grupo: Secuencia de RNA HH 363-24, HH 363-31, HH 363-16, HH 363-10, HH 363-50, HH 363-17 y HH 363-18, codificadas por las secuencias de DNA SEQ ID NO 60, 61, 62, 63, 64, 65 y 66, respectivamente.

De igual forma pueden elaborarse secuencias de RNA que estén
10 constituidas o que comprendan más de una de las secuencias de RNA de la invención de tal forma que se adicione la capacidad de inhibición de la replicación del virus de todas ellas. Por consiguiente, otro objeto particular de la invención lo constituye una construcción de RNA de la invención caracterizada porque está constituida por, o porque contiene, una cualquiera de las
15 combinaciones posibles de dos o más secuencias de RNA de unión al IRES de la presente invención con un dominio de unión o no entre dichas secuencias.

Además, forman parte de la presente invención cualquiera de las secuencias y construcciones de RNA de la invención anteriormente descritas que son objeto de modificaciones, preferentemente químicas, que conduzcan a
20 una mayor estabilidad frente a la acción de ribonucleasas y con ello a una mayor eficiencia, sin que suponga la alteración de su mecanismo de acción que es la unión específica al IRES. Tal como se utiliza en la presente invención el término "modificaciones químicas" se refiere a la introducción de nucleótidos modificados químicamente en la secuencia de RNA de la invención, por
25 ejemplo, grupos S sustituyendo O en la cadena fosfodiéster, o la inclusión de 5 metilcitosinas, que permiten incrementar la eficiencia del mismo (conferir mayor resistencia frente a degradación, favorecer su entrada a las células, etc), así como cualquier modificación en la pentosa o en la base nitrogenada (Brown and Brown, 1991. Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide
30 synthesis, en Oligonucleotides and Analogues: a practical approach. pag 1-48; Heidenreich et al., 1993. Chemically modified RNA: approaches and applications. Faseb J. 7(1):90-6; Usman and Cedergren, 1992. Exploiting the chemical synthesis of RNA. Trends Biochem Sci. 17 (9): 334-9).

La preparación de la secuencia de RNA de la invención es fácil para un experto en la materia, se puede hacer por síntesis química lo cual permite además la incorporación de modificaciones químicas tanto en los distintos nucleótidos del producto como la incorporación de otros compuestos químicos en cualquiera de los extremos. La síntesis también puede hacerse 5 enzimáticamente utilizando cualquiera de las RNA polimerasas disponibles (Struhl et al., 2002. DNA-dependent RNA polymerases. 1: 3, 3.8.2). La síntesis enzimática también permite alguna modificación química de los productos o RNAs inhibidores (Theissen G et al. 1989. Degree of biotinylation in nucleic 10 acids estimated by a gel retardation assay. Anal Biochem.179(1): 98-10).

Otro objeto de la presente invención lo constituye una construcción genética de DNA, en adelante construcción genética de DNA de la invención, caracterizada porque permite la transcripción *in vitro* o intracelular de la secuencia RNA o construcción de RNA de la invención y porque está 15 constituida por una de las secuencias pertenecientes al siguiente grupo:

- a) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante de la secuencia de RNA o de la construcción de RNA de la invención para su transcripción *in vitro*, 20 y,
- b) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, caracterizada porque es un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la secuencia de RNA de la invención con, al menos, un promotor que dirige la transcripción de 25 dicha secuencia de nucleótidos de interés, al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc. 30

Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos bacterianos o de expresión eucariótica (por ejemplo pcDNA3),

bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, o virus, que pueden contener, además, un origen de replicación bacteriano o de levadura para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Múltiples de estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención].

Una realización particular de la presente invención lo constituye la construcción de DNA de la presente invención caracterizada porque es una secuencia codificante de una secuencia de RNA de la invención (punto a) anterior) perteneciente, entre otras, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo (ver Ejemplo 1): SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 55, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 58, SEQ ID NO 59.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la construcción de DNA de la presente invención caracterizada porque es una secuencia codificante de una construcción de RNA de la invención (punto a) anterior) perteneciente, entre otras, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo (ver Ejemplo 2): SEQ ID NO 60, SEQ ID NO 61, SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 63, SEQ ID NO 64, SEQ ID NO 65, SEQ ID NO 66.

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituyen células, entre otras y a título ilustrativo, células procariotas y eucariotas que contengan la construcción genética de DNA de la invención y en donde puede expresarse de forma adecuada la secuencia de RNA de la invención. Estas células pueden ser transformadas, infectadas o transfectadas mediante dicha construcción de DNA por técnicas de ingeniería genética conocidas por un experto en la materia. [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención]. Estas células pueden ser útiles para la

realización de valoraciones de actividad inhibidora de dicha secuencia en ensayos de infección con el virus, preferentemente el VHC, para la expresión condicionada por una región IRES de proteínas de interés comercial, para la amplificación y obtención de dicha construcción genética de DNA, preferentemente el vector de expresión, para su posterior uso en terapia génica, etc.

Constituye asimismo otro objeto de la invención la utilización de la secuencia de RNA, de la construcción de RNA y de la construcción genética de DNA de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica, por ejemplo, un medicamento, un vector para terapia génica, un reactivo o compuesto de laboratorio, etc. Dicha composición farmacéutica es útil para proteger humanos y animales frente a enfermedades causadas por determinados virus RNA. En una realización particular, dicha composición farmacéutica resulta especialmente útil para proteger humanos frente a la infección causada por el VHC.

La secuencia de RNA, la construcción de RNA y la construcción genética de DNA de la invención podrán ser utilizadas de manera independiente o combinadas entre sí formando parte de una mezcla de secuencias (RNA y/o DNA) que se aplican conjuntamente en la elaboración de dicha composición terapéutica. De esta forma, la mezcla podría estar constituida por cualquiera de las posibles combinaciones de las distintas secuencias de RNA, la construcción de RNA y las construcciones genéticas de DNA que forman parte de la presente invención. De la misma manera se podrán utilizar en combinación con otros productos distintos a los aquí descritos y existentes en el estado del arte presente y futuro, ej. interferón, fármacos antivirales, etc; también en este caso formando parte de un único producto o de una mezcla, a modo de terapia combinada.

Finalmente, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la secuencia de RNA y/o construcción de RNA y/o construcciones genéticas de DNA de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

En una realización particular, dicha composición farmacéutica es un

medicamento destinado a conferir protección o al tratamiento de enfermedades humanas o animales causadas por virus RNAs. En otra realización particular, dicha composición farmacéutica es un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades humanas causadas por el VHC. En otra
5 realización particular, dicha composición farmacéutica es un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades animales causadas por virus, como por ejemplo, el virus de la diarrea bovina o incluso de la peste porcina clásica. En otra realización particular, dicho medicamento es un vector de expresión para procedimientos terapéuticos de terapia génica que requieran la
10 inserción de un ADN terapéutico en el genoma del mamífero.

En otra realización particular, dicha composición farmacéutica es un reactivo de laboratorio para su uso en aplicaciones biotecnológicas y en investigación básica como agentes bloqueantes de la traducción de genes dispuestos bajo el control del IRES del VHC, como herramientas para
15 caracterizar funcional o estructuralmente el IRES, o subdominios del mismo, así como sus posibles interacciones con otros dominios o moléculas virales o factores celulares.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de secuencia de RNA de la
20 invención o a la cantidad de una construcción génica que permitan su expresión intracelular calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichas secuencias y construcciones y el efecto terapéutico a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden
25 ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha composición se prepara en forma de una solución o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente
30 aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como

resultado una respuesta terapéutica protectora frente a la infección del virus, preferentemente el VHC, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Representación esquemática de las estructuras secundaria y terciaria propuesta para el dominio IRES del VHC. Los distintos dominios y subdominios se identifican por I, II, IIIa, b, c, d, e, f y IV. AUG representa el sitio de inicio de la traducción.

Figura 2.- Representación esquemática de la estructura secundaria teórica que presentan las secuencias de RNA inhibidoras de la invención distribuidos en cada una de las familias seleccionadas.

Figura 3.- Ensayo de inhibición de la traducción *in vitro* mediante la secuencia de RNA inhibitoria de la invención. Se representa la cantidad relativa de proteína luciferasa con respecto a la cantidad de la proteína Cat usada como control, en presencia de cantidades crecientes de los distintos aptámeros. La luciferasa se traduce bajo el control del IRES del VHC mientras que la proteína Cat es independiente del mismo. En círculos sólidos se representa la inhibición de la traducción de luciferasa producida por el aptámero 24 representante del grupo 1. En círculos vacíos se representa la inhibición producida por el aptámero 31 representante del grupo 2. Con triángulos sólidos se representa la inhibición producida por el aptámero 16 perteneciente al grupo 3. Triángulos vacíos representan la inhibición producida por el aptámero 10 perteneciente al grupo 4. Con cuadrados sólidos se representa la inhibición obtenida por el aptámero 50 que representa tanto al grupo 5 como al 6, pues contiene simultáneamente los dominios que definen ambos grupos. Con cuadrados vacíos se representa la inhibición obtenida por el aptámero 17 representante del grupo 7. Rombos sólidos se utilizan para representar la inhibición obtenida por el aptámero 18 representante del grupo 8.

Figura 4.- Ensayo de inhibición de la actividad del VHC-IRES mediado por

construcciones de RNA inhibidoras quiméricas de la invención portadores de una ribozima y un aptámero de la invención. La luciferasa se traduce bajo el control del IRES del VHC mientras que la proteína Cat es independiente del mismo. En círculos sólidos se representa la inhibición de la traducción de luciferasa producida por la ribozima 363. En círculos vacíos se representa la inhibición producida por el RNA inhibidor que porta la ribozima 363 y el aptámero 24. Con triángulos sólidos se representa la inhibición producida por el RNA inhibidor que porta la ribozima 363 y el aptámero 18. Triángulos vacíos representan la inhibición producida por el RNA inhibidor que porta la ribozima 363 y el aptámero 16. Con cuadrados sólidos se representa la inhibición obtenida por el RNA inhibidor que porta la ribozima 363 y el aptámero 17. Con cuadrados vacíos se representa la inhibición obtenida por el RNA inhibidor que porta la ribozima 363 y aptámero 10. Rombos sólidos se utilizan para representar la inhibición obtenida por el RNA inhibidor que porta la ribozima 363 y aptámero 50.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Ejemplo 1.- Diseño, elaboración y selección de la secuencia de RNA inhibitoria de la invención.

La invención se llevó a cabo mediante la aplicación de una estrategia de amplificación selectiva de las moléculas capaces de unirse al IRES (aptámeros). Esta estrategia se aplicó sobre una población de secuencias de RNA resultado de la combinación aleatoria de los cuatro nucleótidos (Adenina, Citosina, Guanina y Uracilo) en 25 posiciones consecutivas. Esta estrategia es aplicable para la obtención de inhibidores de agentes causantes de otras patologías.

Selección *in vitro* de los aptámeros o secuencias de RNA de la invención

El IRES de VHC (SEQ ID NO 1) biotinilado internamente fue inmovilizado a una columna de estreptavidina (HiTrap Streptavidin HP column, Amersham Biosciences). La población de secuencias RNAs inhibidoras utilizada se obtuvo por transcripción *in vitro* de una población de DNA que se construyó a partir del apareamiento de dos desoxioligonucleótidos complementarios (SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3). El DNA de doble cadena

resultante constaba de una región aleatoria de 25 nucleótidos flanqueada en 5' por una secuencia conocida que contenía el promotor del fago T7 y en 3' por una secuencia conocida que sería empleada en los pasos de amplificación y clonaje. La transcripción *in vitro* de dicho DNA con el enzima T7 RNA polimerasa (Barroso-del Jesús et al., 1999. Comparative kinetic analysis of structural variants of the hairpin ribozyme reveals further potential to optimize its catalytic performance. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 9 (5): 433-40) generó una población de moléculas de RNA que fueron sometidas al siguiente proceso de selección molecular *in vitro*. Dicha población fue incorporada a la columna y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo la columna fue sometida a 10 pasos de lavado con búfer TMN (Tris-Acético 10 mM pH 7.5, acetato de magnesio 10 mM, cloruro sódico 100 mM), lo cual consiguió eluir las moléculas de la población que no habían quedado unidas al IRES de VHC. Para recoger las moléculas retenidas se procedió a la desnaturalización del RNA contenido en la columna mediante calentamiento de la misma a 95 °C y posterior lavado con búfer TMN a 65 °C. Las moléculas recogidas en los cuatro primeros pasos de elución fueron utilizadas para la reacción de retro-transcripción y amplificación con una enzima DNA polimerasa termoestable, Tth (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como oligonucleótidos cebadores fueron empleados SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5. Una fracción del DNA generado tras la amplificación fue destinada a transcripción *in vitro* (Barroso-delJesus et al., 1999. Comparative kinetic analysis of structural variants of the hairpin ribozyme reveals further potential to optimize its catalytic performance. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 9 (5): 433-40), siendo el RNA resultante integrado en el siguiente ciclo de selección. El proceso se repitió seis veces, seis ciclos de selección. Para incrementar la presión selectiva a partir del cuarto ciclo se redujo el tiempo de incubación de la reacción de asociación y se incrementó la temperatura a 37 °C.

Las diferentes secuencias independientes resultantes del sexto ciclo de selección fueron analizadas por secuenciación, obteniéndose una colección de productos (SEQ ID NO 6 a la SEQ ID NO 36) que se agruparon, en función de unos determinados dominios de secuencia definida, en las distintas familias de las secuencias y estructuras de RNA que se integran en la secuencia de RNA

de la invención y que se relacionan a continuación:

Familia 1: 5' (N)_mX_kCCAACX_z(N)_p3'

Familia 2: 5' (N)_mXkUAUGGCUX_z(N)_p3'

Familia 3: 5' (N)_mXkCCACGX_z(N)_p3'

5 Familia 4: 5' (N)_mXkRUUCGYRAX_z(N)_p3'

Familia 5: 5' (N)_mXkCUYGUUYX_z(N)_p3'

Familia 6: 5' (N)_mXkUYRUGGX_z(N)_p3'

Familia 7: 5' (N)_mXkYGAGACYX_z(N)_p3'

Familia 8: 5' (N)_mXkAUUAGX_z(N)_p3'

10 Familia 9: 5' (N)_mXkAUUCAGX_z(N)_p3'

Donde: A, Adenina

C, Citosina

G, Guanina

15 U, Uracilo

N y X es cualquier nucleótido

R, nucleótido de purina (Adenina o Guanina)

Y, nucleótido de pirimidina (Citosina o Uracilo)

m, p, k y z cualquier número entero desde 0 en adelante.

20 La predicción de estructura secundaria de los RNAs inhibidores seleccionados se realizó mediante el empleo del programa Mfold. En la Figura 2 se muestra una representación esquemática de la estructura secundaria teórica que presentan los RNAs inhibidores de cada uno de los grupos seleccionados, donde las secuencias que definen cada grupo quedan
25 expuestas en una región de cadena sencilla flanqueada por una región de doble cadena representada por los nucleótidos N (cualquier secuencia) la longitud de la región de doble cadena es variable y viene representada por m nucleótidos en la hebra 5' y p nucleótidos en la hebra 3', donde m y p son números enteros desde 0 en adelante. La zona de cadena sencilla incluye
30 además un número variable de nucleótidos k en 5' y z en 3' flanqueando las secuencias fijas representados por X que puede ser cualquier nucleótido, k y z representan un número entero desde 0 en adelante.

Las secuencias de RNA de la invención identificadas se unen al IRES a

través de la secuencia consenso que define cada familia muy probablemente en las siguientes posiciones del RNA viral: Aptámeros pertenecientes al grupo 1, por ejemplo AP24, SEQ ID NO 19, a las posiciones 263 a 268; Aptámeros pertenecientes al grupo 2, por ejemplo AP31 SEQ ID NO 21, a las posiciones 80 a 87; Aptámeros pertenecientes al grupo 3, por ejemplo AP16, SEQ ID NO 13, a las posiciones 282 a 286; Aptámeros pertenecientes al grupo 4, por ejemplo AP10, SEQ ID NO 9, a las posiciones 305 a 312; Aptámeros pertenecientes al grupo 5, por ejemplo AP50, SEQ ID NO 33, a las posiciones 18 a 23; Aptámeros pertenecientes al grupo 6, por ejemplo AP50, SEQ ID NO 33, a las posiciones 340 a 2345; Aptámeros pertenecientes al grupo 7, por ejemplo AP17, SEQ ID NO 14, a las posiciones 322 a 328; Aptámeros pertenecientes al grupo 8, por ejemplo AP18, SEQ ID NO 15, sin determinar; Aptámeros pertenecientes al grupo 9, por ejemplo AP53, SEQ ID NO 34, a las posiciones 305 a 312. Hay que indicar que estas posiciones de unión al IRES se presentan a título de orientación sin pretender establecer ningún modelo que pueda limitar el alcance de la presente invención.

Inhibición de la traducción *in vitro* mediante las secuencias de RNA de la invención

La actividad anti-VHC de estas secuencias de RNA de la invención se puede ensayar fácilmente en un laboratorio en extractos celulares de transcripción-traducción o traducción utilizando DNAs plasmídicos apropiados en los que la traducción de un gen cuya actividad es fácilmente cuantificable se expresa bajo el control de la región IRES del VHC. Para llevar a cabo estos ensayos las secuencias de RNA inhibitoras de la invención previamente seleccionadas fueron sintetizadas mediante transcripción *in vitro* utilizando oligonucleótidos (SEQ ID. NO 37, SEQ ID NO 38, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43). La hibridación de cada uno de estos anteriores oligonucleótidos con el oligonucleótido SEQ ID NO 52 permitió la generación de una serie de construcciones genéticas de DNA que se utilizaron como un molde apto para la reacción de transcripción *in vitro* (Barroso-del Jesús et al., 1999. Comparative kinetic analysis of structural variants of the hairpin ribozyme reveals further potential to optimize its catalytic performance. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 9 (5): 433-40). A continuación

se indican las construcciones genéticas de DNA desarrolladas:

- DNA Ap 24 (SEQ ID NO 53): Oligo SEQ. ID. NO 52 con SEQ ID NO 37,
- DNA Ap 18 (SEQ ID NO 54): Oligo SEQ. ID. NO 52 con SEQ ID NO 38,
- DNA Ap 31 (SEQ ID NO 55): Oligo SEQ. ID. NO 52 con SEQ ID NO 39,
- 5 - DNA Ap 16 (SEQ ID NO 56): Oligo SEQ. ID. NO 52 con SEQ ID NO 40,
- DNA Ap 17 (SEQ ID NO 57): Oligo SEQ. ID. NO 52 con SEQ ID NO 41,
- DNA Ap 10 (SEQ ID NO 58): Oligo SEQ. ID. NO 52 con SEQ ID NO 42,
- y
- DNA Ap 50 (SEQ ID NO 59): Oligo SEQ. ID. NO 52 con SEQ ID NO 43.

10

Los ensayos de inhibición de la traducción *in vitro* se llevaron a cabo usando lisados de reticulocito de conejo (Alt et al., 1995. Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Hepatology. 22(3): 707-717). Se utilizaron 50 ng de un

15 DNA plasmídico que contiene la secuencia codificante para la proteína Cat (Cloramfenicol acetil transferasa) bajo el promotor del fago T7, seguido de la secuencia genómica de VHC, desde el nucleótido +1 hasta el +585 (en esta región se encuentra el IRES del virus así como la región codificante de la proteína componente de la cápsida viral) (AF009606). Esta región viral controla

20 la traducción del mRNA de la proteína luciferasa codificada en 3' de la misma.

Tras 60 minutos de incubación a 30°C en presencia o ausencia de las diferentes secuencias de RNA inhibidoras de la invención los productos de las reacciones se resolvieron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS y posteriormente fueron cuantificados mediante un

25 escáner de fluorescencia (Storm, Molecular Dinamycs).

En la Figura 3 se muestran los resultados de los ensayos de inhibición de la actividad biológica del IRES del VHC como sitio de entrada de ribosomas por las secuencias de RNA inhibidoras de la invención correspondientes a los distintos grupos descritos anteriormente. Todos los aptámeros testados

30 demostraron ejercer una disminución en la síntesis de proteínas de hasta un 85%, llegando incluso a conseguirse una inhibición del 100% cuando la secuencia ap10 fue testada.

En la Tabla 1 se presentan los niveles IC₅₀ obtenidos con secuencias de

RNA de la invención representativas de varios de las familias descritas anteriormente. El valor de IC₅₀ representa la concentración de secuencia de RNA inhibidora capaz de conseguir una bajada en los niveles de proteína del 50%. Este valor fue obtenido a partir de los datos de inhibición que se detallan en la Figura 3.

Tabla 1.- Niveles IC₅₀ de cada inhibidor ensayado

inhibidor	Grupo	IC ₅₀ (µM)
Ap 24	1	1,75
Ap 31	2	0,36
Ap 16	3	0,45
Ap 10	4	0,19
Ap 50	5, 6	4,4
Ap 17	7	1,53
Ap 18	8	1,2

Ejemplo 2.- Inhibición de la traducción *in vitro* mediante las secuencias de RNA de la invención unidas a una ribozima

Los aptámeros o secuencias de RNA de la invención descritos pueden además utilizarse en combinación con otros agentes inhibidores. Como ejemplo de su uso se han elaborado unas construcciones de RNA quiméricas que portan un aptámero y un dominio catalítico, una ribozima tipo hammerhead diseñada para cortar el IRES del VHC en la posición 363 (Lieber et al., 1996. Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. J Virol. 70 (12): 8782-91). La construcción de estas nuevas construcciones de RNA inhibidoras (HH 363-NºAp) se realizó mediante hibridación de dos oligonucleótidos complementarios:

- SEQ. ID. NO 44 con SEQ ID NO 45 (Construcción de RNA HH 363-24),
- SEQ. ID. NO 44 con SEQ ID NO 46 (Construcción de RNA HH 363-31),
- SEQ. ID. NO 44 con SEQ ID NO 47 (Construcción de RNA HH 363-

- 16),
- SEQ. ID. NO 44 con SEQ ID NO 48 (Construcción de RNA HH 363-10),
 - SEQ. ID. NO 44 con SEQ ID NO 49 (Construcción de RNA HH 365-50),
 - 5 - SEQ. ID. NO 44 con SEQ ID NO 50 (Construcción de RNA HH 363--17), y
 - SEQ. ID. NO 44 con SEQ ID NO 51 (Construcción de RNA HH 363-18); y
- 10 su posterior extensión con Taq DNA polimerasa (Biotools) generándose así una construcción genética de DNA de doble cadena que fue utilizado como molde para la reacción de transcripción *in vitro*. A continuación se indican las construcciones genéticas de DNA desarrolladas:
- SEQ. ID. NO 60: codificante de la construcción de RNA HH 363-24,
 - 15 - SEQ. ID. NO 61: codificante de la construcción de RNA HH 363-31,
 - SEQ. ID. NO 62: codificante de la construcción de RNA HH 363-16,
 - SEQ. ID. NO 63: codificante de la construcción de RNA HH 363-10,
 - SEQ. ID. NO 64: codificante de la construcción de RNA HH 363-50,
 - SEQ. ID. NO 65: codificante de la construcción de RNA HH 363-17,
 - 20 y
 - SEQ. ID. NO 66: codificante de la construcción de RNA HH 363-18.

La construcción genética de DNA se hizo de modo que el dominio catalítico está en 5' del aptámero. Las construcciones de RNAs inhibidoras (HH 363-24/31/16/10/50/17 y 18) fueron purificadas y su acción inhibidora de la traducción dependiente del IRES del VHC testada en ensayos de traducción *in vitro* usando lisados de reticulocito de conejo tal y como se describe anteriormente.

25

En la Figura 4 se muestran los resultados de inhibición de la actividad del VHC-IRES mediado por las distintas construcciones de RNA inhibidoras (quimeras) portadores de una ribozima y un aptámero, y se comparan con la inhibición ejercida por el ribozima independientemente. La luciferasa se traduce bajo el control del IRES del VHC mientras que la proteína Cat es independiente

30

del mismo. El efecto supresor obtenido por las construcciones de RNA quiméricas resultó en todos los casos superior al ejercido por la ribozima HH363, lo cual reporta una mejora sustancial de estas moléculas quiméricas con respecto a los inhibidores de RNA clásicos.

- 5 En la Tabla 2 se presentan los niveles IC_{50} obtenidos con los inhibidores quiméricos. Este valor fue obtenido a partir de los datos de inhibición que se detallan en la Figura 4.

Construcción de RNA inhibidora	IC_{50} (μM)
HH 363	0,37
HH 363-24	0,12
HH 363-31	0,54
HH 363-16	0,03
HH 363-10	0,75
HH 363-50	n. d.
HH 363-17	0,90
HH 363-18	0,63

Ejemplo 3.- Ensayo de la actividad antiviral de los RNAs inhibidores.

- 10 La actividad antiviral de la secuencia de RNA de la invención puede ser evaluada en modelos celulares, aunque la imposibilidad de cultivar el VHC hace necesario recurrir a medidas indirectas mediante la utilización de genes marcadores cuya traducción tenga lugar bajo el control de la región IRES del VHC y cuyo producto sea fácilmente cuantificable, por ejemplo, luciferasa.
- 15 Una realización concreta consiste en el uso de virus, por ejemplo, híbridos derivados del virus de la polio al cual se le ha sustituido la región del IRES por la correspondiente al IRES del VHC junto con la región 5' del gen de la proteína de la cápsida del VHC (PV-VHC). En estos virus híbridos la traducción viral y en consecuencia su capacidad proliferativa es dependiente de
- 20 la actividad del IRES del VHC. Este tipo de construcciones y ensayos pueden llevarse a cabo tal como se han sido descritos anteriormente (Das et al., 1998. A small Yeast RNA blocks Hepatitis C virus internal Ribosome Entry site (HCV-IRES)-mediated Translation and inhibits replication of a chimeric poliovirus

under translational control of the HCV IRES element. *J. Virology* 72, 5638-5647).

Se construyen líneas celulares de Hepatocarcinoma (Huh-7) que produzcan establemente uno cualquiera de las realizaciones concretas de la secuencia de RNA de la invención. Para ello, se transfectarán con un vector de expresión, por ejemplo un plásmido apropiado en el cual se incluye la secuencia de DNA que codifica para dicha secuencia de RNA. Esta secuencia de DNA se clonará bajo el control de un promotor tipo polIII (por ejemplo, el promotor CMV). Las células que producen la secuencia de RNA inhibidora serán expuestas a infección por los virus híbridos PV-VHC. Tres días después de la infección se preparan extractos celulares para volver a infectar células HeLa en monocapa. Después de tres días de incubación a 37°C se realiza una tinción con cristal violeta para determinar las placas de lisis producto de la infección viral. Aquellas células en las que la síntesis de la secuencia de RNA de la invención logre la inhibición de la replicación del virus no ocurrirá la lisis.

REIVINDICACIONES

1.- Secuencia de RNA inhibidora de la proliferación del virus causante de la hepatitis tipo C (VHC) caracterizada porque está constituida por una secuencia de RNA que se une específicamente a regiones del dominio 5' no traducible del genoma del virus, región IRES del VHC, y porque se encuentra formando una estructura definida por una región de doble cadena que deja expuestos nucleótidos en cadena sencilla de RNA, a través de los cuales se une específicamente al RNA de la región IRES del VHC.

2.- Secuencia de RNA según la reivindicación 1 caracterizada porque pertenece, entre otras, a una de las siguientes familias de secuencias definidas en función de unos dominios de secuencia consenso de unión al IRES definida:

- Familia 1: 5' (N)_mX_kCCAACX_z(N)_p 3'
- Familia 2: 5' (N)_mXkUAUGGCUX_z(N)_p 3'
- Familia 3: 5' (N)_mXkCCACGX_z(N)_p 3'
- 15 Familia 4: 5' (N)_mXkRUUCGYRAX_z(N)_p 3'
- Familia 5: 5' (N)_mXkCUYGUUYX_z(N)_p 3'
- Familia 6: 5' (N)_mXkUYRUGGX_z(N)_p 3'
- Familia 7: 5' (N)_mXkYGAGACYX_z(N)_p 3'
- Familia 8: 5' (N)_mXkAUUAGX_z(N)_p 3'
- 20 Familia 9: 5' (N)_mXkAUUCAGX_z(N)_p 3'

donde: A, es Adenina
 C, es Citosina
 G, es Guanina
 U, es Uracilo
 25 N y X es cualquier nucleótido
 R, es un nucleótido de purina (Adenina o Guanina)
 Y, es un nucleótido de pirimidina (Citosina o Uracilo)
 m, p, k y z es cualquier número entero desde 0 en adelante.

3.- Secuencia de RNA según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizada porque pertenece, entre otras, al siguiente grupo:

- SEQ ID NO 6, GGCUCGUUCAAGUGUCCCAACCACC
- SEQ ID NO 7, GGAACGAUCAGAGCAACCAACUGCC
- 5 - SEQ ID NO 8, GGAUGCAAUCUUGAGACCAACCUCC
- SEQ ID NO 9, UUCUGAGUGAUUCGUAAUCCUAC
- SEQ ID NO 10, GGUACCAGCGCGAGUCCCAACCACC
- SEQ ID NO 11, GGAUAUGGCUACGCUAAAACCCCC
- SEQ ID NO 12, GGAGCCUCCACCGGUAACCAACUCC
- 10 - SEQ ID NO 13, CUCGUUCCACGACCUCACGAGACC
- SEQ ID NO 14, CGUCGCCACAUGAGACUUUACCCAC
- SEQ ID NO 15, GGAUUAGCUUCGGAUUUUGGCUGCC
- SEQ ID NO 16, AUGGCUAGCCUCAUCCACGGCCC
- SEQ ID NO 17, AUGGCUCGCCUCCUCACCAACCC
- 15 - SEQ ID NO 18, UCCUAAGUAUGGCUAUUAGGCAACC
- SEQ ID NO 19, GCCGUCCGAGCAGGUCCCAACACC
- SEQ ID NO 20, GCGUGACCAACCACGCUACCAACCC
- SEQ ID NO 21, UAGAAGGUAUGGCUCUUCUUGCC
- SEQ ID NO 22, GCAUUCGCGAUUGGUAACCAACUAC
- 20 - SEQ ID NO 23, UGCUCUUCACCGCCCGAUCCACGC
- SEQ ID NO 24, UGGACCAGCAUGGCUAACUCCUCCC
- SEQ ID NO 25, GGUUCUACCUUGGUGUCCCAACCACC
- SEQ ID NO 26, UCCUAAGUAUGGCUAUUAGGCAACC
- SEQ ID NO 27, GGCACACCUAUUGUCGUGAACCUGC
- 25 - SEQ ID NO 28, UGUGACCAACCACAUAAACCACCCC
- SEQ ID NO 29, GUGUUCGCAAGCUAACCCAACUAG
- SEQ ID NO 30, ACACUGCCCCAACCGGUGUAUGCC
- SEQ ID NO 31, GGCUUGACACUGACCAACCAGUGC
- SEQ ID NO 32, GCGGUCCGACAGUUUCCCAACGGC
- 30 - SEQ ID NO 33, GCUUGUUCUACAUCAUGGGUAGAGC
- SEQ ID NO 34, GUGAUUCAGCUUUUCUUCACGCC
- SEQ ID NO 35, CGAGAUGUAUGGCUCUCUUGAGGUC
- SEQ ID NO 36, GGGUCUCUCCUCUGUAACCAACUAC

- 4.- Construcción de RNA caracterizada porque está constituida además de la secuencia de RNA según las reivindicaciones 1 a la 3 por una secuencia de nucleótidos que permite la adición o incremento de la actividad inhibidora de la replicación del VHC.
- 5 5.- Construcción de RNA según la reivindicación 4 caracterizada porque es una construcción que contiene un oligonucleótido antisentido, una ribozima o un aptámero como secuencia que adiciona la actividad inhibidora.
- 6.- Construcción de RNA según la reivindicación 5 caracterizada porque la ribozima es la ribozima 363 y porque pertenece, entre otras, al siguiente grupo:
- 10 Secuencia de RNA HH 363-24, HH 363-31, HH 363-16, HH 363-10, HH 363-50, HH 363-17 y HH 363-18, codificadas por las secuencias de DNA SEQ ID NO 60, 61, 62, 63, 64, 65 y 66, respectivamente.
- 7.- Construcción de RNA según la reivindicación 4 caracterizada porque está constituida por, o porque contiene, una cualquiera de las combinaciones
- 15 posibles de dos o más secuencias de RNA según una de las reivindicaciones 1 a la 3 con un dominio de unión o no entre dichas secuencias.
- 8.- Secuencia de RNA y construcción de RNA según las reivindicaciones 1 a la 3 y 4 a la 7, respectivamente, caracterizadas porque presentan modificaciones, preferentemente químicas, que conducen a una mayor estabilidad frente a la
- 20 acción de ribonucleasas y con ello a una mayor eficiencia, sin que suponga la alteración de su mecanismo de acción que es la unión específica al IRES.
- 9.- Construcción genética de DNA caracterizada porque permite la transcripción *in vitro* o intracelular de la secuencia RNA o construcción de RNA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 7 y porque está constituida por una de
- 25 las secuencias pertenecientes al siguiente grupo:
- a) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, dicha secuencia codificante de la secuencia de RNA o de la construcción de RNA para su transcripción *in vitro*,
 - y,
- 30 b) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, caracterizada porque es un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la secuencia de RNA de la invención con, al menos, un promotor que dirige la transcripción de dicha secuencia de

nucleótidos de interés, al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.

5 10.- Construcción genética de DNA según la reivindicación 9 caracterizada porque es una secuencia codificante de una secuencia de RNA (punto a)) perteneciente, entre otras, al siguiente grupo: SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 55, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 58, SEQ ID NO 59.

10 11.- Construcción genética de DNA según la reivindicación 9 caracterizada porque es una secuencia codificante de una construcción de RNA (punto a)) perteneciente, entre otras, al siguiente grupo: SEQ ID NO 60, SEQ ID NO 61, SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 63, SEQ ID NO 64, SEQ ID NO 65, SEQ ID NO 66.

12.- Célula, preferentemente, células procariontas y eucariontas, caracterizada porque contiene y en la que se expresa adecuadamente la construcción genética de DNA según las reivindicaciones 9 a la 11.

15 13.- Utilización de la secuencia de RNA, construcción de RNA y de la construcción genética de DNA según las reivindicaciones 1 a la 11 en la elaboración de una composición farmacéutica, por ejemplo, un medicamento, un vector para terapia génica, y un reactivo o compuesto de laboratorio.

20 14.- Composición farmacéutica caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la secuencia de RNA y/o construcción de RNA y/o construcciones génicas de DNA según las reivindicaciones 1 a la 11, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

25 15.- Composición farmacéutica según la reivindicación 14 caracterizada porque es un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades humanas o animales causadas por virus RNAs.

16.- Composición farmacéutica según la reivindicación 15 caracterizada porque es un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades humanas causadas por el VHC.

30 17.- Composición farmacéutica según la reivindicación 15 caracterizada porque es un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades animales causadas por virus, como por ejemplo, el virus de la diarrea bovina o incluso de la peste porcina clásica.

- 18.- Composición farmacéutica según la reivindicación 15 caracterizada porque el medicamento es un vector de expresión para procedimientos terapéuticos de terapia génica que requieran la inserción de ADN terapéutico en el genoma del mamífero.
- 5 19.- Composición farmacéutica según la reivindicación 14 caracterizada porque es un reactivo de laboratorio para su uso en aplicaciones biotecnológicas y en investigación básica como agentes bloqueantes de la traducción de genes dispuestos bajo el control del IRES del VHC, como herramientas para caracterizar funcional o estructuralmente el IRES, o subdominios del mismo,
- 10 así como sus posibles interacciones con otros dominios o moléculas virales o factores celulares.

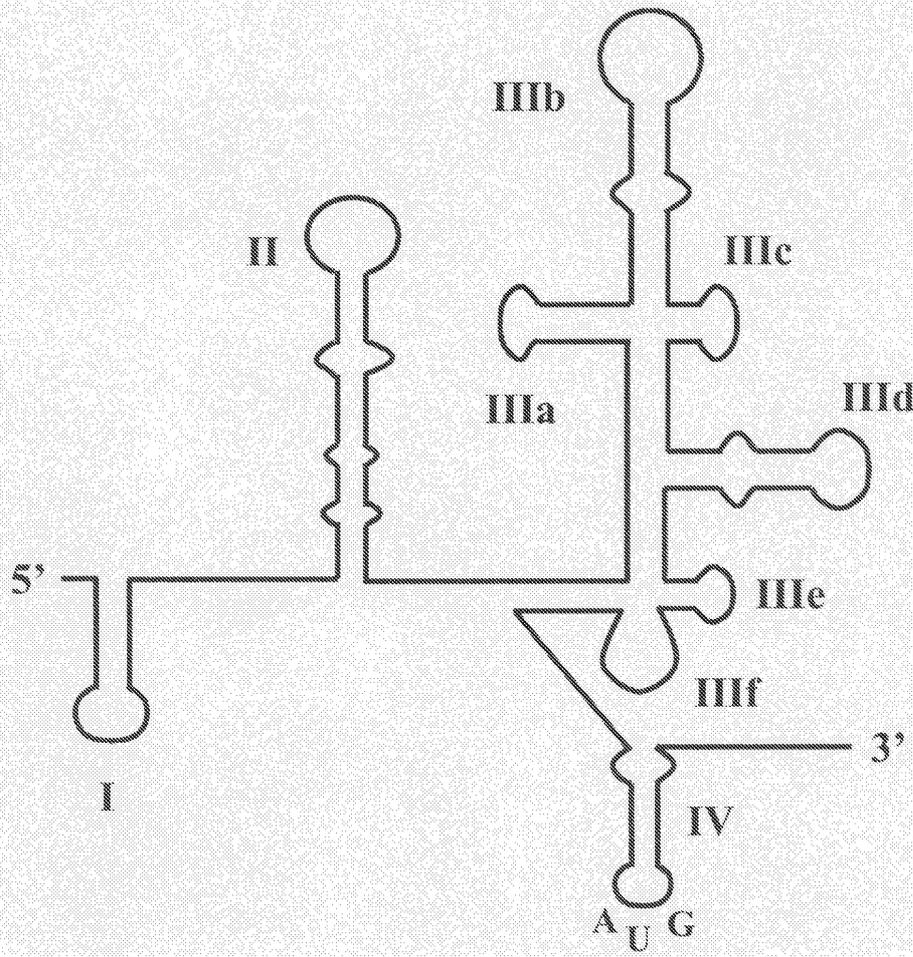


Figura 1

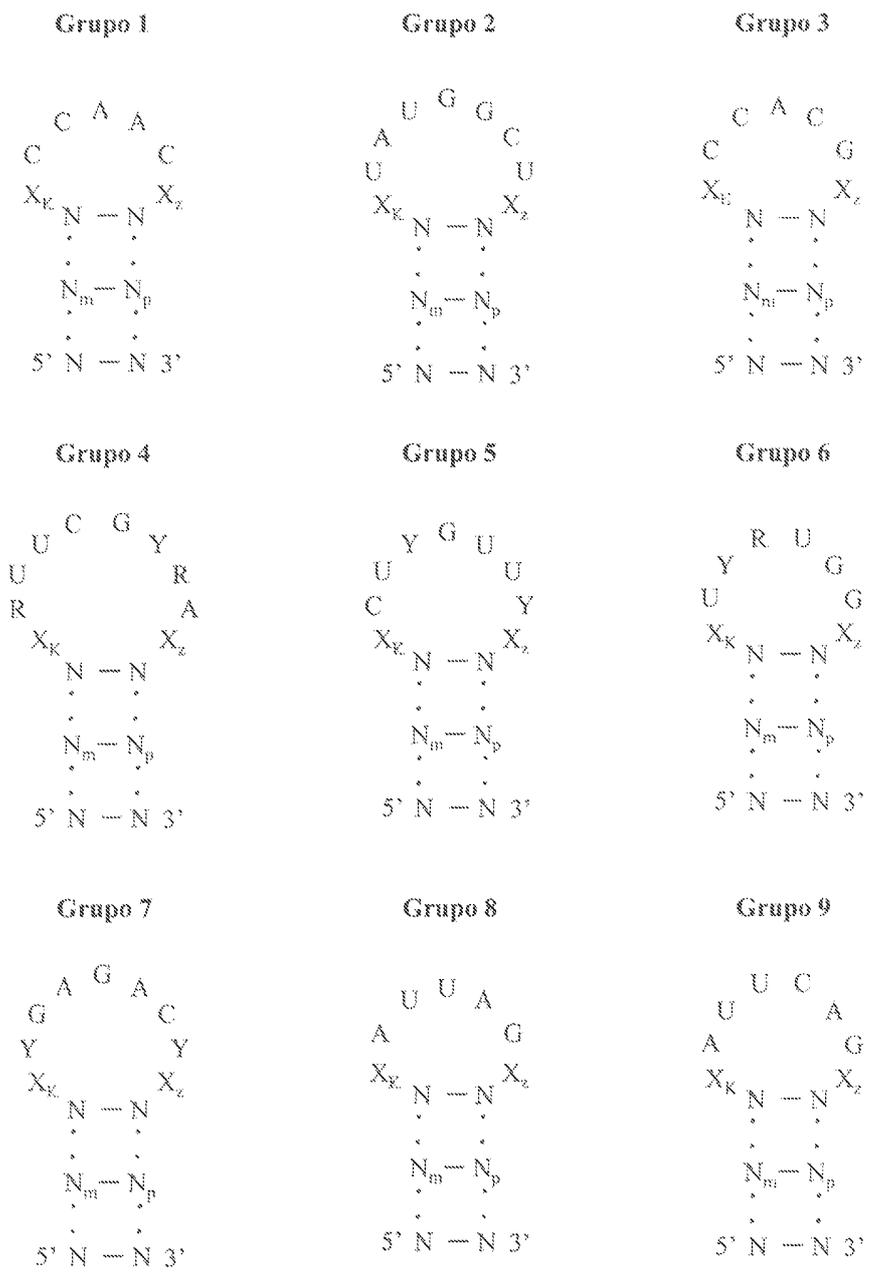


Figura 2

A

Inhibición de la traducción

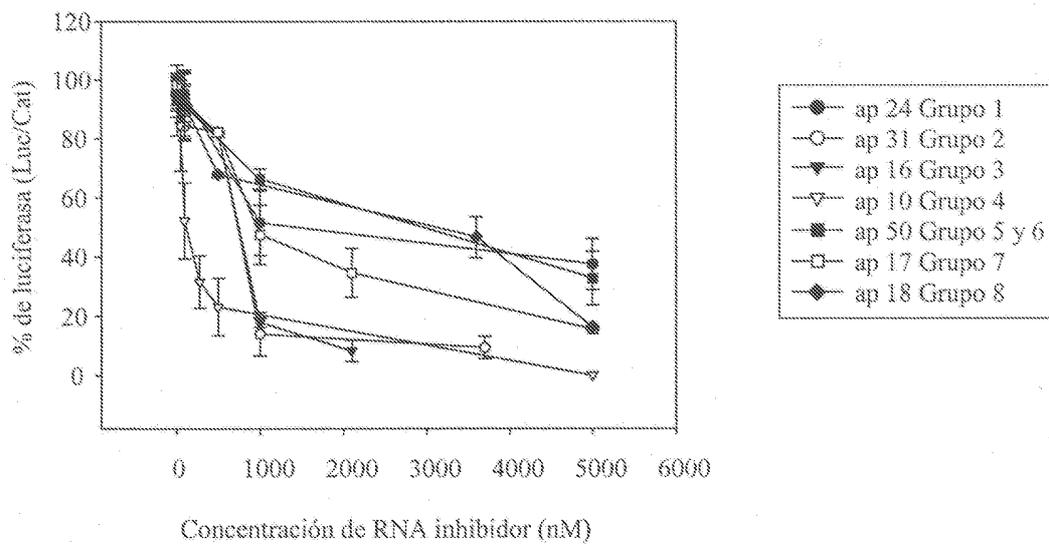


Figura 3

Inhibición por construcciones de RNA inhibidoras quiméricas
(Ribozima/aptámero)

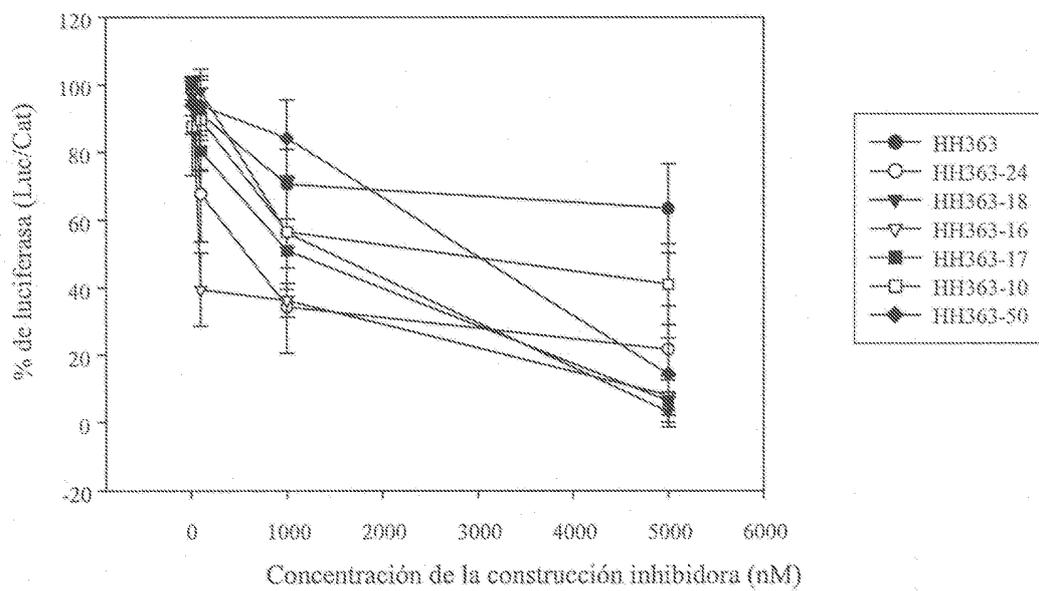


Figura 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2005/070034

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C12N15/11		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, EMBASE, REGISTRY, HCAPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TALLET-LOPEZ, B., ALDAZ-CARROLL, L., CHABAS, S. et al. Antisense oligonucleotides targeted to the domain III _d of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent <i>in vitro</i> translation. Nucleic Acids Research. JAN 2003, Vol. 31, N° 2, pages 734-742.	1-19
A	KIKUCHI, K., UMEHARA, T., FUKUDA, K., et al. RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. Journal of Biochemistry. MARCH 2003, Vol. 133, N° 3, pages 263-270.	1, 4-19
A	ALDAZ-CARROLL, L., TALLET, B., DAUSSE, E. et al. Apical loop-internal loop interactions: a new RNA-RNA recognition motif identified through <i>in vitro</i> selection against RNA hairpins of the hepatitis C virus mRNA. Biochemistry. 2002, Vol. 41, pages 5883-5893.	1, 4-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 JUN 2005 (15.06.05)		28 JUL 2005 (28.07.05)
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O.		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2005/070034

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The various families of sequences do not have a common structure enabling same to bind to HCV IRES and inhibit translation. As a result, the International Searching Authority considers that 9 inventions are covered by the following claims:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2005/070034

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2196157 T3 (HIBRIDON, INC.) 16.12.2003. pages 4-24.	2-19
A	LIEBER, A., HE, C.-Y., POLYAK, S. J. et al. Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. Journal of Virology. DEC 1996, Vol. 70, N° 12, pages 8782-8791.	4-6, 8-19
A	JP 2002165594 A (DOKURITSU GYOSEI HOJIN SANGYO GIJUTSU SO & MITSUBISHI GAS CHEM CO INC) 11.06.2002	5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2005/070034

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2196157 T3	16.12.2003	ZA 9604446 A	06.12.1996
		WO1996039500A2,A3	12.12.1996
		CA 2226438 A1	12.12.1996
		US 2002081577 A1	27.06.2002
		EP 0833902 B1	14.05.2003
		AT 240392 T	15.05.2003
		DE 69628167 D	18.06.2003
		EP 1331267 A2	30.07.2003
		PT 833902 T	30.09.2003
-----	-----	-----	-----
JP2002165594 A	11.06.2002	NONE	-----
-----	-----	-----	-----

Invention 1: RNA sequences belonging to sequence family 1 (SEQ ID NO 6, 7, 8, 10, 12, 19, 20, 22, 25, 28, 29, 30, 31, 32 y 36), RNA constructs (SEQ ID NO 60) containing same or DNA constructs (SEQ ID NO 53) encoding same, host cells having said DNA construct, and the use thereof for preparing pharmaceutical compositions and laboratory reagents (claims 1 to 19 in part).

Invention 2: RNA sequences belonging to sequence family 2 (SEQ ID NO 11, 18, 21, 26, 35), RNA constructs (SEQ ID NO 61) containing same or DNA constructs (SEQ ID NO 55) encoding same, host cells having said DNA construct, and the use thereof for preparing pharmaceutical compositions and laboratory reagents (claims 1 to 19 in part).

Invention 3: RNA sequences belonging to sequence family 3 (SEQ ID NO 13, 16, 20, 23), RNA constructs (SEQ ID NO 62) containing same or DNA constructs (SEQ ID NO 56) encoding same, host cells having said DNA construct, and the use thereof for preparing pharmaceutical compositions and laboratory reagents (claims 1 to 19 in part).

Invention 4: RNA sequences belonging to sequence family 4 (SEQ ID NO 9, 22, 29), RNA constructs (SEQ ID NO 63) containing same or DNA constructs (SEQ ID NO 58) encoding same, host cells having said DNA construct, and the use thereof for preparing pharmaceutical compositions and laboratory reagents (claims 1 to 19 in part).

Invention 5: RNA sequences belonging to sequence family 5 (SEQ ID NO 33), RNA constructs (SEQ ID NO 64) containing same or DNA constructs (SEQ ID NO 59) encoding same, cells having said DNA construct, and the use thereof for preparing pharmaceutical compositions and laboratory reagents (claims 1 to 19 in part).

Invention 6: RNA sequences belonging to sequence family 6 (SEQ ID NO 33), RNA constructs (SEQ ID NO 64) containing same or DNA constructs (SEQ ID NO 59) encoding same, cells having said DNA construct, and the use thereof for preparing pharmaceutical compositions and laboratory reagents (claims 1 to 19 in part).

Invention 7: RNA sequences belonging to sequence family 7 (SEQ ID NO 14), RNA constructs (SEQ ID NO 65) containing same or DNA constructs (SEQ ID NO 57) encoding same, cells having said DNA construct, and the use thereof for preparing pharmaceutical compositions and laboratory reagents (claims 1 to 19 in part).

Invention 8: RNA sequences belonging to sequence family 8 (SEQ ID NO 15), RNA constructs (SEQ ID NO 66) containing same or DNA constructs (SEQ ID NO 54) encoding same, host cells having said DNA construct, and the use thereof for preparing pharmaceutical compositions and laboratory reagents (claims 1 to 19 in part).

Invention 9: RNA sequences belonging to sequence family 9 (SEQ ID NO 34), RNA or DNA constructs containing same, cells having the DNA construct, and the use thereof for preparing pharmaceutical compositions and laboratory reagents (claims 1 to 5, 7 to 9 and 12 to 19 in part).

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2005/070034

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12N15/11

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

CIP⁷ C12N

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

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

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, EMBASE, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	TALLET-LOPEZ, B., ALDAZ-CARROLL, L., CHABAS, S. et al. Antisense oligonucleotides targeted to the domain III _d of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent <i>in vitro</i> translation. Nucleic Acids Research. Enero 2003, Vol. 31, Nº 2, páginas 734-742.	1-19
A	KIKUCHI, K., UMEHARA, T., FUKUDA, K., et al. RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. Journal of Biochemistry. Marzo 2003, Vol. 133, Nº 3, páginas 263-270.	1, 4-19
A	ALDAZ-CARROLL, L., TALLET, B., DAUSSE, E. et al. Apical loop-internal loop interactions: a new RNA-RNA recognition motif identified through <i>in vitro</i> selection against RNA hairpins of the hepatitis C virus mRNA. Biochemistry. 2002, Vol. 41, páginas 5883-5893.	1, 4-19

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

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

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 15 Junio 2005 (15.06.2005)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 28 JULIO 2005 (28.07.2005)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado E. Relaño Reyes Nº de teléfono + 34 91 3493047

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17(2)(a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones nºs:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones nºs:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. Las reivindicaciones nºs:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber: Las diferentes familias de secuencias no presentan una estructura común que sea la que le confiera su capacidad de unión al IRES del VHC y de inhibición de la traducción, por lo que la Administración encargada de la búsqueda internacional considera que hay 9 invenciones cubiertas por las siguientes reivindicaciones: (Ver anexo)

1. Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza

3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nºs:

4. Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones nºs: de la 1 a la 19, todas de manera parcial

- Indicación en cuanto a la protesta
- Se acompañó a las tasas adicionales una protesta por parte del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
 - Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido.
 - El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2005/070034

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ES 2196157 T3 (HIBRIDON, INC.) 16.12.2003. Páginas 4-24.	2-19
A	LIEBER, A., HE, C.-Y., POLYAK, S. J. et al. Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. Journal of Virology. Diciembre 1996, Vol. 70, Nº 12, páginas 8782-8791.	4-6, 8-19
A	JP 2002165594 A (DOKURITSU GYOSEI HOJIN SANGYO GIJUTSU SO & MITSUBISHI GAS CHEM CO INC) 11.06.2002	5

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2005/070034

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 2196157 T3	16.12.2003	ZA 9604446 A WO1996039500A2,A3 CA 2226438 A1 US 2002081577 A1 EP 0833902 B1 AT 240392 T DE 69628167 D EP 1331267 A2 PT 833902 T	06.12.1996 12.12.1996 12.12.1996 27.06.2002 14.05.2003 15.05.2003 18.06.2003 30.07.2003 30.09.2003
----- JP2002165594 A	----- 11.06.2002	----- NINGUNO	----- -----
-----	-----	-----	-----

Invención 1ª: Secuencias de ARN que pertenecen a la familia de secuencias 1 (SEQ ID NO 6, 7, 8, 10, 12, 19, 20, 22, 25, 28, 29, 30, 31, 32 y 36), construcciones de ARN (SEQ ID NO 60) que las contienen o de ADN (SEQ ID NO 53) que las codifican, células huésped con dicha construcción de ADN, así como su uso en la elaboración de composiciones farmacéuticas y reactivos de laboratorio (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 19).

Invención 2ª: Secuencias de ARN que pertenecen a la familia de secuencias 2 (SEQ ID NO 11, 18, 21, 26, 35) construcciones de ARN (SEQ ID NO 61) que las contienen o de ADN (SEQ ID NO 55) que las codifican, células huésped con la construcción de ADN, así como su uso en la elaboración de composiciones farmacéuticas y reactivos de laboratorio (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 19).

Invención 3ª: Secuencias de ARN que pertenecen a la familia de secuencias 3 (SEQ ID NO 13, 16, 20, 23), construcciones de ARN (SEQ ID NO 62) que las contienen o de ADN (SEQ ID NO 56) que las codifican, células huésped con la construcción de ADN, así como su uso en la elaboración de composiciones farmacéuticas y reactivos de laboratorio (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 19).

Invención 4ª: Secuencias de ARN que pertenecen a la familia de secuencias 4 (SEQ ID NO 9, 22, 29) construcciones de ARN que las contienen (SEQ ID NO 63) o de ADN que las codifican (SEQ ID NO 58), células huésped con la construcción de ADN, así como su uso en la elaboración de composiciones farmacéuticas y reactivos de laboratorio (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 19).

Invención 5ª: Secuencias de ARN que pertenecen a la familia de secuencias 5 (SEQ ID NO 33), construcciones de ARN (SEQ ID NO 64) que las contienen o de ADN (SEQ ID NO 59) que las codifican, células con la construcción de ADN, así como su uso en la elaboración de composiciones farmacéuticas y reactivos de laboratorio (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 19).

Invención 6ª: Secuencias de ARN que pertenecen a la familia de secuencias 6 (SEQ ID NO 33), construcciones de ARN que las contienen (SEQ ID NO 64) o de ADN (SEQ ID NO 59) que las codifican, células con la construcción de ADN, así como su uso en la elaboración de composiciones farmacéuticas y reactivos de laboratorio (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 19).

Invención 7ª: Secuencias de ARN que pertenecen a la familia de secuencias 7 (SEQ ID NO 14), construcciones de ARN que las contienen (SEQ ID NO 65) o de ADN que las codifican (SEQ ID NO 57), células con la construcción de ADN, así como su uso en la elaboración de composiciones farmacéuticas y reactivos de laboratorio (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 19).

Invención 8ª: Secuencias de ARN que pertenecen a la familia de secuencias 8 (SEQ ID NO 15), construcciones de ARN que las contienen (SEQ ID NO 66) o de ADN que las codifican (SEQ ID NO 54), células huésped con la construcción de ADN, así como su uso en la elaboración de composiciones farmacéuticas y reactivos de laboratorio (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 19).

Invención 9ª: Secuencias de ARN que pertenecen a la familia de secuencias 9 (SEQ ID NO 34), construcciones de ARN o ADN que las contienen, células que contienen la construcción de ADN, así como su uso en la elaboración de composiciones farmacéuticas y reactivos de laboratorio (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 5, de la 7 a la 9 y de la 12 a la 19).