

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 356**

51 Int. Cl.:

C12N 15/36 (2006.01)
C07K 14/02 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2002 E 02758669 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1412501**

54 Título: **Polipéptidos sintéticos derivados de pre-S1 del virus de la hepatitis B y usos de los mismos**

30 Prioridad:

27.07.2001 EP 01402048

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

27.03.2013

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (50.0%)
101, RUE DE TOLBIAC
75013 PARIS, FR y
URBAN, STEPHAN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**URBAN, STEPHAN y
GRIPON, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 399 356 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

Polipéptidos sintéticos derivados de pre-S1 del virus de la hepatitis B y usos de los mismos

La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos y derivados de los mismos que bloquean la infección por hepatitis B en una etapa temprana.

5 Los hepadnavirus son un grupo de virus de ADN parcialmente bicatenario de cubierta pequeña que se han encontrado en mamíferos y aves. El virus de la hepatitis B humano (HBV), que representa el prototipo de este grupo, causa hepatitis aguda y crónica en el hombre. Las infecciones por HBV representan un grave problema sanitario, que conduce estimadamente a un millón de muertes al año.

10 El ciclo de replicación intracelular de los hepadnavirus, en particular la transcripción de ADN vírico, empaquetamiento y transcripción inversa de ARN genómico y el establecimiento de un conjunto intracelular de ADN de HBV circular cerrado covalentemente se ha dilucidado con cierto detalle (Nassal *et al.*, 1993; Nassal *et al.*, 1996). Sin embargo, hasta ahora la falta de una estirpe celular infectable por HBV y la disponibilidad limitada de hepatocitos humanos primarios para los estudios de infección *in vitro* han evitado implacablemente el progreso de la comprensión de las etapas tempranas de la infección por HBV. Por consiguiente, se han propuesto una variedad de
15 candidatos a receptor de HBV basándose en estudios de unión (revisados por DeMeyer *et al.*, 1997), pero en ninguno de ellos pudo demostrarse convincentemente que estuviera implicado en el proceso de entrada.

Sin embargo, se han hecho más progresos recientemente al determinar los requisitos de secuencia para la infección en las proteínas de cubierta de virus de la hepatitis B de pato y humano (Urban *et al.*, 1998, LeSeyec *et al.*, 1998, LeSeyec *et al.*, 1999).

20 La envoltura vírica del HBV contiene las proteínas de cubierta vírica grande (L), mediana (M) y pequeña (S). Los hepadnavirus aviares comprenden solo las proteínas L y S. Las proteínas de superficie de todos los hepadnavirus están codificadas en marcos de lectura abiertos individuales del ADN vírico de tal modo que la proteína L contiene el dominio S completo que sirve como anclaje en la bicapa lipídica derivada de la membrana RE. En el caso de HBV, las proteínas L y M difieren de la proteína S en una extensión N-terminal hidrófila de 163 a 174 aminoácidos, denominada pre-S. Esta extensión pre-S se divide adicionalmente en un dominio pre-S2 (55 aminoácidos) y otro pre-S1 (108 aminoácidos de subtipo ayw), hacia el extremo amino. Dependiendo del subtipo de HBV, el dominio pre-S1 muestra cierta variación de secuencia y, en el caso del subtipo adr, porta una inserción de 11 aminoácidos
25 adicionales.

30 El análisis de la infectividad de HBV pseudotipados que portan mutaciones en la parte pre-S exterior de la proteína L ha mostrado que la infección depende de una secuencia extendida en el dominio pre-S1 de la proteína L de HBV (Le Seyec, 1999). En contraposición, la mayoría de partes del dominio pre-S2 resultaron ser prescindibles para la infectividad (Le Seyec *et al.*, 1998). Esto indica que la secuencia entre los aminoácidos 3 y 77 del dominio pre-S1 está implicada en la etapa de infección.

35 Debido a la disponibilidad de hepatocitos de pato primarios, se ha conseguido un mayor progreso en el sistema modelo de virus de la hepatitis B de pato relacionado. Usando este sistema, se mostró que los polipéptidos de pre-S derivados de *E. coli* de la proteína L del virus de la hepatitis B de pato inhiben la infección por DHBV de hepatocitos de pato primarios al interferir con la unión a receptor (Urban *et al.*, 1998). Se demostró adicionalmente que la proteína de unión a DHBV-preS carboxipeptidasa D, inicialmente identificada por Kuroki *et al.*, (1994) funciona como componente receptor común para los HBV aviares (Urban *et al.*, 1998; Breiner *et al.*, 1998; Urban *et al.*, 2000) (véanse también los documentos EP 1.088.830 A; EP 0.485.361 A; WO 99/15671 A; WO 0.250.253 A; WO 91/05059 A; US 4.935.235 A; Gripon, P. *et al.* (1995), *Virology* 213: 292-299; Neurath, AR *et al.* (1987), *Molecular Immunology* 24: 975-980).
40

45 En el caso de infección por HBV, sigue faltando un estado de conocimiento similar y todavía no hay evidencias experimentales de componentes peptídicos que interfieran eficazmente con las etapas tempranas de una infección por HBV.

Los autores de la presente invención han investigado si los polipéptidos de pre-S derivados de *E. coli* recombinante y los péptidos de pre-S de proteína L de HBV sintetizados químicamente podían interferir con una infección por HBV.

Han identificado un grupo de péptidos sintéticos que, a la vez que exhiben una excelente actividad inhibidora directa de la infección por HBV, hacen posible desencadenar una protección inmunitaria frente a HBV.

50 Estos polipéptidos se diseñaron a partir de la secuencia de los aminoácidos 1 a 78 de pre-S1 (SEQ ID NO 1) del virus de la hepatitis B subtipo ayw. Sin embargo, aunque estos polipéptidos son más cortos que la región pre-S1, sorprendentemente muestran una mejor actividad inhibidora que polipéptidos más largos que imitarían la región pre-S1 entera.

55 Los polipéptidos sintéticos aislados de la presente invención como se definen en las reivindicaciones tienen la secuencia aminoacídica de fórmula:

X-Y-Z (I)

en la que:

- X es un aminoácido, por ejemplo una metionina, o está ausente;

5 - Y es la secuencia aminoacídica 2 a 48 de la región pre-S1 mostrada en la SEQ ID NO 2, o una forma truncada N-terminal y/o C-terminal de esta secuencia;

- Z, ligado al grupo –CO- del último residuo de Y, es una secuencia aminoacídica que comprende 1 a 30 aminoácidos consecutivos de la región pre-S1 mostrada en la SEQ ID NO 3, o está ausente;

estando dichos polipéptidos opcionalmente modificados químicamente para portar un resto hidrófobo.

10 Preferiblemente, cuando Y es una forma truncada C-terminal, y opcionalmente N-terminal, de la secuencia SEQ ID NO 2, o una variante de la misma, Z está ausente.

Preferiblemente, el resto hidrófobo corresponde al resto acilo de un ácido graso saturado o insaturado que tiene al menos 4 átomos de carbono, preferiblemente al menos 6 átomos de carbono, más preferiblemente al menos 8 átomos de carbono, tal como ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, oleato, linoleato, linolenato o araquidonato, por ejemplo, o el resto hidrófobo corresponde a un grupo colesterol o similar.

15 En una realización preferida, los polipéptidos de la presente invención están miristoilados. Más preferiblemente, los polipéptidos comprenden la secuencia aminoacídica entera de 2 a 48 de SEQ ID NO 1, portando el aminoácido 2 (glicina) un grupo mirístico: MyrGQNLSTSNPLGFFPOHQLOPAFRANTANPDWOFNPNKDTWPDANKVG (Myr 2-48, SEQ ID NO 7).

En otra realización, el polipéptido de la invención tiene la secuencia SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 7.

20 El término “variante” hace referencia a las secuencias polinucleotídicas homólogas encontradas en diferentes especies víricas, cepas o subtipos del género hepadnavirus, tales como HBV cepa α 1, HBV cepa LSH (aislamiento de chimpancé), HBV de marmota, HBV de mono lanudo (WMHBV), o cepas seleccionadas del grupo consistente en los subtipos de HBV AD, ADR, ADW, ADYW, AR y AYW.

25 Cualquier análogo de los polipéptidos sintéticos de pre-S1 es parte de la presente divulgación. Los análogos implican deleciones aminoacídicas, sustituciones aminoacídicas tales como por reemplazo conservativo o no conservativo por otros aminoácidos o por isómeros (aminoácidos modificados que ostentan una similitud estructural y espacial parecida a los aminoácidos proteicos), adiciones aminoacídicas o adiciones isostéricas, a condición de que las secuencias desencadenen un 70% de inhibición de la infección por HBV de cultivos primarios de hepatocitos humanos con una concentración peptídica menor de 100 μ M, preferiblemente menor de 10 μ M, y preferiblemente menor de 1 μ M.

30 Las sustituciones aminoacídicas conservativas se refieren típicamente a sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Estas clases incluyen, por ejemplo, aminoácidos que tienen cadenas laterales polares no cargadas, tales como asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina; aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas, tales como lisina, arginina e histidina; aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas, tales como ácido aspártico y ácido glutámico y aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares, tales como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano y cisteína.

Ventajosamente, los péptidos según la invención se modifican para resistir la proteólisis. Esto puede conseguirse, por ejemplo, sustituyendo los L-aminoácidos en sitios expuestos por su contrapartida D-aminoacídica.

40 En otra realización, los polipéptidos de la invención pueden incorporar ligadores peptídicos o no peptídicos cortos para diseñar péptidos tridimensionalmente limitados (Root M.J. *et al.*, 2001).

45 Los polipéptidos de esta invención pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos fácilmente conocidos por los expertos en la materia. Dichos procedimientos incluyen más particularmente la síntesis secuencial y en bloques en fase sólida (B.W. Erickson y R.B. Merrifield, 1976). El procedimiento secuencial en fase sólida puede efectuarse usando métodos automatizados establecidos tales como mediante el uso de un sintetizador polipeptídico automatizado. En este procedimiento, se une un aminoácido protegido en el amino α a un soporte de resina. El soporte de resina empleado puede ser cualquier resina adecuada empleada convencionalmente en la materia para la preparación en fase sólida de polipéptidos, preferiblemente poliestireno que se ha copolimerizado con polioxietileno proporcionando sitios de formación de éster con el aminoácido protegido en el amino α inicialmente introducido. Este método optimizado, aplicados por los inventores, se ha descrito explícitamente por Gausepohl *et al.*, 1989 y 1990.

50 Los aminoácidos se introducen uno a uno. Cada ciclo de síntesis correspondiente a la introducción de un aminoácido incluye una etapa de desprotección, etapas de lavado sucesivas, una etapa de acoplamiento con activación del aminoácido y etapas de lavado posteriores. Cada una de estas etapas es seguida por una filtración.

Los agentes reactivos para acoplamiento son los agentes reactivos clásicos para síntesis polipeptídica tales como dicitclohexilcarbodiimida, hidroxibenzotriazol, hexafluorofosfato de benzotriazolil-1-il-oxitris(dimetilamino)fosfonio y difenilfosforilazida.

5 Después de la síntesis del polipéptido en la resina, se separa el polipéptido de la resina mediante tratamiento con un ácido fuerte tal como ácido trifluoroacético en presencia de anisol, etanoditiol o 2-metilindol. El compuesto se purifica entonces mediante las técnicas clásicas de purificación, en particular mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC).

Los polipéptidos de la presente invención pueden obtenerse también acoplando fragmentos polipeptídicos que están protegidos selectivamente, efectuándose este acoplamiento en solución.

10 El polipéptido puede producirse adicionalmente mediante técnicas de ingeniería genética. Un sistema de expresión eucariótico, tal como el sistema de baculovirus, es particularmente adecuado. Según este procedimiento, se expresan proteínas en células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga y secuencias de ácido nucleico reguladoras, tales como un promotor. Están disponibles varias estirpes celulares para infección con baculovirus recombinantes, tales como la
15 estirpe celular SF-9, disponible en la American Type Culture Collection (CRL 1711).

Los polipéptidos de la presente invención pueden usarse para inhibir *in vitro* o *in vivo* la infección de hepatocitos por HBV mediante la prevención de la unión a y/o la internalización en hepatocitos de partículas de HBV.

Por consiguiente, la invención proporciona un método de inhibición *in vitro* de la infección de hepatocitos por HBV que comprende usar un polipéptido como se describe anteriormente.

20 Los hepatocitos adecuados incluyen hepatocitos primarios humanos o la estirpe celular derivada de hepatoma denominada HepaRG (descrita en la solicitud de patente FR 0109044), que es también sensible a la infección por HBV.

La invención se refiere adicionalmente a un método para la identificación *in vitro* y/o *in vivo* de un receptor de hepatocito implicado en el ligamiento y/o penetración de HBV y/o la cuantificación de la expresión de dicho receptor
25 que comprende usar un péptido como se describe anteriormente.

En particular, dicho método comprende las etapas consistentes en:

- poner en contacto una biopsia hepática o un hepatocito con un polipéptido de la invención en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir una unión específica de dicho polipéptido a un receptor expresado en la superficie de un hepatocito;
- 30 - detectar la unión de dicho polipéptido a un receptor; e
- identificar dicho receptor.

Esto puede conseguirse según procedimientos clásicos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, esto podría implicar marcaje radiactivo, enzimático o fluorescente de los polipéptidos de la invención, y la posterior detección con un método apropiado. Son conocidos una serie de materiales fluorescentes y pueden utilizarse como
35 marcadores. Estos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina y rojo de Texas. Los marcadores enzimáticos consisten en la conjugación de una enzima con una molécula de interés, por ejemplo un polipéptido, y pueden detectarse mediante cualquiera de las técnicas colorimétrica, espectrofotométrica o fluoroespectrofotométrica.

La presente solicitud se refiere también a anticuerpos dirigidos contra un polipéptido según la invención, o un fragmento de dicho polipéptido. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o los fragmentos de unión a antígeno Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Pueden ser también anticuerpos inmunoconjugados o marcados.

Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse a partir de suero de un animal inmunizado contra un polipéptido de la invención, según métodos estándares bien conocidos por un experto en la materia. La especificidad del suero policlonal puede aumentarse adicionalmente mediante cromatografía de inmunoafinidad usando polipéptidos de fórmula (I), o un fragmento del mismo, inmovilizado sobre una fase sólida. Se pone en contacto el anticuerpo con el polipéptido inmunizador inmovilizado durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo anticuerpo-polipéptido inmovilizado.
45

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse según el método estándar de cultivo de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975).
50

Dichos anticuerpos son particularmente útiles para inhibir *in vitro* o *in vivo* la infección por HBV de hepatocitos, o para valorar *ex vivo* la infectividad de partículas de HBV.

Por consiguiente, la solicitud proporciona un método para valorar *ex vivo* la infectividad de partículas de HBV que comprende usar un anticuerpo según esta divulgación.

En otra realización, los polipéptidos de la invención pueden usarse como fármaco. Dicho fármaco puede ser particularmente útil para bloquear o prevenir la infección por HBV.

- 5 Las composiciones farmacéuticas que comprenden, en un portador farmacéuticamente aceptable, un polipéptido según la invención están dentro del alcance de la invención.

Por consiguiente, la invención proporciona un método terapéutico para la prevención o el tratamiento de infección por HBV que comprende la administración de un péptido o anticuerpo de la invención a un paciente necesitado de ello.

- 10 La invención se refiere adicionalmente al uso de un polipéptido o anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento pretendido para la inhibición *in vivo* de la infección por HBV. Como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" pretende indicar la mejora o la estabilización de la afección de un paciente. Esto incluye, por ejemplo, la prevención de la propagación de HBV a células no infectadas de un organismo.

- 15 La invención proporciona adicionalmente una composición terapéutica que comprende un polipéptido de la invención asociado a un portador farmacéuticamente aceptable.

Por consiguiente, la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende, en un portador farmacéuticamente aceptable, un polipéptido dado a conocer en la presente memoria.

En el contexto de la presente solicitud, "vacunación" pretende indicar vacunación profiláctica o terapéutica. "Vacunación terapéutica" pretende indicar la vacunación de un paciente con infección por HBV.

- 20 Preferiblemente, el péptido o péptidos del método/composición de vacuna o composición inmunogénica está miristoilado. La miristoilación hace posible de hecho potenciar la respuesta inmunitaria desencadenada hacia el antígeno peptídico.

- 25 Los polipéptidos de la invención pueden modificarse para tener propiedades inmunogénicas aumentadas. Dichas propiedades inmunogénicas aumentadas hacen referencia, por ejemplo, a aumentar el intervalo de anticuerpos desencadenados después de la inmunización, o a permitir la producción de anticuerpos capaces de neutralizar la infección por diversas cepas víricas.

En otra realización, los polipéptidos de la invención pueden modificarse para reducir sus propiedades inmunogénicas. Dichos polipéptidos serían particularmente útiles en una aplicación terapéutica para inhibir la infección por HBV *in vivo* HBV evitando o limitando los efectos adversos.

- 30 Un "portador farmacéuticamente aceptable" hace referencia a cualquier vehículo en el que las composiciones farmacéuticas o de vacuna según la invención puedan formularse. Incluye una disolución salina tal como disolución salina tamponada con fosfato. En general, se selecciona un diluyente o portador basándose en el modo y vía de administración y la práctica farmacéutica estándar.

- 35 Según la invención, el término "paciente" se pretende que indique cualquier ser humano que sea probable que se infecte por HBV.

- 40 Los polipéptidos de la invención pueden usarse para el diagnóstico *ex vivo* de infección por HBV mediante la detección de la interacción de dichos polipéptidos con anticuerpos presentes en una muestra biológica y dirigidos hacia un fragmento de la región pre-S1 de partículas víricas de HBV. Esta interacción específica de dichos polipéptidos con anticuerpos endógenos puede detectarse mediante cualquier método de detección adecuado fácilmente conocido por el experto en la materia.

La invención proporciona por tanto un método para el diagnóstico *ex vivo* de infección por HBV que comprende las etapas consistentes en:

- 45 - poner en contacto una muestra biológica con un polipéptido de la invención en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos entre dicho polipéptido y un anticuerpo presente en una muestra biológica y dirigido hacia un fragmento de la región pre-S1 de partículas víricas de HBV;
- detectar dichos complejos, cuya presencia es indicativa de infección por HBV.

- 50 El método de diagnóstico de la invención es útil como método predictivo del desarrollo de infección por HBV. Por consiguiente, las repeticiones en diferentes puntos temporales del método de diagnóstico *ex vivo* anterior hacen posible revelar el aumento o reducción del número de anticuerpos contra un fragmento de la región pre-S1 de partículas víricas de HBV que se detectan. Un aumento en el número de dichos anticuerpos indica habitualmente una mejora de la afección del paciente. En particular, dicho método permite la valoración de la respuesta de un paciente ante un tratamiento.

La detección puede conseguirse mediante cualquier medio, por ejemplo, marcaje radiactivo, enzimático o fluorescente de los polipéptidos de la invención combinado con un medio apropiado de detección fácilmente conocido por un experto en la materia.

5 La presente solicitud está también dirigida a métodos de diagnóstico referentes a la detección de anticuerpos de antígenos de HBV codificados por el gen pre-S1. Dichos anticuerpos pueden detectarse *ex vivo* en una muestra biológica con los inmunógenos peptídicos sintéticos dados a conocer en la presente memoria mediante inmunoensayos tanto de tipo sándwich como de tipo competitivo, tales como aquellos inmunoensayos en que el antígeno en la muestra compete con el inmunógeno marcado por el anticuerpo.

10 Se hace referencia también a un método para detectar una infección por HBV que comprende efectuar inmunoensayos cuantitativos en un suero tomado de un ser humano para determinar la cantidad de anticuerpos presentes en el mismo, que son anticuerpos de un antígeno codificado por la región pre-S1, empleando el inmunógeno peptídico de HBV anteriormente descrito y comparando el valor con un patrón conocido.

15 Se refiere también a un método para detectar la presencia de infección por HBV que comprende efectuar inmunoensayos cuantitativos en un suero tomado de un ser humano para determinar la cantidad de antígenos codificados por la región pre-S1, empleando los anticuerpos anteriormente descritos del inmunógeno peptídico de HBV y comparando el valor con un patrón conocido.

Los péptidos según la invención pueden usarse similarmente para determinar el resultado de la infección por HBV llevando a cabo periódicamente un inmunoensayo en una muestra biológica de un paciente para valorar la cantidad de anticuerpos de un antígeno codificado por la región pre-S1, o de antígenos codificados por la región pre-S1.

20 La invención se entenderá adicionalmente a la vista de los siguientes ejemplos y las figuras adjuntas, en las que:

- La Figura 1 es una comparación de la infectividad por HBV de hepatocitos humanos cultivados en presencia de un péptido miristoilado o no miristoilado correspondiente a un dominio de la región pre-S1 (1-78). Se evaluó la eficacia de infección midiendo HBsAg en el sobrenadante de células infectadas 14 días después de la infección. Los valores se expresan como % del control (sin péptido).

25 - La Figura 2 ilustra la comparación de la actividad inhibidora de péptidos miristoilados truncados C-terminales. Se infectaron con HBV hepatocitos humanos en presencia de péptidos miristoilados y no miristoilados correspondientes a partes del dominio pre-S1 de la proteína L de HBV. La concentración de péptidos estaba en el intervalo de 0,8 a 800 nM. Se evaluó la eficacia de infección midiendo la secreción de HBsAg 7 días después de la infección y se expresó como % de control positivo.

30 - La Figura 3 es una comparación de la actividad inhibidora de péptidos truncados C-terminales más cortos que Myr 2-48. La concentración de péptidos estaba en el intervalo de 0,8 a 8 µM. Se evaluó la eficacia de infección midiendo la secreción de HBsAg 8 días después de la infección y se expresó en ng/ml.

35 - La Figura 4 ilustra la actividad inhibidora comparativa de péptidos 2-48 miristoilados derivados de WMHBV y HBV. Se efectuó la infección de hepatocitos humanos primarios con HBV en presencia de concentraciones decrecientes de péptidos. Se recogió el sobrenadante de las células infectadas el día 10 después de la infección y se analizó la presencia de HbsAg.

40 - La Figura 5 es un análisis de transferencia puntual de HBV de pato (DHBV) en el suero de patos tratados con Myr 2-41 de preS de pato (DpreS2-41^{myr}), Myr 2-44 de preS de garza (HepreS2-44^{myr}), Myr 2-68 de preS humano (HupreS2-68^{myr}), Myr 2-21 de preS de pato (DpreS2-21^{myr}) o H₂Odd, 5, 9, 15 y 28 días después de la infección (p.i.) con DHBV.

- La Figura 6 es un análisis de transferencia Western de proteína L de DHBV en el suero de patos 35 días después de la infección.

EJEMPLO 1: Materiales y métodos para la inhibición de la infección por HBV con polipéptidos sintéticos pre-S1-HBV

45 a) Establecimiento del cultivo de células infectables por HBV

50 Se obtuvieron fragmentos de hígado humano adulto normal de pacientes que padecían resección hepática por metástasis hepáticas (los fragmentos se tomaron a una distancia de la metástasis en hígado microscópicamente normal). El acceso a este material de biopsia estaba de acuerdo con las leyes francesas y satisfacía los requisitos del Comité Ético Nacional Francés. Se aislaron hepatocitos mediante el procedimiento de Guguen-Guillouzo y Guillouzo y se cultivaron en medio H suplementado con hemisuccinato de hidrocortisona 3,5 x 10⁻⁶ M, L-glutamina 2 mM, gentamicina 50 mg/l, 2% de dimetilsulfóxido, 5% de suero humano adulto y 5% de FCS. Tres días después de la siembra, se infectaron las células.

Como alternativa, para algunos experimentos se hizo uso, en lugar de cultivos primarios, de una nueva estirpe celular derivada de hepatoma denominada HepaRG, que es también sensible a la infección por HBV (solicitud de

patente FR 0109044). Antes del procedimiento de infección, se dejaron diferenciar las células, dejando que las células adquiriesen una morfología de tipo hepatocítica (solicitud de patente FR 0109044). Se infectaron entonces las células.

b) Infección por HBV de cultivo celular

- 5 Se usó como inóculo infeccioso un medio de cultivo concentrado 50 veces de células HepG2 clon 2.2.15, debido a su suministro ilimitado y calidad constante.

Se preparó como se describe anteriormente. Se incubaron las células diferenciadas con la fuente infecciosa concentrada, diluida 10 veces en medio de cultivo suplementado con 5% de PEG 8000 (Sigma), durante 20 h a 37°C como se describe anteriormente (Gripon *et al.*, 1988; Gripon *et al.*, 1993). Se incubaron los cultivos de control con 10 5% de PEG y 25% de FCS diluidos en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) en lugar de la fuente infecciosa. Al final de la incubación, se lavaron las células tres veces con el medio de cultivo y se mantuvieron en presencia de 2% de DMSO y hemisuccinato de hidrocortisona 5×10^{-5} M y se recolectaron en los momentos indicados.

c) Ensayos competitivos de polipéptidos

- 15 Se efectuaron los ensayos competitivos de polipéptidos preincubando células con el polipéptido analizado durante 30 min, a 37°C, antes de la adición de la fuente infecciosa.

d) Valoración de la inhibición de la infección por HBV

- Ensayo de HBsAg

- 20 Se detectó HBsAg en el medio mediante un kit ELISA (Monolisa AgHBs plus) obtenido de Bio-Rad Laboratories. Los valores se expresan en ng/ml de sobrenadante o en porcentaje de control (ausencia de péptido).

- Extracción y análisis de ARN

- 25 Se extrajo el ARN celular total mediante el kit Total SV RNA (Promega, Francia), se fraccionó en un gel de agarosa al 1,5% y se analizó mediante un procedimiento estándar de transferencia Northern (Sambrook *et al.*, 1989). Se efectuó el control de la cantidad de ARN transferida a los filtros después de tinción con azul de metileno. Se efectuó la hibridación con ADN de HBV marcado con ^{32}P .

EJEMPLO 2: Resultados de la inhibición de la infección por HBV con polipéptidos sintéticos pre-S1-HBV

a) Influencia de la miristoilación de péptidos sintéticos de pre-S1 sobre la inhibición de la infección por HBV

- 30 Experimentos de mutagénesis han mostrado anteriormente que una parte (los aminoácidos (AA) 3-77) de la región pre-S1 era esencial para la infectividad por HBV (Le Seyec *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado también que la miristoilación de AA2, un residuo de glicina, asociada a la retirada de AA1, un residuo de metionina, era también crítica (Gripon *et al.*, 1995). Por lo tanto, se ha postulado que un péptido que comprende los aminoácidos 2-77, con una glicina miristoilada, podría interferir con el proceso de infección por HBV. Para evaluar esta hipótesis, se sintetizaron dos péptidos: PreS 1-78 y Myr PreS 2-78. Se añadieron entonces estos péptidos antes de y durante el proceso de infección de cultivos de hepatocitos humanos, y se evaluó el nivel de infección midiendo la secreción de 35 HBsAg de células infectadas. La Figura 1 exhibe que aunque el péptido no miristoilado tiene solo un débil efecto sobre la infectividad de HBV a 1 μM , la misma cantidad de péptido miristoilado la anulaba casi completamente, y dosis menores eran parcialmente inhibidoras. Estos resultados se confirmaron mediante análisis de ARN.

- Otros experimentos realizados con concentraciones mayores de péptidos (hasta 100 μM) indican que la miristoilación no es absolutamente necesaria para la inhibición de la infección de HBV, pero potencia en gran 40 medida la actividad de los péptidos por un factor de 15 a aproximadamente 100 veces.

b) Actividad de péptidos sintéticos de pre-S1 truncados C-terminales

- 45 Se infectaron con HBV hepatocitos humanos en presencia de péptidos miristoilados o no miristoilados correspondientes a partes del dominio Pre-S1 de la proteína L de HBV. La concentración de péptidos estaba en el intervalo de 0,8 a 800 nM. La Figura 2 muestra la actividad de inhibición de los péptidos truncados miristoilados. Los resultados obtenidos con péptidos no miristoilados se exhiben en la Tabla 1 (a continuación).

Parece que el péptido Myr 2-48 muestra la mayor actividad inhibidora. Los péptidos mayores, Myr 2-68 y Myr 2-78, aunque muy eficaces a 800 nM, son menos eficaces a dosis menores. El péptido menor Myr 2-28 es mucho menos activo, aunque se observa un 50% de inhibición a 800 nM.

- 50 Ya que persiste cierta actividad para el péptido menor de 2-48, para evaluar la contribución de los aminoácidos N-terminales se ha producido y evaluado un nuevo conjunto de péptidos cortos. Los resultados se muestran en la Figura 3. Resulta obvio a partir de la figura que los péptidos Myr 2-38 y Myr 2-28 siguen manteniendo una actividad

inhibidora significativa ya que bloquean casi completamente la infección por HBV a 8 µM. En contraposición, los 2 péptidos más cortos no son ya activos y el más corto tiende a aumentar la infectividad por HBV por razones desconocidas.

5 Se estudió también el efecto de la miristoilación y el truncamiento C-terminal de los péptidos de pre-S1 mediante análisis de ARN. Los resultados confirman que los péptidos truncados miristoilados exhibían actividad inhibidora potenciada en comparación con los correspondientes péptidos no miristoilados, y que se obtiene la actividad inhibidora mayor con Myr 2-48.

c) Actividad inhibidora de infección por HBV de secuencias homólogas de pre-S1

10 Se ha mostrado que un hepadnavirus de primate recién descubierto, el virus de la hepatitis B de mono lanudo (WMHBV), es muy poco infeccioso para cultivos primarios de hepatocitos de chimpancé y humanos. La secuencia polipeptídica 1- 78 de pre-S1 de WMHBV muestra un 66% de identidad de secuencia con el péptido derivado de HBV original. Se ha investigado la actividad inhibidora de un péptido Myr 2-48 derivado de WMHBV (SEQ ID NO 14) frente a la infección por HBV de células humanas.

15 La Figura 4 ilustra la actividad inhibidora comparativa de péptidos 2-48 miristoilados derivados de WMHBV y HBV (64% de identidad de secuencia). Este experimento muestra claramente que el péptido derivado de WMHBV es sorprendentemente casi tan eficaz como el péptido derivado de HBV en la inhibición de la infección por HBV. Este resultado está en contraposición con la ausencia completa de actividad de un péptido derivado de DHBV (Myr 2-41 de PreS (SEQ ID NO 16), véase la tabla 1) sobre la infección por HBV, aunque este péptido es un fuerte inhibidor de la infección por DHBV.

20 A partir de estos resultados, puede concluirse que es posible inhibir eficazmente la infección por HBV. La tolerancia de hasta un 46% de variaciones de la secuencia peptídica sugiere que será posible inhibir la infección de virus HBV de todos los genotipos con un solo péptido.

Tabla 1: Resumen de los resultados de los experimentos competitivos

Polipéptidos no miristoilados (100 µM)	Inhibición de la infectividad por HBV de hepatocitos humanos	Polipéptidos miristoilados (1 µM)	Inhibición de la infectividad por HBV de hepatocitos humanos
PreS 1-78 de HBV (SEQ ID NO 1)	ND	Myr PreS 2-78 de HBV (SEQ ID NO 4)	++++
PreS 1-68 de HBV	ND	Myr PreS 2-68 de HBV (SEQ ID NO 5)	++++
PreS 1-48 de HBV (SEQ ID NO 6)	+++	Myr PreS 2-48 de HBV (SEQ ID NO 7)	+++++
PreS 1-38 de HBV	ND	Myr PreS 2-38 de HBV (SEQ ID NO 8)	+++
PreS 1-28 de HBV (SEQ ID NO 9)	+	Myr PreS 2-28 de HBV (SEQ ID NO 10)	+++
PreS 1-18 de HBV	ND	Myr PreS 2-18 de HBV (SEQ ID NO 11)	-
PreS 1-8 de HBV	ND	Myr PreS 2-8 de HBV (SEQ ID NO 12)	-

Polipéptidos no miristoilados (100 µM)	Inhibición de la infectividad por HBV de hepatocitos humanos	Polipéptidos miristoilados (1 µM)	Inhibición de la infectividad por HBV de hepatocitos humanos
PreS 19-48 de HBV (SEQ ID NO 17)	-	Myr PreS 19-48 de HBV (SEQ ID NO 18)	-
WMHBV PreS 1-48 (SEQ ID NO 13)	+++	Myr PreS 2-48 de WMHBV (SEQ ID NO 14)	+++++
PreS 1-41 de HBV (SEQ ID NO 15)	-	Myr PreS 2-41 de DHBV (SEQ ID NO 16)	-

ND: no determinado

EJEMPLO 3: Inhibición de la infección por DHBV *in vivo* con polipéptidos sintéticos de pre-S-HBV

Se inyectan simultáneamente patos con DHBV y Myr 2-41 de preS de pato (DpreS2-41^{myr}), Myr 2-44 de preS de garza (HepreS2-44^{myr}), Myr 2-68 de preS humano (HupreS2-68^{myr}), Myr 2-21 de preS de pato (DpreS2-21^{myr}) o H₂Odd. Se valora la viremia de los animales infectados mediante análisis de transferencia puntual de ADN vírico 5, 9, 15 y 28 días después de la infección. Los resultados exhibidos en la Figura 5 muestran que se detecta ADN vírico en animales de control tratados con H₂Odd, indicando una infección exitosa de estos animales. Por el contrario, puede observarse una viremia transitoria los días 9 y 15 después de la infección en patos tratados con DpreS2-41 myr o DpreS2-21 myr. El día 28, el ADN vírico se reduce o no es ya detectable, lo que sugiere que los animales eliminaron el virus. Este análisis se apoya adicionalmente por el análisis de transferencia Western mostrado en la Figura 6, que muestra que la proteína L de DHBV no se detecta en el suero de patos tratados con DpreS2-41^{myr} o DpreS2-21^{myr} 35 días después de la infección.

Por el contrario, el péptido humano HupreS2-68^{myr} parece retardar pero no prevenir la infección de patos por DHBV (Figuras 5 y 6).

Puesto que se mostró que el péptido DpreS2-21^{myr} no tenía actividad inhibitora frente a la infección por DHBV de hepatocitos de pato primarios, la protección *in vivo* observada con este péptido sería el resultado de un efecto indirecto del péptido, concretamente, el potenciamiento de la respuesta inmunitaria por el desencadenamiento de anticuerpos dirigidos contra DpreS2-21^{myr}.

Este experimento ilustra que los péptidos miristoilados pueden conferir protección frente a infección por el virus de la hepatitis B.

REFERENCIAS

- Breiner *et al.* (1998). "Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses". *J. Virol.* 72: 8098-8104;
- DeMeyer *et al.* (1997). "Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes". *J. Viral. Hepat.* 4,145-153;
- Gausepohl, H. *et al.* (1989). *Int. J. Prot. Pept. Res.* 34, 287-294.
- Gausepohl, H. (1990). "Peptidsynthesen an Polystyrol-Polyoxyethylen Pfropfcopolymeren im Vergleich zu anderen Traqern in der Festphasensynthese nach dem Durchflussprinzip", tesis de doctorado de la Universidad de Tübingen.
- Gripon, P., C. *et al.* (1988). "Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide". *Journal of Virology.* 62: 4136-43.
- Gripon, P., *et al.* (1993). "Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration". *Virology.* 192: 534-40.
- Guguen-Guillouzo y Guillouzo (1986). "Methods for preparation of adult and fetal hepatocytes". Pág. 1-12. En A. Guillouzo and C. Guguen-Guillouzo (ed.), "Isolated and cultured hepatocytes". Les Editions INSERM Paris. John Libbey and Co, Ltd., Londres, Reino Unido.
- Kuroki *et al.* (1994). "A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles". *J. Virol.* 68: 2091-2096;

- Le Seyec *et al.* (1998). "Role of the preS2-domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity". J. Virol., 72, 5573-5578.
- Le Seyec *et al.* (1999). "Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S 1 domain". J. Virol., 73, 2052-2057.
- 5 - Nassal *et al.* (1993). "Hepatitis B Virus replication". Trends Microbiol. 1, 221-228.
- Nassal *et al.* (1996). "H. Hepatitis B virus replication, an update". J. Viral Hepatitis, 3, 217-226.
- Root, M.J. *et al.* (2001). Science, 291: 884-888.
- Schlicht *et al.* (1987). "Biochemical and immunological characterization of the duck hepatitis B virus envelope proteins". J. Virol. 61: 2280-2285.
- 10 - Urban *et al.* (1998). "Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct preS-subdomain with the cellular receptor gp180". J. Virol. 72: 8089-8097.
- Urban *et al.* (2000). "Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction". EMBO J. 19 (6): 1217-1227.
- 15 - Urban *et al.* (1998). "Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct preS-subdomain with the cellular receptor gp180". J. Virol. 72: 8089-8097.
- Sambrook, J., E. F. Fritsh, y T. Maniatis. (1989). "Molecular cloning, a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INSERM
Urban, Stephan
- <120> Péptidos bloqueantes de infección por HBV
- 5 <130> BET 02/0704
- <140>
- <141>
- <160> 18
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- 10 <210> 1
- <211> 78
- <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B humano
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Gln | Asn | Leu | Ser | Thr | Ser | Asn | Pro | Leu | Gly | Phe | Phe | Pro | Asp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| His | Gln | Leu | Asp | Pro | Ala | Phe | Arg | Ala | Asn | Thr | Ala | Asn | Pro | Asp | Trp |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Asp | Phe | Asn | Pro | Asn | Lys | Asp | Thr | Trp | Pro | Asp | Ala | Asn | Lys | Val | Gly |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ala | Gly | Ala | Phe | Gly | Leu | Gly | Phe | Thr | Pro | Pro | His | Gly | Gly | Leu | Leu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Gly | Trp | Ser | Pro | Gln | Ala | Gln | Gly | Ile | Leu | Gln | Thr | Leu | Pro | | |
| 65 | | | | 70 | | | | | | 75 | | | | | |
- 15 <210> 2
- <211> 47
- <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B humano
- 20 <400> 2
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gln | Asn | Leu | Ser | Thr | Ser | Asn | Pro | Leu | Gly | Phe | Phe | Pro | Asp | His |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gln | Leu | Asp | Pro | Ala | Phe | Arg | Ala | Asn | Thr | Ala | Asn | Pro | Asp | Trp | Asp |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Phe | Asn | Pro | Asn | Lys | Asp | Thr | Trp | Pro | Asp | Ala | Asn | Lys | Val | Gly | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
- <210> 3
- <211> 30
- <212> PRT

ES 2 399 356 T3

<213> Virus de la hepatitis B humano

<400> 3

Ala Gly Ala Phe Gly Leu Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Gln Thr Leu Pro
 20 25 30

<210> 4

5 <211> 77

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B humano

<220>

<221> LÍPIDO

10 <222> (1)

<223> MIRISTATO

<400> 4

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
 1 5 10 15
 Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp Asp
 20 25 30
 Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly Ala
 35 40 45
 Gly Ala Phe Gly Leu Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly
 50 55 60
 Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Gln Thr Leu Pro
 65 70 75

<210> 5

15 <211> 67

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B humano

<220>

<221> LÍPIDO

20 <222> (1)

<223> MIRISTATO

<400> 5

ES 2 399 356 T3

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
 1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp Asp
 20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly Ala
 35 40 45

Gly Ala Phe Gly Leu Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly
 50 55 60

Trp Ser Pro
 65

<210> 6

<211> 48

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B humano

<400> 6

Met Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp
 1 5 10 15

His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp
 20 25 30

Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
 35 40 45

<210> 7

<211> 47

10 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B humano

<220>

<221> LÍPIDO

<222> (1)

15 <223> MIRISTATO

<400> 7

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
 1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp Asp
 20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
 35 40 45

ES 2 399 356 T3

<210> 8
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis B humano
 5 <220>
 <221> LÍPIDO
 <222> (1)
 <223> MIRISTATO
 <400> 8
 Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
 1 5 10 15
 Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp Asp
 20 25 30
 Phe Asn Pro Asn Lys
 10 35
 <210> 9
 <211> 28
 <212> PRT
 15 <213> Virus de la hepatitis B humano
 <400> 9
 Met Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp
 1 5 10 15
 His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala
 20 25
 <210> 10
 <211> 27
 20 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis B humano
 <220>
 <221> LÍPIDO
 <222> (1)
 25 <223> MIRISTATO
 <400> 10

ES 2 399 356 T3

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
 1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala
 20 25

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B humano

<220>

<221> LÍPIDO

<222> (1)

<223> MIRISTATO

10 <400> 11

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
 1 5 10 15

Gln

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Virus de la hepatitis B humano

<220>

<221> LÍPIDO

<222> (1)

<223> MIRISTATO

20 <400> 12

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser
 1 5

<210> 13

<211> 48

<212> PRT

25 <213> Virus de la hepatitis B de mono lanudo

<400> 13

ES 2 399 356 T3

Met Gly Leu Asn Gln Ser Thr Phe Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Ser
 1 5 10 15

His Gln Leu Asp Pro Leu Phe Lys Ala Asn Ala Gly Ser Ala Asp Trp
 20 25 30

Asp Lys Asn Pro Asn Lys Asp Pro Trp Pro Gln Ala His Asp Thr Ala
 35 40 45

<210> 14

<211> 47

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B de mono lanudo

<220>

<221> LÍPIDO

<222> (1)

<223> MIRISTATO

10 <400> 14

Gly Leu Asn Gln Ser Thr Phe Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Ser His
 1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Leu Phe Lys Ala Asn Ala Gly Ser Ala Asp Trp Asp
 20 25 30

Lys Asn Pro Asn Lys Asp Pro Trp Pro Gln Ala His Asp Thr Ala
 35 40 45

<210> 15

<211> 41

<212> PRT

15 <213> Virus de la hepatitis B de pato

<400> 15

Met Gly Gln His Pro Ala Lys Ser Met Asp Val Arg Arg Ile Glu Gly
 1 5 10 15

Gly Glu Ile Leu Leu Asn Gln Leu Ala Gly Arg Met Ile Pro Lys Gly
 20 25 30

Thr Leu Thr Trp Ser Gly Lys Phe Pro
 35 40

<210> 16

20 <211> 40

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B de pato

ES 2 399 356 T3

<220>

<221> LÍPIDO

<222> (1)

<223> MIRISTATO

5 <400> 16

Gly Gln His Pro Ala Lys Ser Met Asp Val Arg Arg Ile Glu Gly Gly
1 5 10 15

Glu Ile Leu Leu Asn Gln Leu Ala Gly Arg Met Ile Pro Lys Gly Thr
20 25 30

Leu Thr Trp Ser Gly Lys Phe Pro
35 40

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

10 <213> Virus de la hepatitis B humano

<400> 17

Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp
5 10

Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
15 20 25 30

<210> 18

<211> 30

15 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B humano

<220>

<221> LÍPIDO

<222> (1)

20 <223> MIRISTATO

<400> 18

Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp
5 10

Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
15 20 25 30

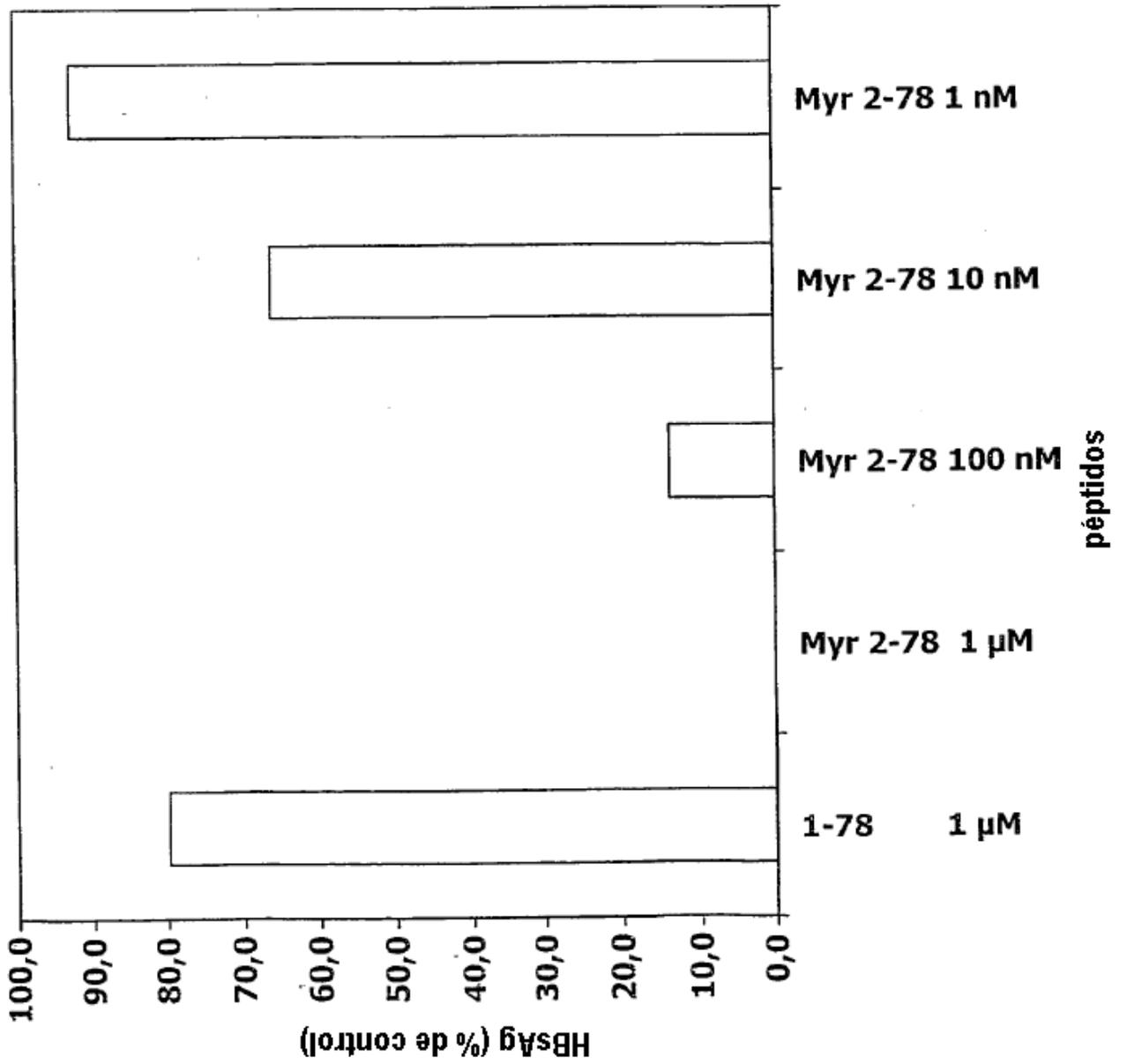
REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido sintético aislado que tiene la secuencia aminoacídica de fórmula X-Y-Z, en la que
 - X es un radical amino o un aminoácido o está ausente;
 - Y es la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO 2;
- 5 -Z, ligado al grupo –CO- del último residuo de Y, es un grupo amino o secuencia aminoacídica que comprende de 1 a 30 aminoácidos consecutivos de la región pre-S1 mostrada en la SEQ ID NO 3, o está ausente;

o una secuencia aminoacídica homóloga de dicha secuencia X-Y-Z de HBV cepa α 1, HBV cepa LSH, HBV de marmota, HBV de mono lanudo o los subtipos de HBV *ad*, *adr*, *adw*, *adyw*, *ar* o *ayw*;

estando dichos polipéptidos modificados químicamente para portar un resto hidrófobo.
- 10 2. Un polipéptido aislado según la reivindicación 1, en el que la modificación química es miristoilación.
3. Un polipéptido aislado según la reivindicación 2, en el que el aminoácido 1 de la SEQ ID NO 2 está miristoilado.
4. Un polipéptido aislado según las reivindicaciones 1 a 3, que tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 7 o SEQ IO NO 14.
5. Un polipéptido aislado que tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO 8 o SEQ ID NO 10.
- 15 6. Uso de un polipéptido de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la infección por HBV.
7. El uso según la reivindicación 6, en el que dicho medicamento es para prevenir la unión a y/o la internalización en hepatocitos de partículas de HBV.
- 20 8. Método de inhibición *in vitro* de infección de hepatocitos por HBV que comprende usar un polipéptido de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Método de identificación *in vitro* de un receptor de hepatocito implicado en el ligamiento y/o penetración de HBV que comprende las etapas de:
 - 25 a) poner en contacto una biopsia hepática o hepatocito con un polipéptido de las reivindicaciones 1 a 5 en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión específica de dicho polipéptido a un receptor expresado en la superficie del hepatocito;
 - b) detectar la unión de dicho polipéptido a un receptor; y
 - c) identificar dicho receptor.
10. Método para el diagnóstico *ex vivo* de infección por HBV que comprende las etapas de:
 - 30 a) poner en contacto una muestra biológica con el polipéptido de las reivindicaciones 1 a 5 en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo entre dicho polipéptido y un anticuerpo presente en una muestra biológica y dirigido hacia un fragmento de la región pre-S1 de partículas víricas de HBV; y
 - b) detectar dichos complejos, cuya presencia es indicativa de infección por HBV.
- 35 11. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador farmacéuticamente aceptable.

FIG.1



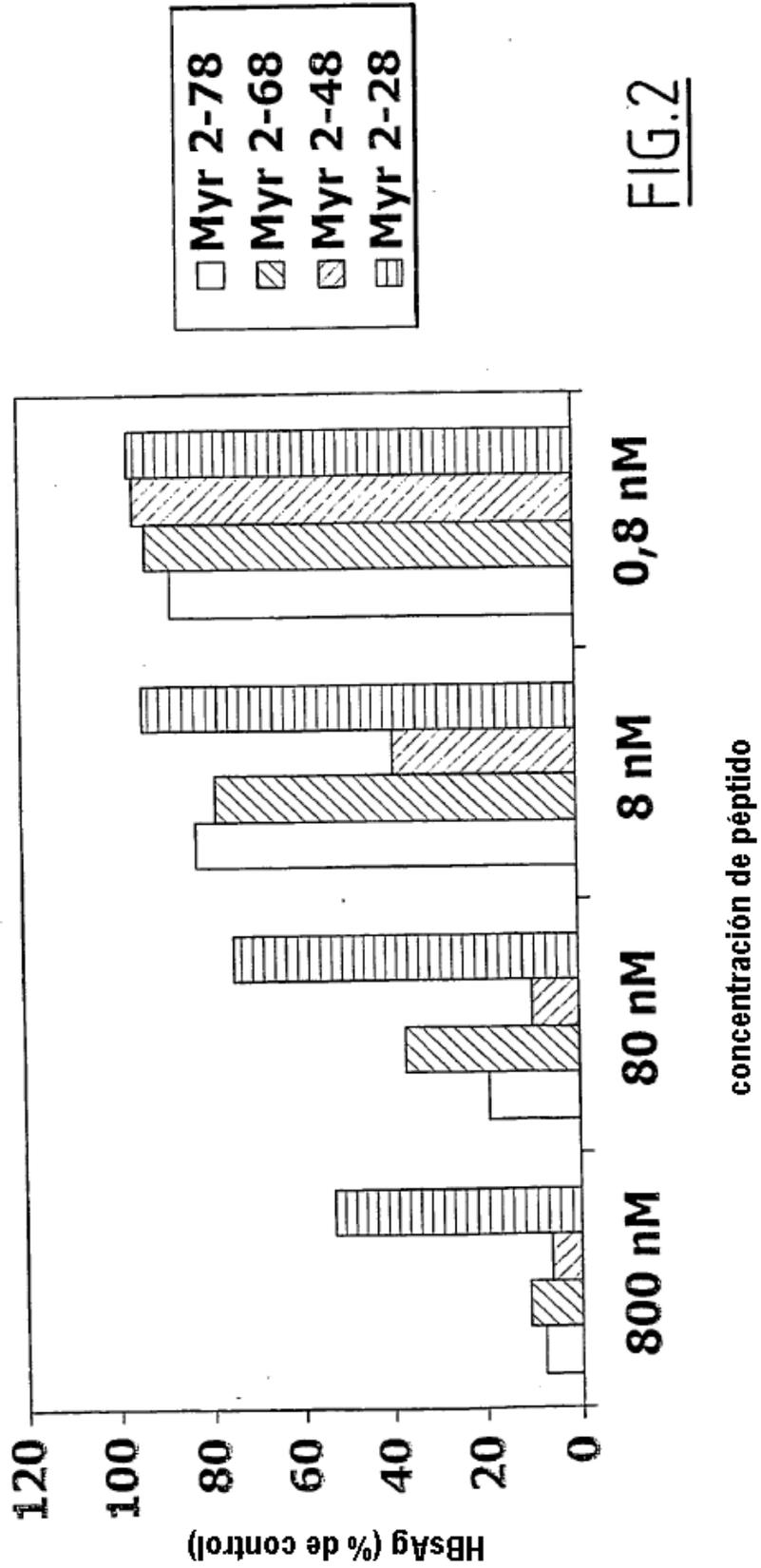


FIG.2

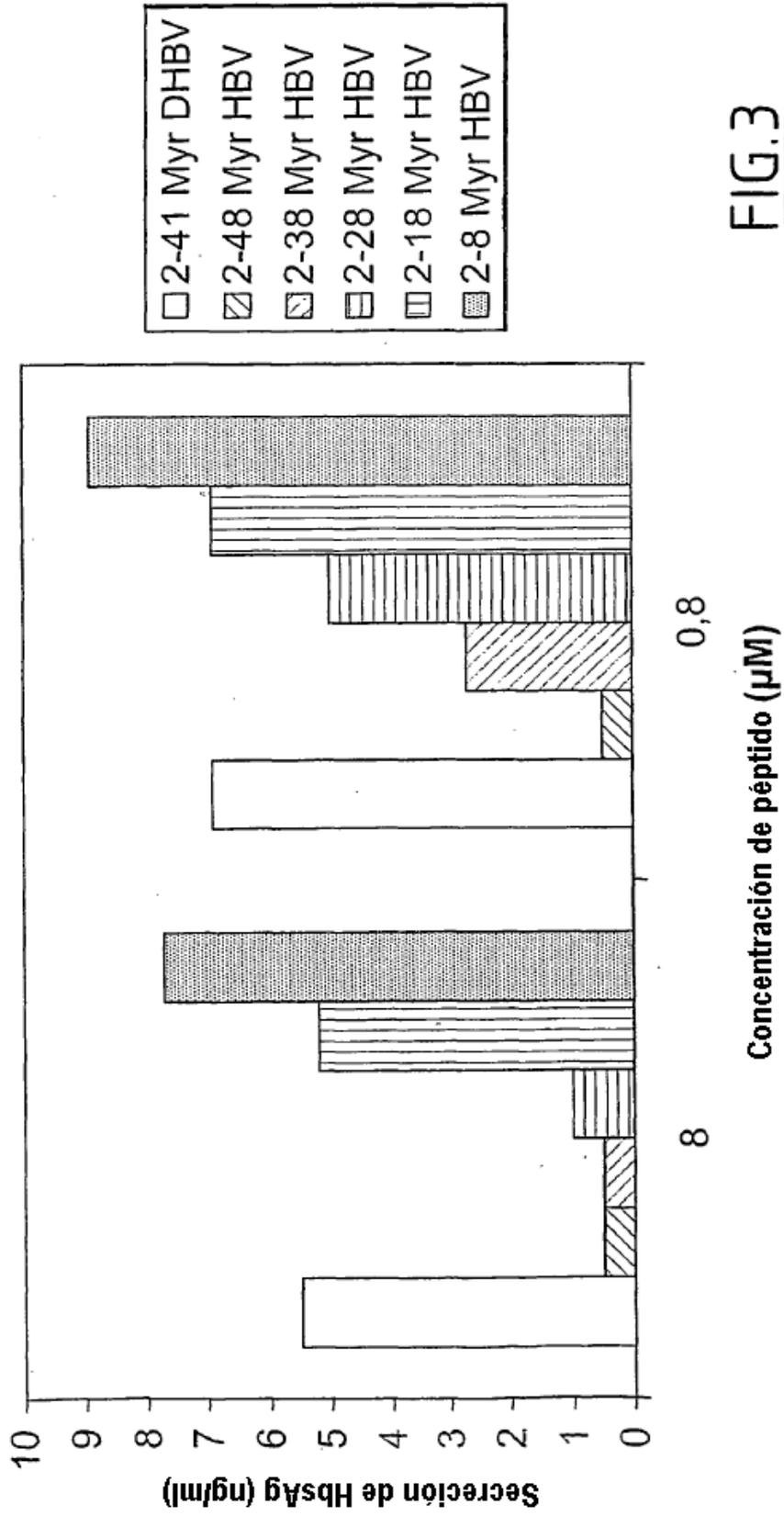


FIG.3

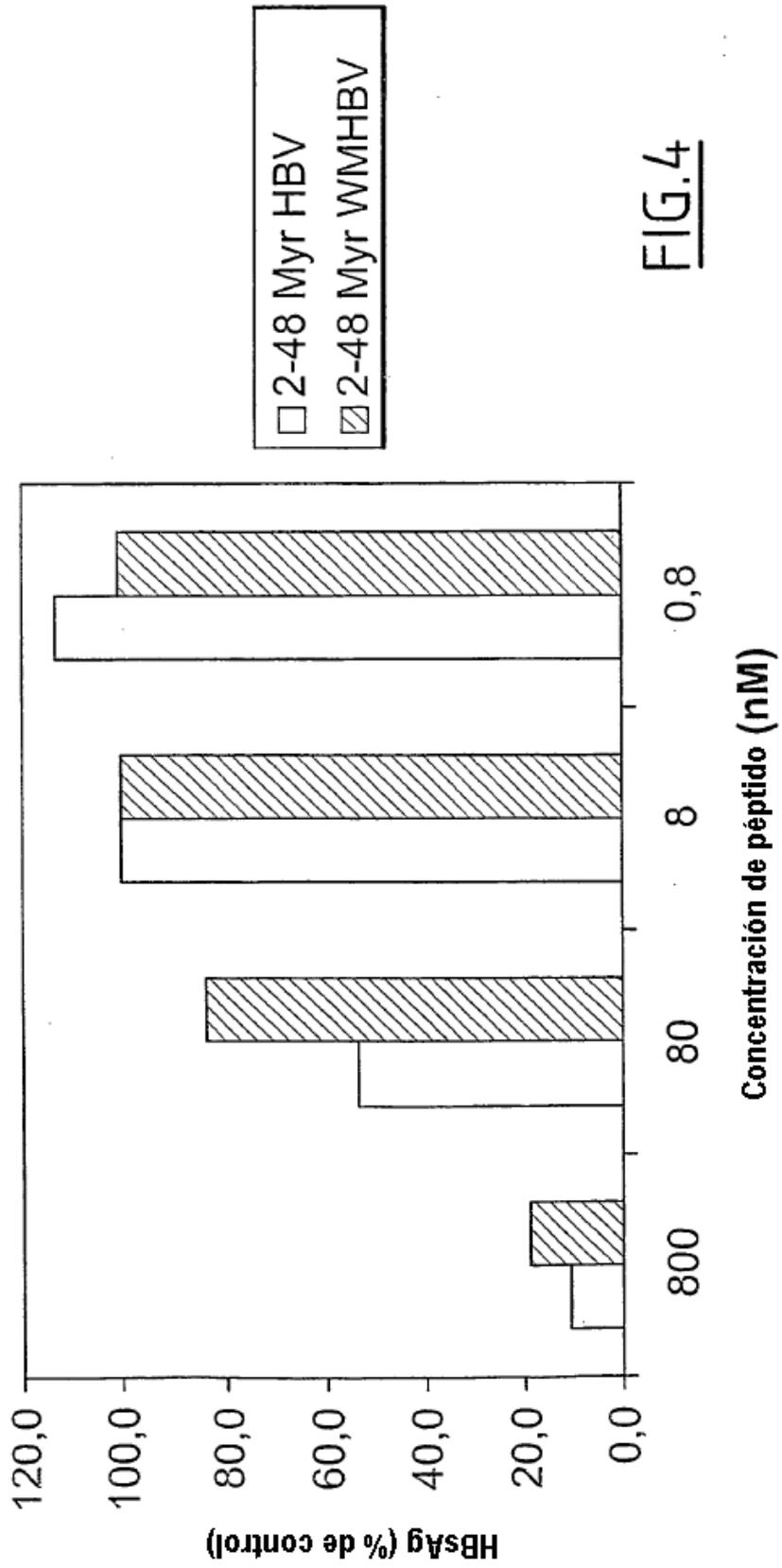


FIG.4

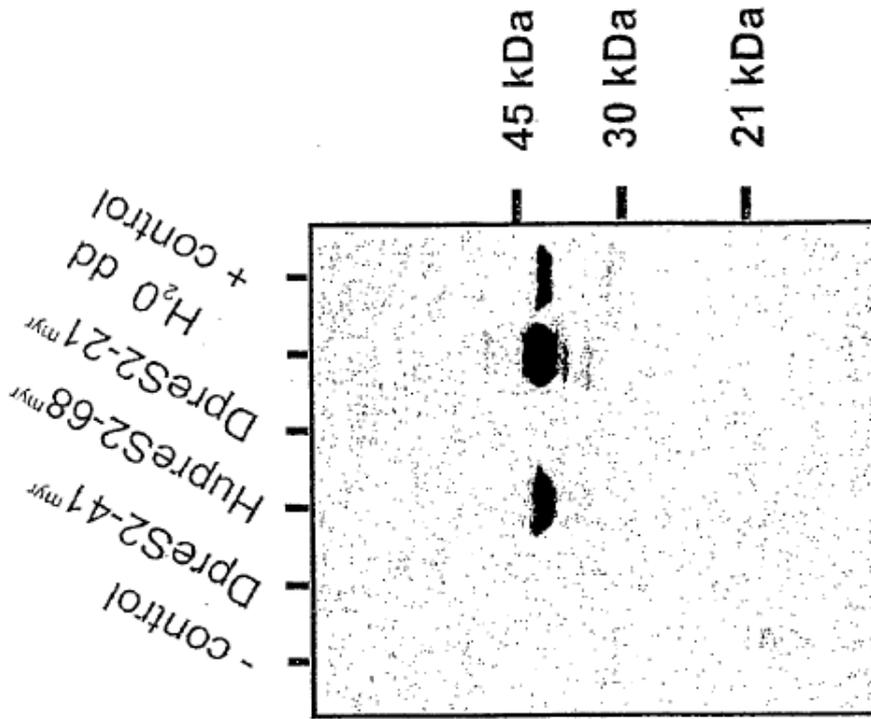


FIG.6

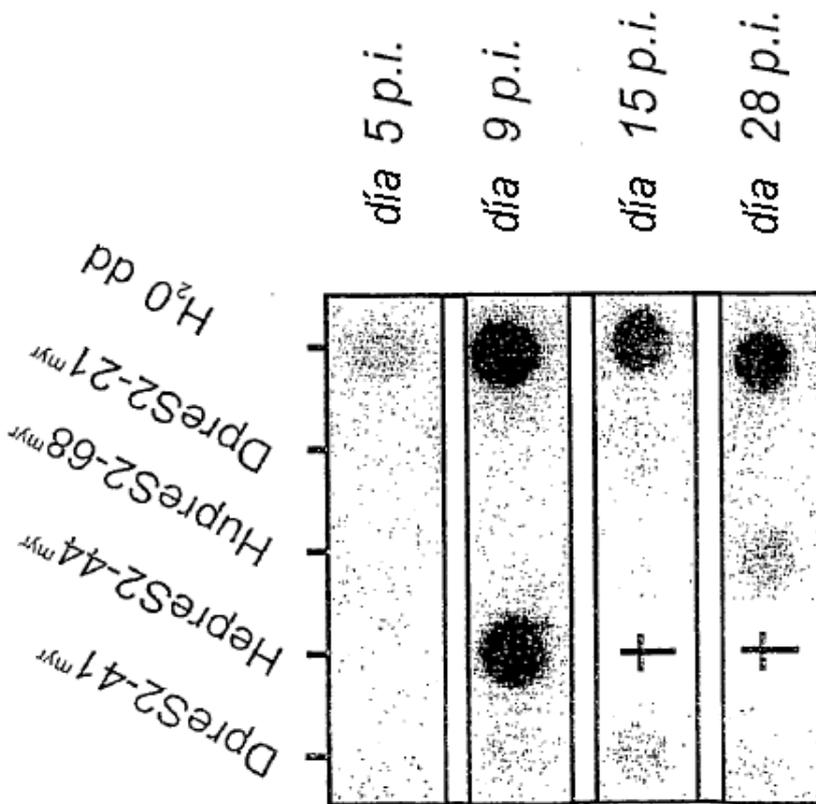


FIG.5