

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 368**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)

**A61K 49/08** (2006.01)

**A61K 51/08** (2006.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2012 PCT/EP2012/052349**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12107579**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2012 E 12704263 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2673004**

54 Título: **Péptidos modificados hidrófobos y uso de los mismos para su direccionamiento específico al hígado**

30 Prioridad:

**10.02.2011 US 201161441492 P**

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

**12.04.2018**

73 Titular/es:

**RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG  
(100.0%)**

**Grabengasse 1  
69117 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**MIER, WALTER;  
URBAN, STEPHAN;  
MEHRLE, STEFAN y  
HABERKORN, UWE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 663 368 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 y uso de los mismos para su direccionamiento específico al hígado.

5 La presente invención se refiere a péptidos modificados hidrófobos derivados de dominio preS del virus de hepatitis (VHB) que son vehículos versátiles para la administración específica de compuestos al hígado, preferentemente a hepatocitos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Es posible dirigir específicamente al hígado cualquier tipo de compuesto, en particular fármacos, y enriquecerse así en el hígado. Este direccionamiento al hígado puede utilizarse además para la prevención y/o tratamiento dirigido de enfermedades y trastornos hepáticos, tales como hepatitis, malaria, carcinoma hepatocelular (CHC), así como para la prevención de infección VHA, VHB, VHC y/o VHD. La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dicho(s) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) y el (los) compuesto(s) administrados específicamente al hígado. La presente invención se refiere asimismo al uso de los péptidos modificados hidrófobos de la invención para la prevención y/o tratamiento de enfermedades o trastornos hepáticos, un método para la prevención y/o tratamiento de enfermedades o trastornos hepáticos y al uso de los péptidos modificados hidrófobos para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades o trastornos hepáticos.

Antecedentes de la invención

20 El hígado, un órgano presente en los vertebrados y en otros animales, desempeña un importante papel en el metabolismo y cumple una serie de funciones en el organismo, incluyendo el almacenamiento de glucógeno, la descomposición de los glóbulos rojos, la síntesis de proteínas del plasma y desintoxicación. El hígado es también la glándula más grande del cuerpo humano. Se sitúa por debajo del diafragma en la región torácica del abdomen. Produce bilis, un compuesto alcalino que favorece la digestión, a través de la emulsificación de lípidos. Asimismo, realiza y regula una amplia gama de reacciones bioquímicas de alto volumen que requieren tejidos especializados.

30 Los hepatocitos constituyen entre el 70 y el 80 % de la masa citoplásmica del hígado. Los hepatocitos participan en la síntesis de proteínas, el almacenamiento de proteínas y la transformación de hidratos de carbono, la síntesis de colesterol, sales biliares y fosfolípidos, y desintoxicación, modificación y excreción de sustancias exógenas y endógenas. El hepatocito inicia también la formación y secreción de bilis.

Existe un amplio número de enfermedades hepáticas conocidas, tales como:

- 35 - Hepatitis: Inflamación del hígado causada principalmente por diversos virus, aunque también por ciertos venenos, autoinmunidad o enfermedades hereditarias;
- Cirrosis: formación de tejido fibroso en el hígado, que reemplaza las células muertas del hígado. La muerte de las células del hígado puede ser causada por ejemplo por hepatitis vírica, alcoholismo o contacto con otras sustancias químicas tóxicas para el hígado;
- 40 - Hemocromatosis: una enfermedad hereditaria que causa la acumulación de hierro en el cuerpo, produciendo en última instancia daños en el hígado;
- Cáncer de hígado: carcinoma hepatocelular primario (CHC) o colangiocarcinoma y cánceres metastásicos, normalmente de otras partes del tracto gastrointestinal;
- Enfermedad de Wilson: una enfermedad hereditaria que causa que el organismo retenga el cobre;
- 45 - Colangitis esclerosante primaria: una enfermedad inflamatoria del conducto biliar; autoinmune por naturaleza;
- Cirrosis biliar primaria: enfermedad autoinmune de los conductos biliares pequeños;
- Síndrome de Budd-Chiari: obstrucción de la vena hepática;
- Síndrome de Gilbert: un trastorno genético del metabolismo de la bilirrubina, observado en aproximadamente un 5 % de la población;
- 50 - Enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II: la acumulación de glucógeno causa una debilidad muscular progresiva (miopatía) en todo el cuerpo y afecta a varios tejidos del organismo, en particular, en el corazón, los músculos esqueléticos, el hígado y el sistema nervioso.

55 También existen muchas enfermedades hepáticas pediátricas, tales como atresia biliar, deficiencia de alfa-1-antitripsina, síndrome de Alagille y colestasis intrahepática familiar progresiva; así como enfermedades metabólicas.

Asimismo, diversos patógenos y parásitos, especialmente de enfermedades tropicales, tienen una fase del hígado durante su ciclo vital. Por ejemplo, la malaria es una de las enfermedades infecciosas más comunes y un enorme problema para la salud pública. La malaria es causada por parásitos protozoos del género *Plasmodium*. Las formas más graves de la enfermedad son causadas por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, si bien existen otras especies relacionadas (*Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y a veces *Plasmodium knowlesi*) que pueden infectar a los seres humanos. Se suele hacer referencia a este grupo de especies de *Plasmodium* patógeno para los seres como parásitos de la malaria. Los parásitos de la malaria son transmitidos por el mosquito *Anopheles* hembra. La malaria en los seres humanos se desarrolla a través de dos fases: una fase exoeritrocítica (fase hepática o "fase del hígado") y una fase eritrocítica. Cuando un mosquito infectado perfora la piel de la persona para chupar su sangre, los esporozoítos de la saliva del mosquito entran en el torrente sanguíneo y se desplazan hasta el hígado. Al cabo de aproximadamente 30 segundos de su introducción en el hospedador humano, infectan los hepatocitos,

5 multiplicándose asexualmente y asintómicamente durante un período de 6-15 días. Una vez en el hígado, estos organismos se diferencian para producir miles de merozoítos que, tras la ruptura de sus células hospedadoras, escapan hacia la sangre e infectan los glóbulos rojos, iniciándose así la fase eritrocítica de su ciclo de vida. El parásito se escapa del hígado sin ser detectado envolviéndose en la membrana celular de la célula del hígado hospedadora infectada. El parásito queda relativamente protegido del ataque del sistema inmune del organismo ya que durante la mayor parte de su ciclo vital en el ser humano reside en el hígado y en los glóbulos y es relativamente invisible a la vigilancia inmunológica. Existe un creciente interés por desarrollar fármacos que aborden las fases específicas en el hígado de parásitos de la malaria (p.ej., trimaquina, inhibidores de la girasa como levofloxacin, doxorubicina) para evitar el desarrollo de las fases en la sangre.

10 Otro ejemplo es la esquistosomiasis o bilarciosis, que es una enfermedad parasitaria causada por diversas especies de platelmintos. Aunque tiene un bajo índice de mortalidad, la esquistosomiasis puede ser muy debilitadora. Suele ser una enfermedad crónica derivada de una infección de la sangre con un platelminto parásito (esquistosoma). Causa debilidad y provoca daños en el hígado y el intestino. Es sobre todo común en Asia, África y Sudamérica, sobre todo en zonas en las que el agua está contaminada con caracoles de agua dulce, que contienen el parásito.

15 El virus de la hepatitis B (VHB), la causa de la hepatitis B, es el prototipo de una familia de pequeños virus de ADN con envoltura de mamíferos y aves (1). La envoltura de VHB encierra tres proteínas denominada L-(larga), M-(mediana) y S-(pequeña) (véase Fig. 1). Comparten el dominio-S C-terminal con cuatro regiones de transmembrana. Las proteínas M- y L- transportan extensiones adicionales N-terminales de 55 y 107 o 118 aa dependiente de genotipo (preS2 y preS1). En los viriones, la relación estequiométrica de L, M y S es aproximadamente 1:1:4, mientras que las partículas subvirales (PSV) no infecciosas secretadas más abundantemente contienen casi exclusivamente proteína S- y solamente trazas de proteína L- (2). Durante la síntesis, el dominio preS1 de L es miristoilado y en algún punto del ciclo vital de VHB translocado a través de la membrana derivada de ER. Esta modificación es esencial para la infectividad (3,4). Una característica destacada del VHB es su tropismo en el hígado, es decir, el hígado es el tejido que soporta específicamente el crecimiento de VHB.

20 Idealmente, los fármacos dirigidos deberían cumplir los siguientes criterios: 1) transferir exclusivamente el fármaco al lugar de acción requerido; 2) un mínimo de efectos para el resto del organismo; 3) uso de un vector farmacológicamente inactivo.

25 Para transportar un fármaco, es decir, un agente terapéutico activo a un tejido específico, se consideran diferentes estrategias. Éstas son por ejemplo el uso de profármacos desde los cuales se libera la parte farmacológicamente activa en el tejido diana mediante enzimas específicas del tejido. Otra posibilidad es acoplar fármacos eficaces, no específicos de tejido con sistemas de vehículo específicos de tejido pero farmacológicamente inertes, como péptidos afines a receptor o partículas coloidales.

30 Se han empleado diversos vehículos de fármaco para potenciar el direccionamiento de fármacos al hígado. Un enfoque sencillo se basa en la fagocitosis activa del sistema reticuloendotelial del hígado, por administración de los fármacos en determinados vehículos, tales como liposomas y microesferas. Por ejemplo, se ha demostrado que, tras la inyección i.v. (intravenosa), los vehículos en partículas que llevan incorporado un fármaco son capturados principalmente por el sistema reticuloendotelial en el hígado, con el resultado del direccionamiento del fármaco al hígado (5). Por otra parte, el direccionamiento de fármacos al hígado con polímeros hidrosolubles con carga positiva se basa en la libre extravasación de la mayoría de las sustancias hidrosolubles desde el sistema vascular del hígado, así como en las cargas negativas en la superficie celular del hígado (6). Por lo tanto, se han empleado polímeros como vehículo para permitir que el fármaco se dirija al hígado sobre la base de dichas características anatómicas y bioquímicas del hígado. Se han realizado tentativas de un direccionamiento de fármaco al hígado más específico utilizando receptores de asialoglicoproteína de las células del hígado. El receptor de asialoglicoproteína (receptor de galactosa) está presente en los hepatocitos con una alta densidad. Por otra parte, una vez que un ligando se une al receptor de galactosa, se internaliza el complejo ligando-receptor lo que permite la captación celular de ligandos galactosidos (7). Asimismo, se han llevado a cabo enfoques de administración con el uso de nanopartículas, p.ej., con polímeros anfifílicos y vectores virales (8). Se ha llevado a cabo también la administración de fármacos y material genético a través del uso de bio-nanocápsulas (BNC). Las BNC se describen como "cápsulas de escala nanométrica que consisten en proteínas producidas a través de técnicas biotecnológicas" y se pueden emplear como sistemas de administración para la administración de un fármaco específica a un órgano (9).

35 En la patente estadounidense US 7.001.760 B2 se divulgan vectores recombinantes derivados del virus de hepatitis B (VHB), que se pueden utilizar para terapia génica, como, por ejemplo, la administración de genes terapéuticos a células del hígado y la expresión de genes heterólogos en células del hígado.

40 En la patente internacional WO2009/092612, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad, se describen péptidos derivados de PreS modificados hidrófobos de VHB y su uso como vehículos para la administración específica de compuestos al hígado. Según dicho documento, los péptidos derivados de preS modificados hidrófobos de VHB se pueden acoplar con un agente activo de diagnóstico o terapéutico a través de un grupo de anclaje (A) que es un péptido derivado de preS modificado hidrófobo preferentemente "C terminal."

La presente divulgación proporciona péptidos modificados hidrófobos conjugados con uno o más compuestos, que son preferentemente fármacos, estando acoplados dichos compuestos a la secuencia de aminoácidos N-terminal del péptido representado por X, lo que hace posible crear péptidos más cortos al mismo tiempo que se mantiene la especificidad para el hígado. Sorprendentemente, ha sido posible acoplar fracciones hidrófobas con los péptidos sin anular el tropismo en el hígado. Los compuestos de acoplamiento, como fármacos con el sitio N-terminal, permiten una mejor administración de los compuestos activos a través de la membrana celular y también permite dirigir los fármacos, que son activos en la membrana celular, directamente al sitio de acción. Por otra parte, el acoplamiento de un fármaco con la región N-terminal del péptido contribuye a la estabilidad de esta sustancia activa. En la **Fig. 3**, se ilustra esquemáticamente el mecanismo molecular de la unión de un péptido modificado hidrófobo con la superficie de un hepatocito.

#### Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve proporcionando un péptido modificado hidrófobo. En la **Fig. 2** se ilustra esquemáticamente la construcción de un péptido modificado hidrófobo de la invención. Dicho péptido modificado hidrófobo tiene la fórmula general:  $[X - P - Y - R_o] A_p$  en la que P es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos secuencia de aminoácidos NPLGFXaaP (código de una sola letra; en el que Xaa es un aminoácido arbitrario, preferentemente F o L, más preferentemente F). X es una secuencia de aminoácidos que comprende  $NX_1SX_2X_3$  que tiene una longitud de  $m = 5, 6, 7$  u  $8$  aminoácidos, en la que  $X_1, X_2$  y  $X_3$  es un aminoácido arbitrario, y en la que uno o más de los aminoácidos de X lleva uno o más grupos para modificación hidrófoba seleccionada entre acilación, preferentemente con ácidos carboxílicos, ácidos grasos saturados e insaturados, ácidos grasos de C8 a C22, aminoácidos con cadenas laterales lipófilas, y adición de fracciones hidrófobas seleccionadas entre colesterol, derivados de colesterol, fosfolípidos, glucolípidos, ésteres de glicerol, esteroides, ceramidas, derivados de isopreno, adamantano, farnesol, grupos alifáticos, compuestos poliaromáticos, y m es al menos 4 ( $m \geq 4$ ). En una realización preferente, la modificación hidrófoba se lleva a efecto por acilación con fracciones acilo seleccionadas preferentemente entre miristoílo (C14), palmitoílo (C16) o estearoílo (C18), más preferentemente por acilación con miristoílo (C14) o por acilación con estearoílo (C18). Y es una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de n aminoácidos, (n es 0 o al menos 1). En la fórmula general expuesta  $m + n$  es al menos 11, es decir, el péptido modificado hidrófobo de la invención tiene una longitud de al menos 18 aminoácidos (aa) en total. R es una modificación C-terminal de dicho péptido modificado hidrófobo, que es preferentemente una fracción que protege de la degradación seleccionada entre amida, D-aminoácido, aminoácido modificado, aminoácido cíclico, albúmina, polímero sintético y natural, como PEG, glucano (o es 0 o al menos 1). A es un grupo de anclaje, preferentemente seleccionadas entre éster, éter, disulfuro, amida, tiol, tioéter, p es 0 o al menos 1. En una realización preferente m es de 4 a 19 y/o n es de 0 a 78. Se acopla(n) uno o más fármaco(s) a uno o más de los aminoácido(s) de X. El fármaco puede estar compuesto de una sustancia o pueden comprender dos o más sustancias, que están unidas a través de cualquier tipo de enlace químico o físico, como por ejemplo un enlace covalente, un enlace iónico, etc., o está en forma de un complejo.

En una realización preferente de la invención, el uno o más fármaco(s) se une(n) a dicho péptido a través de un engarce o espaciador, en el que el engarce o el espaciador se escinden preferentemente separándose del conjugado con el péptido modificado hidrófobo a través de una proteína hepática, preferentemente una enzima proteolítica hepatocelular que se puede seleccionar entre citocromos, como citocromo p450, proteasas y liasas de la ruta endocítica (p.ej., esterasas), metaloproteinasas de matriz MMP1, MMP2, mMP7, MMP9 y MMP12, preferentemente MMP7. En este caso, el engarce o espaciador comprende preferentemente las secuencias de péptido gCHAK o RPLALWRS.

En otra realización preferente más, el uno o más fármaco(s) está(n) acoplado(s) a uno o más aminoácido(s) de X que tiene un grupo amino en una cadena lateral, que se selecciona preferentemente entre lisina,  $\alpha$ -amino glicina, ácido  $\alpha, \gamma$ -diaminobutírico, ornitina, ácido  $\alpha, \beta$ -diaminopropiónico, más preferentemente lisina. Los aminoácido(s) que tienen un grupo amino en una cadena lateral están localizados preferentemente en el término N de X, en el que están localizados preferentemente de 1 a 11, más preferentemente de 1 a 3, aminoácidos que tienen un grupo amino en una cadena lateral en el término N de X.

De acuerdo con la presente invención este objeto se resuelve además proporcionando una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido modificado hidrófobo, tal como se define en el presente documento, y al menos un fármaco que se administra específicamente al hígado, preferentemente a los hepatocitos, tal como se define en el presente documento y, opcionalmente un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferente, el péptido modificado hidrófobo y la composición farmacéutica se utilizan en la administración específica de fármaco al hígado, preferentemente para su uso en el tratamiento y prevención de una enfermedad o trastorno hepático.

En una realización preferente, el fármaco es un a péptido penetrante de células (CPP por sus siglas en inglés).

En una realización preferente, se acoplan combinaciones de dos o más fármacos diferentes con un péptido modificado hidrófobo. Más preferentemente, el uno o más fármacos que están acoplados o unidos a uno o más aminoácido(s) de X son uno o más fármacos o una combinación de dos o más fármacos.

De acuerdo con la presente invención se resuelve el objeto además proporcionando un uso de un péptido modificado hidrófobo o la composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades o trastornos hepáticos.

5 De acuerdo con la presente invención, el objeto se resuelve además proporcionando un método para la prevención y/o tratamiento de enfermedades o trastornos hepáticos que comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido modificado hidrófobo o una composición farmacéutica de la invención.

10 Otras realizaciones de la presente invención se definen en las reivindicaciones dependientes.

Descripción de las realizaciones preferentes de la invención

15 Antes de describir la presente invención con mayor detalle a continuación, debe entenderse que dicha invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos descritos en particular en el presente documento, ya que éstos pueden variar. Debe entenderse además que la terminología utilizada en el presente documento tiene como fin describir realizaciones en particular únicamente y no se pretende limitar el alcance de la invención, que quedará limitado únicamente con las reivindicaciones adjuntas. A no ser que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que entienden comúnmente  
20 las personas especializadas en la técnica.

*Péptidos modificados hidrófobos*

25 Tal como se ha señalado, la presente invención proporciona péptidos modificados hidrófobos que se derivan del dominio preS del virus de la hepatitis B (VHB) (también designados "péptidos preS"). La envoltura de VHB encierra tres proteínas que reciben el nombre de L (larga), M (mediana) y S (pequeña) (véase Figura 1). Comparten el dominio S C terminal con cuatro regiones de transmembrana. La proteína M- y L- llevan extensiones N-terminales adicionales de aminoácidos 55 y 107 o 118 dependientes de genotipo (preS2 y prS1).

30 Por lo tanto, el péptido de acuerdo con la presente invención se refiere a un péptido con una secuencia de aminoácidos que corresponde o se basa en las extensiones N-terminales de la proteína L- del VHB, preS1, preferentemente de los genotipos A a H, así como virus de la hepatitis B de mono lanudo (WMVHB), orangután, chimpancé y gorila, aunque también se refiere a variantes de los mismos, preferentemente variantes truncadas C-terminales, variantes de sustitución de aminoácido. Como secuencia indispensable, los restos de aminoácido que  
35 son importantes para el tropismo en el hígado de los péptidos derivados de preS modificados hidrófobos de VHB, tal como se exponen en la SEQ ID NO: 1 (NPLGFXP) están presentes en la secuencia de aminoácidos del péptido modificado hidrófobo de la invención. En particular, los péptidos modificados hidrófobos de la invención se basan en las siguientes secuencias (aminoácidos en código de una sola letra; dominio esencial subrayado).

40 Dominio esencial del péptido modificado hidrófobo (SEQ ID NO: 1):

nPLGFXP (en el que X es un aminoácido arbitrario, preferentemente F o L, más preferentemente F)

45 preS VHB-A (ID: M57663; SEQ ID NO: 2):

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNPDWDFNPIKDHWPQA  
NQVGVGAFGPGFTPPHGGVLGWSPQAQGILATVPAMPPPASTNRQSGRQPTPISPLR  
DSHPQA

preS VHB-B (ID: D00329, SEQ ID NO: 3)

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFKANSENPDWDLNPHKDNWPDA  
HKVGVGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTSVPAAPPASTNRQSGRQPTPLSPPLR  
50 DTHPQA

preS VHB-C (ID: AB048704, SEQ ID NO: 4)

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFKANSENPDWDLNPHKDNWPDA  
HKVGVGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTSVPAAPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLR  
DTHPQA

5 preS VHB-Chimpancé (ID: AB032432, SEQ ID NO: 5)

MGQNLSTSNPLGFFPEHQLDPAFKANTNNPDWDFNPKKDYWPEANKVGAGAFGPGF  
TPPHGGLLGWSPQAQGILTTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDTHPQA

10 preS VHB-D (ID: AB048702, SEQ ID NO: 6)

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTNNPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLG  
FTPPHGGLLGWSPQAQGIMQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRTTHPQA

preS VHB-E (ID: X65657, SEQ ID NO: 7)

15 MGLSWTVPLEWGKNISTTNPLGFFPDHQLDPAFRANTRNPDWDHNPNDHWTEAN  
KVGVGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGMMLKTLPADPPPASTNRQSGRQPTPITPPLRD  
THPQA

preS VHB-F (ID: X69798@8, SEQ ID NO: 8)

20 MGAPLSTTRGMGQNLSVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWFNTNKDSWPMAN  
KVGVGGYGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGVLTTLPADPPPASTNRRSGRKPTVSPPLR  
DTHPQA

preS VHB-G (ID: AF160501, SEQ ID NO: 9)

25 MGLSWTVPLEWGKNLSANPLGFLPDHQLDPAFRANTNNPDWDFNPKKDPWPEAN  
KVGVGAYGPGFTPPHGGLLGWSPQSQGTTLTLPADPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRD  
SHPQA

VHB Gibón (ID: AJ131572, SEQ ID NO: 10)

MGQNHSTNPLGFFPDHQLDPLFRANSNNPDWDFNPNKDTWPEATKVGVGAFGPGF  
TPPHGGLLGWSPQAQGILTTLPAAPPPASTNRQSGRKATPISPPLRDTHPQA

30 VHB-H (ID: Q8JMY6, SEQ ID NO: 11)

MGAPLSTARRGMGQNLSVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWFNTNKDNWPMAN  
KVGVGGFPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTSPDPPPPASTNRRSGRKPTVSPPLRDT  
HPQA

VHB Orangután (ID: AF193864, SEQ ID NO: 12)

MGQNLSVSNPLGFFPEHQLDPLFRANTNNPDWDFNPNKDTWPEATKVGVGAFGPGF  
TPPHGGLLGWSPQAQGVTTILPAVPPASTNRQSGRQPTPISPLRDTHPQA

5 VHB Mono lanudo (ID: NC\_001896, SEQ ID NO: 13)

MGLNQSTFNPLGFFPSHQLDPLFKANAGSADWDKPNPNKDPWPQAHDTAVGAFGPGL  
VPPHGGLLGWSSQAQGLSVTVPDTPPPPSTNRDKGRKPTPATPPLRDTHPQA

10 Las "variantes" son preferentemente variantes truncadas N-terminales y/o C-terminales, variantes de sustitución o supresión de aminoácido o variantes prolongadas de las secuencias de las SEQ ID NO: 2-13, que llevan una modificación hidrófoba y en las que están acoplados uno o más fármacos(s) a uno o más aminoácido(s) N-terminales del dominio esencial del péptido modificado hidrófobo. Las variantes comprenden además una secuencia de aminoácidos que comprende aminoácido(s) modificados, aminoácido(s) no natural(es) o péptido mimético(s) u otros compuestos que pueden imitar una cadena principal/estructura de un péptido. Preferentemente, las variantes se seleccionan entre variantes truncadas C-terminales de SEQ ID NO. 2 a 13; variantes de sustitución o supresión de aminoácido; variantes que comprende aminoácido(s) modificados, aminoácido(s) no natural(es) o péptido miméticos(s) u otros compuestos que pueden imitar a una cadena principal/estructura de péptido.

20 De acuerdo con la invención, a variante de un péptido modificado hidrófobo comprende al menos los aminoácidos que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1 y puede consistir en 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 o 119 aminoácidos de las secuencias mencionadas SEQ ID NO: 2 a 13, o variantes de las mismas.

25 Las variantes truncadas N-terminales y/o C-terminales comprenden preferentemente al menos 18 aminoácidos consecutivos, más preferentemente al menos 19 aminoácidos consecutivos, incluso más preferentemente al menos 20 e incluso más preferentemente aún al menos 21 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 2 a 13 o variantes de los mismos.

30 La secuencia N-terminal (X) del péptido modificado hidrófobo que tiene una longitud de m aminoácidos comprende al menos 4 aminoácidos (es decir  $m = 4$ ). Preferentemente, la secuencia N-terminal (X) del péptido modificado hidrófobo puede consistir en 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 aminoácidos. Es decir, m puede ser de 4 a 19.

35 En una realización preferente, uno o más aminoácido(s) de X tiene un grupo amino en una cadena lateral, que se selecciona(n) preferentemente entre lisina,  $\alpha$ -amino glicina,  $\alpha,\gamma$ -diaminobutírico ácido, ornitina, ácido  $\alpha,\beta$ -diaminopropiónico, más preferentemente lisina. Los aminoácido(s) de X que tienen un grupo amino en una cadena lateral, están localizados preferentemente en el término-N de X, en el que están localizados de uno a once (1-11), preferentemente de uno a tres (1- 3), aminoácidos que tienen un grupo amino en una cadena lateral en el término -N de X.

40 En una realización preferente, la secuencia N-terminal (X) del péptido modificado hidrófobo comprende preferentemente la secuencia  $NX_1SX_2X_3$  (SEQ ID NO: 16), en la que  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  pueden ser aminoácido arbitrarios. Preferentemente,  $X_1$  de SEQ ID NO: 16 es L, I o Q, más preferentemente L. Preferentemente,  $X_2$  de SEQ ID NO: 16 es T, V, A o no está presente, preferentemente t o V, más preferentemente, T. Preferentemente,  $X_3$  de SEQ ID NO: 16 es P, S, T o F, más preferentemente P o S, incluso más preferentemente s. Preferentemente, la secuencia  $NX_1SX_2X_3$  (SEQ ID NO: 16) está directamente unida al término-N del péptido P (SEQ. ID NO: 1; NPLGFXaaP), con el resultado de un péptido que comprende la secuencia  $NX_1SX_2X_3NPLGFXaaP$ , en la que  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y Xaa son como se ha definido.

45 La secuencia C-terminal (Y) del péptido modificado hidrófobo que tiene una longitud de n aminoácidos comprende 0 o al menos 1 aminoácido (es decir  $n \geq 0$ ). Preferentemente, la secuencia C-terminal (Y) del péptido modificado hidrófobo puede consistir en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 o 93 aminoácidos. Es decir, n puede ser de 0 a 93.

60 En una realización preferente, la secuencia C-terminal (Y) del péptido modificado hidrófobo consiste en al menos 4 aminoácidos ( $n = 4$ ), que tienen preferentemente la secuencia  $X_4HQLDP$  (SEQ ID NO: 17), en la que  $X_4$  es un

aminoácido arbitrario. Preferentemente, X<sub>4</sub> de SEQ ID NO: 17 es D, E o S, más preferentemente D o E, incluso más preferentemente D. Preferentemente, la secuencia X<sub>4</sub>HQLDP (SEQ ID NO: 17) está directamente unida al término C del péptido P (SEQ. ID NO: 1; nPLGFXaaP), con el resultado de un péptido que comprende la secuencia NPLGFXaaPX<sub>4</sub>HQLDP, en la que X<sub>4</sub> y Xaa son como se ha definido.

5 En una realización preferente, el péptido modificado hidrófobo de la presente invención comprende un péptido codificado por la secuencia de aminoácidos NX<sub>1</sub>SX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>NPLGFXaaPX<sub>4</sub>HQLDP (SEQ ID NO: 18), en la que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> y Xaa son como se han definido.

10 El término "variante" se refiere también a las secuencias homólogas que se encuentran en las diferentes especies, cepas y subtipos virales, del género hepadnavirus, como la cepa alfa de VHB, la cepa LSH de VHB (aislado de chimpancé), VHB de mono lanudo (VMVHB) o cepas seleccionadas del grupo que consiste en los genotipos A a H de VHB (véase SEQ ID NO: 2-13).

15 El término "variante" se refiere también a secuencias homólogas que presentan al menos un 50 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que comprende la invariante dominio NPLGFXaaP- y las secuencias adyacentes de SEQ ID NO. 2-13 o cualquier otra secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento, preferentemente 70 %, más preferentemente 80 %, incluso más preferentemente 90 % o 95 %.

20 Por lo tanto, un péptido modificado hidrófobo preferente de acuerdo con la invención comprende una variante de SEQ ID NO. 2 a 13 con una secuencia de aminoácidos de diferentes especies, cepas o subtipos virales, preferentemente de los genotipos de VHB o VHB de mono lanudo (WMVHB) o variantes de los mismos.

25 "Variantes" de SEQ ID NOS. 2 a 13 comprende también variantes o "análogos" que comprenden supresiones de aminoácido, sustituciones de aminoácido, como por ejemplo reemplazamiento conservador o no conservador con otros aminoácidos o mediante isosteros (aminoácidos modificados que soportan una similitud estructural y espacial próxima a los aminoácidos de proteína), adiciones de aminoácido o adiciones de isosteros, siempre y cuando la secuencia siga presentando tropismo en el hígado, preferentemente más de un 10 % de la dosis inyectada se acumula en el tejido del hígado al cabo de 1 h tras la inyección intravenosa. El tropismo en el hígado del péptido modificado hidrófobo o su "variante" es preferentemente 10 % o más de la dosis inyectada al cabo de 1 h, más preferentemente 25 % o más de la dosis inyectada al cabo de 1 h, incluso más preferentemente 50 % o más de la dosis inyectada al cabo de 1 h.

35 Las sustituciones de aminoácido conservadoras se refieren normalmente a sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Dichas clases incluyen por ejemplo

- aminoácidos que tienen cadenas laterales polares sin cargar, como asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina;
- aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas, como lisina, arginina e histidina;
- 40 - aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas, como ácido aspártico, ácido glutámico; y
- aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares, como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano y cisteína.

45 "N-terminal" se refiere al término-N de X, es decir el correspondiente resto de aminoácido, pero comprende también la modificación hidrófoba en estrecha proximidad con el término-N, como los correspondientes restos de aminoácido (-4), (-3), (-2), (-1), 1, 2 o 3 o 4. Por tanto, el acoplamiento del compuesto (p.ej., un fármaco) y la modificación hidrófoba se pueden obtener además por unión de un fármaco y una fracción hidrófoba en un sitio próximo al término N de X.

50 La modificación hidrófoba de dicho péptido modificado hidrófobo de acuerdo con la presente invención añade una fracción hidrófoba al péptido.

X está modificado con al menos una fracción o grupo hidrófobo. En realizaciones preferentes de la presente invención, X está modificado con 1, 2, 3, 4 o más fracciones/grupo(s) hidrófobo(s). Es decir, X está modificado con más de una fracción o grupo hidrófobo, como por ejemplo 2. Las fracciones o grupos hidrófobos pueden ser iguales o diferentes entre sí. La modificación hidrófoba de dicho péptido de acuerdo con la presente invención se selecciona entre:

- acilación;
- 60 - adición de fracciones hidrófobas.

La acilación se selecciona preferentemente entre acilación con ácidos carboxílicos, ácidos grasos, aminoácidos con cadenas laterales lipófilas. Los ácidos grasos preferentes son ácidos grasos saturados o insaturados, ácidos grasos ramificados o sin ramificar, preferentemente con 9 a 22 átomos de carbono (C8 a C11). Más preferentemente, la modificación hidrófoba por acilación se selecciona entre acilación con miristoílo (C 14), palmitoílo (C 16) o estearoílo (C 18). La modificación con miristoílo es preferente en aplicaciones *in vivo* y medicinales, debido a su mayor

seguridad, p.ej., no presentan los efectos adversos del grupo esteroideo (respuesta inmune innata, etc.). La adición de fracciones hidrófobas se selecciona preferentemente entre adición de colesterol, derivados de colesterol, fosfolípidos, glucolípidos, ésteres de glicerol, esteroides, ceramidas, derivados de isopreno, adamantano, fernesol, grupos alifáticos, compuestos poliaromáticos. La unión de las fracciones hidrófobas es preferentemente mediante enlace covalente, que puede conseguirse por unión carbamato, amida, éter, disulfuro o cualquier otro enlace, que entre dentro del conocimiento de las personas especializadas en la técnica. Por lo tanto, los péptidos acilados modificados hidrófobos de la invención son preferentemente lipopéptidos debido a su grupo/fracción hidrófoba lipófila N-terminal.

La modificación C-terminal (R) de Y es preferentemente una modificación con una fracción que protege de la degradación, como pueda ser la degradación *in vivo*.

"C-terminal" se refiere a la modificación en el término C, es decir, el correspondiente último resto aminoácido, aunque comprende también la modificación en estrecha proximidad al término C, como, por ejemplo, el último salvo un resto aminoácido, el último salvo dos restos aminoácido o más restos aminoácido (p.ej., introducción de un D-aminoácido que protege el vehículo de la degradación enzimática, p.ej., por acción de carboxipeptidasas). Las personas especializadas serán capaces de seleccionar las correspondientes fracciones adecuadas dependiendo de la correspondiente aplicación. Las fracciones preferentes que protegen de la degradación se seleccionan entre amidas, D-aminoácidos, aminoácidos modificados, aminoácidos cíclicos, albúmina, polímeros naturales y sintéticos, como PEG, glucano. Asimismo, o es 0 o al menos 1, es decir la modificación (R) C-terminal es opcional. Preferentemente, o es 1. En una realización más de la presente invención o es 1, 2, 3, 4 o más. Es decir, el término C del péptido modificado hidrófobo o su proximidad se puede modificar con más de una fracción o grupo, como por ejemplo, 2. Las fracciones o los grupos pueden ser iguales o diferentes entre sí.

En una realización de la presente invención, la modificación hidrófoba y/o R están unidos al péptido a través de un engarce o espaciador. Los engarces o espaciadores son conocidos entre las personas especializadas en la técnica, tales como polialanina, hidratos de carbono, grupos (CH<sub>n</sub>)<sub>n</sub>. Las personas especializadas podrán por tanto seleccionar el (los) engarce(s) o espaciador(es) adecuados correspondientes dependiendo de la aplicación correspondiente.

El grupo de anclaje opcional (A) sirve como punto de fijación adicional para un compuesto, un marcador, una etiqueta y está localizado en un aminoácido de Y. Es decir, en el caso de que esté presente al menos un grupo de anclaje (A) (es decir  $p \geq 1$ ) Y comprende al menos un aminoácido, además (es decir  $n \geq 1$ ). En una realización preferente, el grupo de anclaje es "C-terminal" de Y, en lo que "C-terminal" se refiere a la modificación en el término-C, es decir el último resto aminoácido correspondiente, aunque comprende también la estrecha proximidad del término-C, como por ejemplo el último resto de aminoácido salvo uno, el último resto aminoácido salvo dos o más restos aminoácidos. En este caso, o puede ser 0, por tanto, no hay otra modificación R C-terminal. El grupo de anclaje A puede ser una cadena lateral de aminoácido de Y o puede ser la cadena lateral de aminoácido de Y en sí, es decir A puede ser la propia cadena lateral o una cadena lateral modificada. El grupo de anclaje puede ser también un resto aminoácido modificado que haya sido introducido en la secuencia de aminoácidos de Y para servir como grupo de anclaje. En otras realizaciones de la invención, el grupo de anclaje A se puede unir a la modificación hidrófoba de X y/o la modificación R C-terminal. Los grupos de anclaje preferentes se seleccionan entre éster, éter, disulfuro, amida tiol, tioéster. Las personas especializadas podrán seleccionar el(los) grupo(s) de anclaje adecuado(s) correspondientes dependiendo del compuesto, marcador, etiqueta, etc. correspondiente que se vaya a unir. El grupo de anclaje puede ser adecuado además para unir un componente de formación de complejo, como por ejemplo el complejo biotina/avidina, poliarginina/oligonucleótido (p.ej., ARNsi). Asimismo, o es 0 o al menos 1, es decir, el grupo de anclaje (A) es opcional. Preferentemente o es 1. En otras realizaciones más de la presente invención o es 1, 2, 3, 4 o más. Es decir, existe más de un grupo de anclaje, como por ejemplo 2. Los grupos de anclaje pueden ser iguales o diferentes entre sí, permitiendo la unión de varios compuestos, como por ejemplo un fármaco o una etiqueta o diferentes grupos.

#### *Síntesis de los péptidos modificados hidrófobos*

Los péptidos de la invención se pueden preparar a través de diversos procedimientos muy conocidos entre las personas especializadas en la técnica, en general, a través de procedimientos de síntesis química y/o procedimientos de ingeniería genética. Los procedimientos de síntesis química incluyen de forma más particular la síntesis de bloque y secuencial en fase sólida (Erickson y Merrifield, 1976). En la patente internacional WO2009/092612 se pueden encontrar más detalles.

El procedimiento secuencial en fase sólida puede realizarse utilizando métodos automáticos establecidos, como por ejemplo mediante el uso de un sintetizador de péptidos automático. En el presente documento, se une un aminoácido [alfa]-amino protegido a un soporte de resina. El soporte de resina empleado puede ser cualquier resina adecuada empleada convencionalmente en la técnica para la preparación de (poli)péptidos en fase sólida, preferentemente, poliestireno que ha sido copolimerizado con polioxietileno para proporcionar sitios para la formación de éster con el aminoácido protegido con o-amino introducido inicialmente. Este método optimizado, aplicado por los autores de la invención, ha sido descrito de forma explícita (véase p.ej., 12). Se introducen los

aminoácidos uno por uno (de forma gradual). Cada ciclo de síntesis que corresponde a la introducción de un aminoácido incluye una etapa de desprotección, sucesivas etapas de lavado, una etapa de acoplamiento con activación del aminoácido y posteriores etapas de lavado. Cada una de estas etapas va seguida de filtración. Los agentes reactivos para el acoplamiento son los agentes reactivos clásicos para la síntesis de (poli) péptidos, tales como diciclohexilcarbodiimida, hidroxibenzotriazol, benzotriazol-1-il-oxitris (dimetilamino) fosfonio hexafluorofosfato y difenilfosforilazida. Tras la síntesis del polipéptido en la resina, se separa el polipéptido de la resina por tratamiento con un ácido fuerte, como por ejemplo ácido trifluoroacético, en presencia de anisol, etanoditiol o 2-metilindol. A continuación, se purifica el compuesto a través de técnicas de purificación clásicas, en particular por HPLC.

Los péptidos de la presente invención pueden obtenerse por acoplamiento de fragmentos de (poli) péptido que están protegidos selectivamente, efectuándose dicho acoplamiento, p.ej., en una solución. Se pueden producir los péptidos además por técnicas de ingeniería genética, tal como conocen las personas especializadas. Es particularmente adecuado un sistema de expresión eucariota, como por ejemplo un sistema de baculovirus. De acuerdo con dicho procedimiento, se expresan las proteínas en células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifican una proteína heteróloga y secuencias de ácido nucleico de regulación, como por ejemplo un promotor. Se dispone de varias líneas celulares para la infección con baculovirus recombinante, como por ejemplo la línea celular Sf-9 disponible en la Colección de Cultivos Tipo Americana (CRL 11711). La expresión en un sistema de expresión procariota, como por ejemplo *E. coli*, es particularmente adecuada.

La introducción de la fracción hidrófoba en el polipéptido se puede llevar a cabo a través de diversos procedimientos muy conocidos entre las personas especializadas en la técnica, incluyendo enfoques sintéticos y de ingeniería genética.

Alternativamente, los péptidos y/o péptidos de fusión (es decir, los péptidos modificados hidrófobos) se pueden producir a través de líneas de células eucariotas establemente transfectadas, como por ejemplo CHO y otras líneas celulares, conocidas en la técnica y que se suelen utilizar para generar vacunas y similares. Dada la propiedad intrínseca de que el aminoácido 47-preS1 N-terminal promueve la secreción de una proteína/péptido miristoilada, puede extraerse el péptido modificado hidrófobo biológicamente activo de los sobrenadantes del cultivo celular.

#### *Vectores y lanzaderas para direccionamiento al hígado*

Tal como se ha señalado, la presente invención proporciona el uso de los péptidos modificados hidrófobos como vehículo o lanzadera para la administración específica de un compuesto (p.ej., un fármaco) al hígado, en los que se acopla el fármaco a los péptidos modificados hidrófobos, tal como se describe en el presente documento.

El "vehículo" o "lanzadera" para la administración específica de un compuesto en el hígado de acuerdo con la presente invención se refiere al tropismo en el hígado o hepatotropismo de los péptidos modificados hidrófobos, tal como han observado los autores de la invención y se describen en el presente documento, es decir, a su capacidad de acumularse selectivamente en el hígado, preferentemente a su acumulación selectiva en la membrana del plasma de los hepatocitos, así como a su penetración selectiva en los hepatocitos. La invención se basa en el hallazgo de una acumulación en el hígado altamente específica y en la identificación de los determinantes del tropismo en el hígado de VHB en la secuencia preS 1 del VHB según los autores de la invención. Por lo tanto, la invención se vale del conocimiento acerca de los determinantes del tropismo en el hígado para el diseño de vehículos y lanzaderas universales para el direccionamiento al hígado específico y la administración respectivamente. Los péptidos modificados hidrófobos de la presente invención son vehículos o lanzaderas versátiles para la administración específica de compuesto(s) al hígado.

Preferentemente, la administración específica de un compuesto al hígado es la administración específica del compuesto a los hepatocitos. Asimismo, el compuesto puede administrarse específicamente a los hepatocitos *in vitro* e *in vivo*. El compuesto se administra específicamente preferentemente al hígado de un animal, preferentemente un mamífero o un ser humano o un ave.

#### *Compuestos para su administración*

Los compuestos (p.ej., fármacos) que se administran directamente al hígado de acuerdo con la presente divulgación pueden ser cualquier tipo de compuesto, siendo preferentemente adecuados para fines terapéuticos. Los fármacos pueden presentarse en forma de profármacos o pre-profármacos. Un compuesto también puede ser un virus o derivado del mismo, como por ejemplo un virus recombinante competente de replicación o deficiente en replicación (p.ej., un adenovirus o un virus adeno-asociado) que ha sido modificado química o genéticamente para exponer la secuencia dirigida en su superficie y que se redirecciona por tanto para infectar hepatocitos. Dichos virus serán aplicables para la administración génica específica de hepatocito.

*Fármaco (agente terapéutico)*

En una realización preferente de la presente divulgación, el compuesto que se administra específicamente a los hepatocitos es un fármaco (o un fármaco en forma de un profármaco). Dicho fármaco/profármaco se selecciona preferentemente entre compuestos terapéuticamente activos, fármacos, agentes, más preferentemente de las siguientes clases de sustancias:

moléculas radioactivas o isótopos (p.ej.,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), agentes alquilantes (p.ej. cisplatino, oxalplatino), anti-metabolitos (p.ej. azatioprina), anti-neoplásicos (p.ej. bleomicina, actinomicina) antraciclinas (p.ej. doxorubicina, epirubicina), antifolatos, (p.ej. Metotrexato) agentes antivirales (p.ej. ribavirina, tenofovir), fármacos que actúan sobre el citoesqueleto (p.ej. vinblastina, TAXOL), citoquinas (p.ej. interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ ), quimioquinas (p.ej. CCL1, CXCL1), ARNsi (p.ej. CALAA-01, SIRNA-034), ARNmi (p.ej. miR-26a), agonistas y antagonistas de receptor nuclear (p.ej. mifepristona), oligonucleótidos y ácidos nucleicos (p.ej. plásmidos, ADNds corto, ADNss corto), epotilona (p.ej. patupilona, ixabepilona), hormonas (p.ej., progestrinas, flouximesterona), antagonistas de hormona (p.ej. toremifeno, fulvestrant), agentes inmunosupresores (p.ej. rapamicina, ciclosporina A), agentes inmunomoduladores (p.ej. lenalidomida), agentes inmunoestimuladores (p.ej. SDC101, ITMN-191), secuencias inmunoestimuladoras como agonistas de TLR, inhibidores de quinasa (p.ej. sorafenib, imatinib, erlotinib), inhibidores de proteasa (p.ej. boceprevir, telaprevir), inhibidores de polimerasa (p.ej. MK-0608, R7128), inhibidores de topoisomerasa (p.ej. irinotecano, topotecano), análogos nucleosida (p.ej. telbivudina, entecavir), análogos de precursor (p.ej. fluorouracil), péptidos y péptido antibióticos (p.ej. defensina 1), antibióticos (p.ej. azitromicina, clindamicina, rifampicina), inhibidores de girasa de la clase fluoroquinilona (p.ej. levofloxacina, clinafloxacin, gatifloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina, sitafloxacina, trovafloxacina, prulifloxacina, garenoxacin, delafloxacina), agentes a base de platino (p.ej. carboplatino, cisplatino), retinoides (p.ej. tazaroteno, bexaroteno), alcaloides vinca (p.ej. vinpocetina, vinorelbina) y sus derivados, agentes citotóxicos y agentes citostáticos como proteínas de inactivación de ribosoma (p.ej.  $\alpha$ -sarcina, restrictotina), vitaminas (p.ej. vitamina B6), toxinas de cadena  $\alpha$  (p.ej. toxina de la difteria), toxinas de veneno de serpiente y sus componentes (p.ej. cobratoxina), agentes derivados de hongos (p.ej. aspergilina), exotoxinas bacterianas (p.ej., exotoxina pseudomonas), enterotoxinas bacterianas (p.ej. toxina del cólera) y endotoxinas bacterianas (p.ej. lipopolisacáridos) y sus análogos, anticuerpos (p.ej. bevacizumab, cetuximab) y CADs (fármacos anfílicos catiónicos) como proclorperacina, flufenacina, trifluorofenacina.

Las realizaciones preferentes de la invención pueden incluir uno o más miembros de las clases de sustancias mencionadas, en particular dapsone, bleomicina, dactinomicina, mitomicina, daunorubicina, doxorubicina, ciclosporina A, tenofovir, lamivudina, adefovir, entecavir, ribavirina, telepravir, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, amsacrina, doxifluridina, cisplatino, carboplatino, oxalplatino, satraplatino, camptotecina, topotecano, irinotecano, amsacrina, etoposida, teniposida, ciclofosfamida, ifosfamida, trofosfamida, melfalano, clorambucil, estramustina, busulfan, clormetina, treosulfano, carmustina, lomustina, nimustina, estrepto-zocina, procarbacin, dacarbacin, temozolomida, tiotepa, vinorelbina, vincristina, vinblastina, vindesina, paclitaxel, docetaxel, metotrexato, pemetrexed, raltitrexed, fluorouracilo, capecitabina, citosina-arabina, gemcitabina, tioguanina, pentostatina, azatioprina, mercaptopurina, fludarabina, cladribina, hidroxycarbamida, mitotano, azacitidina, citarabina, gemcitabina, nelarabina, bortezomib, anagrelida, preferentemente imatinib, erlotinib, sunitinib, sorafenib, dasatinib, lapatinib o nilotinib, MK 886, pizotileno, toremifeno, SDC-101, ITMN-191, RG7227, nitazoxanida, VX-950, VX-222, BMS-790052, BMS-650032, GS 9190, GS 9256, BI 201335, BI 207127, IDX184, R7128, boceprevir, MK-7009, SIRNA-034, MK-0608, R7128, RG7347, RG7348, TMC435, PF-868554, PF-4878691, TT033, BI201335, BI 207127, BMS-790052, BMS-791325, BMS-650032, BMS-824393, ANA598, VCH-759, G1 50005, ITX5061, ITX4520, IDX184, IDX320, IDX375, A-837093, GS 9190, GS 9256, ACH-1095, ACH-1625, PPI-461, PPI1301, TG4040, AZD7295, quimizol, SPC3649, GNI-104, ID-12, GSK625433, ABT-450, ABT-072, ABT-333, PSO-7977, INX09189, pSI-938, EDP-239, SDC-101, SP-30, AVL-181, VX-500 y combinaciones de los mismos.

En una realización preferente, el fármaco se selecciona del grupo que consiste en primaquina, doxorubicina e inhibidores de girasa, preferentemente levofloxacina.

Doxorubicina se utiliza como fármaco de primera línea para el tratamiento de CHC primario y se ha observado que actúa como fármaco anti-malaria (Friedman R, (2009); 38; Gamo FJ et al. (2010); 39). Sin embargo, la doxorubicina presenta una severa cardiotoxicidad y nefrotoxicidad. El acoplamiento de doxorubicina con los péptidos modificados hidrófobos de la invención elimina la toxicidad diana de este fármaco.

Los inhibidores de girasa de la clase fluoroquinilona, como levofloxacina, están reconocidos por inhibir la malaria en fase del hígado (Friesen et al., Scie. Transl. Med., 2010; 40). Para ser eficaces como fármaco contra la malaria, es necesario un uso diario a largo plazo. Además, se sabe que los inhibidores de girasa desarrollan intolerancia cuando se requiere una alta dosis a largo plazo. El acoplamiento de inhibidores de girasa como levofloxacina puede reducir el uso de una alta dosis y permitir una inducción de liberación sostenida mediante el uso de una inyección subcutánea.

Los fármacos que se han especificado pueden utilizarse en solitario en cualquier combinación adecuada. Las combinaciones preferentes para el tratamiento de carcinoma hepatocelular inextirpable son combinaciones de

bortezomib y doxorubicina; sorafenib y doxorubicina; botezomib y sorafenib; erlotinib y fluorouracil; erlotinib, fluorouracil e interferón- $\alpha$ ; cisplatino y doxorubicina; y cisplatino, doxorubicina y erlotinib.

5 Las combinaciones preferentes para el tratamiento de cánceres colorrectales metastatizados son irinotecano y fluorouracil, irinotecano y erlotinib, oxaliplatino y fluorouracil, FOLFOX (oxaliplatino, fluorouracil, lencovorina), cisplatino y doxociclina.

10 Las combinaciones preferentes para el tratamiento de malaria en fase del hígado son: primaquina y clindamicina, primaquina y azitromicina, ciprofloxacina, doxociclina y atovaquona, primaquina, ciprofloxacina y rifampicina, primaquina, rifampicina y dapsona.

15 Las combinaciones preferentes para el tratamiento de hepatitis C crónica son: interferón- $\alpha$  y ribavirina, telepravir y ribavirina, telepravir, ribavirina e interferón- $\alpha$ , boceprevir y ribavirina, boceprevir, ribavirina e interferón- $\alpha$ , ciclosporina e interferón- $\alpha$ .

Las combinaciones preferentes para el tratamiento de hepatitis B son: tenofovir y entecavir, tenofovir e interferón- $\alpha$ , entecavir e interferón- $\alpha$ , tenofovir, entecavir e interferón- $\alpha$ .

20 Otra información sobre los fármacos, sus acciones y combinaciones adecuadas de fármacos para la prevención y/o tratamiento de enfermedades o trastornos hepáticos puede obtenerse de Chen, K. F., H. C. Yu, *et al.* (2010); Czauderna, P., G. Mackinlay, *et al.* (2002); Javle, M. and C. T. Hsueh (2009); Lee, J., J. O. Park, *et al.* (2004); Mendelsohn, J. and J. Baselga (2000); Patt, Y. Z., M. M. Hassan, *et al.* (2003); Richly, H., B. Schultheis, *et al.* (2009). Falcone, A., S. Ricci, *et al.* (2007); Javle, M. and C. T. Hsueh (2009); Sagar, J., K. Sales, *et al.* (2010); Seymour, M. T., T. S. Maughan, *et al.* (2007); Tournigand, C., T. Andre, *et al.* (2004); Kappe, S. H., A. M. Vaughan, *et al.* (2010); Goodman, C. D., V. Su, *et al.* (2007); Zeuzem, S. (2004). McHutchison, J. G., G. T. Everson, *et al.* (2009); Nelson, DR, Ghalib, RH, Sulkowski, M, *et al.* (2009). "EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B." *J Hepatol* 50(2): 227-242; Liaw, y. F., N. Leung, *et al.* (2005); Lok, A. S. and B. J. McMahon (2009) Kornhuber, J., P. Tripathi, *et al.* (2008); Gastaminza, p., C. Whitten-Bauer, *et al.* (2010).

30 *Péptidos penetrantes de células*

Pueden acoplarse uno o más péptido(s) penetrante(es) de células (CCP por sus siglas en inglés) con los péptidos modificados hidrófobos de la invención para administrar eficientemente los profármacos y agentes activos intracelulares en los hepatocitos. Preferentemente, los CCP se utilizan en combinación con otros compuestos/fármacos. Las realizaciones preferentes son: CCP acoplados N-terminalmente y primaquina y/o antibióticos para el tratamiento de malaria, CPP acoplados N-terminalmente y análogos de nucleósido para el tratamiento de VHB y VHC, CPP acoplados N-terminalmente e inhibidores de proteasa para el tratamiento de VHC y combinaciones de los mismos. En una realización preferente, los CPP se seleccionan entre poliarginina, penetratina, VHB preS2-TLM, antennapedia.

40 Los CPP acoplados N-terminalmente se pueden utilizar para la administración de conjuntados oligonucleótido-péptido y conjugados de péptido ácido nucleico a los hepatocitos. Una realización preferente es la administración de sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenilbutirato) acoplado a ARNs anti-VHC a los hepatocitos utilizando péptidos HIV-TAT acoplados N-terminalmente. Otros detalles concernientes a los CPP se pueden obtener en Meng, S., B. Wei, *et al.* (2009); de Koning, M. C., G. A. van der Marel, *et al.* (2003) y Zatsepin, T. S., J. J. Turner, *et al.* (2005).

#### *Combinación con marcador*

50 En una realización preferente más, se combina un fármaco con un marcador que consiste en uno o más marcadores acoplado al péptido modificado hidrófobo de la presente invención, con el que se acopla uno o más fármacos. Gracias a esta combinación, se puede controlar la administración del fármaco al hígado detectando el marcador. Los marcadores pueden ser cualquier tipo de compuesto adecuado para fines de diagnóstico y que se pueda acoplar con el péptido modificado hidrófobo de la presente invención a través de los métodos descritos. Preferentemente, el marcador se selecciona entre un colorante fluorescente, un radioisótopo o un agente de contraste. De acuerdo con la presente invención, un agente de contraste es un colorante u otra sustancia que ayuda a mostrar las áreas anormales dentro del cuerpo. Los radioisótopos/isótopos de emisión de fluorescencia preferentes se seleccionan del grupo que consiste en isótopos de radiación alfa, isótopos de radiación gamma, isótopos de emisión de electrones Auger, isótopos de emisión de rayos X, isótopos de emisión de fluorescencia, tales como  $^{18}\text{F}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{72}\text{Se}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{101\text{m}}\text{Rh}$ ,  $^{119}\text{Sb}$ ,  $^{128}\text{Ba}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{169}\text{Eu}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{198}\text{Au}$  y  $^{199}\text{Ag}$ . Los colorantes fluorescentes preferentes se seleccionan entre las siguientes clases de colorantes: xantenos (p.ej., fluoresceína), acridinas (p.ej., amarillo de acridina), oxazinas (p.ej. oxazina 1), cininas (p.ej. Cy7 / Cy 3), colorantes de estirilo (p.ej. colorante-28), Cumarinas (p.ej. Alexa Fluor 350), porfirinas (p.ej. clorofila B), complejos de metal-ligando (p.ej. PtOEPK), proteínas fluorescentes (p.ej. APC, R-ficoeritrina), nanocristales (p.ej. Quantum-dot 705), perilenos (p.ej. rojo F300 de Lumogen) y ftalocianinas (p.ej. IRDYE™700DX) así como conjugados y combinaciones de estas clases de colorantes. Los agentes de contraste preferentes se seleccionan entre agentes

paramagnéticos, p.ej. Gd, Eu, W y Mn, preferentemente formando complejo con un agente quelante. Otras opciones son complejos supramagnéticos de hierro (Fe) y partículas, compuestos que contienen átomos de un alto número atómico, es decir, yodo para tomografía computarizada (TC), micro-burbujas y vehículos, como liposomas que contienen estos agentes de contraste.

5

#### *Agente quelante*

El compuesto que se administra específicamente a los hepatocitos puede unirse al péptido modificado hidrófobo en forma de un complejo con un agente quelante que es capaz de formar complejos con el compuesto correspondiente.

10 En una realización preferente de la invención, el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N,N'-tetraacético (DOTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 1,4,7-triazaciclononan-1,4,7-triacético (NOTA), trietilentetramina (TETA), ácido iminodiacético, ácido dietilentriamina-N,N,N',N',N"-pentaacético (DTPA) y ácido 6-hidrazinopiridina-3-carboxílico (HYNIC), si bien es particularmente preferente ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N,N'-tetraacético (DOTA).

15

#### *Acoplamiento de un compuesto con el péptido modificado hidrófobo*

El acoplamiento del (los) compuesto(s) con los correspondientes aminoácidos de X puede llevarse a cabo a través de cualquier método adecuado conocido entre las personas especializadas en la técnica.

20

En una realización preferente de la presente invención, se acopla(n) el (los) compuesto(s) con el correspondiente aminoácido de X utilizando un éster activado. En particular, se puede utilizar este método en el caso del acoplamiento de compuesto(s) con los aminoácidos de X que tiene un grupo amino en una cadena lateral. Alternativamente, se pueden emplear los siguientes métodos de acoplamiento para acoplar uno o más compuestos con los aminoácidos de X correspondientes, que se resumen brevemente. El químico especialista puede determinar fácilmente las condiciones de reacción específicas para conseguir el acoplamiento de un compuesto con el aminoácido con o sin un engarce:

25

30

- Formación de **amidas** por reacción de una amina y ácidos carboxílicos activados, preferentemente ésteres NHS o carbodiimidas; una carbodiimida es un engarce completo que facilita la conjugación directa de carboxilos con amina primaria. Los ésteres NHS son grupos reactivos formados por activación de moléculas que comprenden grupos carboxilato con carbodiimida.

35

- Unión **disulfuro** utilizando dos tioles y un tiol que reaccionan específicamente con disulfuros de piridilo; los disulfuros de piridilo reaccionan con grupos sulfhidrilo a lo largo de un amplio intervalo de pH (el óptimo es un pH 4-5) para formar uniones disulfuro. Durante la reacción, se produce un intercambio de disulfuro entre el grupo Sh de la molécula y el grupo 2-piridilditiol. Como resultado, se libera piridina-2-tiona.

40

- Formación de **tioéter** utilizando maleimidias o haloacetilos y un componente tiol; los haloacetilos reaccionan con grupos sulfhidrilo a un pH fisiológico. La reacción del grupo yodoacetilo tiene lugar por sustitución nucleofílica de yodo con un átomo de azufre de un grupo sulfhidrilo para dar como resultado una unión tioéter estable. El grupo maleimida reacciona específicamente con grupos sulfhidrilo cuando el pH de la mezcla de reacción está comprendido entre pH 6,5 y 7,5 y forma una unión tioéter estable que no es reversible.

45

- Formación de **amidina** utilizando un imidoéster y una amina; los reticuladores de imidoéster reaccionan rápidamente con aminas a un pH alcalino pero tienen una semi-vida corta. A medida que se hace más alcalino el pH, aumentan la semi-vida y la reactividad con aminas; por lo tanto, la reticulación es más eficiente cuando se realiza a un pH 10 que cuando se realiza a un pH 8. Las condiciones de reacción por debajo de pH 10 pueden tener como resultado reacciones secundarias, si bien la formación de amidina se favorece a un pH entre 8 y 10.

50

- Unión de **hidrazida** utilizando carbonilos (p.ej., aldehídos) e hidrazidas; los carbonilos (aldehídos y cetonas) reaccionan con hidrazidas y aminas a un pH 5-7. Los carbonilos no existen fácilmente en proteínas; sin embargo, la oxidación suave de glicoles de azúcar utilizando meta-periodato de sodio convierte los hidroxilos próximos en aldehídos o cetonas. La posterior reacción con hidrazidas tiene como resultado la formación de un enlace hidrazona.

55

- Unión de **amina** utilizando carbonilos y aminas en condiciones reductoras; la aminación reductora (también conocida como alquilación reductora) es una forma de aminación que implica la conversión de un grupo carbonilo en una amina a través de una imina intermedia. El grupo carbonilo es comúnmente sobre todo una cetona o un aldehído.

60

- Formación de **triazol** catalizada por cobre utilizando nitrilos y azidas. Se utiliza la cicloadición 1,3-dipolar de tipo Huisgen entre una azida y una alquina interna o terminal para dar 1,2,3-triazoles estables.

65

- Formación de **isotiourea** utilizando isotiocianatos y aminas; la reacción entre isotiocianatos y aminas, es decir, los grupos ε-amino de lisina lleva a un enlace isotiourea estable.

- Formación de **ésteres** por reacción de un alcohol y ácidos carboxílicos activados, preferentemente cloruros de ácido y carbodiimidias; la reacción a alta temperatura permite una reacción directa entre alcoholes y ácidos carboxílicos para formar ésteres estables, alternativamente, los ácidos carboxílicos pueden activarse en condiciones catalíticas ácidas o básicas.
- 5 - Formación de **éteres** por reacción de un alcohol y haluros de alquilo. Los haloalcanos son reactivos con nucleófilos. Tienen moléculas polares: el carbono al que se une el halógeno es ligeramente electropositivo, mientras que el halógeno es ligeramente electronegativo. Esto tiene como resultado un carbono deficiente electrónicamente (electrófilo) que, inevitablemente, atrae nucleófilos.

10 *Engarce/espaciador del compuesto (p.ej., un fármaco)*

El péptido modificado hidrófobo, en particular los conjugados de la presente invención se utilizan preferentemente para enriquecer un compuesto que es lanzado hacia el hígado, en el hígado. Preferentemente, los compuestos se escinden desde el conjugado con un polipéptido modificado hidrófobo mediante una proteína del hígado, preferentemente una enzima proteolítica hepatocelular, en particular *in vivo* en el hígado. El compuesto (p.ej., fármaco) y el péptido modificado hidrófobo forman un conjugado. Preferentemente, se forma el conjugado de un compuesto y un péptido modificado hidrófobo por unión covalente o por formación de complejo. La forma de unión depende del tipo de compuesto.

20 El acoplamiento del (los) compuesto(s) (p.ej., fármaco(s) con los correspondientes aminoácidos de X puede llevarse a cabo utilizando un espaciador o engarce. El engarce o espaciador es conocido entre las personas especializadas, como por ejemplo polialanina, poliglicina, hidratos de carbono, grupos  $(CH_2)_n$  o secuencias de aminoácidos. Las personas especializadas en la técnica podrán por tanto seleccionar el(los) engarce(s) o espaciador(es) adecuado(s) dependiendo de la aplicación correspondiente. El espaciador o engarce comprende preferentemente un sitio de reconocimiento para la activación específica de hepatocito, que es reconocida preferentemente por una proteína específica de hígado o tumor. El sitio de reconocimiento es preferentemente un sitio de escisión proteolítica. La proteína hepática es por tanto preferentemente una proteína hepatocelular, más preferentemente una enzima proteolítica hepatocelular o una enzima proteolítica que está sobre expresada en un tumor, p.ej., MMP7. Por lo tanto, el péptido modificado hidrófobo se puede administrar a un sujeto y se transportará a través del organismo, por ejemplo en los fluidos del cuerpo, sin escindirse. Sin embargo, tan pronto como el péptido modificado hidrófobo alcance su diana, el hígado o los hepatocitos, respectivamente, la proteína hepática, como pueda ser una enzima proteolítica hepatocelular escindirán el sitio de escisión proteolítica y liberará el compuesto de su lanzadera, es decir el péptido modificado hidrófobo.

35 Otras proteínas hepáticas preferentes son citocromos, como por ejemplo citocromo P450 o liasas de la ruta endocítica. La tecnología HepDirect(R) (de Metabasis Technologies, Inc.) utilizada en Adefovir o Pradevofir, también es adecuada para la presente invención.

40 Reviste una particular importancia para enfermedades tumorales, como las alteraciones neoplásicas por metástasis de carcinomas, p.ej., carcinomas de colon, el intercambio entre el tejido maligno y el tejido que lo rodea. Es necesaria la activación de células epiteliales sanas y/o el reclutamiento de células inmunes, que es un requisito previo para la formación de metástasis distante de un tumor primario. Los análisis de tejido han demostrado que los niveles de expresión ARNm específico de tumor de metaloproteasas de matriz (MMP1, MMP2, MMP7, MMP9 y MMP12) están asociados con un mal pronóstico de pacientes con tumor (Gentner b. et al., Anti-cáncer Res. 2009 Jan; 29(1):67-74). De estas proteasas, MMP7 especialmente reviste un gran interés ya que es expresado principalmente por células tumorales. El acoplamiento de un fármaco con la secuencia de péptidos descrita a través de una secuencia de engarce que contiene el sitio de unión proteolítica específico para MMP7 (p.ej., una secuencia de péptido corta GCHAK o RPLALWRS), aunque también todos los demás sustratos MMP7 (p.ej., fibronectina, elastina, caseína u otros) permitirá administrar un profármaco inactivo al hígado a través de la modificación del péptido original a través de los medios descritos. En el hígado, los péptidos modificados se escindirán entonces preferentemente en el entorno directo del tejido del tumor y se activará el profármaco inactivo. Este método de administración de fármaco al hígado dirigido principalmente a carcinomas hepatocelulares o metástasis en el hígado que sobre expresan uno de los MMP enumerados (p.ej., metástasis de carcinoma de colon) presenta una nueva forma de dirigir fármacos tejidos de tumor.

55 En una realización, se forma el conjugado de compuesto y el péptido derivado modificado hidrófobo por formación de complejo. Los complejos preferentes útiles en la invención son biotina/avinda, poliarginina/oligonucleótido (p.ej., ARNsi). Las personas especializadas podrán determinar los componentes de complejo adecuados y diseñar el compuesto y el péptido modificado hidrófobo en consecuencia.

60 *Prevención y tratamiento de enfermedades de hígado*

En una realización preferente de la invención se proporcionan los péptidos modificados hidrófobos, en particular sus conjugados con compuestos para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático.

65

Dependiendo de la enfermedad o trastorno hepático objeto de la prevención y/o tratamiento, se seleccionará el compuesto correspondiente y se administrará selectiva y específicamente al hígado. Una “enfermedad hepática” o un “trastorno hepático” de acuerdo con la presente invención se refiere a una enfermedad o trastorno que tiene efecto sobre el órgano hígado, el tejido del hígado o los hepatocitos, o que está relacionado con ellos,

- 5 Entre los ejemplos de enfermedades hepáticas se incluyen:
- Hepatitis: Inflamación del hígado causada principalmente por diversos virus, aunque también por ciertos venenos, autoinmunidad o enfermedades hereditarias;
  - 10 - Cirrosis: formación de tejido fibrosos en el hígado, que reemplaza las células muertas del hígado. La muerte de las células del hígado puede ser causada por ejemplo por hepatitis vírica, alcoholismo o contacto con otras sustancias químicas tóxicas para el hígado;
  - Hemocromatosis: una enfermedad hereditaria que causa la acumulación de hierro en el cuerpo, produciendo en última instancia daños en el hígado;
  - 15 - Cáncer de hígado: carcinoma hepatocelular primario (CHC) o colangiocarcinoma cánceres metastásicos, normalmente de otras partes del tracto gastrointestinal;
  - Enfermedad de Wilson: una enfermedad hereditaria que causa que el organismo retenga el cobre;
  - Colangitis esclerosante primaria: una enfermedad inflamatoria del conducto biliar; autoinmune por naturaleza;
  - Cirrosis biliar primaria: enfermedad autoinmune de los conductos biliares pequeños;
  - 20 - Síndrome de Budd-Chiari: obstrucción de la vena hepática;
  - Síndrome de Gilbert: un trastorno genético del metabolismo de la bilirrubina, observado en aproximadamente un 5 % de la población;
  - Enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II: la acumulación de glucógeno causa una debilidad muscular progresiva (miopatía) en todo el cuerpo y afecta a varios tejidos del organismo, en particular, en el
  - 25 - Enfermedad hepática pediátrica, como atresia biliar, deficiencia de alfa-1-antitripsina, síndrome de Alagille y colestasis intrahepática familiar;
  - Enfermedades metabólicas.
- 30 Asimismo, se incluyen las enfermedades hepáticas de animales, como por ejemplo mascotas o ganado, en particular, las enfermedades transmitidas a los seres humanos, como toxoplasmosis.

La enfermedad o trastorno hepático que se debe prevenir y/o tratar se selecciona preferentemente entre hepatitis, cirrosis, hemocromatosis, preferentemente hepatitis causada por virus de la hepatitis A, B, C, D, E, F, G y H. La enfermedad o trastorno hepático que se debe prevenir y/o tratar puede ser también hepatitis concomitante causada por virus como virus de la familia *Herpesviridae*, p.ej. herpes virus, virus citomegálico (VCM), aunque también el virus zoster de la varicela (VZV), virus de Epstein Barr (EBV), virus coxsackie, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue. La enfermedad o trastorno hepático que se debe prevenir y/o tratar puede ser también una enfermedad que implica una fase del hígado de un virus o un patógeno no viral, como ocurre con muchas enfermedades tropicales, por ejemplo. Dado que el estado en el hígado de algunos patógenos es una fase temprana, la infección correspondiente puede tratarse de forma selectiva y específica en dicha primera fase. Dichos virus son virus de la hepatitis A, B, C, D, E, F, G y H, herpes virus.

Dichos patógenos no virales son bacterias, parásitos y/o gusanos. Los parásitos son por ejemplo parásitos protozoos del género *Plasmodium* que causa la malaria, como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* y especies relacionadas (p.ej. *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowles*[iota]). Dichos gusanos son por ejemplo platelmintos del género *Schistosoma* que causa la esquistosomiasis y bilarciosis, como *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma haematobio*, *Schistosoma japonicum* y *Schistosoma mekongi*. Dichos parásitos son por ejemplo protozoos *Leishmania trypanosome* del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, responsables de la enfermedad leishmaniasis. Por tanto, es posible prevenir y/o tratar malaria, esquistosomiasis (bilarciosis) y/o leishmaniasis con la presente invención. Por lo tanto, es posible prevenir y/o tratar ciertas enfermedades tropicales con la presente invención.

Las enfermedades o trastornos hepáticos que se pueden prevenir y/o tratar son preferentemente tumores de hígado, preferentemente carcinoma hepatocelular (CHC) o alteraciones neoplásicas por metástasis de tumores sólidos, p.ej., carcinomas de colon. La enfermedad o trastorno hepático que se debe prevenir y/o tratar también puede ser una enfermedad metabólica, como diabetes, hiperlipidemia, síndrome metabólico y obesidad, hiperglucemia crónica, síndrome metabólico, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (véase también (9)).

En una realización preferente de la invención, se proporcionan los péptidos modificados hidrófobos indicados, en particular, sus conjugados con compuestos, para la regulación de la función del hígado.

Es preferente su uso para la presentación de antígeno mediada por hepatocitos y la activación de respuestas inmunes dirigidas al hígado. En este caso, el compuesto que se administre al hígado es preferentemente un epítipo inmunógeno.

En una realización preferente de la invención, los péptidos modificados hidrófobos descritos, preferentemente los péptidos derivados acilados, en particular sus conjugados con compuestos, pueden utilizarse para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático.

#### 5 *Composiciones farmacéuticas*

Tal como se ha señalado, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido modificado hidrófobo, tal como se ha definido en el presente documento, y al menos un compuesto para administrarlo específicamente al hígado, tal como se ha definido en el presente documento y, opcionalmente, un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende:

- al menos un péptido modificado hidrófobo tal como se define en el presente documento; y
- opcionalmente, un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se adaptan perfectamente para todos los usos y métodos descritos en el presente documento.

Un "vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier vehículo en el que se pueden formular o con el que se puede formular las composiciones farmacéuticas o de vacuna de acuerdo con la invención. Incluye una solución salina, como por ejemplo solución salina tamponada con fosfato, tampón citrato, NaCl, glucosida de octilo o poloxámero. En general, el diluyente o vehículo se selecciona sobre la base del modo y la ruta de administración y la práctica farmacéutica normal.

#### 25 *Método de tratamiento*

Asimismo, y tal como se ha señalado, la presente invención proporciona métodos para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático utilizando el(los) péptido(s) modificado(s) hidrófobo(s) descritos o la(s) composiciones farmacéuticas de la invención.

La presente invención proporciona asimismo un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático por administración a un sujeto de un conjugado tal como se define en el presente documento, que comprende un péptido derivado modificado hidrófobo y un compuesto (p.ej., un fármaco) o una composición farmacéutica, tal como se ha definido en el presente documento. El método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático de acuerdo con la invención comprende la administración al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz de:

- (a) un péptido modificado hidrófobo tal como se ha definido y que comprende al menos un compuesto (p.ej., un fármaco) tal como se ha definido, o
- (b) una composición farmacéutica, tal como se ha definido.

#### *Ruta de administración*

Preferentemente, la ruta de administración de los conjugados o composiciones farmacéuticas de la presente invención, en particular, en el método de tratamiento, se selecciona entre subcutánea, intravenosa, oral, nasal, intramuscular, transdérmica, inhalación o por supositorio. En una realización preferente para la administración o aplicación nasal, es spray nasal.

En otra realización preferente más, se disuelve el péptido modificado hidrófobo de la invención que comprende un compuesto (p.ej. un fármaco) en suero del paciente y se aplica por inyección.

#### *Cantidad terapéuticamente eficaz*

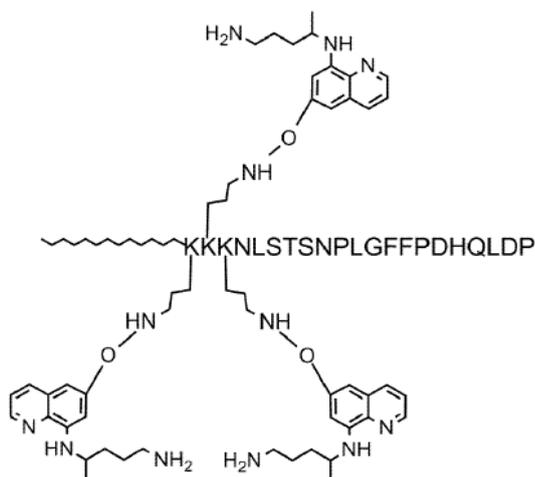
Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un péptido modificado hidrófobo o una composición farmacéutica de la presente invención se refiere a la cantidad que es suficiente para prevenir y/o tratar la enfermedad o trastorno hepático correspondiente. La cantidad terapéuticamente eficaz preferente depende del compuesto correspondiente que se vaya a administrar y su potencial terapéutico correspondiente. Las personas especializadas podrán determinar la cantidad terapéuticamente eficaz adecuada. En una realización preferente, la cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra en el intervalo de 10 pmoles por kg a 20  $\mu$ moles por kg de peso corporal. Para su uso como agente terapéutico (es decir, un fármaco está acoplado con el péptido modificado hidrófobo) una cantidad preferente para su aplicación a un paciente está comprendida en el intervalo de 100 nmoles por kg a 2  $\mu$ moles por kg de peso corporal.

65

*Péptidos modificados hidrófobos de la invención preferentes*

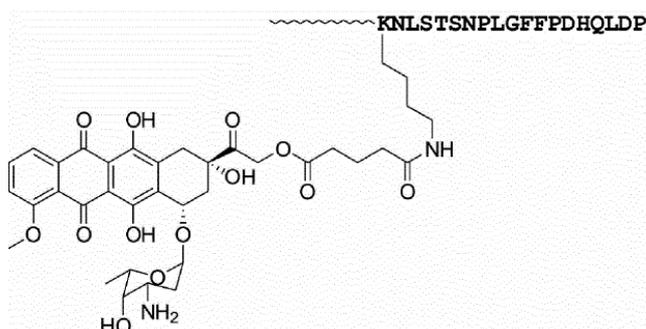
A continuación, se proporciona péptidos modificados hidrófobos de la invención preferentes. Dichos péptidos modificados hidrófobos se basan en la secuencia de aminoácidos KKKNLSTSNPLGFFPDHQLDP (SEQ ID NO. 14) o KKKNLSTSNPLGFFPDHQLDP (SEQ ID NO. 15), en las que pueden estar suprimidas o sustituidas una o dos de las lisinas N-terminales (K) por otro aminoácido.

Un ejemplo de péptido modificado hidrófobo tiene la siguiente estructura química:



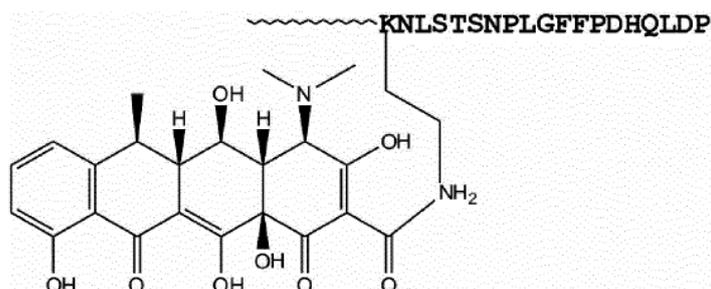
La secuencia de aminoácidos del compuesto que tiene la estructura química ilustrada es estearoil-[K(primaquina)] [K(primaquina)] [K(primaquina)]-NLSTSNPLGFFPDHQLDP, en la que se acopla a cada una de las tres lisinas N-terminales (KKK) una molécula de primaquina y la primera lisina N-terminal está modificada además con un grupo estearoil hidrófobo. En conexión con esto, debe señalarse que las fórmulas de los péptidos modificados hidrófobos de la invención se simplifican en el texto de modo que el péptido modificado hidrófobo del ejemplo puede designarse también "estearoil-[K(primaquina)] 3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP"

Otro ejemplo de péptido modificado hidrófobo preferente tiene la siguiente estructura química:



miristoil-[K-Doxorrubicina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDP (VHBpreS/myr- [K-Doxorrubicina]3-20).

Otro ejemplo más de péptido modificado hidrófobo preferente tiene la siguiente estructura química:



miristoil-[K-Levofloxacin]-NLSTSNPLGFFPDHQLDP (VHBpreS/myr- [K-Levofloxacin]3-20)

A continuación, se indican péptidos modificados hidrófobos de la invención preferentes, así como sus usos específicos preferentes en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos hepáticos:

- 5 - Estearoil-[K(primaquina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y estearoil-[K(GCHAK-primaquina)]-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de malaria en la fase del hígado, especialmente terciana;
- Miristoil-[K(Doxociclina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y miristoil-[K(GCHAK Doxociclina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de alteraciones neoplásicas de  
10 sobreexpresión de MMP 7 en el hígado;
- Miristoil-[K(Penicilina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y miristoil-[K(GCHAK Penicilina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas en el hígado;
- 15 - Miristoil-[K(Ciclosporina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y miristoil-[K(GCHAK Ciclosporina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de pacientes antes y después de trasplante de hígado;
- Miristoil-[K(Rapamune™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y miristoil-[K(GCHAK Rapamune™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de pacientes antes y después de trasplante de hígado;
- 20 - Estearoil-[K(RPLALWRS-Velcade™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en la inhibición de neoangiogénesis en alteraciones neoplásicas del hígado;
- Estearoil-[K(Nexavar™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y estearoil-[K(RPLALWRS-Nexavar™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en la inhibición de neoangiogénesis en alteraciones neoplásicas del hígado; y
- 25 - Estearoil-[K(Tiazolidinodiona)]3 -NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de esteatosis, diabetes melítus tipo 2 y la inhibición de neoangiogénesis.
- Estearoil-[K(primaquina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y estearoil-[K(GCHAK-primaquina)]-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de malaria en la fase del hígado, especialmente terciana;
- 30 - Miristoil-[K(Doxociclina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y miristoil-[K(GCHAK Doxociclina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de alteraciones neoplásicas de sobreexpresión de MMP 7 en el hígado;
- Miristoil-[K(Penicilina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y miristoil-[K(GCHAK Penicilina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas en el  
35 hígado;
- Miristoil-[K(Ciclosporina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y miristoil-[K(GCHAK Ciclosporina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de pacientes antes y después de trasplante de hígado;
- Miristoil-[K(Rapamune™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y miristoil-[K(GCHAK Rapamune™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de pacientes antes y después de trasplante de hígado;
- 40 - Estearoil-[K(RPLALWRS-Velcade™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en la inhibición de neoangiogénesis en alteraciones neoplásicas en el hígado;
- Estearoil-[K(Nexavar™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y estearoil-[K(RPLALWRS-Nexavar™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en la inhibición de neoangiogénesis en alteraciones neoplásicas en el hígado;
- 45 - Estearoil-[K(Tiazolidinodiona)]3 -NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de esteatosis, diabetes melítus tipo 2 y la inhibición de neoangiogénesis;
- Miristoil-[K-Doxorrubicina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDP preferentemente para su uso en el tratamiento de cáncer, preferentemente CHC primario (carcinoma hepatocelular) o malaria; y
- 50 - Miristoil-[K-Levofloxacin]-NLSTSNPLGFFPDHQLDP (VHBpreS/myr- [K-Levofloxacin]3-20y) para el tratamiento de malaria.

Tabla 1. Péptidos modificados hidrófobos preferentes

Péptido modificado hidrófobo	Agente de copulación	Aplicación
estearoil-[K (Primaquina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Primaquina	Tratamiento de malaria terciana
miristoil-[K (Doxociclina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Doxociclina	Tratamiento de alteraciones neoplásicas de sobreexpresión de MMP7 en el hígado
miristoil-[K (Penicilina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Penicilina	Tratamiento de infecciones bacterianas en el hígado
estearoil-[K(RPLALWRSVelcade™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Velcade™	Inhibición de neoangiogénesis

Péptido modificado hidrófobo	Agente de copulación	Aplicación
miristoil-[K (Rapamune™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Rapamune™	Para el tratamiento de pacientes antes y después de trasplante de hígado
miristoil-[K (Ciclosporina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Ciclosporina™	Para el tratamiento de pacientes antes y después de trasplante de hígado
estearoil-[K(Tiazolidinediona)]3 nLSTSNPLGFFPDHQLDP	Tiazolidinediona (glitazonas)	Tratamiento de diabetes melitus tipo 2, esteatosis y neoangiogénesis en el hígado
estearoil-[K (Nexavar™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Nexavar™	Inhibición de neoangiogénesis en el hígado
miristoil-[K(Doxorrubicina)-nLSTSNPLGFFPDHQLDP	Doxorrubicina	Fármaco de primera línea para CHC primario; fármaco anti-malaria
miristoil-[K(Levofloxacina)-nLSTSNPLGFFPDHQLDP	Levofloxacina	Tratamiento de malaria terciana por inhibición de la fase del hígado de malaria
estearoil-[K (Primaquina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Primaquina	Tratamiento de malaria terciana
miristoil-[K (Doxiciclina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Doxiciclina	Tratamiento de alteraciones neoplásicas de sobreexpresión de MMP7 en el hígado
miristoil-[K (Penicilina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Penicilina	Tratamiento de infecciones bacterianas en el hígado
estearoil-[K(RPLALWRSVelcade™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Velcade™	Inhibición de neoangiogénesis
miristoil-[K (Rapamune™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Rapamune™	Para el tratamiento de pacientes antes y después de trasplante de hígado
miristoil-[K (Ciclosporina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Ciclosporina™	Para el tratamiento de pacientes antes y después de trasplante de hígado
estearoil-[K(Tiazolidindiona)]3 nLSTSNPLGFFPDHQLDP	Tiazolidinediona (glitazonas)	Tratamiento de diabetes melitus tipo 2, esteatosis y neoangiogénesis en el hígado
estearoil-[K (Nexavar™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP	Nexavar™	Inhibición de neoangiogénesis en el hígado

myr se refiere a miristoilación del término N; palm se refiere a palmitoilación del término N; estearoil se refiere a estereoilación del término N.

- 5 Los siguientes ejemplos y dibujos ilustran la presente invención sin limitarla por ello.

#### Breve descripción de las figuras

- 10 Fig. 1: Representación esquemática de la partícula de VHB y las proteínas L, M- y S- VHB. El ADN parcialmente bicatenario se asocia covalentemente con el complejo de polimerasa viral, que consiste en la proteína terminal, (TP), la transcriptasa inversa (RT) y ARNasaH. El genoma está encapsulado con una cubierta isocahédrica, construida de 120 dímeros de núcleo-proteína. Las 3 proteínas de superficie de VHB L-, M- y S- están embebidas en una bicapa de lípido derivada de ER. Las proteínas L y M contienen el dominio S completo que sirve como anclaje de membrana. La representación esquemática del genoma de ADN parcialmente bicatenario
- 15 de VHB; C = proteína de núcleo que forma la cápside viral; X = X Proteína, un transactivación pleiotrópico con función indefinida; P = Polimerasa viral; combinaciones preS1 / preS2 / S de ellos forman la proteína de superficie de VHB (preS1/preS2/S) larga (proteína L) proteína de superficie de VHB media (preS2/S) de VHB y la proteína de superficie de VHB pequeña (S).
- 20 Fig. 2: Diagrama esquemático de la fórmula general del péptido modificado hidrófobo de la presente invención y un ejemplo de un péptido modificado hidrófobo de la invención.
- Fig. 3: Diagrama esquemático de la unión de un péptido modificado hidrófobo de la invención con la superficie de un hepatocito.
- Fig. 4: imagen PET de una rata portadora de tumor. Fig. 4A Enriquecimiento específico de 400 nmoles/kg de estearoil-[K(DOTA[68Ga])3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP- amida en el hígado de una rata WAG/Rji cinco minutos
- 25 después de la inyección i.v. Fig. 4B Contratación utilizando <sup>18</sup>F -FDG 24 horas después de la medición inicial. Se enriquece <sup>18</sup>F-FDG en órganos que consumen grandes cantidades de glucosa, en la imagen el corazón (masa gris en la parte superior) y el tumor enriquecen glucosa (no se muestra <sup>18</sup>F -FDG enriquecido en el cerebro con por razones técnicas). Fig. 4C Fusión de ambas imágenes que demuestran la especificidad de los péptidos que tiñen el tejido del hígado solamente, pero no el tejido de tumor.
- 30 Fig. 5: Distribución en los órganos de péptidos modificados con doxorrubicina.

Fig. 6: Ensayo de viabilidad celular con hepatocitos de ratón primarios. Fig 6A Medición 12h de hepatocitos de ratón primarios incubados durante 12 horas con doxorubicina acoplada a péptidos preS modificados N-terminalmente (conjugados) y controles. Fig. 6B Medición 12h de hepatocitos de ratón primarios incubados durante 12 horas con doxorubicina acoplada a péptidos preS modificados N-terminalmente (conjugados) y controles.

Fig. 7: Ensayo de viabilidad celular con células HepG2. Medición 12h de células HepG2 incubadas durante 12 horas con doxorubicina acoplada a péptidos preS modificados N-terminalmente (conjugados) y controles

Fig. 8: Resumen de imágenes PET de ratas a las que se les ha inyectado miristoil-[K-Levofloxacina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDPy-<sup>131</sup>I(VHBpreS/myr- [K-Levofloxacina]3-20y-<sup>131</sup>I). Fig. 8A Resumen de imágenes PET de una rata a la que se le ha inyectado VHBpreS/myr-[K-Levofloxacina] 3-20y-<sup>131</sup>I que cubre 0-20 minutos tras la inyección. Fig. 8B Resumen de imágenes PET de una rata a la que se le ha inyectado miristoil-[K-Levofloxacina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDPy-<sup>131</sup>I (VHBpreS/myr- [K-Levofloxacina]3-20y-<sup>131</sup>I) que cubre 20-40 minutos tras la inyección. Fig. 8C Resumen de imágenes PET de una rata a la que se le ha inyectado miristoil-[K-Levofloxacina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDPy-<sup>131</sup>I (VHBpreS/myr- [K-Levofloxacina]3-20y-<sup>131</sup>I) que cubre 40-60 minutos tras la inyección.

Fig. 8D Resumen de imágenes PET de una rata a la que se le ha inyectado miristoil-[K-Levofloxacina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDPy-<sup>131</sup>I (VHBpreS/myr- [K-Levofloxacina]3-20y-<sup>131</sup>I) medido durante 10 min 6 h tras la inyección.

## Ejemplos

En los siguientes ejemplos 1 y 2, se utilizó un péptido hidrófobo que llevaba Gd como marcador formando complejo con DOTA (estearoil-[K(DOTA[Gd])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida para demostrar el principio de acción de la presente invención.

### Ejemplo 1

#### Síntesis de péptido modificado hidrófobo

Se llevó a cabo la síntesis de los péptidos utilizando el método Fmoc tal como se describe en (10) Gripon, P. et al. J. Virol 79, 1613-1622 (2005).

#### Síntesis de DOTA-DFP

Se disolvió diisopropilcarbodiimida (5 mmoles, 631 mg, 774 µl) en piridina (15 ml) y se vertió durante 10 minutos a una solución de DOTA (5 mmol, 2,02 g) y difluoro fenol (5 mmol, 650 mg) en agua (60 ml) al mismo tiempo que se agitaba. Al cabo de 30 min de la adición, se extrajo la mezcla de reacción tres veces con diclorometano y se evaporó la fase acuosa a sequedad utilizando un evaporador rotatorio. Se disolvió el producto en bruto en una mezcla de agua (11 ml) y acetonitrilo (3 ml) y se purificó por RP-HPLC preparativa. Se concentraron las fracciones de HPLC que contenían el producto por liofilización. Rendimiento: 1,0633 g (41 %).

#### Acoplamiento al péptido

Se disolvió el péptido estearoil-KKKNLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida (140 mg, 0,055 mmoles) en 5ml de DMF. Se añadió DOTA-DFP (129 mg, 0,25 mmol) y además DIPEA (410 µl, 2,5 mmoles). Se agitó la mezcla durante toda la noche a 50 °C. Se añadió éter dietílico hasta que precipitó; se separó el precipitado utilizando una centrifuga y se lavó dos veces con éter dietílico. Se purificó el producto en bruto utilizando RP-HPLC. Se llevó a efecto la purificación utilizando un gradiente de agua y acetonitrilo, comprendiendo ambos 0,1% ácido trifluoroacético. Se concentraron las fracciones de HPLC que contenían el producto por liofilización. Rendimiento: 112 mg (55 %).

#### Formación de complejo de Gd<sup>3+</sup>

Se disolvió el péptido estearoil-[K(DOTA)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida (112 mg, 0.030 mmoles) en 0,4 M tampón de acetato sódico (pH 5) y se añadió GdCl<sub>3</sub>\*6 H<sub>2</sub>O (335 mg, 0,90 mmoles). Se calentó la mezcla durante 1 hora en un baño de agua mientras se agitaba. Se purificó la mezcla de productos resultante utilizando RP-HPLC. Se llevó a cabo la purificación utilizando un gradiente de agua y acetonitrilo, comprendiendo ambos de ácido trifluoroacético al 0,1 %. Se concentraron las fracciones de HPLC que contenían el producto (estearoil-[K(DOTA[Gd])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida) por liofilización. Rendimiento: 94 mg (77%).

### Ejemplo 2

#### Obtención de imágenes PET

Se disolvió el péptido estearoil-[K(DOTA[<sup>68</sup>Ga])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida en tampón citrato (pH 8,0) + 4 % BSA y se inyectó i.v. en la vena caudal de ratas WAG/Rij portadoras de tumor. Se inyectaron ortópicamente a las ratas 1 x 10<sup>6</sup> células de carcinoma de colon singénicas (células CC531) 10 días antes de las mediciones. El día de la

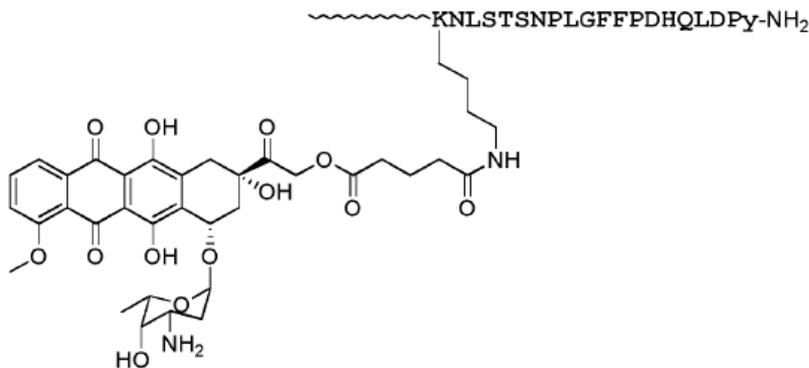
medición, las ratas recibieron el péptido en una concentración de 400 nmoles/kg de peso corporal. Durante los experimentos, se anestesió a las ratas con isoflurano y se mantuvieron a 37 °C. Se realizaron imágenes PET utilizando un sistema Inveon para PET de animales pequeños de Siemens, se comenzó la obtención de imágenes inmediatamente después de la inyección i.v. del péptido 24 horas después de la medición inicial utilizando estearoil-[K(DOTA[68Ga])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida, se inyectó a las ratas <sup>18</sup>F-FDG (Fluodesoxiglucosa (<sup>18</sup>F) en una concentración de milicurios como control. En la **Fig. 4A-C** se muestra una imagen PET representativa de una rata portadora de tumor. **Fig. 4A** enriquecimiento específico con 400 nmoles / kg estearoil-[K(DOTA[68Ga])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida en el hígado de una rata WAG/Rji cinco minutos después de la inyección i.v. Fig. 4B Contraintegración utilizando <sup>18</sup>F-FDG 24 horas después de la medición inicial se enriquece <sup>18</sup>F-FDG en los órganos que consumen altas cantidades de glucosa, en la imagen el corazón (masa gris en la parte superior) y el tumor enriquece glucosa (<sup>18</sup>F-FDG enriquecido en el cerebro no se muestra por razones técnicas). Fig. 4C funde ambas imágenes demostrando la especificidad de los péptidos que tiñen solamente el tejido del hígado pero no el tejido de tumor.

### 15 Ejemplo 3

#### Prueba de especificidad de hígado y citotoxicidad de péptidos preS modificados N-terminalmente acoplados con doxorubicina

20 Se sintetizan péptidos acoplados a doxorubicina, tal como se describe en el presente documento. Brevemente, se utilizó síntesis de péptidos en fase sólida protegidos con FMOC para sintetizar la cadena principal del péptido (KNLSTSNPLGFFPDHQLDPy), a continuación se acopló doxorubicina a la cadena principal del péptido utilizando formación de amida. La "y" en el la cadena principal del péptido representa D-tirosina a la que se puede acoplar yodo 131 para que actúe como marcador para detectar el péptido modificado en ratas. Se purificó el péptido  
25 resultante por HPLC y se analizó la pureza por espectrometría de masa. La pureza del péptido resultante fue 97 % o superior.

A continuación, se muestra un esquema del péptido modificado:



30

miristoil-[K-Doxorubicina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDPy-amida (VHBpreS/myr- [K-Doxorubicina]3-20y)

35 Para demostrar que los péptidos sintetizados resultantes seguían siendo específicos del hígado, se marcó el péptido del esquema C-terminalmente con yodo <sup>131</sup> radioactivo utilizando el método de cloramina T descrito en (Eisenhut y Mier, 2011; 36).

#### Marcado con yodo específico de tirosina

40 Se añaden 10 µl de una solución de péptido 1 mM (disuelto en agua) a 20 µl de tampón fosfato. Se añaden cantidades diversas de solución de Na <sup>131</sup>I radioactivo a la solución de péptido según se requiera para conseguir un marcado completo. La cantidad varía sobre la base de la edad de la solución de Na <sup>131</sup>I radioactivo. Las personas especializadas en la técnica podrán controlar las cantidades requeridas midiendo la actividad radioactiva (recuento). A continuación, se añaden 5 µl de solución cloramina-T (2 mg / ml en agua) y se agita con  
45 vórtice la solución resultante (5 veces) y se centrifuga (8000 g, 3 s, 5 veces). A continuación, se añaden 10 µl de solución de metionina saturada y se invierte con cuidado del vial para el mezclado. A continuación, se purifica la solución resultante utilizando RP-HPLC. Se recoge la fracción de péptido y se seca al vacío. A continuación, se puede resolver el péptido liofilizado marcado en el tampón experimental deseado y utilizarlo para experimentos  
50 en dirección 3'.

A continuación, se resolvieron los péptidos marcados radioactivos en PBS + 3 % BSA, se calentaron a 37°C y se inyectaron en la vena caudal de ratas WAG/RJ. Se sometieron a eutanasia los animales en los puntos temporales

indicados (Fig. 5). Se explantaron los órganos y se midieron con un contador gamma. Se midió cuatro animales por punto temporal. En la Fig. 5 se muestra la distribución de los órganos de los péptidos modificados con doxorubicina indicando la radiación promedio medida por órgano como porcentaje de la dosis inyectada. Tal como se demuestra en la Fig. 5, el tropismo en el hígado no se perjudica con la modificación N-terminal de péptidos preS de VHB con doxorubicina.

A continuación, se analizó si la doxorubicina modificada seguía siendo citotóxica para células. En este experimento, se incubaron hepatocitos de ratón primarios de ratones C57BL/6 tal como se describen en Galle et al.,(1994) (37) se volvieron a sembrar en una placa de 96 pocillos de fondo plano para formar una capa de células confluyente. 24 horas después de la siembra, se incubaron las células con los péptidos sintetizados (conjugado), un producto intermedio de síntesis inactivo de doxorubicina, doxorubicina solamente y, como control adicional, se pre-incubaron las células durante 30 minutos utilizando péptidos sin modificar sin añadir doxorubicina (péptido frío) seguido del péptido sintetizado (conjugado) a las concentraciones indicadas (Figs. 6A y 6B). A continuación, se incubaron las células durante 12 horas 12 h (Fig. 6A) o 24 h (Fig. 6B), respectivamente. Tras la incubación, se llevó a cabo un ensayo MTT (Cell proliferation Kit, Roche Mannheim Alemania) según las instrucciones del fabricante para determinar la viabilidad de las células restantes. En las Figs. 6A y 6B (Ensayo de viabilidad celular), se muestran los resultados.

**Fig. 6a (Medición 12 h):** Se incubaron hepatocitos de ratón primario durante 12 h con doxorubicina solamente, con doxorubicina acoplada a los péptidos preS modificados N-terminalmente mostrados (conjugado) o un producto intermedio de síntesis inactivo de doxorubicina. La pre-incubación con los péptidos preS sin modificar (péptido frío) durante 30 minutos seguido de incubación con el conjugado sirvió como control de interacción específica de receptor.

**Fig. 6b (Medición 24h):** Se incubaron hepatocitos de ratón primarios durante 12 horas con doxorubicina solamente, con doxorubicina acoplada a los péptidos preS modificados N-terminalmente mostrado (conjugado) o productos intermedios de síntesis inactivos de doxorubicina. La pre-incubación con péptidos preS sin modificar (péptido frío) durante 30 minutos seguido de incubación con el conjugado sirvió como control de interacción específico de receptor.

La incubación de hepatocitos de ratón primarios con doxorubicina solamente o péptidos de miristoíl-[K-Doxorubicina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDPy- amida (VHBpreS/myr- [K-Doxorubicina]3-20y) presentó efectos citotóxicos significativos al cabo de 12 h y 24 h de incubación. La incubación con un producto intermedio de síntesis inactivo de la reacción de acoplamiento no presente ninguna toxicidad. Asimismo, el bloqueo del receptor específico de péptido por pre-incubación de las células con péptidos preS sin modificar durante 30 minutos antes del tratamiento de las células con Miristoíl-[K-Doxorubicina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDPy-amida (VHBpreS/myr- [K-Doxorubicina]3-20y), anula completamente el efecto citotóxico de péptidos modificados.

Como control HepG2 adicional, se incubaron células durante 12 horas en las mismas condiciones que se han indicado. Las células HepG2 no expresan el receptor de péptido específico. Por esta razón, las células HepG2 no deberían ser afectadas por el efecto citotóxico observado de péptidos Miristoíl-[K-Doxorubicina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDPy-amida (VHBpreS/myr- [K-Doxorubicina] 3-20y) si el efecto observado es específico de péptido y receptor. Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 7. **Fig. 7 (Medición 12 h):** se incubaron células HepG2 durante 12 horas con doxorubicina solamente, doxorubicina acoplada con los péptidos preS modificados N-terminalmente mostrados (conjugado) o el producto intermedio de síntesis inactivo de doxorubicina. La preincubación con péptidos preS sin modificar (péptido frío; Péptido C) durante 30 minutos seguido de incubación con el conjugado sirvió como control de interacción específica de receptor.

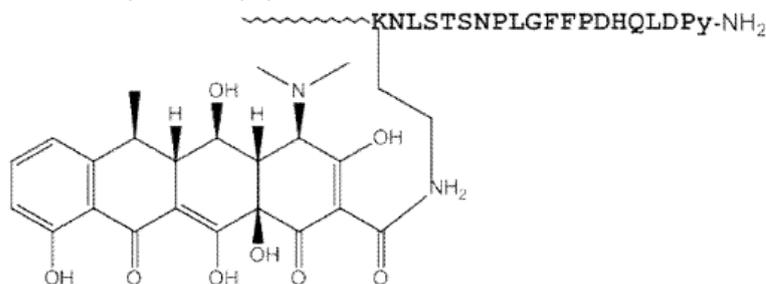
Tal como se muestra en la Fig. 7, los péptidos Miristoíl-[K-Doxorubicina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDPy-amida (VHBpreS/myr- [K-Doxorubicina] 3-20y) no presentaron actividad citotóxica en las células que no expresaron el receptor específico de péptido, aunque doxorubicina en solitario sigue presentando una significativa citotoxicidad al cabo de 12 horas de incubación.

Ejemplo 4

Especificidad del hígado de péptidos VHBpreS modificados N-terminalmente acoplados a levofloxacina para el tratamiento de malaria en fase del hígado

Se sintetiza péptidos acoplados a Levofloxacina tal como se describe en el presente documento. Brevemente, se utilizó síntesis de péptidos en fase sólida protegidos con FMOC para sintetizar la cadena principal del péptido (KNLSTSNPLGFFPDHQLDP), a continuación, se acopló Levofloxacina a la cadena principal del péptido utilizando formación de amida. Se purificó el péptido resultante por HPLC y se analizó la pureza por espectrometría de masa. La pureza del péptido resultante fue 95 % o más alta.

A continuación, se muestra un esquema del péptido modificado:



miristoíl-[K-Levofloxacina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDpy-amida (VHBpreS/myr-[K-Levofloxacina]3-20y)

5 Para demostrar que el péptido sintetizado resultante seguía siendo específico del hígado, se marcó el péptido representado en este esquema C-terminalmente con yodo 131 radioactivo utilizando el método de cloramina T descrito en (36) y tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, se disolvieron los péptidos marcados con radioactivo en PBS + 3 % BSA, se calentaron a 37 °C y se inyectaron en la vena caudal de ratas WAG/RJ. Se  
10 narcotizó a los animales utilizando isoflurano y se llevó un seguimiento de la distribución del péptido utilizando un escáner de PET para animales pequeños. A continuación, se tomaron imágenes en los puntos temporales indicados para llevar un seguimiento de la distribución del péptido en los animales. Las imágenes 8 A a 8D son un resumen de las imágenes que cubren los puntos temporales indicados.

15 **Fig. 8 A:** Resumen de la imagen PET de una rata a la que se le inyecta Miristoíl-[K-Levofloxacina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDpy-<sup>131</sup>I (VHBpreS/myr-[K-Levofloxacina]3-20y-<sup>131</sup>I) que cubre 0-20 minutos tras la inyección. Prácticamente el 100 % de toda la radiación se encuentra en el hígado.

20 **Fig. 8B:** Resumen de imagen PET de una rata a la que se le inyecta Miristoíl-[K-Levofloxacina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDpy-<sup>131</sup>I (VHBpreS/myr-[K-Levofloxacina]3-20y-<sup>131</sup>I) que cubre 20-40 minutos tras la inyección. Prácticamente el 100 % de toda la radiación se encuentra en el hígado.

25 **Fig. 8C:** Resumen de imagen PET de una rata a la que se le inyecta Miristoíl-[K-Levofloxacina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDpy-<sup>131</sup>I (VHBpreS/myr-[K-Levofloxacina]3-20y-<sup>131</sup>I) que cubre 40-60 minutos tras la inyección. La mayor parte de la radiación se encuentra en el hígado, se observa un moderado enriquecimiento en el intestino y la vejiga.

30 **Fig. 8D:** Resumen de imagen PET de una rata a la que se le ha inyectado Miristoíl-[K-Levofloxacina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDpy-<sup>131</sup>I (VHBpreS/myr-[K-Levofloxacina]3-20y-<sup>131</sup>I) medido durante 10 minutos 6 h tras la inyección. La mayor parte de la radiación sigue encontrándose en el hígado, sin embargo, puede observarse una clara acumulación de radiación en los intestinos y en la vejiga.

35 Estos experimentos demuestran que los péptidos Miristoíl-[K-Levofloxacina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDpy-<sup>131</sup>I (VHBpreS/myr-[K-Levofloxacina]3-20y-<sup>131</sup>I) péptidos se enriquecen específicamente en el hígado de ratas WAG/RJ, en las que son captados por los hepatocitos y que se pueden encontrar trazas de radioactividad en el intestino y la vejiga en los animales al cabo de 6 horas tras la inyección.

40 Las características divulgadas en la descripción expuesta, en las reivindicaciones y/o en los dibujos adjuntos pueden constituir material, ya sea por separado o según cualquier combinación del mismo, para realizar la invención y diversas formas de la misma.

#### REFERENCIAS

- 40
1. Seeger, C. & Mason, W.S. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 51- 68 (2000).
  2. Nassal, M. Hepatitis B virus morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 214, 297- 337 (1996).
  3. Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S. & Guguen-Guillouzo, C. Myristylation of the hepatitis B virus large Surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* 213, 292- 299 (1995).
  4. Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, L, Guguen-Guillouzo, C. & 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).
  5. Juliano RL (1988) Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres, and emulsions. *Adv Drug Deliv Rev* 2: 31 -54.
  6. Hashida M and Takakura Y (1994) Pharmacokinetics in design of polymeric drug delivery systems. *J Control Release* 31: 163-171.
  7. Lu, X. M., Fischman, A. J., Jyawook, S. L., Hendricks, K., Tompkins, R.G. and Yarmush, M. L. (1994) Antisense DNA delivery in vivo: liver targeting by receptor- mediated uptake. *J. Nucl. Med.* 35, 269-275.
  8. Kasuya T, Kuroda S. Nanoparticles for human liver-specific drug and gene delivery systems: in vitro and in vivo advances. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009 Jan;6(1):39-52. Review. PubMed PMID: 19236207.
- 50

9. Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, Iwabuki H, Chuah MK, VandenDriessche T, Fukuda H, Kondo A, Ueda M, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S. Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat Biotechnol.* 2003 agosto;21(8):885-90. Epub 2003 Jun 29. PubMed PMID: 12833071
10. Gripon, P., Cannie, I. & 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).
11. Chen, K. F., H. C. Yu, et al. (2010). "Synergistic interactions between sorafenib and bortezomib in hepatocellular carcinoma involve PP2A-dependent Akt inactivation." *J Hepatol* 52(1): 88-95.
12. Czauderna, P., G. Mackinlay, et al. (2002). "Hepatocellular carcinoma in children: results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology group." *J Clin Oncol* 20(12): 2798-2804.
13. Javle, M. and C. T. Hsueh (2009). "Updates in Gastrointestinal Oncology - insights from the 2008 44th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology." *J Hematol Oncol* 2: 9.
14. Lee, J., J. O. Park, et al. (2004). "Phase II study of doxorubicin and cisplatin in patients with metastatic hepatocellular carcinoma." *Cancer Chemother Pharmacol* 54(5): 385-390.
15. Mendelsohn, J. and J. Baselga (2000). "The EGF receptor family as targets for cancer therapy." *Oncogene* 19(56): 6550-6565.
16. Patt, Y. Z., M. M. Hassan, et al. (2003). "Phase II trial of systemic continuous fluorouracil and subcutaneous recombinant interferon Alfa-2b for treatment of hepatocellular carcinoma." *J Clin Oncol* 21(3): 421-427.
17. Richly, H., B. Schultheis, et al. (2009). "Combination of sorafenib and doxorubicin in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results from a phase I extension trial." *Eur J Cancer* 45(4): 579-587.
18. Falcone, A., S. Ricci, et al. (2007). "Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest." *J Clin Oncol* 25(13): 1670-1676.
19. Javle, M. and C. T. Hsueh (2009). "Updates in Gastrointestinal Oncology - insights from the 2008 44th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology." *J Hematol Oncol* 2: 9.
20. Sagar, J., K. Sales, et al. (2010). "Lowering the apoptotic threshold in colorectal cancer cells by targeting mitochondria." *Cancer Cell Int* 10: 31.
21. Seymour, M. T., T. S. Maughan, et al. (2007). "Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial." *Lancet* 370(9582): 143-152.
22. Tournigand, C., T. Andre, et al. (2004). "FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study." *J Clin Oncol* 22(2): 229-237.
23. Kappe, S. H., A. M. Vaughan, et al. (2010). "That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda." *Science* 328(5980): 862-866.
24. Goodman, C. D., V. Su, et al. (2007). "The effects of anti-bacterials on the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol* 152(2): 181-191.24.
25. Zeuzem, S. (2004). "Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well?" *Ann Intern Med* 140(5): 370-381.
26. McHutchison, J. G., G. T. Everson, et al. (2009). "Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection." *N Engl J Med* 360(18): 1827-1838.
27. Nelson, DR, Ghalib, RH, Sulkowski, M, et al. Efficacy and safety of the cyclophilin inhibitor Debio 025 in combination with pegylated interferon alpha-2a and ribavirin in previously null-responder genotype 1 HCV patients. Presented at the 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Copenhagen, Denmark; April 22-26, 2009; abstract #95
28. (2009). "EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B." *J Hepatol* 50(2): 227-242.
29. Liaw, Y. F., N. Leung, et al. (2005). "Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2005 update." *Liver Int* 25(3): 472-489.
30. Lok, A. S. and B. J. McMahon (2009). "Chronic hepatitis B: update 2009." *Hepatology* 50(3): 661-662.
31. Meng, S., B. Wei, et al. (2009). "TAT peptides mediated small interfering RNA delivery to Huh-7 cells and efficiently inhibited hepatitis C virus RNA replication." *Intervirology* 52(3): 135-140.
32. de Koning, M. C., G. A. van der Marel, et al. (2003). "Synthetic developments towards PNA-peptide conjugates." *Curr Opin Chem Biol* 7(6): 734-740.
33. Zatsepin, T. S., J. J. Turner, et al. (2005). "Conjugates of oligonucleotides and analogues with cell penetrating peptides as gene silencing agents." *Curr Pharm Des* 11(28): 3639-3654.
34. Kornhuber, J., P. Tripal, et al. (2008). "Identification of new functional inhibitors of acid sphingomyelinase using a structure-property-activity relation model." *J Med Chem* 51(2): 219-237.
35. Gastaminza, P., C. Whitten-Bauer, et al. (2010). "Unbiased probing of the entire hepatitis C virus life cycle identifies clinical compounds that target multiple aspects of the infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1): 291-296.
36. Eisenhut, M. and W. Mier (2011). *Radioiodination Chemistry and Radioiodinated Compounds Handbook of Nuclear Chemistry*. A. Vértes, S. Nagy, Z. Klencsár, R. G. Lovas and F. Rösch, Springer US: 2121-2141.
37. Galle, P. R., Hagelstein, J., Kommerell, B., Volkmann, M., Schranz, P., and Zentgraf, H., *Gastroenterology* 106: 664-673 (1994).
38. Friedman R, Cafilisch A. Discovery of plasmepsin inhibitors by fragment-based docking and consensus scoring. *ChemMedChem*. 2009 Aug;4(8): 1317-26. PubMed PMID: 19472268.
39. Gamo FJ, Sanz LM, Vidal J, de Cozar C, Alvarez E, Lavandera JL, Vanderwall DE, Green DV, Kumar V, Hasan S, Brown JR, Peishoff CE, Cardon LR, Garcia-Bustos JF. Thousands of chemical starting points for

antimalarial lead identification. Nature. 2010 May 20;465(7296):305-10. PubMed PMID: 20485427 40. Friesen J, Silvie O, Putrianti ED, Hafalla JC, Matuschewski K, Borrmann S. Natural immunization against malaria: causal prophylaxis with antibiotics. SciTransl Med. 2010 Jul 14;2(40):40ra49. PubMed PMID: 20630856.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ruprecht-Karls-Universitat Heidelberg

10 <120> PÉPTIDOS MODIFICADOS HIDRÓFOBOS Y SU USO PARA DIRECCIONAMIENTO ESPECÍFICO AL HÍGADO

<130> 789-2 PCT

15 <150> US 61/441.492

<151> 10-02-2011

<160> 18

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Virus de la hepatitis B

<220>

<221 > VARIANTE

30 <222> (6)..(6)

<223> Amino ácido arbitrario, preferentemente F o L, más preferentemente F

<400> 1

**Asn Pro Leu Gly Phe Xaa Pro**  
**1 5**

35 <210> 2

<211> 119

<212> PRT

40 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 2

ES 2 663 368 T3

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 Ile  
 35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Gln Ala Asn Gln Val Gly Val Gly Ala Phe Gly  
 50 55 60

Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Val Leu Gly Trp Ser Pro Gln  
 65 70 75 80

Ala Gln Gly Ile Leu Ala Thr Val Pro Ala Met Pro Pro Pro Ala Ser  
 85 90 95

Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu  
 100 105 110

Arg Asp Ser His Pro Gln Ala  
 115

<210>3

<211> 119

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 3

5

ES 2 663 368 T3

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 His Lys Val Gly Val Gly Ala Phe Gly  
 50 55 60

Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln  
 65 70 75 80

Ala Gln Gly Ile Leu Thr Ser Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser  
 85 90 95

Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Leu Ser Pro Pro Leu  
 100 105 110

Arg Asp Thr His Pro Gln Ala  
 115

<210>4  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 4

5

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

10

ES 2 663 368 T3

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 His Lys Val Gly Val Gly Ala Phe Gly  
 50 55 60

Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln  
 65 70 75 80

Ala Gln Gly Ile Leu Thr Ser Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser  
 85 90 95

Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Leu Ser Pro Pro Leu  
 100 105 110

Arg Asp Thr His Pro Gln Ala  
 115

<210>5  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B

5

<400>5

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

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

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

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

Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Leu Pro Ala Asn  
 65 70 75 80

Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro  
 85 90 95

Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asp Thr His Pro Gln Ala  
 100 105

10

<210>6  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B

15

ES 2 663 368 T3

<400>6

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

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

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

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

Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Met Gln Thr Leu Pro Ala Asn  
 65 70 75 80

Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro  
 85 90 95

Leu Ser Pro Pro Leu Arg Thr Thr His Pro Gln Ala  
 100 105

- 5 <210>7
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B

10 <400> 7

ES 2 663 368 T3

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 Val Gly Ala Phe Gly Pro  
 50 55 60

Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala  
 65 70 75 80

Gln Gly Met Leu Lys Thr Leu Pro Ala Asp Pro Pro Pro Ala Ser Thr  
 85 90 95

Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Thr Pro Pro Leu Arg  
 100 105 110

Asp Thr His Pro Gln Ala  
 115

5

<210>8  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B  
 <400>8

ES 2 663 368 T3

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 Val Gly Gly Tyr Gly  
 50 55 60

Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln  
 65 70 75 80

Ala Gln Gly Val Leu Thr Thr Leu Pro Ala Asp Pro Pro Pro Ala Ser  
 85 90 95

Thr Asn Arg Arg Ser Gly Arg Lys Pro Thr Pro Val Ser Pro Pro Leu  
 100 105 110

Arg Asp Thr His Pro Gln Ala  
 115

<210>9  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B  
 <400>9

5

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

10

ES 2 663 368 T3

Asp Pro Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly Val Gly Ala Tyr Gly Pro  
 50 55 60

Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ser  
 65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Thr Thr Leu Pro Ala Asp Pro Pro Pro Ala Ser Thr  
 85 90 95

Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg  
 100 105 110

Asp Ser His Pro Gln Ala  
 115

5

<210> 10  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B  
 <400> 10

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

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

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

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

Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Leu Pro Ala Ala  
 65 70 75 80

Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Lys Ala Thr Pro  
 85 90 95

Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Thr His Pro Gln Ala  
 100 105

10

<210> 11  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B

15

<400> 11

ES 2 663 368 T3

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 Val Gly Gly Phe Gly  
 50 55 60

Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln  
 65 70 75 80

Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Ser Pro Pro Asp Pro Pro Pro Ala Ser  
 85 90 95

Thr Asn Arg Arg Ser Gly Arg Lys Pro Thr Pro Val Ser Pro Pro Leu  
 100 105 110

Arg Asp Thr His Pro Gln Ala  
 115

- <210> 12
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B
- <400> 12

ES 2 663 368 T3

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

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

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

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

Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Val Thr Thr Ile Leu Pro Ala Val  
 65 70 75 80

Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro  
 85 90 95

Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Thr His Pro Gln Ala  
 100 105

<210> 13  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 13

5

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

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

Gly Trp Ser Ser Gln Ala Gln Gly Leu Ser Val Thr Val Pro Asp Thr  
 65 70 75 80

Pro Pro Pro Pro Ser Thr Asn Arg Asp Lys Gly Arg Lys Pro Thr Pro  
 85 90 95

Ala Thr Pro Pro Leu Arg Asp Thr His Pro Gln Ala  
 100 105

ES 2 663 368 T3

5  
<210> 14  
<211>21  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis B  
<400> 14

**Lys Lys Lys Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp**  
**1 5 10 15**

**His Gln Leu Pro Asp**  
**20**

10  
<210> 15  
<211>21  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis B  
15  
<400> 15

**Lys Lys Lys Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp**

**1 5 10 15**

**His Gln Leu Asp Pro**  
**20**

20  
<210> 16  
<211>5  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis B

25  
<220>  
<221 > VARIANTE  
<222> (2)..(2)  
<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente L, I o Q, más preferentemente L

30  
<220>  
<221 > VARIANTE  
<222> (4)..(4)  
<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente T, V A o no está presente, más preferentemente T o V, más preferentemente T

35  
<220>  
<221 > VARIANTE  
<222> (5)..(5)  
<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente P, S, T o F, más preferentemente P o S, incluso más preferentemente S

40  
<400> 16

**Asn Xaa Ser Xaa Xaa**  
**1 5**

45  
<210> 17  
<211>6  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis B

50

ES 2 663 368 T3

5 <220>  
 <221 > VARIANTE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Aminoácido arbitrario, preferentemente D, E o S, más preferentemente D o E, incluso más preferentemente D

<400> 17

**Xaa His Gln Leu Asp Pro**  
**1 5**

10 <210> 18  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B

15 <220>  
 <221 > VARIANTE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Aminoácido arbitrario, preferentemente L, I o Q, más preferentemente L

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Aminoácido arbitrario, preferentemente T, V, A o no está presente, más preferentemente T o V, incluso más preferentemente T

30 <220>  
 <221 > VARIANTE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Aminoácido arbitrario, preferentemente P, S, T o F, más preferentemente P o S, incluso más preferentemente S

35 <220>  
 <221 > VARIANTE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Aminoácido arbitrario, preferentemente F o L, más preferentemente F

40 <220>  
 <221 > VARIANTE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Aminoácido arbitrario, preferentemente F o L, más preferentemente F

45 <220>  
 <221 > VARIANTE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Aminoácido arbitrario, preferentemente D, E o S, más preferentemente D o E, incluso más preferentemente D

50 <400> 18

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

**Asp Pro**

## REIVINDICACIONES

1. Péptido modificado hidrófobo de fórmula

5 [X - P - Y - R<sub>o</sub>] A<sub>p</sub>

en la que

10 P es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos NPLGF<sub>Xaa</sub>P, en la que Xaa es un aminoácido arbitrario, preferentemente F o L;

15 X es una secuencia de aminoácidos que comprende NX<sub>1</sub>SX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>, que tiene una longitud de m= 5, 6, 7 u 8 aminoácidos, en la que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> es un aminoácido arbitrario y en la que uno o más de los aminoácidos lleva una o más modificaciones hidrófobas seleccionadas entre acilación, preferentemente con ácidos carboxílicos, ácidos grasos, ácidos grasos de C8 a C22, aminoácidos con cadenas laterales lipófilas, y adición de fracciones hidrófobas seleccionadas entre colesterol, derivados de colesterol, fosfolípidos, glucolípidos, ésteres de glicerol, esteroides, ceramidas, derivados de isopreno, adamantano, farnesol, grupos alifáticos, compuestos poliaromáticos;

20 Y es una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de n aminoácidos, en la que n es 0 o al menos 1, en la que n es preferentemente 0 a 78;

$$m + n \geq 11$$

25 R es una modificación C-terminal de dicho péptido modificado hidrófobo, que es preferentemente una fracción que protege de la degradación seleccionada entre amida, D-aminoácido, aminoácido modificado, aminoácido cíclico, albúmina, polímero natural y sintético, como PEG, glicina, o es 0 o al menos 1,

A es un grupo de anclaje, preferentemente seleccionado entre éster, éter, disulfuro, amida, tiol, tioéster; p es 0 o al menos 1,

en el que

30 uno o más fármacos(s) está(n) acoplado(s) a uno o más aminoácido(s) de X.

2. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el uno o más fármacos(s) está(n) unido(s) a dicho péptido a través de un engarce o espaciador.

35 3. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el engarce o espaciador se escinde separándose del péptido modificado hidrófobo a través de una proteína del hígado, preferentemente una enzima proteolítica hepatocelular, en el que, preferentemente, el engarce o espaciador se escinde mediante enzimas seleccionadas entre citocromos, como citocromo P450, proteasas y liasas de la ruta endocítica, metalo proteasas de matriz MMP1, MMP2, MMP7, MMP9 y MMP12, preferentemente MMP7.

40 4. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que uno o más fármacos(s) está(n) acoplado(s) a uno o más aminoácido(s) de X que tiene(n) un grupo amino en una cadena lateral, que, preferentemente se selecciona(n) entre lisina,  $\alpha$ - amino glicina, ácido  $\alpha,\gamma$ -diaminobutírico, ornitina, ácido  $\alpha,\beta$ -diaminopropiónico.

45 5. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el(los) aminoácido(s) que tiene(n) un grupo amino en una cadena lateral está(n) localizado(s) en el término -N de X.

50 6. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la modificación hidrófoba es por acilación, seleccionada entre acilación con miristoílo (C14), palmitoílo (C16) o estearoílo (C18), en la que, preferentemente, la modificación hidrófoba es por acilación con miristoílo (C14) o estearoílo (C18).

55 7. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que dicho péptido comprende una variante de las SEQ ID NO. 2 a 13 y en el que la variante tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 2 a 13.

8. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el uno o más fármacos(s) que está(n) acoplado(s) o unido(s) a uno o más aminoácido(s) de X es una combinación de dos o más fármacos.

60 9. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con reivindicación 8, en el que el fármaco se selecciona entre:

(i) moléculas radioactivas o isótopos como <sup>18</sup>F, <sup>51</sup>Cr, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc;

agentes alquilantes como cisplatino y oxalplatino;

anti-metabolitos como azatioprina;

65 anti-neoplásicos como bleomicina y actinomicina;

antraciclina como doxorubicina y epirubicina;

antifolatos, como Metotrexato,  
 agentes antivirales como ribavirina y tenofovir;  
 fármacos que actúan sobre el citoesqueleto como vinblastina y taxol;  
 citoquinas como interferón- $\alpha$  e interferón- $\beta$ ;  
 5 quimioquinas como CCL1 y CXCL1;  
 ARNsi como CALAA-01 y SIRNA-034;  
 ARNm como miR-26<sup>a</sup>;  
 oligonucleótidos y ácidos nucleicos como plásmidos, ADNds corto y ADNss corto;  
 10 agonistas y antagonistas de receptor nuclear como mifepristona;  
 epotilona como patupilona e ixabepilona;  
 hormonas como progestinas y flouximesterona;  
 antagonistas de hormona como toremifeno y fulvestrant;  
 agentes inmunosupresores como rapamicina y ciclosporina A;  
 15 agentes inmunomoduladores como lenalidomida;  
 agentes inmunoestimuladores como SDC101 y ITMN-191;  
 secuencias inmunoestimuladoras como agonistas de TLR;  
 inhibidores de quinasa como sorafenib, imatinib y erlotinib;  
 inhibidores de proteasa como boceprevir y telaprevir;  
 20 inhibidores de polimerasa como MK-0608 y R7128;  
 inhibidores de topoisomerasa como irinotecano y topotecano;  
 análogos nucleosida como telbivudina y entecavir;  
 análogos de precursor como fluorouracil;  
 péptidos y péptido antibióticos como defensina 1;  
 25 antibióticos como azitromicina, clindamicina y rifampicina e inhibidores de girasa de la clase fluoroquinilona como  
 levofloxacina;  
 agentes a base de platino como carboplatino y cisplatino;  
 retinoides como tazaroteno y bexaroteno;  
 alcaloides vinca como vinpocetina, vinorelbina y sus derivados;  
 30 agentes citotóxicos y agentes citostáticos como proteínas de inactivación de ribosoma como  $\alpha$ - sarcina y  
 restrictotina;  
 vitaminas como vitamina B6;  
 toxinas de cadena  $\alpha$  como toxina de la difteria;  
 toxinas de veneno de serpiente y sus componentes como cobratoxina;  
 35 agentes derivados de hongos como aspergilina;  
 exotoxinas bacterianas como exotoxina pseudomonas;  
 enterotoxinas bacterianas como toxina del cólera;  
 endotoxinas bacterianas como lipopolisacáridos y sus análogos;  
 anticuerpos como bevacizumab y cetuximab y  
 40 fármacos anfílicos catiónicos (CAD) como proclorperacina, flufenacina y trifluorofenacina;  
 y combinaciones de los mismos;  
 (ii) dapsona, bleomicina, dactinomicina, mitomicina, daunorubicina, doxorubicina, ciclosporina A, tenofovir,  
 lamivudina, adefovir, entecavir, ribavirina, telepravir, epirubicina, idarubicina, intoxantrona, doxifluridina,  
 45 cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, camptotecina, topotecano, irinotecano, amsacrina, etoposida,  
 teniposida, ciclofosfamida, ifosfamida, trefosfamida, melfalano, clorambucil, estramustina, busulfan, clormetina,  
 treosulfano, carmustina, lomustina, nimustina, estreptozocina, procarbina, dacarbacina, temozolomida, tiotepa,  
 vinorelbina, vincristina, vinblastina, vindesina, paclitaxel, docetaxel, metotrexato, pemetrexed, raltitrexed,  
 fluorouracilo, capecitabina, citosina-arabinosida, gemcitabina, tioguanina, pentostatina, azatioprina,  
 mercaptopurina, fludarabina, cladribina, hidroxycarbamida, mitotano, azacitidina, citarabina, gemcitabina,  
 50 nelarabina, bortezomib, anagrelida, preferentemente imatinib, erlotinib, sunitinib, sorafenib, dasatinib, lapatinib o  
 nilotinib, MK 886, pizotieno, toremifeno, SDC-101, ITMN-191, RG7227, nitazoxanida, VX-950, VX-222, BMS-  
 790052, BMS-650032, GS 9190, GS 9256, BI 201335, BI 207127, IDX184, R7128, boceprevir, MK-7009, SIRNA-  
 034, MK-0608, R7128, RG7347, RG7348, TMC435, PF-868554, PF-4878691, TT033, BI201335, BI 207127,  
 BMS-790052, BMS-791325, BMS-650032, BMS-824393, ANA598, VCH-759, G1 50005, ITX5061, ITX4520,  
 55 IDX184, IDX320, IDX375, A-837093, GS 9190, GS 9256, ACH-1095, ACH-1625, PPI-461, PPI1301, TG4040,  
 AZD7295, quimizol, SPC3649, GNI-104, ID-12, GSK625433, ABT-450, ABT-072, ABT-333, PSO-7977,  
 INX09189, PSI-938, EDP-239, SDC-101, SP-30, AVL-181, VX-500 y combinaciones de los mismos.

10. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que se selecciona del  
 grupo que consiste en

60 estearoil-[K(Primaquina<sup>TM</sup>)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 estearoil-[K(GCHAK-Primaquina<sup>TM</sup>)]-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 miristoil-[K(Doxociclina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 miristoil [K(GCHAK(Doxociclina)]3NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 65 miristoil-[K(Penicilina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 miristoil-[K(GCHAK(Penicilina)]3NLSTSNPLGFFPDHQLDP,

miristoil-[K(Ciclosporina)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 miristoil-[K(GCHAK(Ciclosporina))]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 miristoil-[K(Rapamune™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 miristoil-[K(GCHAK Rapamune™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 5 estearoil-[K(RPLALWRS-Velcade™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 estearoil-[K(Nexavar™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 estearil-[K(RPLALWRS-Nexavar™)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 estearoil-[K(Tiazolidinadiona)]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,  
 10 miristoil-[K-Levofloxacina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDP y  
 miristoil-[K-Doxorrubicina]-NLSTSNPLGFFPDHQLDP.

11. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que uno o más del (los) fármaco(s) que se acopla(n) o une(n) a uno o más aminoácido(s) de X es uno o más péptidos penetrantes de célula (CPP).

12. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que uno o más fármacos se acopla adicionalmente al péptido modificado hidrófobo.

13. Composición farmacéutica que comprende:

al menos un péptido modificado hidrófobo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; y, opcionalmente, un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

14. Péptido modificado hidrófobo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en la administración específica de un fármaco al hígado.

15. Péptido modificado hidrófobo o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho uso comprende además el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno hepático, en el que la enfermedad o trastorno hepático se selecciona preferentemente entre:

- (a) hepatitis, cirrosis, hemocromatosis, preferentemente hepatitis causada por virus de la hepatitis A, B, C, D, E, F, G y H o hepatitis concomitante causada por virus;
- (b) una enfermedad que implica una fase del hígado de un virus o un patógeno no viral;
- (c) una enfermedad tropical, malaria, esquistosomiasis, leishmaniasis;
- (d) un tumor de hígado, preferentemente carcinoma hepatocelular (CHC); y
- (e) una enfermedad metabólica, preferentemente obesidad, síndrome metabólico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

Fig.1

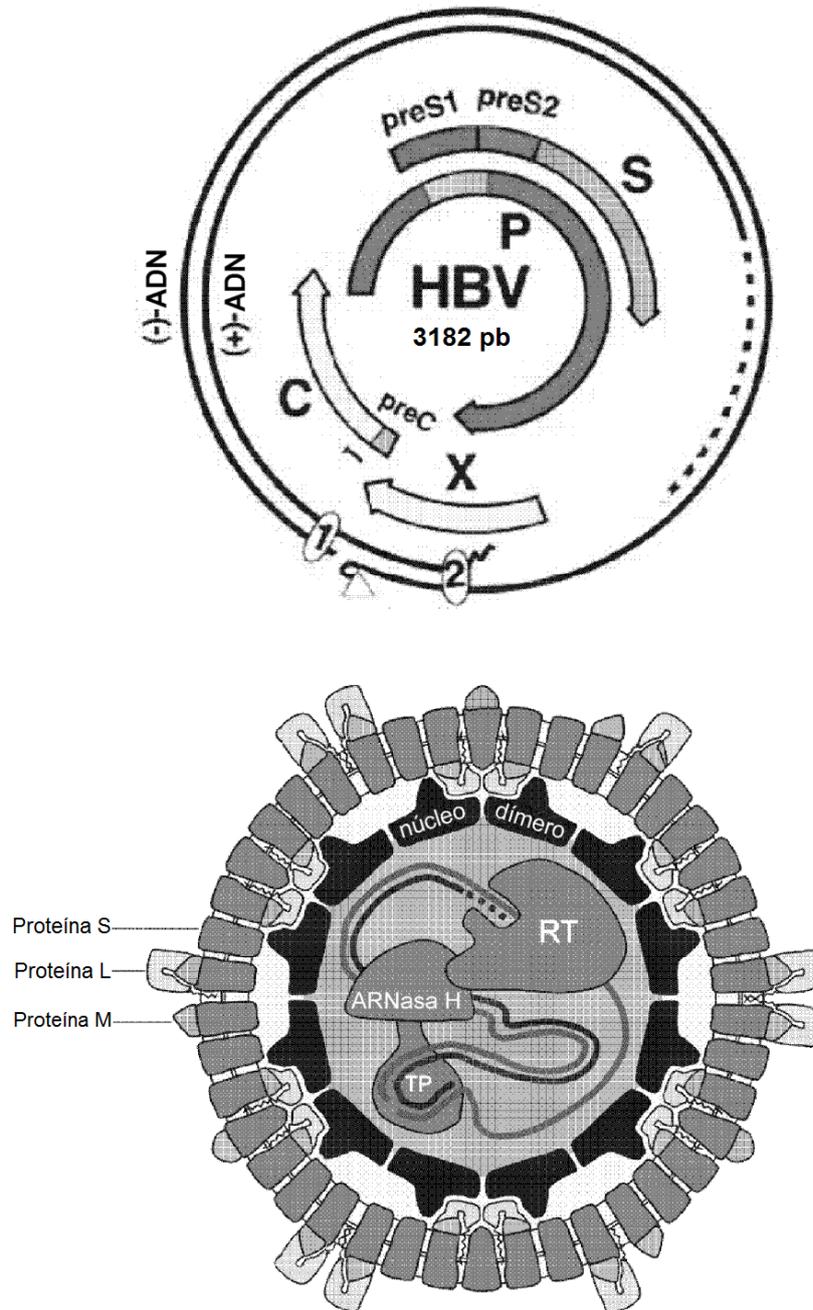


Fig. 2

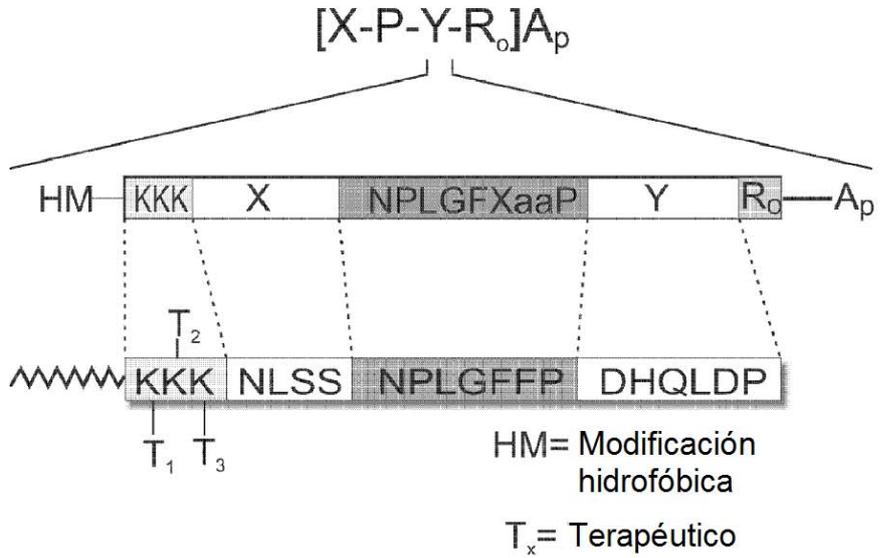


Fig. 3

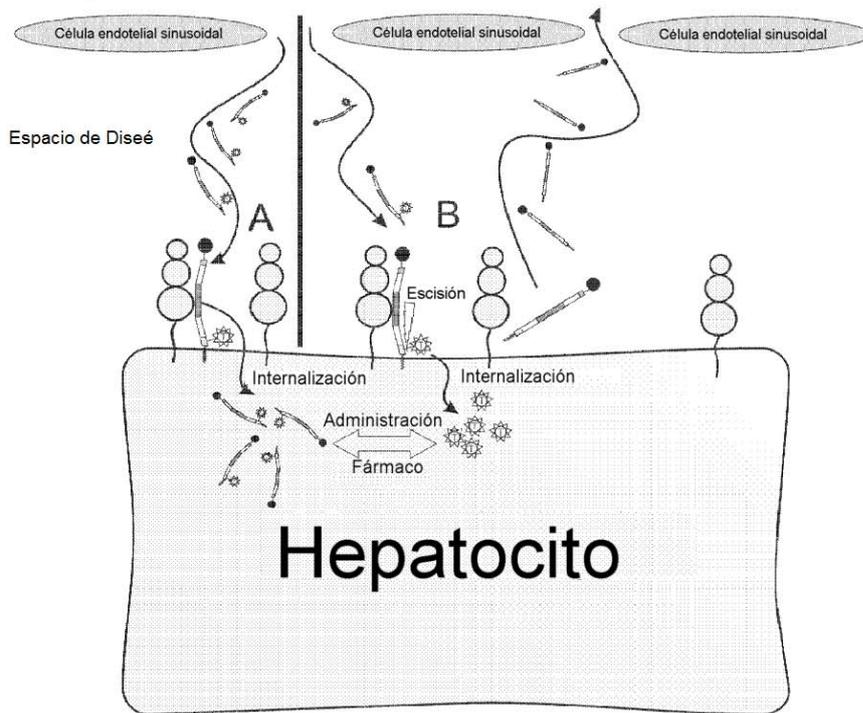


Fig. 4

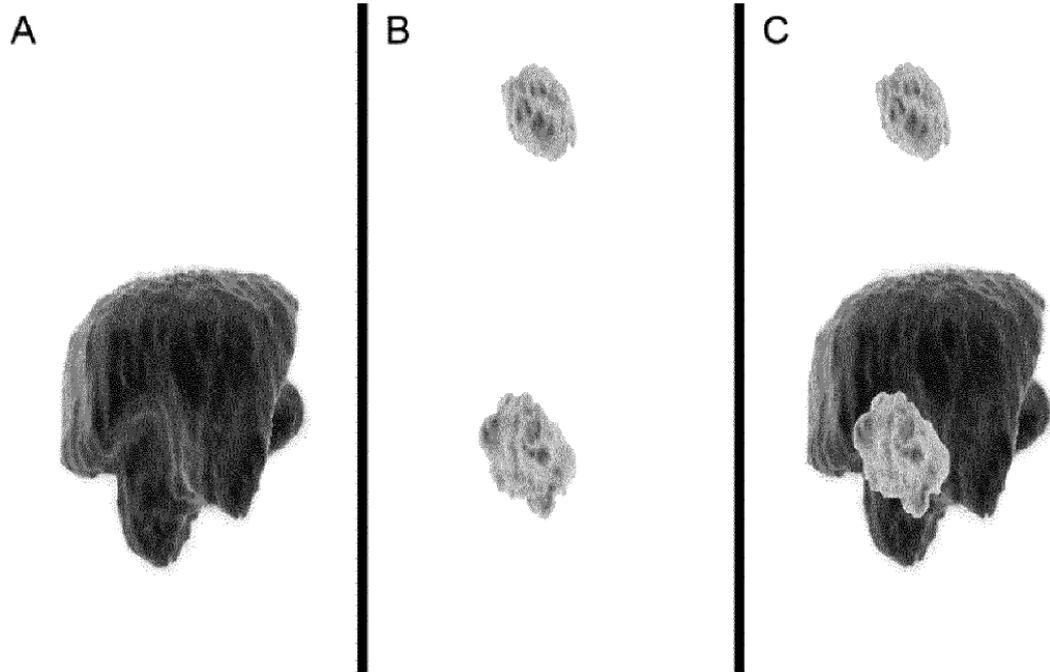


Fig. 5

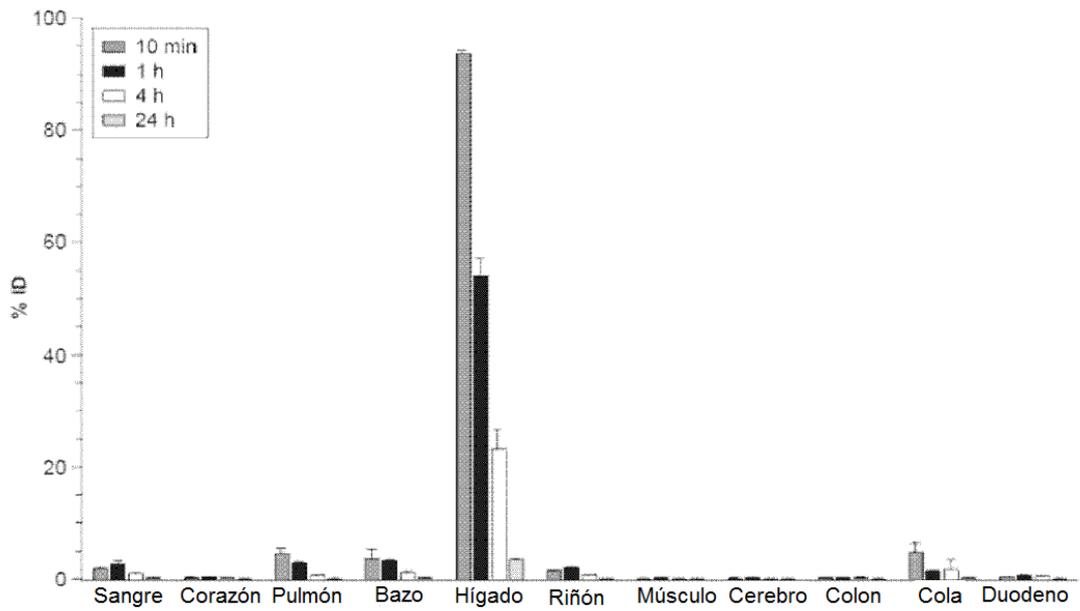


Fig. 6A

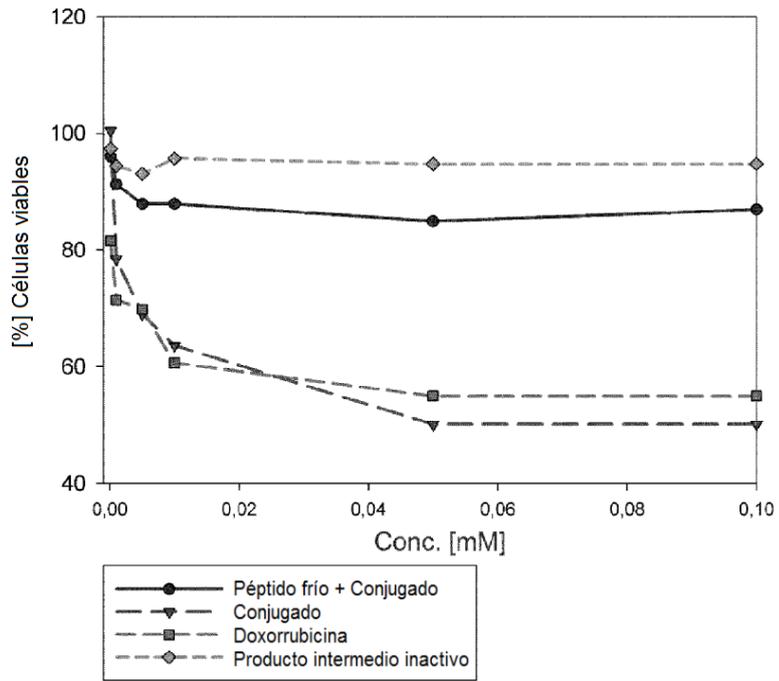


Fig. 6B

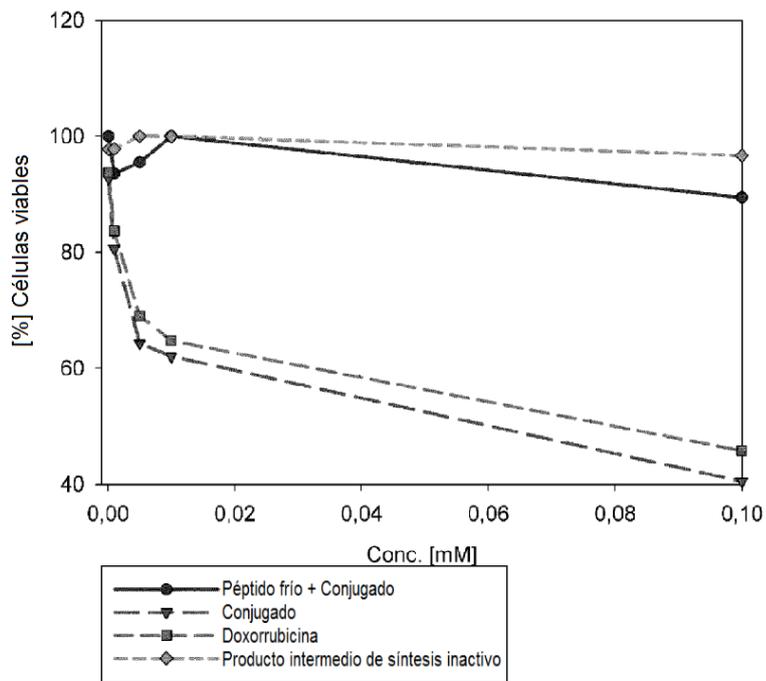
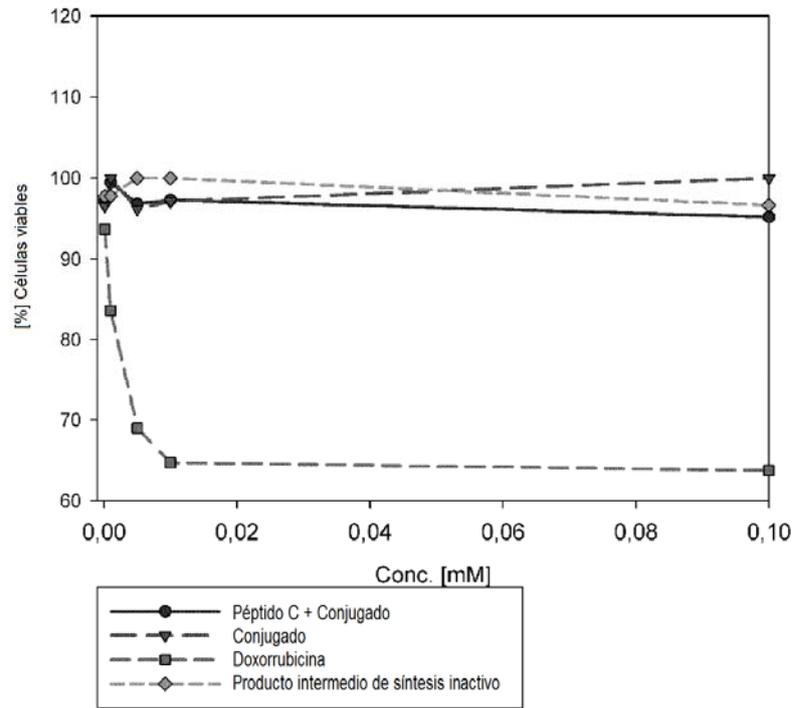
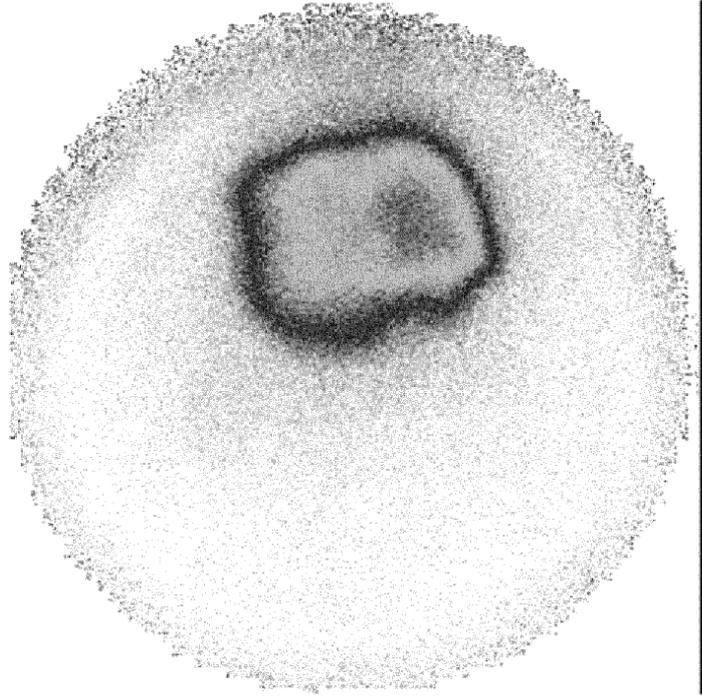


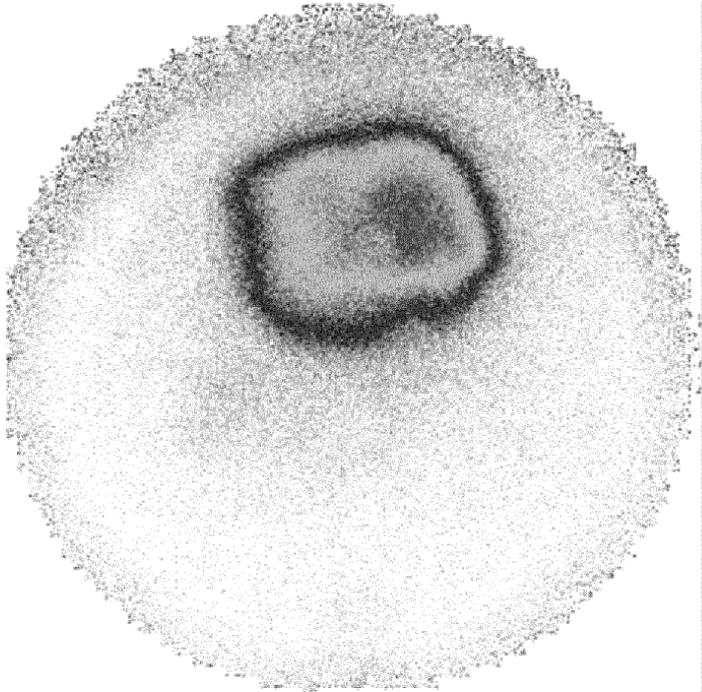
Fig. 7A



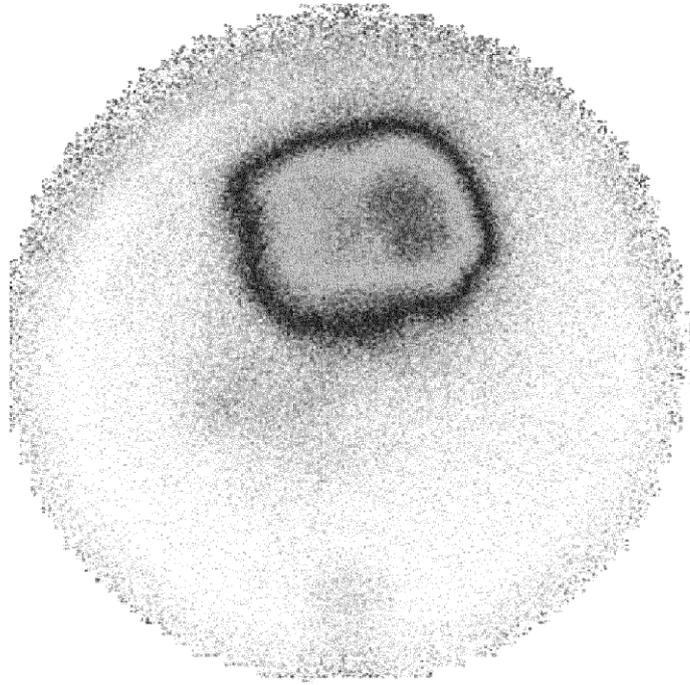
**Fig. 8A**



**Fig. 8B**



**Fig. 8C**



**Fig. 8D**

