

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 118**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/005** (2006.01)

**A61K 39/29** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2009 E 09704471 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2247605**

54 Título: **Péptidos modificados hidrófobos derivados de preS del virus de la hepatitis B (HBV), y su uso como inhibidores del acceso del HBV y el HDV**

30 Prioridad:

**25.01.2008 WO PCT/EP2008/000591**

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

**31.01.2014**

73 Titular/es:

**RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG  
(100.0%)  
Grabengasse 1  
69117 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**MIER, WALTER y  
URBAN, STEPHAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 441 118 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

Péptidos modificados hidrófobos derivados de preS del virus de la hepatitis B (HBV), y su uso como inhibidores del acceso del HBV y el HDV

5 La presente invención se refiere a péptidos modificados hidrófobos derivados de preS del virus de la hepatitis B (HBV; del inglés, hepatitis B virus), que derivan de una secuencia de consenso de preS de HBV y están preferiblemente acilados en el extremo N y opcionalmente modificados en el extremo C. Estos péptidos modificados hidrófobos derivados de preS del HBV son inhibidores muy eficaces del acceso de HBV así como inhibidores del acceso de HDV y, por lo tanto, son adecuados para la inhibición de una infección por HBV y/o HDV, la prevención de una infección primaria por HBV y/o HDV, así como el tratamiento de una hepatitis B y/o D (crónicas). La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas y de vacuna que comprenden estos péptidos modificados hidrófobos derivados de preS del HBV.

## Antecedentes de la invención

15 Hoy en día, aproximadamente 2000 millones de personas portan marcadores serológicos de HBV. Aproximadamente 400 millones de ellas están crónicamente infectadas por el HBV. Según el Centro de Control de Enfermedades (CDC; del inglés, Center of Disease Control), el 15-25% de las personas crónicamente infectadas por el HBV son propensas a desarrollar un carcinoma hepatocelular (HCC; del inglés, hepatocellular carcinoma) en un decenio si no reciben un tratamiento apropiado (1). El HCC relacionado con el HBV tiene un mal pronóstico y, por lo tanto, el HBV ha sido clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el más importante carcinógeno humano presente en la naturaleza. A pesar de la existencia de una vacuna profiláctica, el número de infecciones aumentará en los próximos decenios a causa de la creciente población mundial y de la limitación de profilaxis en los países pobres.

20 En los países industrializados, el HBV se transmite esencialmente por vía parenteral. El 90-95% de los individuos inmunocompetentes agudamente infectados eliminan el virus, obteniendo de este modo una protección inmune para toda la vida. Aproximadamente el 5-10% de ellos desarrollan una hepatitis B crónica (300.000-500.000 personas en Alemania). Por contraste, en zonas con alto número de endemias, particularmente en África Central y Asia Oriental, el principal modo de transmisión es el vertical de madre a hijo. Desafortunadamente, la infección de niños no totalmente inmunocompetentes da lugar a un curso crónico de la enfermedad de 90-98%. Por lo tanto, el HCC relacionado con la hepatitis B es la malignidad más común en muchos de estos países.

30 Los regímenes terapéuticos actualmente aprobados para el tratamiento de infecciones crónicas por el virus de la hepatitis B (HBV) o bien se dirigen a fases de replicación del genoma vírico después de una infección ya establecida (lamivudina, adefovir, entecavir) o bien actúan como moduladores del sistema inmune (interferón alfa). Desafortunadamente, sólo el 10-25% de los pacientes mantienen una respuesta virológica ininterrumpida tras dichas terapias, lo que refleja *inter alia* la selección rápida de mutantes resistentes a nucleós(t)idos. Por lo tanto, a pesar de la disponibilidad de una vacuna preventiva, es de suma importancia el desarrollar nuevos agentes terapéuticos que se dirijan a fases de replicación hasta ahora no afectadas, tales como, por ejemplo, el acceso del virus.

35 La inhibición específica del acceso del virus es un concepto terapéutico atractivo para controlar y finalmente eliminar infecciones agudas y crónicas. Para el VIH, se ha llevado exitosamente a cabo la interferencia en el acceso del virus mediante un péptido consistente en 36 aminoácidos (Fuzeon<sup>®</sup>) derivado de la proteína gp41, que evita la fusión de la membrana vírica y la membrana celular (2).

40 A pesar de la disponibilidad de una vacuna profiláctica y de inhibidores de la transcriptasa inversa (RT; del inglés, reverse transcriptase), están creciendo en todo el mundo el número de personas infectadas por el HBV y el número de muertes relacionadas con el HBV (actualmente cerca de 500.000 al año). Aproximadamente dos terceras partes de los cánceres hepáticos primarios son atribuibles a una infección persistente por el HBV (3).

45 El tratamiento actual sigue dos estrategias: (i) el tratamiento con interferón (IFN alfa) modula respuestas inmunes contra el HBV y presenta un efecto antiviral directo que conduce a un beneficio clínico de larga duración en aproximadamente el 30% de los pacientes tratados, sin erradicación del virus; y (ii) la administración de inhibidores de la transcriptasa inversa vírica suprime la replicación vírica y va acompañada de mejoras bioquímicas e histológicas significativas después de un año de tratamiento. Sin embargo, el tratamiento de larga duración está asociado con la aparición de cepas víricas resistentes (4).

50 El HBV es el prototipo de una familia de pequeños virus de DNA con envoltura que afectan a mamíferos y aves (5). La envoltura del HBV encierra tres proteínas, denominadas L (grande; del inglés, large), M (mediana; del inglés, middle) y S (pequeña; del inglés, small) (véase la Figura 1A). Comparten el dominio S C-terminal con cuatro regiones transmembranales. Las proteínas M y L llevan extensiones N-terminales adicionales de 55 aminoácidos (preS2) y, dependiendo del genotipo, 107 o 118 aminoácidos (preS1) (véase la Figura 1B). En los viriones, la relación estequiométrica de L, M y S es aproximadamente 1:1:4, mientras que las partículas subvíricas (SVPs; del

inglés, subviral particles) no infecciosas más abundantemente secretadas contienen casi exclusivamente S y solo cantidades mínimas de proteína L (6). Durante la síntesis, el dominio preS1 de L es miristoilado y es translocado a través del retículo endoplasmático. Esta modificación es esencial para la infectividad del HBV (7, 8).

5 Los estudios sobre los primeros pasos de la infección por HBV han sido limitados ya que hasta hace poco no se ha dispuesto de sistemas de cultivo celular ni de modelos en animales pequeños (9). El desarrollo de la línea celular HepaRG susceptible al HBV facilitó investigaciones sistemáticas sobre el acceso del HBV y dio lugar al descubrimiento de inhibidores del acceso derivados de proteínas de envoltura (10).

En la publicación de patente china CN 1733798 se describen polipéptidos derivados de la proteína L de la superficie del HBV, en donde el extremo N comprende una modificación por acilación con miristoilo.

10 Además, no existe hasta la fecha una terapia eficaz para la infección por HDV, un virusoide satélite que utiliza proteínas de la envoltura del HBV para el acceso a hepatocitos (15, 17, 20). Existe en la técnica la necesidad de proporcionar terapias eficaces contra una infección por HDV.

15 De esta manera, la presente invención pretende mejorar los métodos y medios presentes en la técnica previa para la inhibición, prevención y/o tratamiento de una infección por HBV y de otras enfermedades relacionadas con el HBV, y, por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos y medios mejorados que permitan una inhibición, prevención y/o tratamiento dirigidos y eficaces de una infección por HBV y de enfermedades relacionadas con el HBV.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos y medios para la inhibición, prevención y/o tratamiento de una infección por HDV y de enfermedades relacionadas con el HDV.

## 20 **Sumario de la invención**

De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve al proporcionar péptidos modificados hidrófobos derivados de preS del HBV.

Dichos péptidos modificados hidrófobos derivados de preS tienen la fórmula general:



25 **P** es dicho péptido derivado de preS y comprende la secuencia de aminoácidos de la secuencia de consenso ID. SEC. nº 11 de preS de HBV o la secuencia ID. SEC. nº 12 de preS de HBV;

**H** es una **modificación hidrófoba** del péptido **P** derivado de preS, que es N-terminal con respecto a **P** y es seleccionada de entre acilación y adición de componentes hidrófobos;

30 **R** es una **modificación C-terminal** de dicho péptido **P** derivado de preS, que protege al péptido frente a la degradación;

**m** es al menos 1; y

**n** es 0 o al menos 1.

35 De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve además al proporcionar una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido modificado hidrófobo derivado de preS del HBV, como el definido en esta memoria, y opcionalmente un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve además al proporcionar el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV y/o la(s) respectiva(s) composición(es) farmacéutica(s) de la invención para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de enfermedades.

40 De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve además al proporcionar el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV o la(s) composición(es) farmacéutica(s) de la invención para la inhibición de una infección por HBV y/o HDV; para la prevención de una infección primaria por HBV y/o HDV; y/o para el tratamiento de una hepatitis B y/o D.

45 De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve además al usar el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV o la(s) composición(es) farmacéutica(s) de la invención para la fabricación de un medicamento para la inhibición de una infección por HBV y/o HDV; para la prevención de una infección primaria por HBV y/o HDV; y/o para el tratamiento de una hepatitis B y/o D (crónicas).

**Descripción de las realizaciones preferidas de la invención**

Antes de que se describa a continuación la presente invención con más detalle, se ha de entender que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos en esta memoria ya que estos pueden variar. Se ha de entender también que la terminología usada en esta memoria tiene sólo la finalidad de describir realizaciones particulares y que con ella no se pretende limitar el alcance de la presente invención, la cual estará sólo limitada por la reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos empleados en esta memoria tienen los mismos significados que los comúnmente entendidos por quien tiene una experiencia normal en la técnica.

*Péptidos modificados hidrófobos derivados de preS del HBV*

10 Como se esbozó anteriormente, la presente invención proporciona péptidos modificados hidrófobos derivados de preS del virus de la hepatitis B (HBV).

15 La envoltura del HBV encierra tres proteínas, denominadas L (grande), M (mediana) y S (pequeña) (véase la Figura 1A). Comparten el dominio S C-terminal con cuatro regiones transmembranales. Las proteínas M y L llevan extensiones N-terminales adicionales de 55 aminoácidos y, dependiendo del genotipo, 107 o 118 aminoácidos (preS2 y preS1) (véase la Figura 1B).

20 De este modo, la expresión "péptido derivado de preS" del HBV se refiere, de acuerdo con la presente invención, a un péptido con una secuencia de aminoácidos que corresponde a las extensiones N-terminales de la proteína L de HBV, preS1, preferiblemente a una secuencia de consenso de la especie y los genotipos A a H así como de virus de la hepatitis B del mono lanudo (WMHBV; del inglés, woolly monkey hepatitis B virus), el chimpancé y el gorila, pero también se refiere a variantes del mismo, preferiblemente variantes N-terminalmente y/o C-terminalmente truncadas y variantes por sustitución de aminoácidos.

La ID. SEC. nº 1 muestra la secuencia de aminoácidos de consenso de preS de HBV de la especie y los genotipos A a H así como del mono lanudo (WMHBV).

25 Véase la alineación de la Figura 2, que muestra la secuencia de consenso de preS de HBV (Consenso) y los ocho genotipos (A-H) de HBV así como la secuencia de preS de HBV del mono lanudo (WMHBV) que abarca los aminoácidos 2-48. Adviértase que los genotipos A, B, C, E, F, G y H tienen hasta once aminoácidos adicionales en sus extremos N.

30 La secuencia de aminoácidos del "genotipo C" de HBV se refiere en esta solicitud a una secuencia artificial, que corresponde o es idéntica al Genotipo C de HBV que se muestra, por ejemplo, en Genbank ABV02850.1 salvo por que la posición 46 (de acuerdo con la numeración que se describe más adelante) es Lys (K) en el genotipo C en lugar del Gln (Q) de la secuencia de Genbank; a la secuencia del genotipo C de HBV de esta solicitud se puede hacer también referencia como "genotipo C Q46K de HBV"; véanse también las ID. SEC. números 4, 12, 21-27.

En la Figura 2 también se muestra la **numeración de los restos de aminoácido** de la secuencia de consenso de preS de HBV, a la que se hará referencia a lo largo de esta memoria descriptiva:

35 El resto de aminoácido número 1 es la metionina (Met1) del genotipo D (previamente descrito como subtipo ayw; véase también la ID. SEC. nº 5), mientras que el resto de aminoácido número (-11) es la metionina [Met(-11)] del genotipo C (ID. SEC. nº 4). La Met1 o Met(-11), respectivamente, es escindida *in vivo* por una metionil aminopeptidasa celular y es modificada por una subsiguiente transferencia de un resto de miristoilo de la miristoil-CoA al resto de aminoácido número 2 de glicocola (Gly2) o al resto de aminoácido número (-10) de glicocola [Gly(-10)], respectivamente, por una N-miristoil transferasa. El resto de aminoácido N-terminal del genotipo D es el aminoácido natural glicocola (Gly2) y es numerado 2 de acuerdo con la respectiva numeración de los codones del subyacente marco de lectura abierto de L [o, por ejemplo, Gly(-10) para el genotipo C].

45 La secuencia de consenso de preS de HBV también comprende los aminoácidos N-terminales adicionales de los genotipos A, B, C, E, F, G y H (indicados en las posiciones "-"). Por lo tanto, en total, la secuencia de consenso de preS de HBV abarca las posiciones (-11) a 48.

De este modo, hay una diferencia entre la numeración anteriormente descrita y la relación real de aminoácidos en la ID. SEC. nº 1; por ejemplo:

Met (-11), número de resto (-11), es inscrito como resto de aminoácido 1 en la ID. SEC. nº 1;

Gly (-10), número de resto (-10), es inscrito como resto de aminoácido 2 en la ID. SEC. nº 1;

50 Met 1, número de resto 1, es inscrito como resto de aminoácido 12 en la ID. SEC. nº 1;

## ES 2 441 118 T3

Gly 2, número de resto 2, es inscrito como resto de aminoácido 13 en la ID. SEC. nº 1;

Gly 48, número de resto 48, es inscrito como resto de aminoácido 58 en la ID. SEC. nº 1.

ID. SEC. nº 1 Secuencia de consenso de preS de HBV [posiciones (-11) a 48]

**(-11)-M GGWSS TPRKG MGTNL SVPNP LGFFP DHQLD PAFRA NSNNP DWDFN PNKDH WPEAN  
KVG-48**

5 ID. SEC. nº 2 Genotipo A de HBV

**(-11)-M GGWSS KPRKG MGTNL SVPNP LGFFP DHQLD PAFGA NSNNP DWDFN PVKDD WPAAN  
QVG-48**

ID. SEC. nº 3 Genotipo B de HBV

**(-11)-M GGWSS KPRKG MGTNL SVPNP LGFFP DHQLD PAFKA NSENP DWDLN PHKDN WPDAN  
KVG-48**

10 ID. SEC. nº 4 Secuencia de aminoácidos artificial, que corresponde al Genotipo C de HBV salvo por que la posición 46 es Lys (K) en lugar de Gln (Q); Q46K

**(-11)-M GGWSS KPRQG MGTNL SVPNP LGFFP DHQLD PAFGA NSNNP DWDFN PNKDH WPEAN  
KVG-48**

ID. SEC. nº 5 Genotipo D de HBV

**1-MGQNL STSNP LGFFP DHQLD PAFRA NTANP DWDFN PNKDT WPDAN  
KVG-48**

ID. SEC. nº 6 Genotipo E de HBV

15 **(-10)-MGLSW TVPLE WGKNI STTNP LGFFP DHQLD PAFRA NTRNP DWDFN PNKDH WTEAN  
KVG-48**

ID. SEC. nº 7 Genotipo F de HBV

**(-11)-M GAPLS TTRRG MGQNL SVPNP LGFFP DHQLD PLFRA NSSSP DWDFN TNKDS WPMAN  
KVG-48**

ID. SEC. nº 8 Genotipo G de HBV

**(-10)-MGLSW TVPLE WGKNL SASNP LGFLP DHQLD PAFRA NTNNP DWDFN PKKDP WPEAN  
KVG-48**

20 ID. SEC. nº 9 Genotipo H de HBV

**(-11)-M GAPLS TARRG MGQNL SVPNP LGFFP DHQLD PLFRA NSSSP DWDFN TNKDN WPMAN  
KVG-48**

ID. SEC. nº 10 WMHBV

**1-MGLNQ STFNP LGFFP SHQLD PLFKA NAGSA DWDFN PNKDP WPOAH  
DTA-48**

Para las ID. SEC. números 2-10, véanse también los Números de Acceso de Genbank:

	Genotipo A de HBV	Genbank AAT28684.1
	Genotipo B de HBV	Genbank AAU01950.1
	Genotipo C de HBV	Genbank ABV02850.1 [en donde la posición 46 es Lys (K) (como en la ID. SEC. nº 4) en lugar de Gln (Q) (de ABV02850.1)]
5	Genotipo D de HBV	Genbank AAR19337.1
	Genotipo E de HBV	Genbank ABS31101.1
	Genotipo F de HBV	Genbank ABK19774.1
	Genotipo G de HBV	Genbank AAF34735.1/AF160501_3
	Genotipo H de HBV	Genbank AAM09052.1
10	WMHBV	Genbank AAC16905.1

Un péptido modificado hidrófobo derivado de preS del HBV de acuerdo con la presente invención tiene la fórmula:



**P** es dicho **péptido** derivado de preS que comprende la secuencia de aminoácidos de la secuencia de consenso ID. SEC. nº 11 de preS de HBV o la secuencia ID. SEC. nº 12 de preS de HBV;

15 **H** es una **modificación hidrófoba** del péptido **P** derivado de preS, que es N-terminal con respecto a **P** y es seleccionada de entre acilación y adición de componentes hidrófobos;

**R** es una **modificación C-terminal** de dicho péptido **P** derivado de preS, que protege al péptido frente a la degradación;

**m** es al menos 1; y

20 **n** es 0 o al menos 1.

La **modificación hidrófoba (H)** del péptido **P** derivado de preS es N-terminal con respecto a **P**.

"N-terminal" se refiere a la modificación hidrófoba en el extremo N, es decir, el respectivo primer resto de aminoácido (por ejemplo, Gly 2), pero también comprende la modificación hidrófoba muy próxima al extremo N, tal como los respectivos restos de aminoácido (-4), (-3), (-2), (-1), 1, 2 o 3 o 4. Por lo tanto, la modificación hidrófoba puede ser además obtenida mediante una fijación de un componente hidrófobo en un lugar próximo al extremo N de P.

La modificación hidrófoba de dicho péptido derivado de preS de HBV de acuerdo con la presente invención añade un componente hidrófobo al péptido.

Además, **m** es al menos 1, es decir, una modificación con al menos un componente o grupo hidrófobo.

30 En realizaciones preferidas de esta invención, **m** es 1, 2, 3, 4 o más. Es decir, **P** puede estar modificado con más de un componente o grupo hidrófobo, tal como 2. Los componentes o grupos hidrófobos pueden ser iguales o diferentes entre sí.

La modificación hidrófoba de dicho péptido derivado de preS de HBV de acuerdo con la presente invención es seleccionada de entre:

– acilación;

35 – adición de componentes hidrófobos.

La acilación es preferiblemente seleccionada de entre acilaciones con ácidos carboxílicos, ácidos grasos, y aminoácidos con cadenas laterales lipófilas.

Los ácidos grasos preferidos son ácidos grasos saturados o insaturados, ácidos grasos ramificados o no ramificados, preferiblemente con de 8 a 22 átomos de carbono (C8 a C22).

40 Más preferiblemente, la modificación hidrófoba por acilación es seleccionada de entre las acilaciones con miristoilo (C14), palmitoilo (C16) y estearoilo (C18).

La adición de componentes hidrófobos es preferiblemente seleccionada de entre las adiciones de colesterol, derivados de colesterol, fosfolípidos, glicolípidos, ésteres de glicerol, esteroides, ceramidas, derivados de isopreno, adamantano, farnesol, grupos alifáticos, y compuestos poliaromáticos.

5 La fijación de los componentes hidrófobos es preferiblemente por unión covalente, la cual puede ser conseguida a través de un enlace carbamato, amida, éter o disulfuro o cualquier otro enlace que esté dentro de la experiencia de la persona experta en la técnica.

Por lo tanto, los péptidos modificados, preferiblemente acilados, hidrófobos derivados de preS de esta invención son preferiblemente lipopéptidos a causa de su grupo/componente lipófilo o hidrófobo N-terminal.

Para los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS preferidos, véanse también las Tablas 1 y 2.

10 Los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS más preferidos de la invención son los siguientes:

- **P** comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre la ID. SEC. nº 11 y la ID. SEC. nº 12; y
- **H** es una modificación hidrófoba por acilación con miristoilo (C14) o estearoilo (C18), preferiblemente con estearoilo (C18).

De este modo, los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS más preferidos de la invención son:

Denominación del péptido	Secuencia de aminoácidos	Modificación hidrófoba
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (consenso)	ID. SEC. nº 11	Estearoilo (C18)
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> (consenso)	ID. SEC. nº 11	Miristoilo (C14)
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (C)	ID. SEC. nº 12	Estearoilo (C18)
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> (C)	ID. SEC. nº 12	Miristoilo (C14)
HBVpreS/2-21 <sup>estearoil</sup> (C)	ID. SEC. nº 12	Estearoilo (C18)

15 en donde (C) se refiere al genotipo C Q46K de HBV.

*Realización preferida de secuencias del genotipo C*

En una realización muy preferida de esta invención, los péptidos **P** modificados hidrófobos de preS de acuerdo con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos derivada del genotipo C.

20 El (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de la presente invención derivado(s) del genotipo C inhibe(n) una infección por HBV más potentemente que aquél (aquellos) del correspondiente genotipo D. Véanse también la Figura 3 y la Tabla 3.

25 Como se discutió anteriormente, la secuencia de aminoácidos del "genotipo C" de HBV se refiere en esta descripción a una secuencia artificial, que corresponde o es idéntica al Genotipo C de HBV que se muestra, por ejemplo, en Genbank ABV02850.1 salvo por que la posición 46 (de acuerdo con la numeración que se describe más adelante) es Lys (K) en el genotipo C en lugar del Gln (Q) de la secuencia de Genbank; a la secuencia del genotipo C de HBV de esta solicitud se puede hacer también referencia como "genotipo C Q46K de HBV"; véanse también las ID. SEC. números 4, 12, 21-27.

La misma numeración que se describió antes para la secuencia de consenso de preS de HBV se utiliza para la numeración de los restos de aminoácido de las secuencias del genotipo C (véase también la Figura 2); por ejemplo:

30 Met (-11), número de resto (-11), es inscrito como resto de aminoácido 1 en la ID. SEC. nº 4;

Gly (-10), número de resto (-10), es inscrito como resto de aminoácido 2 en la ID. SEC. nº 4;

Met 1, número de resto 1, es inscrito como resto de aminoácido 12 en la ID. SEC. nº 4;

Gly 2, número de resto 2, es inscrito como resto de aminoácido 13 en la ID. SEC. nº 4 y es inscrito como resto de aminoácido 1 en la ID. SEC. nº 12;

35 Gly 48, número de resto 48, es inscrito como resto de aminoácido 58 en la ID. SEC. nº 4 y es inscrito como resto de aminoácido 47 en la ID. SEC. nº 12.

ID. SEC. nº 12 Secuencia de aminoácidos que corresponde a las posiciones 2 a 48 del Genotipo C de HBV salvo por que la posición 46 es Lys (K) en lugar de Gln (Q); Q46K

2-GTNL SVPNP LGFFP DHQLD PAFGA NSNNP DWDFN PNKDH WPEAN KVG-48

**P** es preferiblemente seleccionado de la

ID. SEC. nº 12 (restos 2 a 48 del genotipo C).

5 En la *realización preferida de secuencias del genotipo C*, un péptido modificado hidrófobo derivado de preS del virus de la hepatitis B (HBV) tiene la fórmula



en donde preferiblemente

**P** es un péptido derivado de preS que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 12;

10 **H** es una modificación hidrófoba del péptido **P** derivado de preS, que es N-terminal con respecto a **P** y es seleccionada de entre acilación y adición de componentes hidrófobos;

**R** es una modificación C-terminal de dicho péptido **P** derivado de preS;

**m** es al menos 1; y

**n** es 0 o al menos 1.

15 El péptido preferido de la invención es particularmente eficaz para la inhibición de una infección por HBV y/o HDV, para la prevención de una infección aguda por HBV y/o HDV, y/o para el tratamiento de una hepatitis B y/o D.

Preferiblemente, **P** comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 12 (restos 2 a 48 del genotipo C).

En la *realización preferida de secuencias del genotipo C*:

- **P** comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la ID. SEC. nº 12;
- 20 – **H** es una modificación hidrófoba por acilación con miristoilo (C14) o estearoilo (C18), preferiblemente con miristoilo (C14).

En aplicaciones *in vivo* y medicinales se prefiere la modificación por miristoilación a causa de su mayor seguridad; por ejemplo, sin los efectos negativos del grupo estearoilo (respuesta inmune innata, etcétera).

Por lo tanto, los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS más preferidos de la invención son:

25 HBVpreS/2-48<sup>mir</sup> (C) [ID. SEC. nº 12].

La **modificación C-terminal (R)** de dicho péptido **P** derivado de preS es preferiblemente una modificación con un componente que protege de la degradación, tal como la degradación *in vivo*.

30 "C-terminal" se refiere a la modificación en el extremo C, es decir, en el respectivo último resto de aminoácido, pero también comprende la modificación muy próxima al extremo C, tal como en el penúltimo resto de aminoácido, el antepenúltimo resto de aminoácido o más restos de aminoácido antes del antepenúltimo (por ejemplo, la introducción de un D-aminoácido que protege al portador frente a la degradación enzimática por la acción de, por ejemplo, carboxipeptidasas).

El técnico experto será capaz de seleccionar el (los) respectivo(s) componente(s) adecuado(s), dependiendo de la respectiva aplicación.

35 Los componentes preferidos que protegen de la degradación son seleccionados de entre amidas, D-aminoácidos, aminoácidos modificados, aminoácidos cíclicos, polímeros naturales y sintéticos, tal como PEG, y glicano.

En una realización, **P** está fusionado con un péptido o una proteína, preferiblemente seleccionados de entre albúmina y dominios de Fc de IgGs humanas.

La fusión es preferiblemente C-terminal con respecto a **P**.

40 Además, **n** es 0 o al menos 1; es decir, la modificación C-terminal (R) es opcional.

Preferiblemente, **n** es 1.

En otras realizaciones de esta invención, **n** es 1, 2, 3, 4 o más. Es decir, se puede modificar el extremo C de **P** o su proximidad con más de un componente o grupo, tal como 2. Los componentes o grupos pueden ser iguales o diferentes entre sí.

En una realización de esta invención, **H** y/o **R** están unidos a **P** por medio de un **conector** o **espaciador**.

- 5 Los conectores o espaciadores, tales como polialanina, poliglicocola, carbohidratos y grupos  $(CH_2)_n$ , son conocidos por el técnico experto.

Por lo tanto, el técnico experto será capaz de seleccionar el (los) respectivo(s) conector(es) o espaciador(es) adecuado(s), dependiendo de la respectiva aplicación.

- 10 En una realización preferida, el péptido modificado hidrófobo derivado de preS de acuerdo con la invención porta una **etiqueta**, preferiblemente seleccionada de entre un colorante fluorescente, un radioisótopo y un agente de contraste.

Los radioisótopos preferidos son  $^{131}I$ ,  $^{125}I$ ,  $^{99m}Tc$ ,  $^{18}F$ ,  $^{68}Ga$ ,  $^{111}In$ ,  $^{90}Y$  y  $^{177}Lu$ .

Los colorantes fluorescentes preferidos son los colorantes Alexa, los derivados de rodamina y fluoresceína, y los colorantes Cy.

- 15 Los agentes de contraste preferidos son complejos de gadolinio (Gd), complejos y partículas de hierro (Fe) supramagnéticos, compuestos que contienen átomos de número atómico elevado, es decir, el yodo para la tomografía computarizada (CT; del inglés, *computer tomography*), y microburbujas y vehículos tales como liposomas que contienen estos agentes de contraste.

- 20 Los péptidos de esta invención pueden ser preparados mediante una diversidad de procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, en general mediante procedimientos químicos sintéticos y/o procedimientos de ingeniería genética.

- Los procedimientos químicos sintéticos incluyen más particularmente la síntesis secuencial y de bloques en fase sólida (11). El procedimiento secuencial en fase sólida puede ser llevado a cabo usando métodos automatizados establecidos, tal como mediante el uso de un sintetizador peptídico automatizado. En este procedimiento, se une un aminoácido con  $\alpha$ -amino protegido a un soporte de resina. El soporte de resina empleado puede ser cualquier resina adecuada convencionalmente empleada en la técnica para la preparación de (poli)péptidos en fase sólida, preferiblemente poliestireno que ha sido copolimerizado con polioxietileno para proporcionar sitios para la formación de ésteres con el aminoácido de  $\alpha$ -amino protegido inicialmente introducido. Este método optimizado, aplicado por los inventores, ha sido explícitamente descrito (véase, por ejemplo, 12). Los aminoácidos se introducen uno tras otro (gradualmente). Cada ciclo de síntesis que corresponde a la introducción de un aminoácido incluye una operación de desprotección, sucesivas operaciones de lavado, una operación de copulación con activación del aminoácido, y subsiguientes operaciones de lavado. Cada una de estas operaciones va seguida de una filtración. Los agentes reactivos para la copulación son los clásicos agentes reactivos para la síntesis de (poli)péptidos, tales como dicitclohexilcarbodiimida, hidroxibenzotriazol, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)-fosfonio, y difenilfosforilazida. Después de la síntesis del polipéptido sobre la resina, el polipéptido es separado de la resina mediante un tratamiento con un ácido fuerte tal como ácido trifluoroacético en presencia de anisol, etanoditol o 2-metilindol. El compuesto es luego purificado mediante las técnicas de purificación clásicas, en particular por medio de cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC; del inglés, *high performance liquid chromatography*).
- 25  
30  
35

- 40 Los péptidos de la presente invención también se pueden obtener al copular fragmentos (poli) peptídicos que están selectivamente protegidos, efectuándose ésta copulación, por ejemplo, en una disolución.

- Además, los péptidos pueden ser producidos mediante técnicas de ingeniería genética como las conocidas por el técnico experto. Es particularmente adecuado un sistema de expresión eucariótico, tal como el sistema de baculovirus. De acuerdo con este procedimiento, se hace que se expresen las proteínas en células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga y secuencias reguladoras de ácido nucleico, tal como un promotor. Para la infección con el baculovirus recombinante se dispone de varias líneas celulares, tal como la línea celular Sf-9, asequible de la American Type Culture Collection (CRL 1711). También es particularmente adecuada la expresión en un sistema de expresión procarriótico, tal como *E. coli*.
- 45

- La introducción del componente hidrófobo en el péptido puede ser llevada a cabo mediante una diversidad de procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo planteamientos sintéticos y de ingeniería genética.
- 50

Alternativamente, los péptidos y/o los péptidos de fusión (es decir, péptidos modificados hidrófobos) se pueden

5 producir mediante líneas celulares eucarióticas establemente transfectadas, tales como CHO y otras líneas celulares que se conocen en la técnica y se emplean normalmente para generar vacunas y similares. A causa de la propiedad intrínseca de los 47 aminoácidos N-terminales de preS1 en cuanto a promover la secreción de una proteína/péptido miristoilados, el péptido modificado hidrófobo biológicamente activo puede ser extraído de los sobrenadantes de cultivos celulares.

*Características de los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS de la invención*

Los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS de la presente invención son inhibidores versátiles del acceso de virus de la hepatitis y presentan además un hepatotropismo/tropismo hepático, es decir, se dirigen al hígado. El tropismo hepático se muestra en particular en la Figura 11.

10 Dicho hepatotropismo se describe adicionalmente en la correspondiente solicitud de patente provisional de EE.UU. de los inventores con el título "Péptidos modificados hidrófobos derivados de preS del virus de la hepatitis B (HBV) y su uso como vehículos para el suministro específico de compuestos al hígado", que se presentó el mismo día y que se incluye aquí por referencia en su totalidad.

15 El (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV de la presente invención es (son) un(os) inhibidor(es) muy adecuado(s) y eficaz(es) del acceso del HBV, aunque también del HDV, ya sea *in vitro* (por ejemplo, al evitar que partículas de HBV se unan a, y/o se internalicen en, los hepatocitos) o ya sea *in vivo*.

20 Como se puede ver en las Figuras y los Ejemplos, el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de la presente invención tiene(n) una elevada actividad inhibitoria, es decir, inhibe(n) eficazmente una infección por HBV y/o HDV en dosis muy bajas. Los valores de IC<sub>50</sub> de las realizaciones más preferidas están en el intervalo de 0,01 a 500 nM, preferiblemente de 0,025 a 50 nM, más preferiblemente de 0,05 a 25 nM. Véase también la Tabla 1.

El (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de la presente invención derivado(s) del genotipo C inhibe(n) una infección por HBV más potentemente que aquél (aquellos) del correspondiente genotipo D.

25 Además, los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS de la presente invención pueden ser adaptados para que no comprendan epítopos inmunogénicos pero presenten aún una potente actividad inhibitoria, tal como HBVpreS/2-21<sup>estearoil</sup>, que no comprende los epítopos inmunogénicos en su secuencia pero tiene aún una IC<sub>50</sub> de aproximadamente 8 nM.

El (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV de la invención es (son) también capaz(es) de prevenir cruzadamente los genotipos C y D de HBV, ya que un péptido derivado del genotipo C [tal como HBVpreS/2-21<sup>estearoil</sup>(C) o HBVpreS/2-48<sup>mir</sup>(C)] puede inhibir el acceso del genotipo D de HBV.

30 *Composiciones farmacéuticas y de vacuna*

Como se esbozó anteriormente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido modificado hidrófobo derivado de preS de HBV, como el definido en esta memoria, y opcionalmente un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende:

- 35 – al menos un péptido modificado hidrófobo derivado de preS de HBV, como el definido en esta memoria;
- un producto de conjugación como el definido en esta memoria; y
- opcionalmente, un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención son muy adecuadas para todos los usos y métodos descritos en esta memoria.

40 Un "vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier vehículo en el que, o con el que, se pueden formular las composiciones farmacéuticas o de vacuna de acuerdo con la invención. Incluye una disolución salina tal como una disolución salina con tampón de fosfato. En general, se selecciona un diluyente o vehículo basándose en el modo y la vía de administración y en la práctica farmacéutica estándar.

*Aplicaciones médicas*

45 Como se esbozó anteriormente, la presente invención proporciona el primer uso médico del (de los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV y/o la(s) respectiva(s) composición(es) farmacéutica(s) de esta invención.

De este modo, el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV o la(s) composición(es) farmacéutica(s) de acuerdo con la invención son adecuados y, por lo tanto, se proporcionan para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de enfermedades.

5 Como se esbozó anteriormente, la presente invención proporciona además el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV y/o la(s) respectiva(s) composición(es) farmacéutica(s) de esta invención para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de ciertas enfermedades.

10 En una realización preferida, el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV o la(s) composición(es) farmacéutica(s) de la invención se proporcionan para la inhibición de una infección por HBV y/o HDV; para la prevención de una infección primaria por HBV y/o HDV; y/o para el tratamiento de la hepatitis B y/o D, preferiblemente la hepatitis B y/o D crónicas.

En una realización preferida, el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV o la(s) composición(es) farmacéutica(s) de la invención se usan para la fabricación de un medicamento para la inhibición de una infección por HBV y/o HDV; para la prevención de una infección primaria por HBV y/o HDV; y/o para el tratamiento de la hepatitis B y/o D.

15 Preferiblemente, el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV o la(s) composición(es) farmacéutica(s) de la invención se proporcionan para la inhibición de una infección por HBV y/o HDV.

Preferiblemente, el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV o la(s) composición(es) farmacéutica(s) de la invención se proporcionan para la prevención de una infección primaria por HBV y/o HDV.

Preferiblemente, se inhibe o previene la infección por HBV de cualquier genotipo.

20 El (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV de la invención es (son) capaz(es) de la prevención cruzada de los genotipos C y D de HBV, ya que un péptido derivado del genotipo C [tal como HBVpreS/2-21<sup>estearoil</sup>(C) o HBVpreS/2-48<sup>mir</sup>(C)] puede inhibir el acceso del genotipo D de HBV.

25 En una realización preferida, el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV o la(s) composición(es) farmacéutica(s) de la invención se usan/proporcionan como inhibidores del acceso de HBV y/o HDV.

Preferiblemente, el (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV o la(s) composición(es) farmacéutica(s) de la invención se proporcionan para el tratamiento de la hepatitis B y/o D, en particular la hepatitis B y/o D crónicas.

30 El (los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de HBV de la presente invención es (son) un(os) inhibidor(es) muy adecuado(s) y eficaz(es) del acceso de HBV, aunque también de HDV, ya sea *in vitro* (por ejemplo, al evitar que partículas de HBV se unan a, y/o se internalicen en, los hepatocitos) o ya sea *in vivo*.

Además, la invención proporciona un método para la inhibición *in vitro* de una infección de hepatocitos por HBV, que comprende emplear un péptido modificado hidrófobo derivado de preS o una composición farmacéutica como los anteriormente descritos.

35 Los hepatocitos adecuados incluyen hepatocitos humanos primarios o la línea celular derivada de hepatoma llamada HepaRG (22) (descrita en la solicitud de patente FR 0109044), y hepatocitos de *Tupaia belangeri* (23), que también son susceptibles a una infección por HBV.

#### *Vía de administración*

40 Preferiblemente, la vía de administración de los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS o las composiciones farmacéuticas de la presente invención es seleccionada de entre las vías subcutánea, intravenosa, oral, nasal, intramuscular, transdérmica, por inhalación y por supositorios.

Una realización preferida para administración o aplicación nasal es un producto nasal pulverizable.

#### *Cantidad terapéuticamente eficaz*

45 Los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS o las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan de modo que comprendan una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho(s) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) derivado(s) de preS de dicha(s) composición(es) farmacéutica(s).

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un péptido modificado hidrófobo derivado de preS o de una composición farmacéutica de esta invención se refiere a la cantidad que es suficiente para inhibir una infección por HBV y/o HDV;

prevenir una infección primaria por HBV y/o HDV; tratar una hepatitis B y/o D; y/o vacunar frente a, y/o inhibir, el acceso de HBV y/o HDV *in vivo*.

Una cantidad terapéuticamente eficaz preferida está en el intervalo de 10 µg a 1 mg por kg de peso corporal, preferiblemente de 10 µg a 100 µg.

- 5 Para el uso de un péptido modificado hidrófobo derivado de preS de la invención como una vacuna, la cantidad terapéuticamente eficaz preferida está en el intervalo de 10 µg a 1 mg por kg de peso corporal.

10 En el caso de un valor de IC<sub>50</sub> del péptido modificado hidrófobo derivado de preS usado de aproximadamente 10 nM, una cantidad terapéuticamente eficaz preferida es aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal o está en el intervalo de 1 a 5 mg por paciente. La cantidad terapéuticamente eficaz preferida en el intervalo de 1 a 5 mg por paciente se puede administrar una vez al día o, en otras realizaciones, sólo una vez cada 2-3 días.

La cantidad terapéuticamente eficaz preferida depende de la respectiva aplicación y del deseado resultado de inhibición, tratamiento o vacunación.

El técnico experto será capaz de determinar las cantidades terapéuticamente eficaces adecuadas.

#### *Identificación del receptor de HBV*

- 15 En la solicitud se describe además un método para la identificación *in vitro* y/o *in vivo* de un receptor de hepatocitos implicado en la fijación y/o penetración del HBV y/o para la cuantificación de la expresión de dicho receptor, que comprende usar un péptido modificado hidrófobo derivado de preS como el anteriormente descrito.

Dicho receptor de hepatocitos puede ser identificado en mamíferos o en respectivos modelos animales, preferiblemente un ratón o un ser humano.

- 20 En particular, dicho método comprende las operaciones que comprenden:

– poner una biopsia hepática o un hepatocito en contacto con un péptido modificado hidrófobo derivado de preS de la invención bajo unas condiciones y durante un período de tiempo suficientes para permitir la unión específica de dicho péptido a un receptor expresado en la superficie de un hepatocito;

– detectar la unión de dicho péptido a un receptor; e

- 25 – identificar dicho receptor.

30 Esto puede ser llevado a cabo de acuerdo con procedimientos clásicos bien conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, podría implicar el etiquetado radiactivo, enzimático o fluorescente de los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS de la invención y la subsiguiente detección con un método apropiado. Se conocen diversos materiales fluorescentes que pueden ser utilizados como etiquetas. Estos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, Rojo Texas, Cy3, Cy5, y etiquetas DIGE. Las etiquetas enzimáticas comprenden la conjugación de una enzima con una molécula de interés, por ejemplo, un polipéptido, y pueden ser detectadas mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas o fluoroespectrofotométricas.

35 Los inventores identificaron lipopéptidos derivados de la proteína superficial preS1 de HBV que bloquean eficazmente el acceso del HBV *in vitro* e *in vivo*. Estudios de biodistribución de la presente invención sobre estos péptidos inhibitorios revelaron que se acumulan selectivamente en el hígado, donde se unen a hepatocitos y probablemente entran en ellos. Este hepatotropismo requiere la acilación N-terminal del péptido y depende de cierto motivo de la secuencia de preS de HBV, dentro de los 47 aminoácidos N-terminales de preS1, es decir, dentro de los restos de aminoácido 2 a 21 (o preferiblemente la secuencia mínima de los restos 9 a 15). La observación de los inventores de que esta secuencia peptídica porta además una señal de translocación a la membrana que facilita el

40 transporte de proteínas de fusión incluso completas a través de membranas plasmáticas (resultados no publicados) abre la posibilidad de suministrar específicamente cualquier clase de fármaco a la membrana plasmática de los hepatocitos o incluso selectivamente a esta célula.

45 Los inventores han mostrado que lipopéptidos derivados de preS1 de HBV, en dosis muy bajas, son capaces de prevenir completamente una infección por HBV en un modelo de ratón uPA-RAG-1 sometido a trasplante. Estudios farmacocinéticos sobre estos inhibidores del acceso derivados de preS de HBV indicaron además un notable hepatotropismo combinado con una extraordinariamente alta estabilidad sérica ( $t_{1/2}$  de aproximadamente 60 horas) y una prolongada semivida en el órgano diana ( $t_{1/2}$  de aproximadamente 24 horas). Son necesarias tanto la acilación N-terminal como la integridad de cierta secuencia de aminoácidos de los péptidos. De esta manera, los péptidos pueden ser también empleados como vectores versátiles para el direccionamiento específico de fármacos al hígado

50 con objeto de vencer a las infecciones de hepatocitos o tratar el carcinoma hepatocelular (véase también la correspondiente solicitud de patente provisional de EE.UU. de los inventores con el título: "Péptidos modificados

hidrófobos derivados de preS del virus de la hepatitis B (HBV) y su uso como vehículos para el suministro específico de compuestos al hígado", que se presentó el mismo día).

Los inventores han demostrado además el principio de que se puede bloquear eficazmente una infección por WMHBV a través de la aplicación subcutánea *in vivo* de péptidos derivados de proteína de envoltura del HBV. Esto abre nuevas perspectivas para la prevención de una infección aguda por HBV y para opciones terapéuticas para la hepatitis B crónica. Puesto que los ratones uPA-RAG-2/Pfp usados en esta invención carecen de células B, células T y células NK, se supone un efecto inhibitorio directo de los péptidos sobre los hepatocitos susceptibles. Esto viene respaldado por la eficaz acumulación de péptidos acilados derivados de preS en el hígado, lo que va seguido de un lento aclaramiento, posiblemente a través de la vía biliar. Ambas propiedades permiten la aplicación subcutánea en dosis muy bajas y con bajas frecuencias. Dado que 5 inyecciones de 0,2 mg/kg de HBV/preS2-48<sup>mir</sup> en 5 días dieron lugar a la prevención del establecimiento de una infección por WMHBV, la administración continua del péptido HBV/preS2-48<sup>estearoil</sup>, aproximadamente 30 veces más activo, podría ser eficaz en dosis inferiores a 7 µg/kg ≈ 13 nanomoles/kg cuando se administra diariamente o cada 2 días. Teniendo en consideración que la dosis farmacológica eficaz por unidad de peso corporal obtenida en ratones ha de ser corregida para seres humanos (13) en un factor de aproximadamente 10, se espera que la dosis eficaz por persona sea inferior a 100 µg/día.

El régimen basado en compuestos análogos de nucleós(t)idos para el tratamiento de una infección crónica por HBV da frecuentemente lugar a la selección de mutantes resistentes (4, 14). Esto exige estrategias alternativas y nuevos fármacos que se dirijan a diferentes fases del ciclo de replicación del HBV. La inhibición del acceso con lipopéptidos de HBV representa dicho planteamiento. A causa del modo de acción, los inventores suponen eficacia frente a cualquier clase de mutante resistente a nucleós(t)idos. Además, puesto que la actividad de los péptidos requiere una secuencia conservada en el dominio preS1 (15), los péptidos son activos frente a cualquier genotipo de HBV. Estudios previos indican que, a diferencia del Fuzeon<sup>®</sup>, que se dirige a la proteína gp41 del VIH permitiendo por ello la aparición de mutaciones intramoleculares compensatorias, los lipopéptidos acilados de HBV se dirigen a un componente celular evitando la interacción del HBV con su receptor (16, 17). Por lo tanto, parece improbable la aparición de mutantes resistentes.

Una indicación evidente de las aplicaciones clínicas de los lipopéptidos derivados de preS de HBV es la prevención de infecciones por HBV aún no establecidas (por ejemplo, profilaxis tras una exposición, transmisión vertical o prevención de una reinfección del trasplante hepático). Sin embargo, los inhibidores del acceso son también eficaces en pacientes crónicamente infectados, tal como en combinación con interferón α o inhibidores de la RT vírica. Puesto que el mantenimiento de una infección crónica por HBV puede depender, por una parte, de un recambio dinámico de los hepatocitos infectados y aclarados por el sistema inmune y, por otra, de la (re)infección de células curadas/naífs (18), será interesante evaluar la eficacia de tales planteamientos terapéuticos en el sistema quimérico de uPA para contener la propagación de la infección y la aparición de cepas resistentes bajo un tratamiento antivírico (19).

Los lipopéptidos derivados de preS de HBV también inhiben *in vitro* una infección por HDV, un virusoide satélite que utiliza proteínas de la envoltura del HBV para el acceso a hepatocitos (15, 17, 20). Puesto que no existe hasta la fecha una terapia eficaz para la infección por HDV, los lipopéptidos derivados de preS representan la primera terapia selectiva para esta enfermedad hepática a menudo complicada.

La aplicación de lipopéptidos derivados de preS de HBV a pacientes inmunocompetentes provoca reacciones inmunes celulares y humorales. Esto es beneficioso para el resultado terapéutico ya que se sabe que anticuerpos que reconocen epítomos de HBVpreS/2-48 neutralizan *in vitro* una infección por HBV (21). Además, se ha especulado con que la eliminación del virus en una infección natural requiere el establecimiento exitoso de una inmunidad específica de preS de HBV. Por lo tanto, además de la interferencia directa en el acceso del virus, la estimulación de respuestas inmunes específicas de preS por el péptido podría contribuir a la eliminación del virus a través de reacciones inmunes citolíticas o no citolíticas, especialmente en combinación con IFN-α.

**Tabla 1** Péptidos modificados hidrófobos derivados de preS

Denominación del péptido	Secuencia de aminoácidos		IC50/IC90
HBVpreS/(-11)-48(consenso)	consenso	ID. SEC. nº 1	
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> (consenso)		ID. SEC. nº 11	IC <sub>50</sub> ~ 70 pM
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (consenso)		ID. SEC. nº 11	IC <sub>50</sub> ~ 50 pM
<i>Péptidos de genotipo C</i>			
*HBVpreS/(-11)-48 <sup>mir</sup> (C)	natural	ID. SEC. nº 4	IC <sub>50</sub> ~ 4 nM
*HBVpreS/(-11)-48 <sup>estearoil</sup> (C)		ID. SEC. nº 4	IC <sub>50</sub> ~ 1 nM

*HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> (C)			ID. SEC. nº 12	IC <sub>90</sub> ~ 5 nM		
*HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (C)			ID. SEC. nº 12	IC <sub>90</sub> ~ 1 nM		
HBVpreS/5-48 <sup>mir</sup> (C)	truncado	N-terminal				
HBVpreS/5-48 <sup>estearoil</sup> (C)						
HBVpreS/9-48 <sup>mir</sup> (C)						
HBVpreS/9-48 <sup>estearoil</sup> (C)						
HBVpreS/2-21 <sup>mir</sup> (C)	truncado	N- y/o C-terminal	ID. SEC. nº 13			
HBVpreS/2-21 <sup>estearoil</sup> (C)			ID. SEC. nº 13			
HBVpreS/5-21 <sup>mir</sup> (C)			ID. SEC. nº 14			
HBVpreS/5-21 <sup>estearoil</sup> (C)			ID. SEC. nº 14			
HBVpreS/9-21 <sup>mir</sup> (C)						
HBVpreS/9-21 <sup>estearoil</sup> (C)						
HBVpreS/2-15 <sup>mir</sup> (C)						
HBVpreS/2-15 <sup>estearoil</sup> (C)						
HBVpreS/5-15 <sup>mir</sup> (C)						
HBVpreS/5-15 <sup>estearoil</sup> (C)						
HBVpreS/9-15 <sup>mir</sup> (C)**				ID. SEC. nº 15		
HBVpreS/9-15 <sup>estearoil</sup> (C)**				ID. SEC. nº 15		
HBVpreS/(-2)-20 <sup>palm</sup> (C)					IC <sub>50</sub> ~ 25 nM	
<i>Péptidos de genotipo D</i>						
HBVpreS/1-48 <sup>mir</sup> (D)			natural		ID. SEC. nº 5	
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> (D)					ID. SEC. nº 16	
*HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (D)		ID. SEC. nº 16		IC <sub>90</sub> ~ 3 nM		
HBVpreS/5-48 <sup>mir</sup> (D)	truncado	N-terminal	ID. SEC. nº 17			
*HBVpreS/5-48 <sup>estearoil</sup> (D)			ID. SEC. nº 17	IC <sub>50</sub> ~ 4 nM		
HBVpreS/9-48 <sup>mir</sup> (D)						
*HBVpreS/9-48 <sup>estearoil</sup> (D)				IC <sub>50</sub> ~ 1 µM		
HBVpreS/2-33 <sup>mir</sup> (D)	truncado	N- y/o C-terminal	ID. SEC. nº 18			
*HBVpreS/2-33 <sup>estearoil</sup> (D)			ID. SEC. nº 18	IC <sub>50</sub> ~ 6 nM		
HBVpreS/2-26 <sup>mir</sup> (D)						
*HBVpreS/2-26 <sup>estearoil</sup> (D)						
HBVpreS/5-33 <sup>mir</sup> (D)			ID. SEC. nº 19			
*HBVpreS/5-33 <sup>estearoil</sup> (D)			ID. SEC. nº 19	IC <sub>50</sub> ~ 7 nM		
HBVpreS/9-33 <sup>mir</sup> (D)						
*HBVpreS/9-33 <sup>estearoil</sup> (D)				IC <sub>50</sub> ~ 500 nM		
HBVpreS/2-21 <sup>mir</sup> (D)				ID. SEC. nº 20		
*HBVpreS/2-21 <sup>estearoil</sup> (D)				ID. SEC. nº 20	IC <sub>50</sub> ~ 2 nM	
HBVpreS/5-21 <sup>mir</sup> (D)						
HBVpreS/5-21 <sup>estearoil</sup> (D)						
HBVpreS/9-21 <sup>mir</sup> (D)						
HBVpreS/9-21 <sup>estearoil</sup> (D)						
HBVpreS/2-15 <sup>mir</sup> (D)						
*HBVpreS/2-15 <sup>estearoil</sup> (D)					IC <sub>50</sub> ~ 200 nM	

HBVpreS/5-15 <sup>mir</sup> (D)				
HBVpreS/5-15 <sup>estearoil</sup> (D)				
HBVpreS/9-15 <sup>mir</sup> (D)**			ID. SEC. nº 15	
HBVpreS/9-15 <sup>estearoil</sup> (D)**			ID. SEC. nº 15	

mir se refiere a la miristoilación del extremo N;

palm se refiere a la palmitoilación del extremo N;

estearoil se refiere a la estearoilación del extremo N;

(C) se refiere al genotipo C (con Q46K, como en la ID. SEC. nº 4);

5 (D) se refiere al genotipo D;

\* Los péptidos se muestran en las Figuras;

\*\* Secuencia mínima.

**Tabla 2** Péptidos modificados hidrófobos derivados de preS con cambios en los epítomos inmunogénicos

Denominación del péptido	Secuencia de aminoácidos
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> -Ala <sup>21,23,29,30</sup> (C)	ID. SEC. nº 21
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> -Ala <sup>21,23,29,30</sup> (C)	ID. SEC. nº 21
HBVpreS/(-11)-48 <sup>mir</sup> -D20A(C)	ID. SEC. nº 22
HBVpreS/(-11)-48 <sup>estearoil</sup> -D20A(C)	ID. SEC. nº 22
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> -D20A(C)	ID. SEC. nº 23
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> -D20A(C)	ID. SEC. nº 23
HBVpreS/(-11)-48 <sup>mir</sup> -SNN(27-29)ANA(C)	ID. SEC. nº 24
HBVpreS/(-11)-48 <sup>estearoil</sup> -SNN(27-29)ANA(C)	ID. SEC. nº 24
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> -SNN(27-29)ANA(C)	ID. SEC. nº 25
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> -SNN(27-29)ANA(C)	ID. SEC. nº 25
HBVpreS/(-11)-48 <sup>mir</sup> -D20A + SNN(27-29)ANA(C)	ID. SEC. nº 26
HBVpreS/(-11)-48 <sup>estearoil</sup> -D20A + SNN(27-29)ANA(C)	ID. SEC. nº 26
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> -D20A + SNN(27-29)ANA(C)	ID. SEC. nº 27
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> -D20A + SNN(27-29)ANA(C)	ID. SEC. nº 27
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> -Ala <sup>21,23,29,30</sup> (D)	ID. SEC. nº 28
*HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> -Ala <sup>21,23,29,30</sup> (D)	ID. SEC. nº 28

mir se refiere a la miristoilación del extremo N;

10 estearoil se refiere a la estearoilación del extremo N;

(C) se refiere al genotipo C (con Q46K, como en la ID. SEC. nº 4);

(D) se refiere al genotipo D.

**Tabla 3** Estudios de inhibición comparativos con péptidos modificados hidrófobos de preS de los genotipos C y D

Denominación del péptido	Secuencia de aminoácidos	Genotipo	Componente hidrófobo	Inhibición
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> (D)	ID. SEC. nº 16	D	Miristoilo (C14)	++
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> (C)	ID. SEC. nº 12	C	Miristoilo (C14)	+++
HBVpreS/(-11)-48 <sup>mir</sup> (C)	ID. SEC. nº 4	C	Miristoilo (C14)	++

HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (C)	ID. SEC. nº 12	C	Estearoilo (C18)	++++
HBVpreS/(-11)-48 <sup>estearoil</sup> (C)	ID. SEC. nº 4	C	Estearoilo (C18)	+++

Véase también la Figura 3.

En donde (C) se refiere al genotipo C Q46K de HBV.

**Tabla 4** Estudios de inhibición de infección con péptidos modificados hidrófobos de preS con la secuencia de consenso

Denominación del péptido	Secuencia de aminoácidos	Componente hidrófobo	Inhibición
HBVpreS/2-48 <sup>mir</sup> (consenso)	ID. SEC. nº 11	Miristoilo (C14)	++++
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (consenso)	ID. SEC. nº 11	Estearoilo (C18)	++++

5 Véase también la Figura 4.

**Tabla 5** Estudios de inhibición comparativos con variantes por supresión C-terminal

Denominación del péptido	Secuencia de aminoácidos	Genotipo	Componente hidrófobo	Inhibición
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (D)	ID. SEC. nº 16	D	Estearoilo (C18)	+++
HBVpreS/2-33 <sup>estearoil</sup> (D)	ID. SEC. nº 18	D	Estearoilo (C18)	+
HBVpreS/2-26 <sup>estearoil</sup> (D)		D	Estearoilo (C18)	+
HBVpreS/2-21 <sup>estearoil</sup> (D)	ID. SEC. nº 20	D	Estearoilo (C18)	+++
HBVpreS/2-15 <sup>estearoil</sup> (D)		D	Estearoilo (C18)	+/-

Véase también la Figura 5.

**Tabla 6** Estudios de inhibición comparativos con variantes por supresión N- y C-terminal

Denominación del péptido	Secuencia de aminoácidos	Genotipo	Componente hidrófobo	Inhibición
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (D)	ID. SEC. nº 16	D	Estearoilo (C18)	+++
HBVpreS/2-33 <sup>estearoil</sup> (D)	ID. SEC. nº 18	D	Estearoilo (C18)	+
HBVpreS/5-33 <sup>estearoil</sup> (D)	ID. SEC. nº 19	D	Estearoilo (C18)	+
HBVpreS/5-48 <sup>estearoil</sup> (D)	ID. SEC. nº 17	D	Estearoilo (C18)	+
HBVpreS/9-33 <sup>estearoil</sup> (D)		D	Estearoilo (C18)	+/-
HBVpreS/9-48 <sup>estearoil</sup>		D	Estearoilo (C18)	+/-

Véase también la Figura 6.

10 **Tabla 7** Estudios de inhibición comparativos con péptidos modificados hidrófobos de preS, que demuestran la necesidad de los restos de aminoácido 9 a 15 (la secuencia mínima)

Denominación del péptido	Secuencia de aminoácidos	Genotipo	Inhibición
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (D)	ID. SEC. nº 16	D	+++
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (D-AS <sup>11-15</sup> )(D)		D	-
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (Ala <sup>11-15</sup> )(D)		D	-
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (Δ17-21)(D)		D	+
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (Ala <sup>17-21</sup> )(D)		D	-
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (Ala <sup>2-9</sup> )(D)		D	-

Véase también la Figura 7.

**Tabla 8** Estudios de inhibición comparativos con péptidos modificados hidrófobos de preS

Denominación del péptido	Secuencia de aminoácidos	Genotipo	Inhibición
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (retroinverso)(D)		D	---
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> -Ala <sup>21,23,29,30</sup> (D)	ID. SEC. nº 28	D	++

retroinverso secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 16 en la dirección C a N.

Véase también la Figura 8.

**Tabla 9** Otros estudios de inhibición comparativos con péptidos modificados hidrófobos de preS, que demuestran la necesidad de los restos de aminoácido 9 a 15 (la secuencia mínima)

Denominación del péptido	Secuencia de aminoácidos	Genotipo	Inhibición
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (Ala <sup>18</sup> )(D)		D	++
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (Δ11-15)(D)		D	---
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (Ser <sup>13</sup> )(D)		D	+
HBVpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (Arg <sup>11</sup> )(D)		D	---

Véase también la Figura 9.

Los ejemplos y dibujos siguientes ilustran la presente invención sin, no obstante, limitar la misma a aquellos.

**Breve descripción de los dibujos**

**Figura 1.** Representación esquemática de la partícula de HBV y las proteínas L, M y S de HBV.

(A) El DNA de cadena parcialmente doble se asocia covalentemente con el complejo de polimerasa vírico, que consiste en la proteína terminal (TP; del inglés, terminal protein), la transcriptasa inversa (RT) y la RNasa H. El genoma está encapsulado por una cubierta icosaédrica compuesta de 120 dímeros de nucleoproteína. Las 3 proteínas de la superficie del HBV, L, M y S, están embebidas en una bicapa lipídica derivada del retículo endoplasmático. Las proteínas L y M contienen el dominio S completo que sirve como un ancla de la membrana.

(B) Estructura de dominios de las tres proteínas, L, M y S, de la superficie del HBV.

La proteína L contiene el dominio preS1 de 107 aminoácidos N-terminalmente miristoilado, el dominio preS2 de 55 aminoácidos y el dominio S que contiene los 4 segmentos transmembranales (I-IV).

**Figura 2.** Secuencia de consenso de preS1 de HBV.

En la parte superior: se representa la proteína L de HBV con sus dominios preS1, preS2 y S. El extremo N está miristoilado.

La alineación inferior muestra: la secuencia de consenso (Consenso) y los ocho genotipos (A-H) de HBV, así como la secuencia de preS de HBV del mono lanudo (WMHBV) que abarca los aminoácidos 2-50. Advértase que los genotipos A, B, C, E, G y H tienen once aminoácidos adicionales en sus extremos N; el genotipo F tiene 10 restos de aminoácido adicionales. En la parte inferior se muestran los subdominios funcionales conocidos.

Advértase, por favor, que el genotipo C de HBV se refiere al genotipo C Q46K de HBV.

**Figura 3.** Ensayo de inhibición de infección comparativo, de péptidos derivados de preS de HBV miristoilados y estearoilados de los dos genotipos C y D.

Se infectaron células HepaRG en ausencia (0 nM) o en presencia de HBVpreS/2-48<sup>mir</sup>(D), HBVpreS/2-48<sup>mir</sup>(C), HBVpreS/(-11)-48<sup>mir</sup>(C), HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(C) y HBVpreS/(-11)-48<sup>estearoil</sup>(C) en concentraciones 1, 5, 25, 100 y 2000 nM. Se incubaron durante la noche el inóculo infeccioso (HBV de genotipo D) y los péptidos. Después de un lavado, se mantuvieron las células durante otros 12 días para permitir la expresión de los genes víricos. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de los días 8-12 fueron recogidos y fueron analizados en cuanto a HBsAg secretado usando un ensayo ELISA cuantitativo comercialmente disponible. Se ajustaron los valores de HBsAg de la respectiva infección incompleta a 100%, y se da el grado de inhibición de infección en porcentaje de la infección incompleta.

En donde (C) o genotipo C se refiere al genotipo C Q46K de HBV.

**Figura 4.** *Ensayo de inhibición de infección, de péptidos miristoilados y estearoilados derivados de preS de HBV con la secuencia de consenso.*

5 Se infectaron células HepaRG en ausencia (0 nM) o en presencia de HBVpreS/2-48<sup>mir</sup>(consenso) y HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(consenso) en concentraciones 0,125, 0,25, 0,5, 0,75 y 1 nM. Se incubaron durante la noche el inóculo infeccioso (HBV de genotipo D) y los péptidos. Después de un lavado, se mantuvieron las células durante otros 12 días para permitir la expresión de los genes víricos. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de los días 8-12 fueron recogidos y fueron analizados en cuanto a HBsAg secretado usando un ensayo ELISA cuantitativo comercialmente disponible. Se ajustaron los valores de HBsAg de la respectiva infección incompleta a 100%, y se da el grado de inhibición de infección en porcentaje de la infección incompleta.

**Figura 5.** *Ensayo de inhibición de infección comparativo, de péptidos derivados de preS de HBV del genotipo D estearoilados y C-terminalmente suprimidos.*

15 Se infectaron células HepaRG en ausencia (0 nM) o en presencia de HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(D), HBVpreS/2-15<sup>estearoil</sup>(D), HBVpreS/2-21<sup>estearoil</sup>(D), HBVpreS/2-26<sup>estearoil</sup>(D) y HBVpreS/2-33<sup>estearoil</sup>(D) en concentraciones 1, 5, 25, 100 y 1000 nM. Se incubaron durante la noche el inóculo infeccioso (HBV de genotipo D) y los péptidos. Después de un lavado, se mantuvieron las células durante otros 12 días para permitir la expresión de los genes víricos. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de los días 8-12 fueron recogidos y fueron analizados en cuanto a HBsAg secretado usando un ensayo ELISA cuantitativo comercialmente disponible. Se ajustaron los valores de HBsAg de la respectiva infección incompleta a 100%, y se da el grado de inhibición de infección en porcentaje de la infección incompleta.

**Figura 6.** *Ensayo de inhibición de infección comparativo, de péptidos derivados de preS de HBV del genotipo D estearoilados y N- y C-terminalmente suprimidos.*

25 Se infectaron células HepaRG en ausencia (0 nM) o en presencia de HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(D), HBVpreS/2-33<sup>estearoil</sup>(D), HBVpreS/5-33<sup>estearoil</sup>(D), HBVpreS/5-48<sup>estearoil</sup>(D), HBVpreS/9-33<sup>estearoil</sup>(D) y HBVpreS/9-48<sup>estearoil</sup>(D) en concentraciones 1, 5, 25, 100 y 1000 nM. Se incubaron durante la noche el inóculo infeccioso (HBV de genotipo D) y los péptidos. Después de un lavado, se mantuvieron las células durante otros 12 días para permitir la expresión de los genes víricos. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de los días 8-12 fueron recogidos y fueron analizados en cuanto a HBsAg secretado usando un ensayo ELISA cuantitativo comercialmente disponible. Se ajustaron los valores de HBsAg de la respectiva infección incompleta a 100%, y se da el grado de inhibición de infección en porcentaje de la infección incompleta.

**Figura 7.** *Ensayo de inhibición de infección comparativo, de péptidos HBVpreS/2-48 del genotipo D estearoilados e internamente mutados.*

35 Se infectaron células HepaRG en ausencia (0 nM) o en presencia de HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(D), HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(D-AS<sup>11-15</sup>)(D), HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Ala<sup>11-15</sup>)(D), HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>( $\Delta$ 17-21)(D), HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Ala<sup>17-21</sup>)(D) y HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Ala<sup>2-9</sup>)(D) en concentraciones 1, 5, 25, 100 y 1000 nM. Se incubaron durante la noche el inóculo infeccioso (HBV de genotipo D) y los péptidos. Después de un lavado, se mantuvieron las células durante otros 12 días para permitir la expresión de los genes víricos. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de los días 8-12 fueron recogidos y fueron analizados en cuanto a HBsAg secretado usando un ensayo ELISA cuantitativo comercialmente disponible. Se ajustaron los valores de HBsAg de la respectiva infección incompleta a 100%, y se da el grado de inhibición de infección en porcentaje de la infección incompleta.

**Figura 8.** *Ensayo de inhibición de infección comparativo, de péptidos HBVpreS/2-48 del genotipo D estearoilados e internamente mutados.*

45 Se infectaron células HepaRG en ausencia (0 nM) o en presencia de HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(retroinverso)(D) y HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Ala<sup>21,23,29,30</sup>)(D) en concentraciones 1, 5, 25, 100 y 1000 nM. Se incubaron durante la noche el inóculo infeccioso (HBV de genotipo D) y los péptidos. Después de un lavado, se mantuvieron las células durante otros 12 días para permitir la expresión de los genes víricos. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de los días 8-12 fueron recogidos y fueron analizados en cuanto a HBsAg secretado usando un ensayo ELISA cuantitativo comercialmente disponible. Se ajustaron los valores de HBsAg de la respectiva infección incompleta a 100%, y se da el grado de inhibición de infección en porcentaje de la infección incompleta.

50 **Figura 9.** *Otro ensayo de inhibición de infección comparativo, de péptidos HBVpreS/2-48 del genotipo D estearoilados e internamente mutados.*

Se infectaron células HepaRG en ausencia (0 nM) o en presencia de HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Ala<sup>18</sup>)(D), HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>( $\Delta$ 11-15)(D), HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Ser<sup>13</sup>)(D) y HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Arg<sup>11</sup>)(D) en concentraciones 1, 5, 25, 100

y 1000 nM. Se incubaron durante la noche el inóculo infeccioso (HBV de genotipo D) y los péptidos. Después de un lavado, se mantuvieron las células durante otros 12 días para permitir la expresión de los genes víricos. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de los días 8-12 fueron recogidos y fueron analizados en cuanto a HBsAg secretado usando un ensayo ELISA cuantitativo comercialmente disponible. Se ajustaron los valores de HBsAg de la respectiva infección incompleta a 100%, y se da el grado de inhibición de infección en porcentaje de la infección incompleta.

**Figura 10.** *Péptidos derivados de preS de HBV del genotipo D estearoilados, usados en esta invención.*

**Figura 11.** *Los péptidos modificados hidrófobos de preS de la invención presentan un tropismo hepático in vivo.*

- 10 A Biodistribución de HBVpreS/2-48 Tyr<sup>estearoil</sup> (D) en ratones.  
 B Biodistribución de HBVpreS/5-48 D-Tyr<sup>estearoil</sup> (D) en ratones.  
 C Biodistribución de HBVpreS/2-33-D Tyr<sup>estearoil</sup> (D) en ratones.

**Figura 12.** *Inhibición de una infección por HBV en células HepaRG mediante Myrcludex B; efecto de la acilación.*

- 15 Myrcludex B se refiere a HBVpreS/2-48(C), en donde (C) se refiere al genotipo C Q46K de HBV.

Ensayo competitivo en que se comparan los péptidos estearoilados y miristoilados HBVpreS/2-48(C), HBVpreS/2-48<sup>mir</sup>(C) y HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(C). Las concentraciones ensayadas fueron inferiores a 1 nM con objeto de que no hubiera competición completa.

Se muestran mediciones de HBeAg, los días 7-14 p.i.

- 20 Las condiciones de reacción e infección fueron las mismas que para los experimentos mostrados en las Figuras 3 a 9.

## Ejemplos

### Métodos

Síntesis de péptidos modificados hidrófobos derivados de preS de HBV

- 25 La síntesis se llevó a cabo del modo descrito, por ejemplo, en (16).

Líneas celulares y cultivos celulares primarios

- 30 Se cultivaron células HepaRG en medio E de William complementado con suero de ternera fetal (FCS; del inglés, fetal calf serum) al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 5 µg/ml de insulina, y hemisuccinato de hidrocortisona  $5 \times 10^{-5}$  M (16). Se sometieron las células a subcultivo 1/5 cada dos semanas mediante tripsinización. De dos a tres semanas antes de la infección, se indujo diferenciación celular añadiendo DMSO al 2% al medio de mantenimiento. El medio fue cambiado cada 2-3 días.

Ensayos de competición de infección

- 35 Como inóculo infeccioso se usó un sobrenadante de cultivo de células del clon 2.2.15 de HepG2 (23), concentrado en un factor de 50, a causa de un suministro ilimitado y una calidad constante. Se preparó a partir de sobrenadantes recién recogidos al precipitar las partículas víricas en presencia de polietilenglicol (PEG) 8000 al 6%. Se resuspendió el sedimento en disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) que contenía FCS al 25%. Se guardaron partes alícuotas a -80 °C. Se incubaron células HepaRG diferenciadas o hepatocitos humanos primarios con la fuente infecciosa concentrada, diluidos por un factor de 10 en medio de cultivo complementado con PEG 8000 (Sigma) al 4%, durante 20 horas a 37 °C. Al final de la incubación, las células fueron lavadas tres veces con el medio de cultivo y mantenidas en presencia de DMSO al 2% y hemisuccinato de hidrocortisona  $5 \times 10^{-5}$  M y fueron recolectadas a los tiempos indicados.

- 45 Se llevaron a cabo experimentos de competición en placas de 12 pocillos. Se preincubaron primero aproximadamente  $1 \times 10^6$  células durante 30 minutos con péptidos derivados de HBV químicamente sintetizados, lo que fue seguido de una incubación conjunta de las células con péptido y virus durante 20 horas. Todas las series de competición se llevaron a cabo al menos dos veces, y en cada caso se muestran los resultados de un experimento representativo (véanse las Figuras 3 a 7).

Se infectaron células HepaRG en ausencia (0 nM) o en presencia de

- concentraciones 1, 5, 25, 100 y 2000 nM de
  - HBVpreS/2-48<sup>mir</sup>(D),
  - HBVpreS/2-48<sup>mir</sup>(C),
  - HBVpreS/(-11)-48<sup>mir</sup>(C),
- 5 ○ HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(C) y
- HBVpreS/(-11)-48<sup>estearoil</sup>(C); o
- concentraciones 0,125, 0,25, 0,5, 0,75 y 1 nM de
  - HBVpreS/2-48<sup>mir</sup>(consenso) y
  - HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(consenso); o
- 10 – concentraciones 1, 5, 25, 100 y 1000 nM de
  - HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(D),
  - HBVpreS/2-15<sup>estearoil</sup>(D),
  - HBVpreS/2-21<sup>estearoil</sup>(D),
  - HBVpreS/2-26<sup>estearoil</sup>(D) y
- 15 ○ HBVpreS/2-33<sup>estearoil</sup>(D); o
- concentraciones 1, 5, 25, 100 y 1000 nM de
  - HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(D),
  - HBVpreS/2-33<sup>estearoil</sup>(D),
  - HBVpreS/5-33<sup>estearoil</sup>(D),
- 20 ○ HBVpreS/5-48<sup>estearoil</sup>(D),
- HBVpreS/9-33<sup>estearoil</sup>(D) y
- HBVpreS/9-48<sup>estearoil</sup>(D); o
- concentraciones 1, 5, 25, 100 y 1000 nM de
  - HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(D),
- 25 ○ HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(D-AS<sup>11-15</sup>)(D),
- HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Ala<sup>11-15</sup>)(D),
- HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Δ17-21)(D) y
- HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Ala<sup>17-21</sup>)(D); o
- concentraciones 1, 5, 25, 100 y 1000 nM de
  - HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(retroinverso)(D) y
  - HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Ala<sup>21,23,29,30</sup>)(D); o
- 30 – concentraciones 1, 5, 25, 100 y 1000 nM de
  - HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Ala<sup>18</sup>)(D),
  - HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Δ11-15)(D),
- 35 ○ HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Ser<sup>13</sup>)(D) y

- HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(Arg<sup>11</sup>)(D); o
- concentraciones 50, 100, 150, 250 y 1000 pM (0,05, 0,1, 0,25 y 1 nM) de
- HBVpreS/2-48<sup>mir</sup>(C) y
- HBVpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(C);

5 en donde (C) se refiere al genotipo C Q46K de HBV.

Se incubaron durante la noche el inóculo infeccioso (HBV de genotipo D) y los péptidos. Después de un lavado, se mantuvieron las células durante otros 12 días para permitir la expresión de los genes víricos. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de los días 8-12 fueron recogidos y fueron analizados en cuanto a HBsAg secretado usando un ensayo ELISA cuantitativo comercialmente disponible. Se ajustaron los valores de HBsAg de la respectiva infección incompleta a 100%, y se da el grado de inhibición de infección en porcentaje de la infección incompleta.

Los resultados se muestran en las Figuras 3 a 9 y 12 así como en las Tablas 3 a 9.

#### *Biodistribución de los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS*

Se estudió la biodistribución de los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS en machos de ratón NMRI. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las leyes alemanas. Los péptidos, que contenían un resto de Tyr adicional en el extremo C-terminal, fueron etiquetados con <sup>131</sup>I (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) mediante el método de la cloramina T y fueron purificados por HPLC. Los péptidos etiquetados fueron subcutáneamente administrados por inyección de una disolución en DMSO al 50%. A los tiempos seleccionados, los ratones fueron sacrificados y la radiactividad contenida en la sangre, el corazón, el pulmón, el bazo, el hígado, el riñón, el músculo y el cerebro fue medida en un contador de radiación  $\gamma$  (Canberra Packard, Rüsselsheim, Alemania) y fue expresada como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%DI/g).

#### *Evaluación de la estabilidad de los péptidos modificados hidrófobos derivados de preS después de su extracción del hígado*

Para determinar la estabilidad de los péptidos en el hígado, se extrajo HBVpreS/2-48<sup>mir</sup> (D), etiquetado con <sup>131</sup>I, de un lóbulo hepático 24 horas después de la inyección subcutánea. Con esta finalidad, se añadió a la muestra 1 ml de agua por gramo de tejido hepático congelado. Después de una homogeneización, se añadió un volumen igual de acetonitrilo y se repitió la homogeneización. Después de una centrifugación (2 x 10 minutos a 4000 x g), se sometió esta disolución a separación en una columna de fase inversa para HPLC y se cuantificó la radiactividad de cada fracción en un contador de radiación gamma.

#### **Referencias**

- 30 1. Shepard, C. W., Simard, E. P., Finelli, L., Fiore, A. E. y Bell, B. P.; Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol. Rev.* **28**, 112-125 (2006).
2. Root, M. J. y Steger, H. K.; HIV-1 gp41 as a target for viral entry inhibition. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1805-1825 (2004).
3. Chan, H. L. y Sung, J. J.; Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Semin. Liver Dis.* **26**, 153-161 (2006).
- 35 4. Zoulim, F.; Antiviral therapy of chronic hepatitis B. *Antiviral Res.* **71**, 206-215 (2006).
5. Seeger, C. y Mason, W. S.; Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 51-68 (2000).
6. Nassal, M.; Hepatitis B virus morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**, 297-337 (1996).
7. Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S. y Guguen-Guillouzo, C.; Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* **213**, 292-299 (1995).
- 40 8. Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C. y Gripon, P.; Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J. Virol.* **73**, 2052-2057 (1999).
9. Glebe, D. y Urban, S.; Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J. Gastroenterol.* **13**, 22-38 (2007).
- 45 10. Gripon, P. et al.; Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15.655-15.660 (2002).

11. B. W. Erickson y R. B. Merrifield, 1976.
12. Gausepohl, H. et al.: *Int. J. Prot. Pept. Res.* **34**, 287-294 (1989).
13. Freireich, E. J., Gehan, E. A., Rall, D. P., Schmidt, L. H, y Skipper, H. E.; Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother. Rep.* **50**, 219-244 (1966).
- 5 14. Locarnini, S. et al.; Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir. Ther.* **9**, 679-693 (2004).
15. Engelke, M. et al.; Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology* **43**, 750-760 (2006).
- 10 16. Gripon, P., Cannie, I. y Urban, S.; Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J. Virol.* **79**, 1613-1622 (2005).
17. Barrera, A., Guerra, B., Notvall, L. y Lanford, R. E.; Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J. Virol.* **79**, 9786-9798 (2005).
18. Dandri, M. y Petersen, J.; Hepatitis B virus cccDNA clearance: killing for curing? *Hepatology* **42**, 1453-1455 (2005).
- 15 19. Dandri, M. et al.; Chronic infection with hepatitis B viruses and antiviral drug evaluation in uPA mice after liver repopulation with tupaia hepatocytes. *J. Hepatol.* **42**, 54-60 (2005).
20. Taylor, J. M.; Hepatitis delta virus. *Virology* **344**, 71-76 (2006).
21. Glebe, D.; Attachment sites and neutralising epitopes of hepatitis B virus. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* **52**, 3-21 (2006).
- 20 22. Gripon P., Rumin S., Urban S., Le S. J., Glaise D., Cannie I., Guyomard C., Lucas J., Trepo C., Guguen-Guillouzo C.; Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15.655-15.660 (2002).
- 25 23. Glebe D., Urban S., Knoop E. V., Cag N., Krass P., Grun S., Bulavaite A., Sasnauskas K., Gerlich W. H.; Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* **129**, 234-245 (2005).

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido modificado hidrófobo derivado de preS del virus de la hepatitis B (HBV), de fórmula



en donde

- 5 **P** es dicho **péptido** derivado de preS, que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 11 o ID. SEC. nº 12;

**H** es una **modificación hidrófoba** del péptido **P** derivado de preS, que es N-terminal con respecto a **P** y es seleccionada de entre acilación y adición de componentes hidrófobos;

- 10 **R** es una **modificación C-terminal** de dicho péptido **P** derivado de preS, que protege al péptido frente a la degradación;

**m** es al menos 1; y

**n** es 0 o al menos 1.

2. Un péptido modificado hidrófobo derivado de preS según la Reivindicación 1, en donde **H** y/o **R** están unidos a **P** por medio de un conector o espaciador.
- 15 3. Un péptido modificado hidrófobo derivado de preS de la Reivindicación 1 o 2, en donde **H** es una modificación hidrófoba por acilación con ácidos carboxílicos, ácidos grasos, ácidos grasos de C8 a C22, o aminoácidos con cadenas laterales lipófilas.
4. Un péptido modificado hidrófobo derivado de preS de la Reivindicación 3, en donde **H** es una modificación hidrófoba por acilación con miristoilo (C14), palmitoilo (C16) o estearoilo (C18).
- 20 5. Un péptido modificado hidrófobo derivado de preS de la Reivindicación 1 o 2, en donde **H** es una modificación hidrófoba por adición de componentes hidrófobos seleccionados de entre colesterol, derivados de colesterol, fosfolípidos, glicolípidos, ésteres de glicerol, esteroides, ceramidas, derivados de isopreno, adamantano, farnesol, grupos alifáticos, y compuestos poliaromáticos.
- 25 6. Un péptido modificado hidrófobo derivado de preS de las Reivindicaciones 1 a 5, en donde **R** es una modificación con un componente seleccionado de entre una amida, un D-aminoácido, un aminoácido modificado, un aminoácido cíclico, un polímero natural o sintético, tal como PEG, y glicocola.
7. Un péptido que comprende un péptido modificado hidrófobo derivado de preS de las Reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una etiqueta, preferiblemente seleccionada de entre un colorante fluorescente, un radioisótopo y un agente de contraste.
- 30 8. Un péptido que comprende un péptido modificado hidrófobo derivado de preS de las Reivindicaciones 1 a 7, que está fusionado con un péptido o una proteína, preferiblemente seleccionados de entre albúmina y dominios de Fc de IgGs humanas.
9. El péptido de las Reivindicaciones 1 a 8 para uso en el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de un paciente.
- 35 10. El péptido de las Reivindicaciones 1 a 8 para el uso de la Reivindicación 9, en donde la enfermedad es una infección por HBV y/o HDV, una infección primaria por HBV y/o HDV, hepatitis B y/o D, o hepatitis B y/o D crónicas.
11. El péptido de las Reivindicaciones 1 a 8 para el uso de la Reivindicación 9 o 10, en donde el péptido se administra al paciente por una vía de administración seleccionada de entre las vías subcutánea, intravenosa, oral, nasal, intramuscular, transdérmica, por inhalación y por supositorios.
- 40 12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un péptido de las Reivindicaciones 1 a 8, y un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
13. Una composición farmacéutica de la Reivindicación 12, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz está en el intervalo de 10 µg a 1 mg por kg de peso corporal, preferiblemente de 10 µg a 100 µg.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universitätsklinikum Heidelberg
- 5 <120> Péptidos modificados hidrófobos derivados de preS del virus de la hepatitis B (HBV), y su uso como inhibidores del acceso del HBV y el HDV
- <130> U30234PCT
- <150> PCT/EP2008/000591
- <151> 25-01-2008
- 10 <160> 28
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 59
- 15 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia de consenso de preS1 de HBV (posiciones (-11) a 48)
- 20 <400> 1
- ```

Met Gly Gly Trp Ser Ser Thr Pro Arg Lys Gly Met Gly Thr Asn Leu
 1          5          10          15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
          20          25          30

Ala Phe Arg Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
          35          40          45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
 50          55
    
```
- <210> 2
- 25 <211> 59

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 2

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Lys Gly Met Gly Thr Asn Leu  
 1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro  
 20 25 30

Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Val  
 35 40 45

Lys Asp Asp Trp Pro Ala Ala Asn Gln Val Gly  
 50 55

5

<210> 3

<211> 59

<212> PRT

10 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 3

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Lys Gly Met Gly Thr Asn Leu  
 1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro  
 20 25 30

Ala Phe Lys Ala Asn Ser Glu Asn Pro Asp Trp Asp Leu Asn Pro His  
 35 40 45

Lys Asp Asn Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly  
 50 55

15

ES 2 441 118 T3

<210> 4  
<211> 59  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Secuencia de preS1 de HBV posiciones (-11) a 48, que corresponde al genotipo C de HBV, pero Q46K

<400> 4

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu  
1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro  
20 25 30

Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn  
35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly  
50 55

10

<210> 5  
<211> 48  
<212> PRT

15 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 5

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> 6

<211> 58

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 6

Met Gly Leu Ser Trp Thr Val Pro Leu Glu Trp Gly Lys Asn Ile Ser  
 1 5 10 15

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

Phe Arg Ala Asn Thr Arg Asn Pro Asp Trp Asp His Asn Pro Asn Lys  
 35 40 45

Asp His Trp Thr Glu Ala Asn Lys Val Gly  
 50 55

10 <210> 7

<211> 59

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

15 <400> 7

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

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro  
 20 25 30

Leu Phe Arg Ala Asn Ser Ser Ser Pro Asp Trp Asp Phe Asn Thr Asn  
 35 40 45

Lys Asp Ser Trp Pro Met Ala Asn Lys Val Gly  
 50 55

<210> 8

<211> 58

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 8

Met Gly Leu Ser Trp Thr Val Pro Leu Glu Trp Gly Lys Asn Leu Ser  
 1 5 10 15

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

Phe Arg Ala Asn Thr Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Lys Lys  
 35 40 45

Asp Pro Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly  
 50 55

10

<210> 9

<211> 59

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

15

<400> 9

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

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro  
 20 25 30

Leu Phe Arg Ala Asn Ser Ser Ser Pro Asp Trp Asp Phe Asn Thr Asn  
 35 40 45

Lys Asp Asn Trp Pro Met Ala Asn Lys Val Gly  
 50 55

<210> 10

<211> 48

5 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B del mono lanudo

<400> 10

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

10

<210> 11

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia de consenso de preS1 de HBV (posiciones 2 a 48)

<400> 11

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> 12

5 <211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de preS1 de HBV, posiciones 2 a 48, correspondiente al genotipo C de HBV, pero Q46K

<400> 12

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

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

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

15 <210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B (posiciones 2 a 21, genotipo C)

20 <400> 13

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

Gln Leu Asp Pro  
 20

<210> 14

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B (posiciones 5 a 21, genotipo C)

<400> 14

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

10 Pro

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Virus de la hepatitis B (posiciones 9 a 15)

<400> 15

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro  
 1 5

20 <210> 16

<211> 47

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B (posiciones 2 a 48, genotipo D)

25 <400> 16

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> 17

<211> 44

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B (posiciones 5 a 48, genotipo D)

<400> 17

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

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

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

<210> 18

10 <211> 32

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B (posiciones 2 a 33, genotipo D)

<400> 18

15 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

<210> 19

<211> 29

20 <212> PRT

ES 2 441 118 T3

<213> Virus de la hepatitis B (posiciones 5 a 33, genotipo D)

<400> 19

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

Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp Asp  
 . . . . . 20 . . . . . 25

5

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B (posiciones 2 a 21, genotipo D)

10

<400> 20

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

Gln Leu Asp Pro  
 . . . . . 20

<210> 21

15

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> Secuencia de consenso de preS1 de HBV, posiciones 2 a 48, correspondiente al genotipo C (pero Q46K), con sustitución Ala en las posiciones 21, 23, 29, 30

<400> 21

ES 2 441 118 T3

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

Gln Leu Asp Ala Ala Ala Gly Ala Asn Ser Asn Ala Ala Asp Trp Asp  
 20 25 30

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

<210> 22

<211> 59

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de preS1 de HBV, posiciones (-11) a 48, correspondiente al genotipo C (pero Q46K), D20A

10

<400> 22

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu  
 1 5 10 15

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

Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn  
 35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly  
 50 55

<210> 23

15 <211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia de preS1 de HBV, posiciones 2 a 48, correspondiente al genotipo C (pero Q46K), D20A

<400> 23

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

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

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

5 <210> 24

<211> 59

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Secuencia de preS1 de HBV, posiciones (-11) a 48, correspondiente al genotipo C (pero Q46K), S27A, N29A

<400> 24

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu  
 1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro  
 20 25 30

15

Ala Phe Gly Ala Asn Ala Asn Ala Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn  
 35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly  
 50 55

<210> 25

<211> 47

<212> PRT

20 <213> Artificial

ES 2 441 118 T3

<220>

<223> Secuencia de preS1 de HBV, posiciones 2 a 48, correspondiente al genotipo C (pero Q46K), S27A, N29A

<400> 25

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

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

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

5

<210> 26

<211> 59

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de preS1 de HBV, posiciones (-11) a 48, correspondiente al genotipo C (pero Q46K), D20A, S27A, N29A

15 <400> 26

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu  
 1 5 10 15

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

Ala Phe Gly Ala Asn Ala Asn Ala Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn  
 35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly  
 50 55

<210> 27

20 <211> 47

ES 2 441 118 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de preS1 de HBV, posiciones 2 a 48, correspondiente al genotipo C (pero Q46K), D20A, S27A, N29A

<400> 27

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

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

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

10

<210> 28

<211> 47

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de preS1 de HBV, posiciones 2 a 48, correspondiente al genotipo C, con sustituciones Ala en las posiciones 21, 23, 29, 30

20

<400> 28

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

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

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

Figura 1

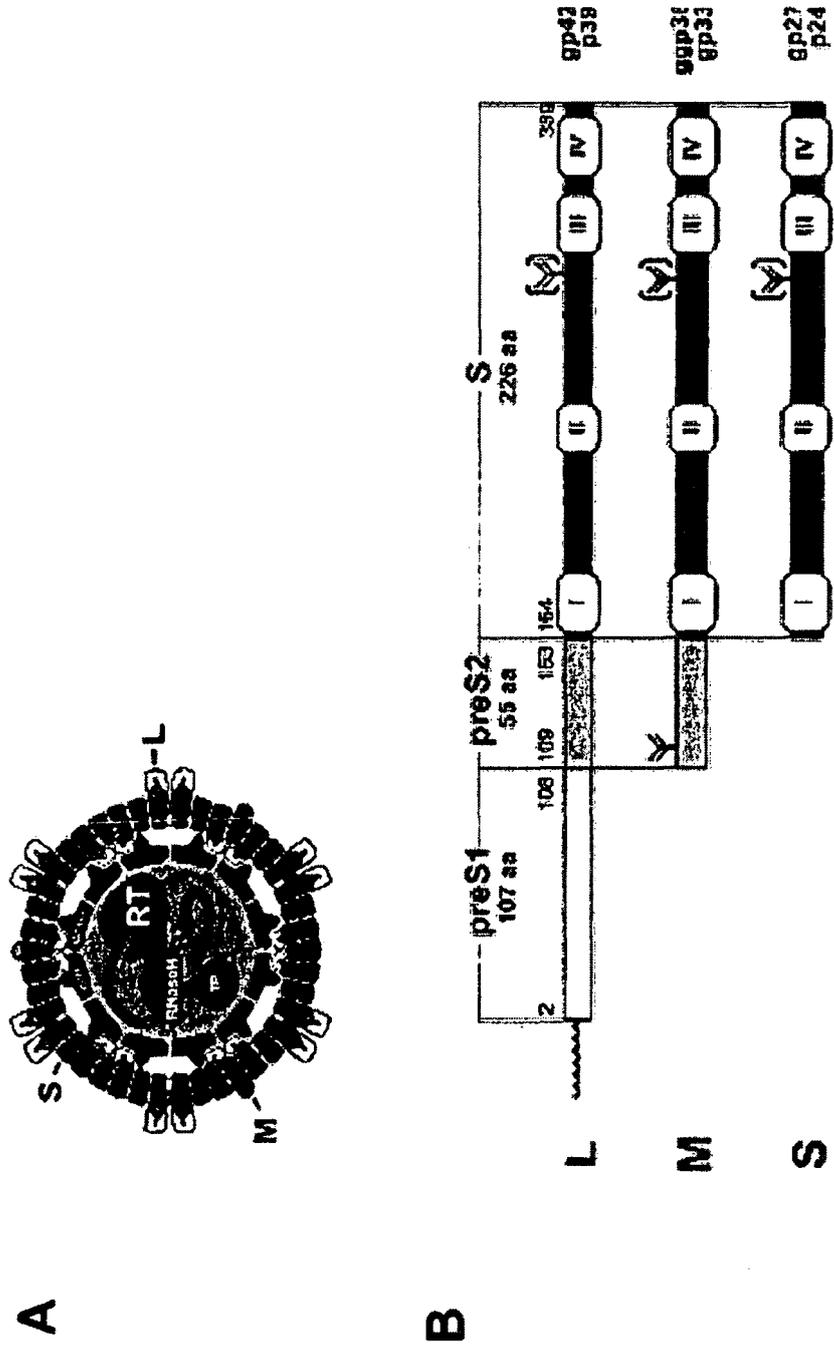


Figura 2

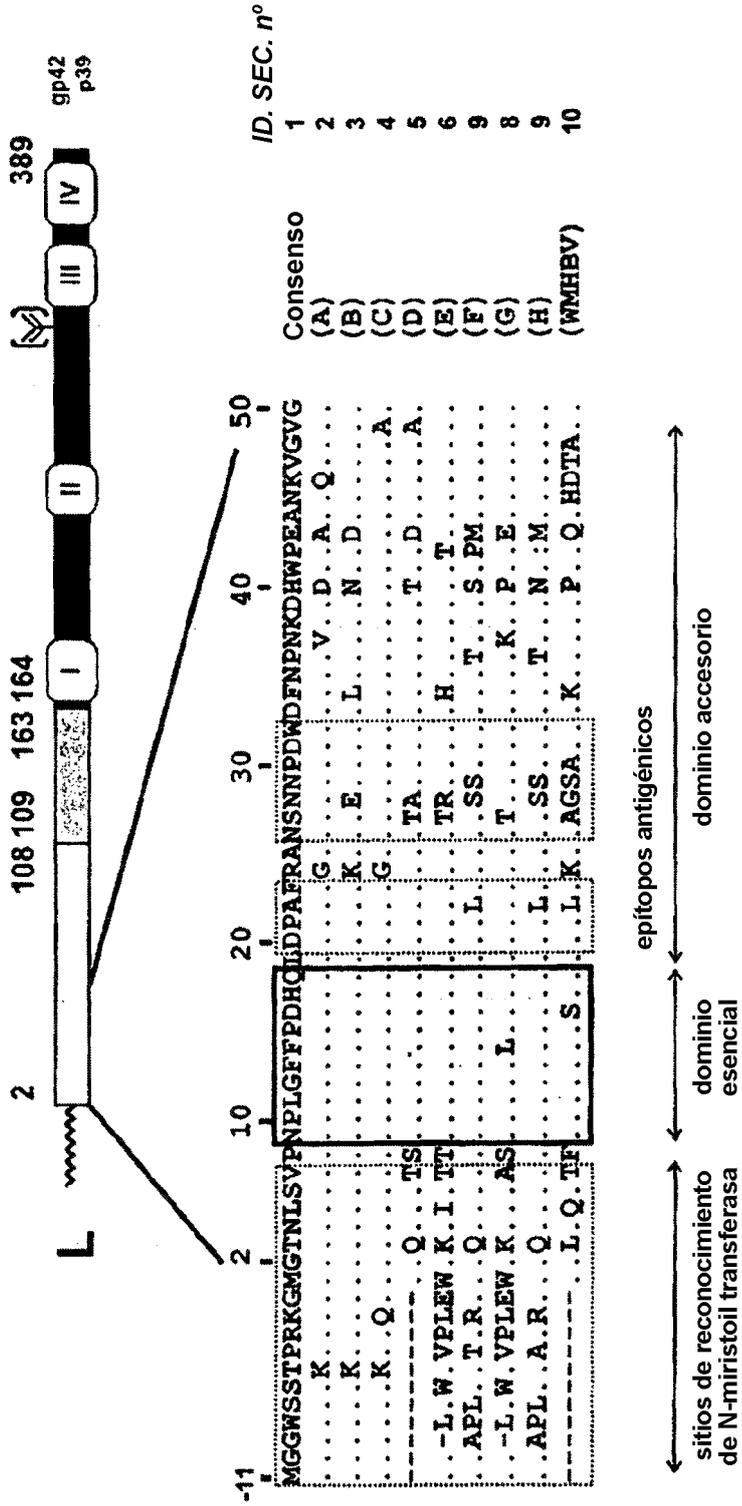


Figura 3

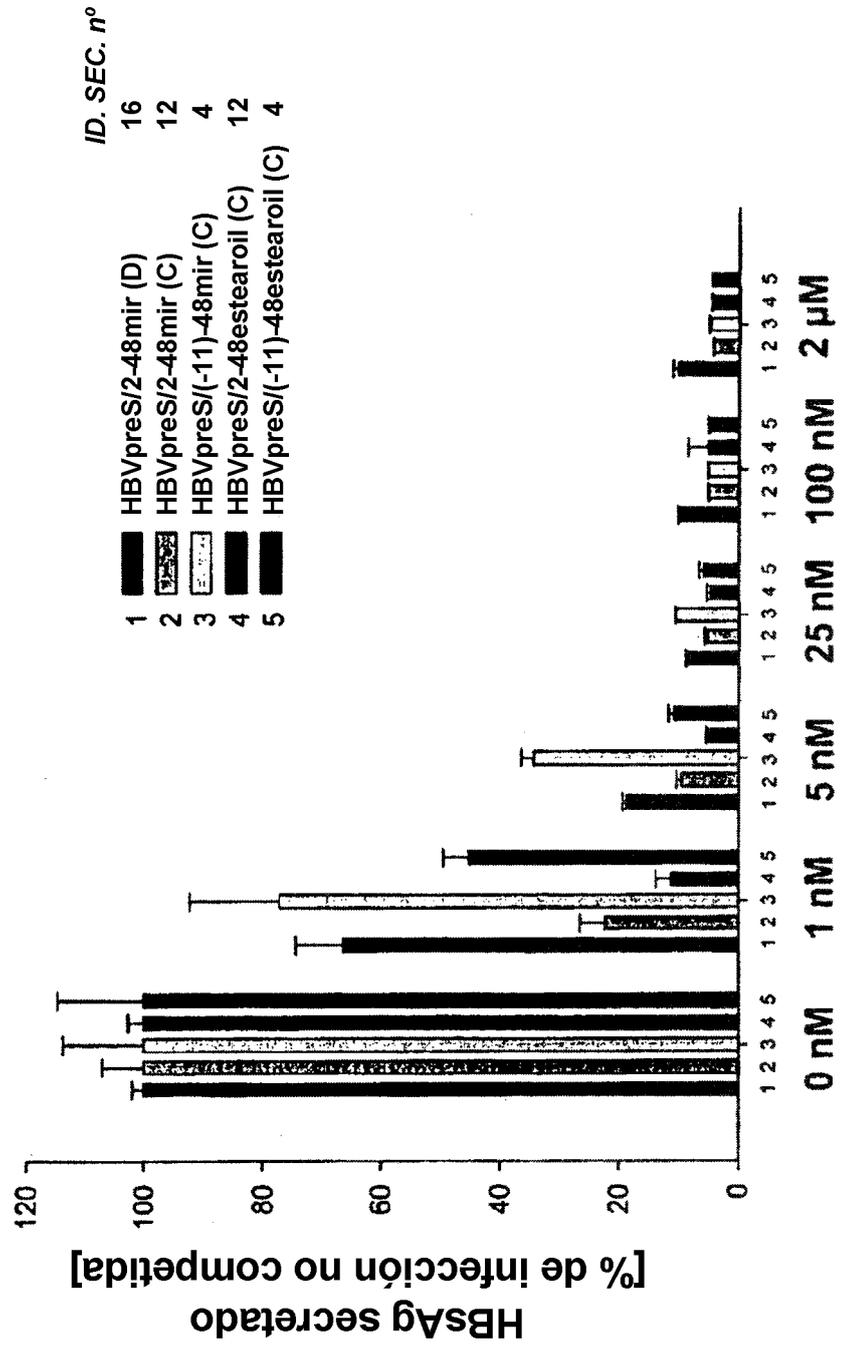
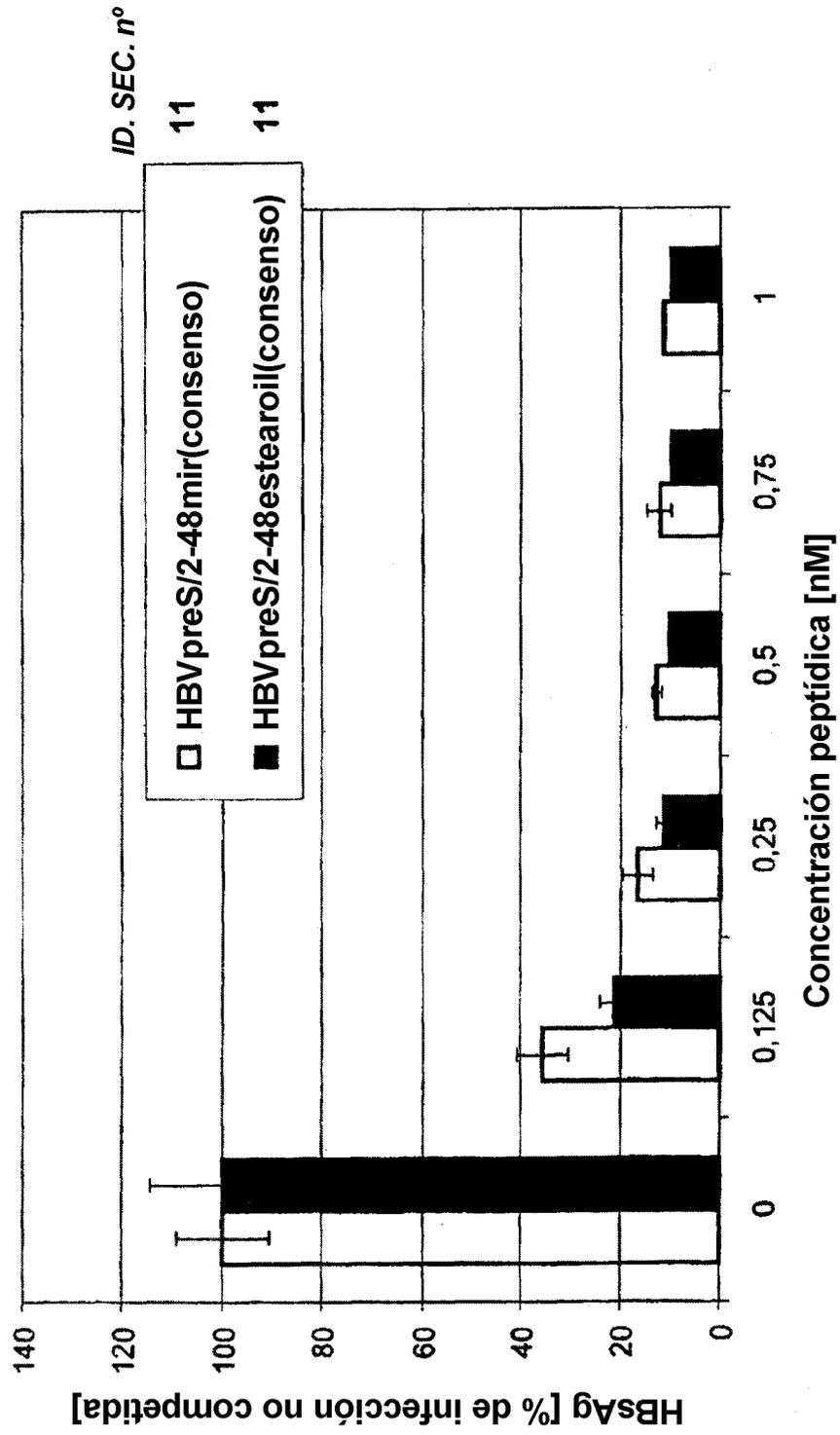
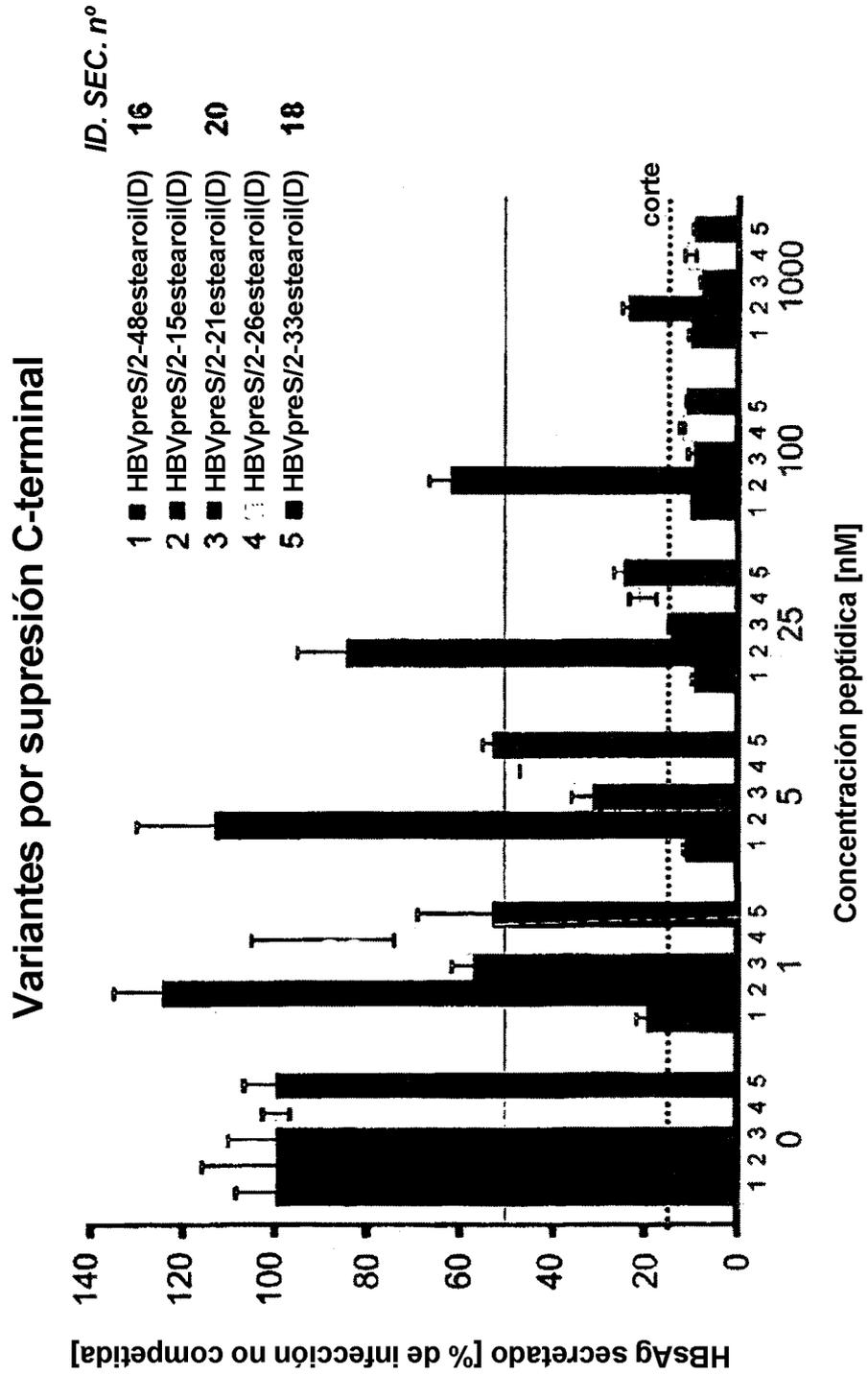


Figura 4



ID. SEC. nº  
11  
11

**Figura 5**



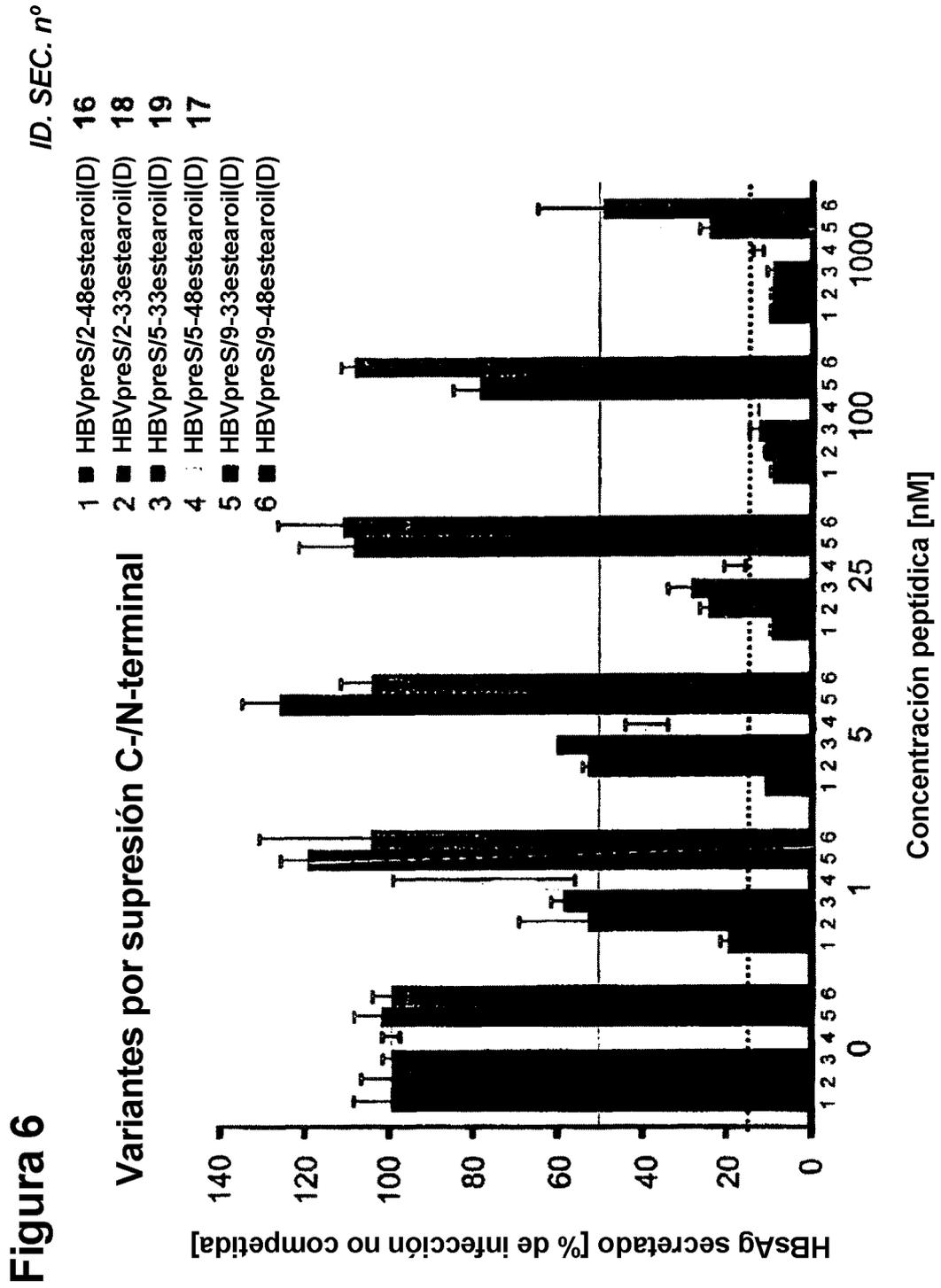


Figura 7

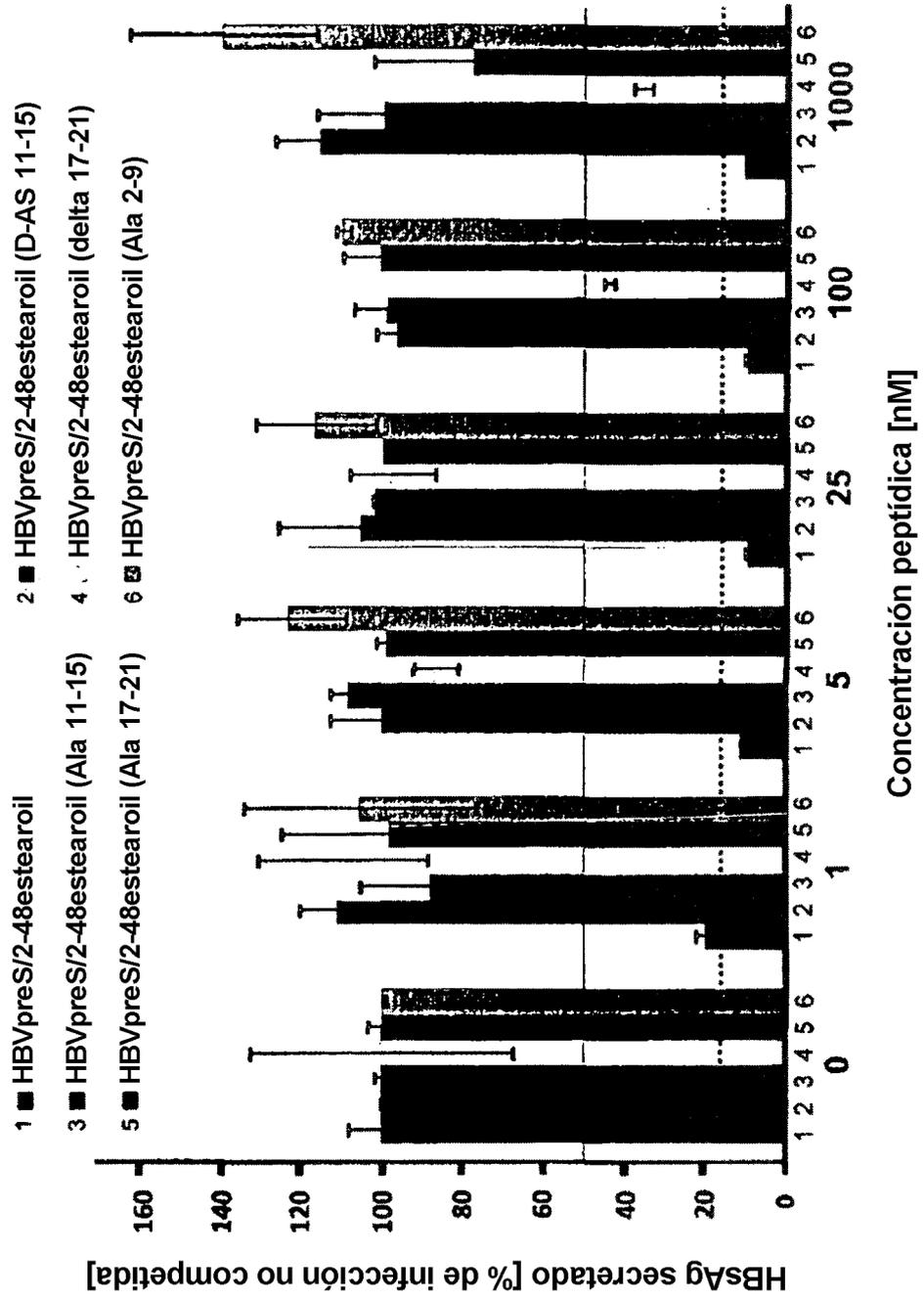
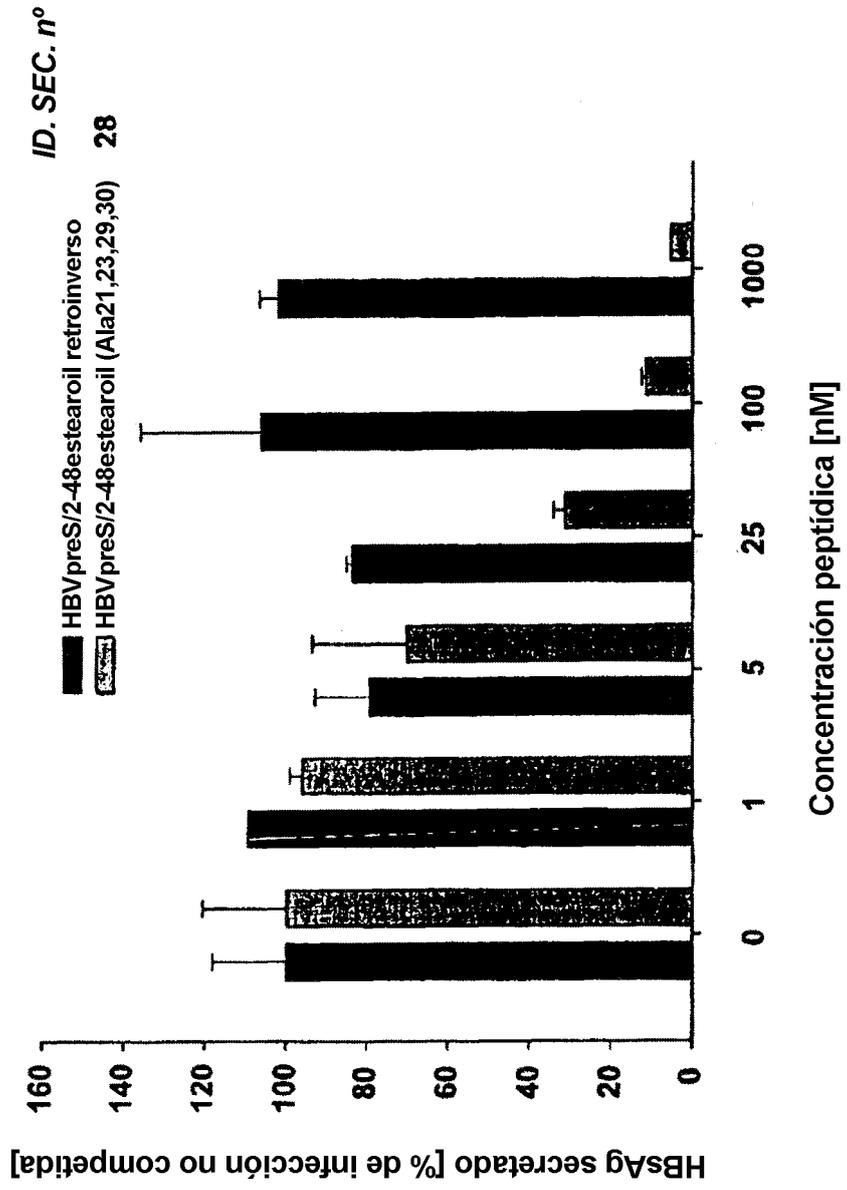


Figura 8



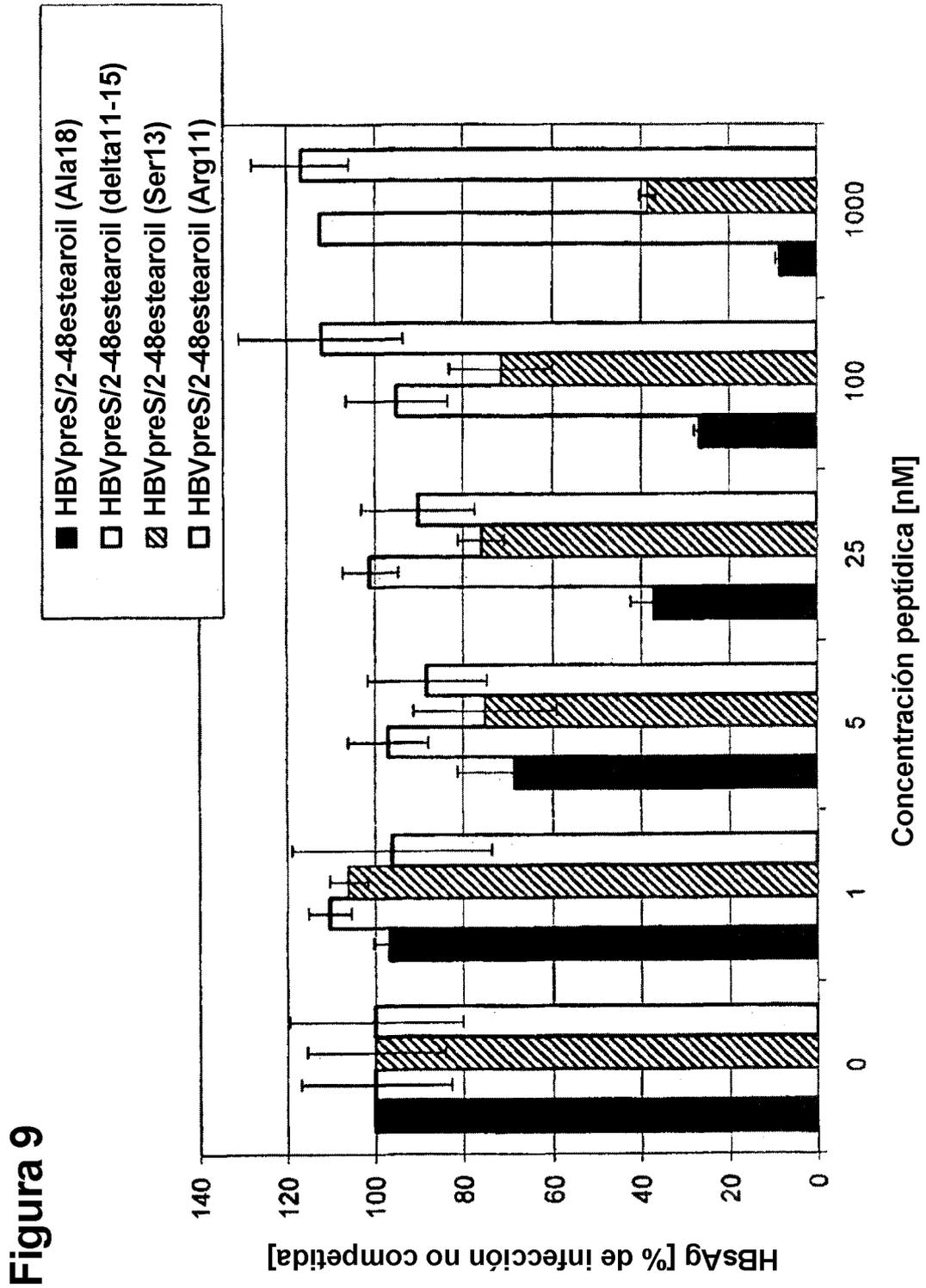


Figura 10

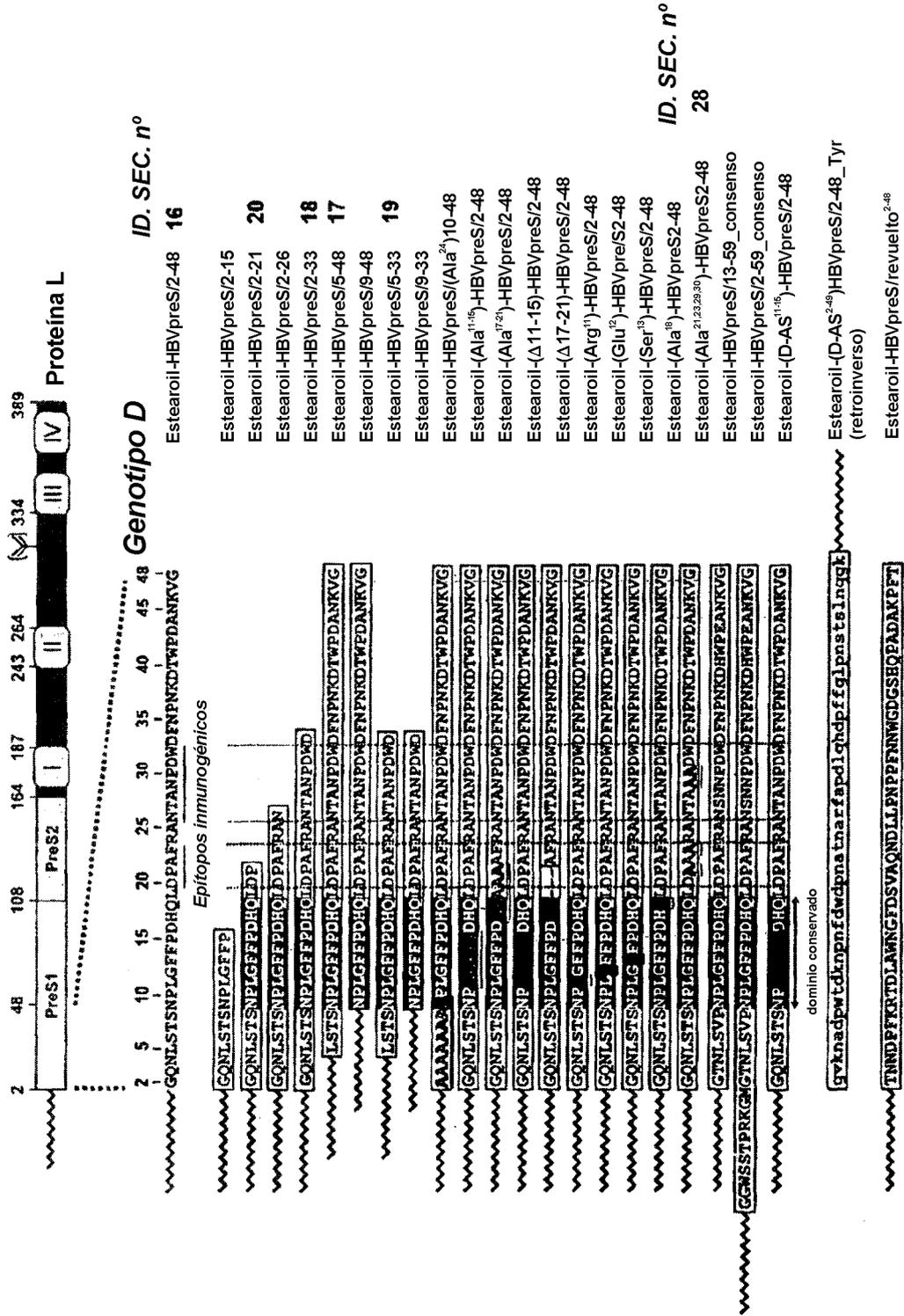


Figura 11

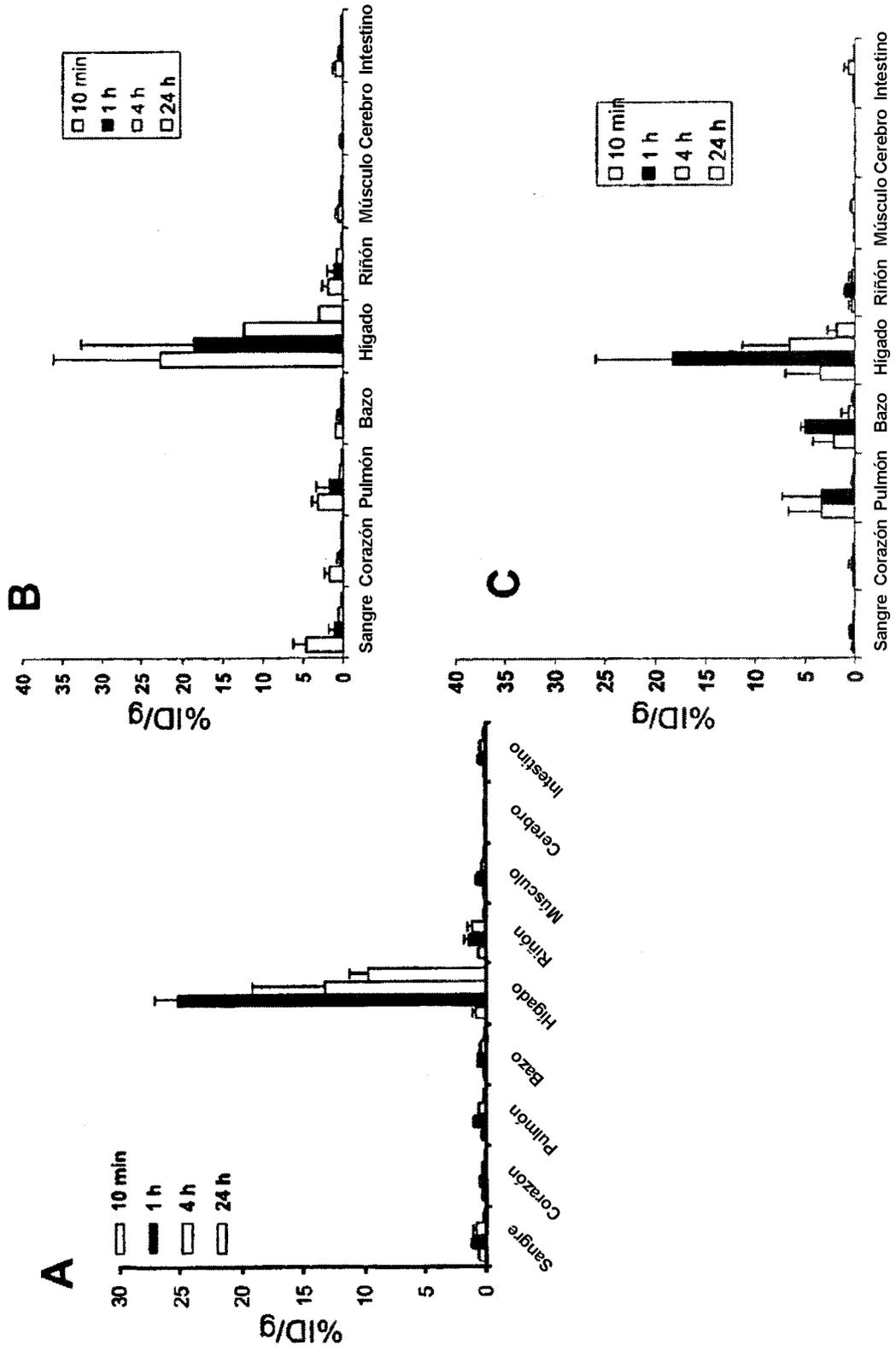
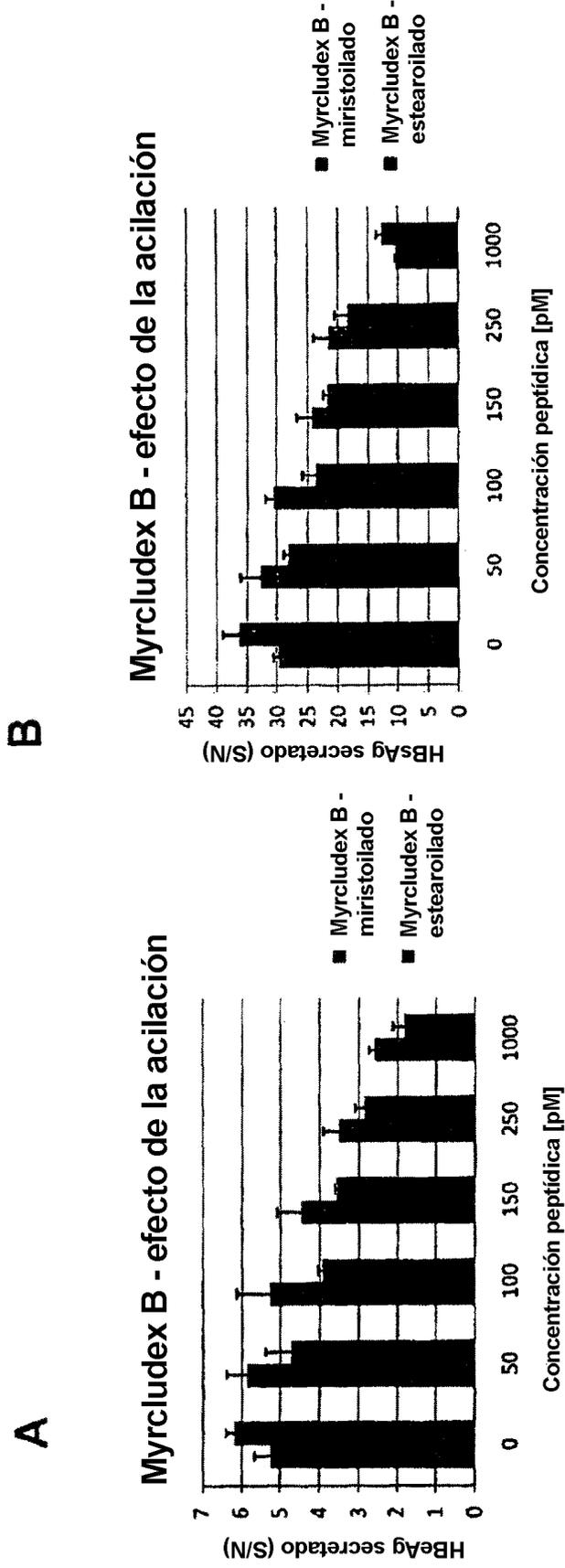


Figura 12



Myrcludex B se refiere a HBVpreS/2-48(C), en donde (C) se refiere al genotipo C Q46K de HBV