

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 662**

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/EP2012/052343**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12107577**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2012 E 12703539 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2673003**

54 Título: **Péptidos hidrofóbicos modificados para el diagnóstico hepático específico**

30 Prioridad:

10.02.2011 US 201161441499 P

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

10.04.2019

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (50.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE y
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**MIER, WALTER;
URBÁN, STEPHAN;
MEHRLE, STEFAN;
HABERKORN, UWE;
MUELLER, THOMAS y
ASKOXYLAKIS, VASILEIOS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 708 662 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 hidrofóbicos modificados para el diagnóstico hepático específico.

5 La presente invención se refiere a péptidos hidrofóbicos modificados derivados del dominio preS del virus de la hepatitis B (HBV) que son vehículos versátiles para el suministro específico de un compuesto de marcado (agentes de diagnóstico, en el siguiente " marcador") al hígado, preferentemente a hepatocitos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Cualquier tipo de
10 marcador puede dirigirse específicamente al hígado y así enriquecerse en el hígado. Esta selección hepática puede usarse además para el diagnóstico específico de enfermedades o trastornos hepáticos, tales como hepatitis, malaria, carcinoma hepatocelular (HCC), así como infecciones por HAV, HBV, HCV y/o HDV. La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dicho(s) péptido(s) hidrofóbico(s) y lo(s) marcador(es) que se suministrarán específicamente al hígado. La presente invención se refiere además al uso de los péptidos hidrofóbicos modificados de la invención o composiciones farmacéuticas que comprenden dicho(s) péptido(s) hidrofóbico(s) modificado(s) para el diagnóstico y/o el monitoreo de un tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático; y el uso de
15 los péptidos hidrofóbicos modificados de la invención para la fabricación de un medicamento para el diagnóstico y/o el monitoreo de un tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático; y a un método para el diagnóstico de enfermedades o trastornos hepáticos o para el monitoreo de un tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático.

Antecedentes de la invención

20 El hígado, un órgano que está presente en los vertebrados y otros animales, desempeña un papel importante en el metabolismo y tiene varias funciones en el cuerpo, que incluyen el almacenamiento de glucógeno, la descomposición de los glóbulos rojos, la síntesis de proteínas plasmáticas y la desintoxicación. El hígado además es la glándula más grande del cuerpo humano. Se encuentra por debajo del diafragma en la región torácica del abdomen. Produce bilis, un compuesto alcalino que ayuda en la digestión, a través de la emulsificación de los lípidos. Además realiza y regula una amplia variedad de reacciones bioquímicas de alto volumen que requieren tejidos especializados.

25 Los hepatocitos constituyen del 70 al 80% de la masa citoplásmica del hígado. Los hepatocitos se involucran en la síntesis de proteínas, el almacenamiento de proteínas y la transformación de carbohidratos, la síntesis de colesterol, sales biliares y fosfolípidos, y la desintoxicación, modificación y excreción de sustancias exógenas y endógenas. El hepatocito además inicia la formación y secreción de la bilis.

Existe una gran cantidad de enfermedades hepáticas conocidas, tales como:

- 35 - Hepatitis: inflamación del hígado, causada principalmente por varios virus pero además por ciertos venenos, autoinmunidad o afecciones hereditarias;
- Cirrosis: la formación de tejido fibroso en el hígado, que reemplaza a las células hepáticas muertas. La muerte de las células hepáticas puede ser causada, por ejemplo, por hepatitis viral, 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, que eventualmente conduce al daño hepático;
- Cáncer de hígado: carcinoma hepatocelular primario (HCC) o colangiocarcinoma y cánceres metastásicos, por lo general de otras partes del tracto gastrointestinal;
- 45 - Enfermedad de Wilson: una enfermedad hereditaria que hace que el cuerpo retenga el cobre;
- Colangitis esclerosante primaria: una enfermedad inflamatoria del conducto biliar, de naturaleza autoinmune;
- 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, que se encuentra en aproximadamente el 5% de la población;
- 50 - Enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II: la acumulación de glucógeno causa debilidad muscular progresiva (miopatía) en todo el cuerpo y afecta a varios tejidos corporales, particularmente en el corazón, los músculos esqueléticos, el hígado y el sistema nervioso.

55 Además existen muchas enfermedades hepáticas pediátricas, tales como la atresia biliar, la deficiencia de alfa-1 antitripsina, el síndrome de alagille y la colestasis intrahepática familiar progresiva; así como las enfermedades metabólicas.

60 Además, varios patógenos y parásitos, especialmente de enfermedades tropicales, tienen una etapa hepática durante su ciclo de vida. Por ejemplo la malaria, es una de las enfermedades infecciosas más comunes y un enorme problema de salud pública. La malaria es causada por parásitos protozoarios del género Plasmodium. Las formas más graves de la enfermedad son causadas por Plasmodium falciparum y Plasmodium vivax, pero otras especies relacionadas (Plasmodium ovale, Plasmodium malariae y algunas veces Plasmodium knowlesi) además pueden infectar a los humanos. Otro ejemplo es el virus de la hepatitis B (HBV), la causa de la hepatitis B. El HBV es el prototipo de una familia de pequeños virus de ADN envueltos de mamíferos y aves (11). La envoltura del HBV contiene tres proteínas denominadas L-(grande), M-(media) y S-(pequeña) (ver la Figura 1). Comparten el dominio S C-terminal con cuatro regiones transmembrana. Las proteínas M y L portan extensiones N- terminal adicionales de 55 y, dependientes del genotipo, 107

o 118 aa (preS2- y preS1). En los viriones, la relación estequiométrica de L, M y S es de aproximadamente 1 :1:4, mientras que las partículas subvirales (SVP) no infecciosas secretadas de manera más abundante contienen casi exclusivamente proteína S y solo trazas de L (2). Durante la síntesis, el dominio preS1 de L se miristoila y en algún punto del ciclo vital del HBV se traslada a través de la membrana derivada del ER. Esta modificación es esencial para la infectividad (13, 14).
 5 Una característica pronunciada del HBV es su tropismo hepático, es decir, el hígado es el tejido que apoya específicamente el crecimiento del HBV.

Las infecciones crónicas por HBV y HCV (virus de la hepatitis C) además son causas importantes de alteraciones neoplásicas en el hígado. El carcinoma hepatocelular primario (HCC), por lo general, se desarrolla en el contexto de una enfermedad hepática crónica, en particular de la hepatitis viral. El diagnóstico de HCC puede ser difícil, por lo general requiere el uso de marcadores séricos y modalidades de imágenes, así como la confirmación histológica después de la biopsia.
 10

Los resultados de HCC en aproximadamente un millón de muertes por año en todo el mundo, la supervivencia media después del diagnóstico es de aproximadamente 6 a 20 meses (11). Una razón para esto es la ausencia de síntomas patogénicos y la gran reserva funcional del hígado (12). Como resultado, la mayoría de los pacientes diagnosticados con carcinoma hepatocelular no son elegibles para la resección quirúrgica, pero requieren otras modalidades de tratamiento, tales como trasplante de hígado, ablación por radiofrecuencia, quimioembolización transarterial, crioablación o radioterapia. Todas estas opciones alternativas tienen una eficacia limitada debido al tamaño del tumor típicamente grande en el momento del diagnóstico.(13) Como consecuencia, la FDA (Agencia Federal de Medicamentos) recomienda la obtención de imágenes de diagnóstico intenso en pacientes con una enfermedad hepática subyacente (es decir, cirrosis, hepatitis viral) que desarrolla un aumento en el nivel de alfa fetoproteína sérica.(12) Las imágenes diagnósticas por lo general se realiza mediante un escaneo CT del hígado y/o imágenes por resonancia magnética (MRI). Sin embargo el diagnóstico inicial incluso cuando se usan métodos de imágenes de alta resolución, frecuentemente es difícil ya que en la mayoría de los pacientes se recomienda la imagen de "seguimiento". (14) Los nuevos agentes de contraste específicos para el hígado, tales como los descritos en la invención, pueden ayudar a resolver este problema.
 15
 20
 25

Otra fuente de alteraciones neoplásicas en el hígado es la diseminación metastásica de tumores primarios de otros órganos, la diseminación más prominente metastásica del carcinoma colorrectal (CRC). Los CRC son la tercera causa más común de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo. Aproximadamente 1,25 millones de pacientes desarrollan cáncer colorrectal por año; más de 600,000 pacientes mueren por año. (Fuente: GLOBOCAN 2008, globocan.iarc.fr). Si bien la patogenia de los CRC ya está casi terminada y la FDA recomienda el examen médico regular para todas las personas a partir de los 50 años, la tasa de incidencia disminuyó ligeramente de 1997 a 2008. (15, 16).
 30

Después del diagnóstico primario, aproximadamente 80% de todos los pacientes se presentan sin metástasis detectables, para aquellos pacientes la resección quirúrgica es la mejor opción terapéutica. A pesar de la resección, más del 40% de todos los pacientes diagnosticados con la clasificación II/III en TMN desarrollan metástasis en el hígado (17-21). Se ha demostrado que las imágenes de alta resolución intensivas después de la resección primaria pueden mejorar significativamente el tiempo de supervivencia de los pacientes clasificados en TMN II/III. El diagnóstico precoz de metástasis pequeñas en el hígado puede mejorar el tiempo de supervivencia de 5 años después de la hepatectomía parcial en 40% en comparación con la atención convencional. Sin embargo, debido a la estructura amorfa del hígado, frecuentemente no es posible el diagnóstico en etapa temprana (22). Los agentes de contraste, tales como los descritos en la presente descripción, pueden ayudar a diagnosticar metástasis hepáticas en una etapa temprana, permitiendo la intervención quirúrgica y, de este modo, ayudan a mejorar la supervivencia libre de enfermedad.
 35
 40
 45

Idealmente, la selección de fármacos debe cumplir con los siguientes criterios: 1) transferencia exclusiva del fármaco (por ejemplo, un marcador) al sitio de acción requerido; 2) un mínimo de efectos para el organismo restante; 3) uso de un vector farmacológicamente inactivo.
 50

Para llevar un marcador a un tejido específico se persiguen diferentes estrategias. Estas son, por ejemplo, el uso de profármacos, a partir de los cuales se libera la parte farmacológicamente activa en el tejido objetivo mediante enzimas específicas del tejido. Una posibilidad adicional es acoplar fármacos efectivos, no específicos al tejido, a sistemas de portadores específicos a tejidos, pero farmacológicamente inertes, como péptidos afines a receptores o partículas coloidales.
 55

Se han usado varios portadores de fármacos para mejorar la selección de fármacos en el hígado. Un enfoque directo se basa en la fagocitosis activa del sistema reticuloendotelial en el hígado mediante el suministro de fármacos en portadores particulares, tales como liposomas y microesferas. Por ejemplo, se ha demostrado que después de la inyección i.v. (intravenosa), los portadores de partículas que incorporan un fármaco se capturan principalmente por el sistema reticuloendotelial en el hígado, lo que resulta en el direccionamiento del fármaco al hígado (5). Por otro lado, el direccionamiento hepático de los fármacos con polímeros solubles en agua, cargados positivamente se basa en la extravasación libre de la mayoría de las sustancias solubles en agua del sistema vascular del hígado, así como en las cargas negativas en la superficie de las células hepáticas (6). Así, se han usado polímeros como portadores para permitir que los fármacos se dirijan al hígado en función de tales características anatómicas y bioquímicas del hígado. Se ha intentado el direccionamiento más específico del fármaco en el hígado mediante el uso de receptores de asialoglicoproteínas de células hepáticas. El receptor de asialoglicoproteína (receptor de galactosa) está presente en los
 60
 65

hepatocitos con alta densidad. Además, una vez que un ligando se une al receptor de galactosa, el complejo ligando receptor se internaliza, lo que permite la absorción celular de ligandos galactosilados (7). Además, los enfoques de suministro que usan nanopartículas se han realizado, por ejemplo, por polímeros anfílicos y vectores virales (8). Además se ha llevado a cabo el suministro de fármacos y material genético mediante el uso de bionanocápsulas (BNC). Las BNC se describen como "cápsulas de nanoescala que consisten en proteínas producidas por técnicas biotecnológicas" y pueden usarse como sistemas de suministro para la administración de fármacos específicos de órganos (9).

El documento de patente núm. US 7,001,760 B2 describe vectores recombinantes derivados del virus de la hepatitis B (HBV), que pueden usarse para la terapia génica, tales como el suministro de genes terapéuticos a las células hepáticas y la expresión de genes heterólogos en las células hepáticas.

El documento de patente núm. WO2009/092612 describe péptidos derivados de preS hidrofóbicos del HBV y su uso como vehículos para el suministro específico de compuestos al hígado. En este documento, los péptidos derivados de preS modificados hidrofóbicos del HBV pueden acoplarse con un agente activo de diagnóstico o terapéutico a través de un grupo de anclaje opcional (A) que es preferentemente "C-terminal" del péptido derivado de preS modificado hidrofóbico.

La presente invención proporciona péptidos hidrofóbicos modificados conjugados a uno o más marcadores cuyo marcador se acopla a la secuencia de aminoácidos N-terminal del péptido representado por X, lo que hace posible crear péptidos más cortos mientras se mantiene la especificidad del hígado. Sorprendentemente, se ha hecho posible acoplar porciones hidrofóbicas a los péptidos sin anular el tropismo hepático. Además, el acoplamiento de los marcadores al sitio N-terminal permite un mejor suministro de compuestos activos a través de la membrana celular y además permite dirigir los marcadores, que están activas en la membrana celular, directamente al sitio de acción. En la Figura 3, se ilustra esquemáticamente el mecanismo molecular de la unión de un péptido hidrofóbico modificado a la superficie de un hepatocito.

Breve descripción de la invención

De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve proporcionando un péptido hidrofóbico modificado. En la Figura 2, se ilustra esquemáticamente la construcción de un péptido hidrofóbico modificado de la invención. Dicho péptido hidrofóbico modificado tiene la fórmula general: [X - P - Y - Ro]Ap en donde P es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos NPLGF_{Xaa}P (código de una sola letra; en donde Xaa es un aminoácido arbitrario, preferentemente F o L, con mayor preferencia F). X es una secuencia de aminoácidos que comprende NX₁SX₂X₃, que tiene una longitud de m = 5, 6, 7 u 8 aminoácidos, en donde X₁, X₂ y X₃ es un aminoácido arbitrario y en donde uno o más de los aminoácidos de X portan uno o más grupo para las modificaciones hidrofóbicas seleccionadas de la acilación, preferentemente con ácidos carboxílicos, ácidos grasos saturados e insaturados, ácidos grasos C8 a C22, aminoácidos con cadenas laterales lipofílicas y adición de porciones hidrofóbicas seleccionadas de colesterol, derivados del colesterol, fosfolípidos, glicolípidos, ésteres de glicerol, esteroides, ceramidas, derivados de isopreno, adamantano, farnesol, grupos alifáticos, compuestos poliaromáticos y m es al menos 4 (m es ≥ 4). En una modalidad preferida, la modificación hidrofóbica se efectúa por acilación con porciones acilo, preferentemente seleccionados de miristoilo (C 14), palmitoilo (C 16) o estearoilo (C 18), con mayor preferencia por acilación con miristoilo (C 14) o por acilación con estearoilo (C 18). Y es una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de n aminoácidos, (n es 0 o al menos 1). En la fórmula general anterior, m n son al menos 11, es decir, el péptido hidrofóbico modificado de la invención tiene una longitud de al menos 18 aminoácidos (aa) en total. R es una modificación C-terminal de dicho péptido hidrofóbico modificado, que es preferentemente una porción que protege de la degradación seleccionada de amida, D-aminoácido, aminoácido modificado, aminoácido cíclico, albúmina, polímero natural y sintético, tal como PEG, glicano (o es 0 o al menos 1). A es un grupo de anclaje, preferentemente seleccionado de éster, éter, disulfuro, amida, tiol, tioéster, p es 0 o al menos 1. En una modalidad preferida, m es 4 a 19 y/o n es 0 a 78. Uno o más marcador(es) se acopla(n) a uno o más aminoácido(s) de X, en donde el marcador se selecciona a partir de un colorante fluorescente, un isótopo emisor de fluorescencia, un radioisótopo y un agente de contraste. El marcador puede estar compuesto de una sustancia o puede comprender dos o más sustancias, que se enlazan entre sí por cualquier tipo de enlace químico o físico, como el enlace covalente, el enlace iónico, etc. o el marcador está en forma de un complejo.

Uno o más marcador(es) está(n) enlazado(s) a dicho péptido a través de un enlazador o espaciador, en donde el enlazador o espaciador se corta preferentemente del péptido hidrofóbico modificado por una proteína hepática, preferentemente una enzima proteolítica hepatocelular que puede seleccionarse de citocromos, tales como el citocromo P450, proteasas y liasas de la vía endocítica (por ejemplo esterases), matriz-metaloproteasas MMP1, MMP2, MMP7, MMP9 y MMP12, preferentemente MMP7. En este caso, el enlazador o espaciador comprende preferentemente las secuencias peptídicas GCHAK o RPLALWRS.

En una modalidad preferida, uno o más marcadores se acoplan a uno o más aminoácidos de X que tienen un grupo amino en una cadena lateral, que se seleccionan preferentemente de lisina, α-aminoglicina, α,γ ácido diaminobutírico, ornitina, ácido α,β-diaminopropiónico, con mayor preferencia lisina. El aminoácido(s) que tiene un grupo amino en una cadena lateral se localiza preferentemente en el extremo N de X, en donde preferentemente 1 a 11, con mayor preferencia 1 a 3, aminoácidos que tienen un grupo amino en una cadena lateral se ubican en el extremo N de X.

De acuerdo con la presente invención, el objeto se resuelve además proporcionando una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido hidrofóbico modificado como se define en la presente descripción y al menos un marcador que se administra específicamente al hígado, preferentemente a hepatocitos, como se define en la presente descripción y opcionalmente un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una modalidad preferida, el péptido hidrofóbico modificado y/o la composición farmacéutica se usan en el suministro específico de marcador(es) al hígado, preferentemente para uso en el diagnóstico o monitoreo del tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático, con mayor preferencia en la visualización intraoperatoria.

De acuerdo con la presente invención, el objeto se resuelve además proporcionando un uso del péptido hidrofóbico modificado o la composición farmacéutica de la invención y el uso del péptido hidrofóbico modificado para la fabricación de un medicamento para el diagnóstico y/o el monitoreo de un tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático.

De acuerdo con la presente invención, el objeto se resuelve además proporcionando un método para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno hepático o para la monitoreo de un tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático, que comprende administrar a un sujeto una cantidad diagnósticamente eficaz de un péptido hidrofóbico modificado o una composición farmacéutica de la invención.

Además modalidades de la presente invención se definen en las reivindicaciones dependientes.

Descripción de las modalidades preferidas de la Invención

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por un experto en la técnica.

Péptidos hidrofóbicos modificados

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona péptidos hidrofóbicos modificados que se derivan del dominio preS del virus de la hepatitis B (HBV) (además denominado "péptidos preS"). La envoltura de HBV contiene tres proteínas denominadas L (grande), M (media) y S (pequeña) (ver Figura 1). Comparten el dominio S C-terminal con cuatro regiones transmembrana. Las proteínas M y L portan extensiones N-terminales adicionales de 55 y, genotipo dependiente, de 107 o 118 aminoácidos (preS2- y preS1).

Así, 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-terminal de la proteína L del HBV, preS1, preferentemente de los genotipos A al H, así como de virus de la hepatitis B de mono de lana (WMHBV), orangután, chimpancé y gorila, pero además se refiere a variantes de estos, preferentemente variantes truncadas en el extremo C, variantes de sustitución de aminoácidos. Como una secuencia indispensable, los residuos de aminoácidos que son importantes para el tropismo hepático de los péptidos derivados de preS derivados de hidrofóbicos del HBV, como se establece en la sec. con núm. de ident.: 1 (NPLGFXP) están presentes en la secuencia de aminoácidos del péptido hidrofóbico modificado de la invención. En particular, los péptidos hidrofóbicos modificados de la invención se basan en las siguientes secuencias (aminoácidos en un código de una sola letra; dominio esencial subrayado).

Dominio esencial del péptido hidrofóbico modificado (sec. con núm. de ident.: 1):

NPLGFXP (en donde X es un aminoácido arbitrario, preferentemente F o L, con mayor preferencia F)

preS HBV-A (con núm de: M57663; sec. con núm. de ident.:2):

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPQA
 NQVGVGAFGPGFTPPHGGVLGWSPQAQGILATVPAMPPPASTNRQSGRQPTPISPPLR
 DSHPQA

preS HBV-B (con núm de: D00329, sec. con núm. de ident.:3)

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFKANSENPDWDLNPHKDNWPDA
 HKVGVGAFGPGFTPPHGGVLGWSPQAQGILTSVPAAPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLR
 DTHPQA

preS HBV-C (con núm de: AB048704, sec. con núm. de ident.:4)

65

ES 2 708 662 T3

5 MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFKANSENPDWDLNPHKDNWPDA
HKVGVGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTSVPAAPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLR
DTHPQA

preS HBV-Chimpancé (con núm de: AB032432, sec. con núm. de ident.:5)

10 MGQNLSTSNPLGFFPEHQLDPAFKANTNNPDWDFNPKKDYWPEANKVGAGAFGPGF
TPPHGGLLGWSPQAQGILTTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDTHPQA

15 preS HBV-D (con núm de: AB048702, sec. con núm. de ident.:6)

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTNNPDWDFNPKDTWPDANKVGAGAFGLG
FTPPHGGLLGWSPQAQGIMQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRTTHPQA

20 preS HBV-E (con núm de: X65657, sec. con núm. de ident.:7)

25 MGLSWTVPLEWGKNISTTNPLGFFPDHQLDPAFRANTRNPDWDHNPNDHWTEAN
KVGVGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGMLKTLPADPPPASTNRQSGRQPTIPPLRD
THPQA

30 preS HBV-F (con núm de: X69798@8, sec. con núm. de ident.:8)

MGAPLSTTRRGMGQNLSPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWFNTNKDSWPMAN
KVGVGGYGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGVLTTLPADPPPASTNRRSGRKPTVSPPLR
DTHPQA

35 preS HBV-G (con núm de: AF160501, sec. con núm. de ident.: 9)

40 MGLSWTVPLEWGKNLSASNPLGFLPDHQLDPAFRANTNNPDWDFNPKKDPWPEAN
KVGVGAYGPGFTPPHGGLLGWSPQSQGLTTLPADPPPASTNRQSGRQPTISPPLRD
SHPQA

45 HBV de Gibbon (con núm de: AJ131572, sec. con núm. de ident.: 10)

MGQNHSVTNPLGFFPDHQLDPLFRANSNNPDWDFNPNKDTWPEATKVGVGAFGPGF
TPPHGGLLGWSPQAQGILTTLPAAPPPASTNRQSGRKA TPISPPLRDTHPQA

50 HBV-H (con núm de: Q8JMY6, sec. con núm. de ident.: 11)

55 MGAPLSTARRGMGQNLSPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWFNTNKDNWPMAN
KVGVGGFPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTSPDPPPASTNRRSGRKPTVSPPLRDT
HPQA

60 HBV de Orangután (con núm de: AF193864, sec. con núm. de ident.: 12)

MGQNLSPNPLGFFPEHQLDPLFRANTNNPDWDFNPNKDTWPEATKVGVGAFGPGF
TPPHGGLLGWSPQAQGVTTILPAVPPPASTNRQSGRQPTISPPLRDTHPQA

65 HBV de Mono lanudo (con núm de: NC_001896, sec. con núm. de ident.: 13)

MGLNQSTFNPLGFFPSHQLDPLFKANAGSADWDKNPNKDPWPQAHDTAVGAFGPGL
 5 VPPHGGLLGWSSQAQGLSVTVPDTPPPPSTNRDKGRKPTPATPPLRDTHPQA

10 Las "variantes" son preferentemente variantes truncadas en el extremo N-terminal y/o C-terminal, variantes de sustitución o deleción de aminoácidos, o variantes prolongadas de las secuencias de las sec. con núms. de ident.: 2-13, que portan una modificación hidrofóbica y en donde una o más marcador(es) se acopla(n) a uno o más aminoácido(s) N-terminal del dominio esencial del péptido hidrofóbico modificado. Las variantes comprenden además una secuencia de aminoácidos que comprende aminoácido(s) modificado(s), aminoácido(s) no natural(es) o peptidomimético(s) o compuestos adicionales que pueden imitar un esqueleto/estructura peptídica. Preferentemente, las variantes se seleccionan de variantes truncadas del extremo C-terminal de sec. con núms. de ident.: 2 a 13; sustitución de aminoácidos o variantes de deleción; variantes que comprenden aminoácido(s) modificado(s), aminoácido(s) no natural(es) o peptidomimético(s) o compuestos adicionales que pueden imitar una esqueleto/estructura peptídica.

20 De acuerdo con la invención, una variante de un péptido hidrofóbico modificado comprende al menos los aminoácidos que tienen la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 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 anteriores sec. con núms. de ident.: 2 a 13, o variantes de estas.

25 Las variantes truncadas en el extremo N-terminal y/o en el extremo C-terminal comprenden preferentemente al menos 18 aminoácidos consecutivos, con mayor preferencia al menos 19 aminoácidos consecutivos, incluso con mayor preferencia al menos 20 y solo incluso con mayor preferencia al menos 21 aminoácidos consecutivos de las sec. con núms. de ident.: 2 a 13 o variantes de estas.

30 La secuencia N-terminal (X) del péptido hidrofóbico modificado que tiene una longitud de m aminoácidos puede consistir en 5, 6, 7 u 8 aminoácidos.

35 En una modalidad preferida, uno o más aminoácido(s) de X tienen un grupo amino en una cadena lateral, que se seleccionan preferentemente de entre lisina, α -amino glicina, ácido α , γ -diaminobutírico, ornitina, α , β ácido diaminopropiónico, con mayor preferencia lisina. El (los) aminoácido(s) de X que tiene(n) un grupo amino en una cadena lateral, preferentemente se encuentra(n) en el extremo N de X, en donde uno a once (1-11), preferentemente uno a tres (1 - 3), aminoácidos que tienen un grupo amino en una cadena lateral se encuentran en el extremo N de X.

40 En una modalidad preferida, la secuencia N-terminal (X) del péptido hidrofóbico modificado comprende preferentemente la secuencia NX1SX2X3 (sec. con núm. de ident.: 16), en donde X1, X2 y, X3 pueden ser aminoácidos arbitrarios. Preferentemente, X1 de la sec. con núm. de ident.: 16 es L, I o Q, con mayor preferencia L. Preferentemente, X2 de la sec. con núm. de ident.: 16 es T, V, A o no está presente, preferentemente T o V, con mayor preferencia T. Preferentemente, X3 de la sec. con núm. de ident.: 16 es P, S, T o F, con mayor preferencia P o S, incluso con mayor preferencia S. Preferentemente, la secuencia NX1SX2X3 (sec. con núm. de ident.: 16) se une directamente al extremo N del péptido P (sec. con núm. de ident.: 1; NPLGFXaaP), que resulta en un péptido que comprende la secuencia NX1SX2X3NPLGFXaaP, en donde X1, X2, X3 y Xaa se definen como anteriormente.

50 La secuencia C-terminal (Y) del péptido hidrofóbico modificado que tiene una longitud de n aminoácidos comprende al menos 1 aminoácidos. Preferentemente, la secuencia terminal (Y) del péptido hidrofóbico modificado puede consistir en 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 3 a 93.

55 En una modalidad preferida, la secuencia C-terminal (Y) del péptido hidrofóbico modificado consiste en al menos 4 aminoácidos (n = 4), que preferentemente tiene la secuencia X4HQLDP (sec. con núm. de ident.: 17), en donde X4 es un aminoácido arbitrario. Preferentemente, X4 de sec. con núm. de ident.: 17 es D, E o S, con mayor preferencia D o E, incluso con mayor preferencia D. Preferentemente, la secuencia X4HQLDP (sec. con núm. de ident.: 17) se une directamente al extremo C del péptido P (sec. con núm. de ident.: 1; NPLGFXaaP), que resulta en un péptido que comprende la secuencia NPLGFXaaPX4HQLDP, en donde X4 y Xaa se definen como anteriormente.

60 En una modalidad preferida, el péptido hidrofóbico modificado de la presente invención comprende un péptido codificado por la secuencia de aminoácidos NX1SX2X3NPLGFXaaPX4HQLDP (sec. con núm. de ident.: 18), en donde X1, X2, X3, X4 y Xaa se definen como anteriormente.

65

El término "variante" además se refiere a las secuencias homólogas encontradas en las diferentes especies, cepas o subtipos virales del género hepadnavirus, tales como la cepa alfa del HBV, la cepa LSH del HBV (aislado del chimpancé), el HBV del mono lanudo (WMHBV) o las cepas seleccionadas del grupo que consiste en los genotipos A y H del HBV (ver la sec. con núm. de ident.: 2-13).

El término "variante" además se refiere a secuencias homólogas que muestran al menos 50% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que comprende el dominio invariante NPLGFXaaP y las secuencias adyacentes de la sec. con núm. de ident.: 2-13 o cualquier otra secuencia de aminoácidos descrita en la presente descripción, preferentemente 70%, con mayor preferencia 80%, incluso con mayor preferencia 90% o 95%.

Así, un péptido hidrofóbico modificado preferido de acuerdo con la invención comprende una variante de las sec. con núms. de ident.: 2 a 13 con una secuencia de aminoácidos de las diferentes especies, cepas o subtipos virales, preferentemente de los genotipos de HBV o HBV de mono lanudo (WMHBV) o variantes de estos.

"Variantes" de las sec. con núms. de ident.: 2 a 13 además comprenden variantes o "análogos" que comprenden deleciones de aminoácidos, sustituciones de aminoácidos, tales como la sustitución conservativa o no conservativa por otros aminoácidos o por isómeros (aminoácidos modificados que tienen una similitud estructural y espacial con los aminoácidos de proteínas), adiciones de aminoácidos o adiciones de isómeros, siempre que la secuencia aún muestre tropismo hepático, preferentemente más del 10% de la dosis inyectada se acumula en el tejido hepático después de 1 h después de la inyección intravenosa. El tropismo hepático del péptido hidrofóbico modificado o una "variante" de esta es preferentemente 80% o más de la dosis inyectada/g de tejido hepático después de 1 h, más preferido 90% o más de la dosis inyectada/g de tejido hepático después de 1 h, incluso más preferido 95% o más de la dosis inyectada/g de tejido hepático después de 1 h.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas típicamente se relacionan con las sustituciones entre los aminoácidos de la misma clase. Estas clases incluyen, por ejemplo,

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

"N-terminal" se refiere al extremo N de X, es decir, el primer residuo de aminoácido respectivo, pero comprende además la modificación hidrofóbica en proximidad cercana al extremo N, tales como los residuos de aminoácido respectivos (-4), (-3), (-2), (-1), 1, 2 o 3 o 4. Así, el acoplamiento del marcador y la modificación hidrofóbica pueden obtenerse además mediante la unión de un marcador y una porción hidrofóbica en un sitio cercano al extremo N de X.

La modificación hidrofóbica de dicho péptido hidrofóbico modificado de acuerdo con la presente invención añade una porción hidrofóbica al péptido.

X se modifica con al menos un grupo o porción hidrofóbica. En modalidades preferidas de esta invención, X se modifica con 1, 2, 3, 4 o más porción(es) o grupo(s) hidrofóbico(s). Es decir, X puede modificarse con más de una porción o grupo hidrofóbico, tal como 2. Las porciones o grupos hidrofóbicos pueden ser iguales o diferentes entre sí. La modificación hidrofóbica de dicho péptido de acuerdo con la presente invención se selecciona de:

- acilación;
- adición de porciones hidrofóbicas.

La acilación se selecciona preferentemente de la acilación con ácidos carboxílicos, ácidos grasos, aminoácidos con cadenas laterales lipofílicas. Los ácidos grasos preferidos son ácidos grasos saturados o insaturados, ácidos grasos ramificados o no ramificados, preferentemente con 8 a 22 átomos de carbono (C 8 a C 22). Con mayor preferencia, la modificación hidrofóbica por acilación se selecciona de la acilación con miristoilo (C 14), palmitoilo (C 16) o estearoilo (C 18). La modificación por miristoilación se prefiere en aplicaciones in vivo y medicinales debido a su mayor seguridad, por ejemplo, que no muestra los efectos adversos del grupo estearoilo (respuesta inmune innata, etc.). La adición de porciones hidrofóbicas se selecciona preferentemente de la adición de colesterol, derivados de colesterol, fosfolípidos, glicolípidos, ésteres de glicerol, esteroides, ceramidas, derivados de isopreno, adamantano, farnesol, grupos alifáticos, compuestos poliaromáticos. La unión de las porciones hidrofóbicas es preferentemente mediante unión covalente, que puede lograrse mediante carbamato, amida, éter, disulfuro o cualquier otro enlace que esté dentro de la experiencia de los expertos en la técnica. Así, los péptidos hidrofóbicos modificados, preferentemente acilados de esta invención son preferentemente lipopéptidos debido a su grupo/porción lipofílico o hidrofóbico N-terminal.

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

"C-terminal" se refiere a la modificación en el extremo C, es decir, el último residuo de aminoácido respectivo, pero comprende además la modificación en la proximidad cercana al extremo C, tal como el último pero un residuo de aminoácido, el último pero dos residuos de aminoácidos o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, la introducción de un D-aminoácido que protege al portador de la degradación enzimática, por ejemplo, por la acción de las carboxipeptidasas). El experto en la técnica podrá seleccionar las respectivas porción(es) adecuada(s) en dependencia de la aplicación correspondiente. Las porciones preferidas que protegen de la degradación se seleccionan de amidas, D-aminoácidos, aminoácidos modificados, aminoácidos cíclicos, albúmina, polímeros naturales y sintéticos, tales como PEG, glicano. Además, o es 0 o al menos 1, es decir, la modificación (R) C-terminal es opcional. Preferentemente, o es 1. En modalidades adicionales de esta invención o es 1, 2, 3, 4 o más. Es decir, el extremo C del péptido hidrofóbico modificado o su proximidad puede modificarse con más de una porción o grupo, tal como 2. Las porciones o grupos pueden ser iguales o diferentes entre sí.

En una modalidad de esta invención, la modificación hidrofóbica y/o R se enlazan al péptido a través de un enlazador o espaciador. El enlazador o espaciador son conocidos por los expertos en la técnica, tales como polialanina, poliglicina, carbohidratos, grupos (CHa)_n. El experto en la técnica podrá seleccionar, así, el(los) enlazador(es) o espaciador(es) correspondiente(s) dependiendo de la aplicación respectiva.

El grupo de anclaje opcional (A) sirve como un punto de unión adicional para un compuesto, una etiqueta, un marcador y se ubica en un aminoácido de Y. Es decir, en caso de que al menos un grupo de anclaje (A) esté presente (es decir, $p \geq 1$) Y también comprende al menos un aminoácido (es decir, $n \geq 1$). En una modalidad preferida, el grupo de anclaje es "C-terminal" de Y, en donde "C-terminal" se refiere a la modificación en el extremo C, es decir, el último residuo de aminoácido respectivo, pero comprende además la proximidad cercana del extremo C, tal como el último pero un residuo de aminoácido, el último pero dos residuos de aminoácido o más residuos de aminoácido. En este caso o puede ser 0, así, no existe otra modificación R C-terminal. El grupo de anclaje A puede estar en una cadena lateral de aminoácido de Y o puede ser la cadena lateral de aminoácido de Y en sí, es decir, A puede ser una propia cadena lateral o una cadena lateral modificada. El grupo de anclaje además puede ser un residuo de aminoácido modificado que se introdujo en la secuencia de aminoácido de Y para servir como un grupo de anclaje. En otras modalidades de la invención, el grupo de anclaje A se une a la modificación hidrofóbica de X y/o la modificación R de C-terminal. Los grupos de anclaje preferidos se seleccionan de éster, éter, disulfuro, amida, tiol, tioéster. El experto en la técnica podrá seleccionar el(los) grupo(s) de anclaje(s) adecuado(s) correspondiente(s) en dependencia del respectivo compuesto, etiqueta, marcador etc. que se adjunta. Además, el grupo de anclaje puede ser adecuado para unir un componente formador de complejos, tal como el complejo de biotina/avidina, poliarginina/oligonucleótido (por ejemplo, ARNip). Además, o es 0 o al menos 1, es decir, el grupo de anclaje (A) es opcional. Preferentemente, o es 1. En modalidades adicionales de esta invención o es 1, 2, 3, 4 o más. Es decir, existen más de un grupo de anclaje, tal como 2. Los grupos de anclaje pueden ser iguales o diferentes entre sí, lo que permite la unión de varios compuestos, tal como un marcador o marcadores diferentes.

Síntesis de los péptidos hidrofóbicos modificados.

Los péptidos de la invención pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos fácilmente conocidos por los expertos en la técnica, en general mediante procedimientos químicos sintéticos y/o procedimientos de ingeniería genética. Los procedimientos químicos sintéticos incluyen más particularmente la síntesis secuencial y en bloques en fase sólida (Erickson y Merrifield, 1976). Se pueden tomar más detalles del documento de patente núm. WO2009/092612.

El procedimiento secuencial en fase sólida puede realizarse usando métodos automatizados establecidos, tal como el uso de un sintetizador de péptidos automatizado. En este procedimiento, un aminoácido [alfa]-amino protegido se une a un soporte de resina. El soporte de resina empleado puede ser cualquier resina adecuada empleada convencionalmente en la técnica para la preparación en fase sólida de (poli)péptidos, preferentemente poliestireno que se ha copolimerizado con polioxitileno para proporcionar sitios para la formación de ésteres con el aminoácido o-amino protegido introducido inicialmente. Este método optimizado, aplicado por los inventores, se ha descrito explícitamente (ver por ejemplo, 12). Los aminoácidos se introducen uno por uno (gradualmente). Cada ciclo de síntesis correspondiente a la introducción de un aminoácido incluye una etapa de desprotección, etapas de lavado sucesivos, una etapa de acoplamiento con la activación del aminoácido, y etapas de lavado subsiguientes. Cada una de estas etapas es seguida por una filtración. Los agentes reactivos para el acoplamiento son los agentes reactivos clásicos para la síntesis de (poli)péptidos, tales como dicitclohexilcarbodiimida, hidroxibenzotriazol, benzotriazol-1-il-oxitris (dimetilamino) fosfonio hexafluorofosfato y difenilfosforocloruro. Después de la síntesis del polipéptido en la resina, el polipéptido se separa de la resina por un tratamiento con un ácido fuerte tal como ácido trifluoroacético en presencia de anisol, etanoditol o 2- metilindol. El compuesto se purifica después por las técnicas clásicas de purificación, en particular por medio de HPLC.

Los péptidos de la presente invención además pueden obtenerse acoplando fragmentos de (poli)péptido que se protegen selectivamente, efectuándose este acoplamiento, por ejemplo, en una solución. Los péptidos pueden producirse adicionalmente mediante técnicas de ingeniería genética como conocen los expertos en la técnica. Un sistema de expresión eucariótico, tal como el sistema de baculovirus, es particularmente adecuado. De acuerdo con este procedimiento, las proteínas se expresan en células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga y que regula las secuencias de ácido nucleico, tal como un promotor. Hay varias líneas celulares disponibles para la infección con baculovirus recombinante, tal como la

línea celular Sf-9, disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (CRL 1711). La expresión en un sistema de expresión procariota, tal como E. coli, además es particularmente adecuada.

5 La introducción de la porción hidrofóbica en el péptido puede lograrse mediante una variedad de procedimientos fácilmente conocidos por los expertos en la técnica, incluidos los enfoques de ingeniería genética y sintética.

10 Alternativamente, los péptidos y/o péptidos de fusión (es decir, péptidos hidrofóbicos modificados) pueden producirse mediante líneas celulares eucarióticas transfectadas de manera estable, como CHO y otras líneas celulares que son conocidas en la técnica y se usan por lo general para generar vacunas y similares. Debido a la propiedad intrínseca de que los aminoácidos N-terminal 47-preSI promueven la secreción de una proteína/péptido miristoilado, el péptido hidrofóbico modificado biológicamente activo puede extraerse de los sobrenadantes de cultivos celulares.

Vectores y lanzaderas para direccionamiento al hígado.

15 Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona el uso de los péptidos hidrofóbicos modificados como vehículo o lanzadera para el suministro específico de un compuesto (marcador) al hígado, en donde el marcador se acopla a los péptidos hidrofóbicos modificados como se describe en la presente descripción.

20 "Vehículo" o "lanzadera" para el suministro específico de un compuesto al hígado de acuerdo con la presente invención se refiere al tropismo hepático o al hepatotropismo de los péptidos hidrofóbicos modificados tal como fueron encontrados por los inventores y descritos en la presente descripción, es decir, a su capacidad para acumular selectivamente en el hígado, preferentemente para acumularse selectivamente en la membrana plasmática de hepatocitos, así como para entrar selectivamente en hepatocitos. La invención se basa en el descubrimiento de una acumulación hepática altamente específica y en la identificación de los determinantes del tropismo hepático del HBV en la secuencia preS 1 del HBV por
25 los inventores. Así, la invención usa el conocimiento acerca de los determinantes del tropismo hepático para el diseño de vehículos o lanzaderas universales para el direccionamiento o suministro específico al hígado, respectivamente. Los péptidos hidrofóbicos modificados de la presente invención son vehículos o lanzaderas versátiles para suministrar específicamente compuesto(s) al hígado.

30 Preferentemente, el suministro específico de un compuesto al hígado es el suministro específico del compuesto a los hepatocitos. Además, el compuesto puede suministrarse específicamente *in vitro* así como *in vivo* a los hepatocitos. El compuesto preferentemente se suministra específicamente al hígado de un animal, preferentemente de mamífero o humano, o un ave.

35 Marcadores que se suministran

Los marcadores que se suministran específicamente al hígado de acuerdo con la presente descripción pueden ser cualquier tipo de compuesto que sea adecuado para propósitos de diagnóstico. Preferentemente, la etiqueta comprende un agente quelante que forma un complejo con cationes metálicos divalentes o trivalentes.

40 En la invención, el marcador se selecciona a partir de un colorante fluorescente, un radioisótopo y un agente de contraste. De acuerdo con la presente invención, un agente de contraste es un colorante u otra sustancia que ayuda a mostrar áreas anormales dentro del cuerpo.

45 Los isótopos emisores de radioisótopos/fluorescencia preferidos se seleccionan del grupo que consiste en isótopos emisores de radiación alfa, isótopos emisores de radiación gamma, isótopos emisores de electrones Auger, isótopos emisores de rayos X, isótopos emisores de fluorescencia, tales como ¹⁸F, ⁵¹Cr, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ^{99m}Tc, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ¹⁴⁹Pm, ¹⁷⁷Lu, ⁴⁷Sc, ¹⁴²Pr, ¹⁵⁹Gd, ²¹²Bi, ⁷²As, ⁷²Se, ⁹⁷Ru, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁵Rh, ^{101m}¹⁵Rh, ¹¹⁹Sb, ¹²⁸Ba, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I, ¹⁹⁷Hg, ²¹¹At, ¹⁶⁹Eu, ²⁰³Pb, ²¹²Pb, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁶Re, ¹⁹⁸Au y ¹⁹⁹Ag.

50 Los colorantes fluorescentes preferidos se seleccionan de las siguientes clases de colorantes: Xantenos (por ejemplo, Fluoresceína), Acridinas (por ejemplo, Amarillo Acridina), Oxazinas (por ejemplo, Oxazina 1), Cininas (por ejemplo, Cy7 / Cy 3), colorantes estirilos (por ejemplo, Dye-28), Coumarinas (por ejemplo, Alexa Fluor 350), Porfinas (por ejemplo, Clorofila B), complejos de ligandos metálicos (por ejemplo, PtOEPK), proteínas fluorescentes (por ejemplo, APC, ficoeritrina), nanocristales (por ejemplo, QuantumDot 705), perilenos (por ejemplo, Lumogen Red F300) y ftalocianinas (por ejemplo, IRDYE™ 700DX) y conjugados y combinaciones de estas clases de colorantes. Los agentes de contraste preferidos se seleccionan entre agentes paramagnéticos, por ejemplo, Gd, Eu, W y Mn, preferentemente complejados con un agente quelante. Otras opciones son complejos y partículas supramagnéticas de hierro (Fe), compuestos que
60 contienen átomos de alto número atómico, es decir, yodo para tomografía computarizada (CT), microburbujas y portadores como los liposomas que contienen estos agentes de contraste.

Agente quelante

65 El marcador que se suministrará específicamente a los hepatocitos puede unirse al péptido hidrofóbico modificado en forma de un complejo con un agente quelante capaz de formar complejos con el marcador respectivo. En una modalidad

preferida de la invención, el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N',N,N'-tetraacético (DOTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA), trietilentetramina (TETA), ácido iminodiacético, ácido dietilentriamina-N,N,N',N',N"-pentaacético (DTPA) y el ácido 6-hidrazinopiridin-3-carboxílico (HYNIC), mientras que el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N,N'-tetraacético (DOTA) es particularmente preferido.

Acoplamiento de un marcador al péptido hidrofóbico modificado.

El acoplamiento de lo(s) marcador(es) a los respectivos aminoácidos de X puede realizarse mediante cualquier método adecuado conocido por el experto en la técnica.

En una modalidad preferida de la presente invención, el(los) marcador(es) se acopla(n) al aminoácido respectivo de X mediante el uso de un éster activado. En particular, este método puede usarse en el caso de un acoplamiento de marcador(es) a los aminoácidos de X que tienen un grupo amino en una cadena lateral. Alternativamente, pueden usarse los siguientes métodos de acoplamiento para acoplar una o más marcadores a los respectivos aminoácidos de X, que se resumen brevemente. Las condiciones de reacción específicas para lograr un acoplamiento de un marcador a un aminoácido con o sin un enlazador pueden determinarse fácilmente por un químico:

- La formación de amidas mediante la reacción de una amina y ácidos carboxílicos activados, preferentemente ésteres de NHS o carbodiimidas; una carbodiimida es un agente de reticulación completo que facilita la conjugación directa de los carboxilos a la amina primaria. Los ésteres de NHS son grupos reactivos formados por la activación con carbodiimida de moléculas que contienen los grupos carboxilato
- El enlace disulfuro en con el uso de dos tioles o un tiol que reacciona específicamente con disulfuros de piridilo; los disulfuros de piridilo reaccionan con los grupos sulfidrilo en un amplio intervalo de pH (el óptimo es pH 4-5) para formar enlaces 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.
- Formación de tioéter con el uso de maleimidas o haloacetilos y un componente tiol; los haloacetilos reaccionan con grupos sulfidrilo a pH fisiológico. La reacción del grupo yodoacetilo procede de la sustitución nucleófila del yodo con un átomo de azufre a partir de un grupo sulfidrilo para dar como resultado un enlace tioéter estable. El grupo maleimida reacciona específicamente con los grupos sulfidrilo cuando el pH de la mezcla de reacción está entre pH 6,5 y 7,5 y forma un enlace tioéter estable que no es reversible.
- La formación de amidina con el uso un imidoéster y una amina; los agentes de reticulación de imidoéster reaccionan rápidamente con aminas a pH alcalino pero tienen vidas medias cortas. A medida que el pH se vuelve más alcalino, aumenta la vida media y la reactividad con las aminas; por lo tanto, la reticulación es más eficiente cuando se realiza a pH 10 que a pH 8. Las condiciones de reacción por debajo del pH 10 pueden provocar reacciones secundarias, aunque la formación de amidina se ve favorecida entre el pH 8-10.
- El enlace hidrazida con el uso de carbonilos (por ejemplo, aldehídos) e hidrazidas; los carbonilos (aldehídos y cetonas) reaccionan con las hidrazidas y aminas a pH 5-7. Los carbonilos no existen fácilmente en las proteínas; sin embargo, la leve oxidación de los glicoles de azúcar con el uso de metaperyodato de sodio convierte a los hidroxilos vecinos en aldehídos o cetonas. La reacción posterior con hidrazidas da como resultado la formación de un enlace de hidrazona.
- El enlace amina con el uso de 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 más comúnmente una cetona o un aldehído.
- Formación de triazol catalizado por cobre con el uso de nitrilos y azidas. La cicloadición 1,3-dipolar de tipo Huisgen entre una azida y un alquino terminal o interno se usa para dar 1,2,3-triazoles estables.
- Formación de isotiourea con el uso de isotiocianatos y aminas; la reacción entre los isotiocianatos y las aminas, es decir, los grupos ϵ -amino de la lisina conduce a un enlace de isotiourea estable.
- Formación de ésteres por reacción de un alcohol y ácidos carboxílicos activados, preferentemente cloruros de ácido o carbodiimidas; la reacción a altas temperaturas permite que la reacción directa entre alcoholes y ácidos carboxílicos forme ésteres estables, alternativamente los ácidos carboxílicos pueden activarse en condiciones catalíticas ácidas o básicas.
- Formación de éteres por la reacción de un alcohol y haluros de alquilo. Los haloalcanos son reactivos frente a los nucleófilos. Son moléculas polares: el carbono que está unido al halógeno es ligeramente electropositivo y el halógeno es ligeramente electronegativo. Esto resulta en un carbono deficiente en electrones (electrófilo) que, inevitablemente, atrae a los nucleófilos.

Enlazador/Espaciador para el marcador

5 El péptido hidrofóbico modificado, en particular los conjugados de la presente invención, se usan preferentemente para enriquecer un marcador que se transporta al hígado, en el hígado. Preferentemente, el marcador se escinde del péptido hidrofóbico modificado por una proteína hepática, preferentemente una enzima proteolítica hepatocelular, en particular, *in vivo* en el hígado. El marcador y el péptido hidrofóbico modificado forman un conjugado. Preferentemente, el conjugado del marcador y el péptido hidrofóbico modificado se forma por la unión covalente o por la formación de complejos. La forma de fijación depende del tipo de marcador.

10 El acoplamiento del(de los) marcador(es) a los respectivos aminoácidos de X puede realizarse con el uso de un espaciador o un enlazador. El enlazador o espaciador son conocidos por los expertos en la técnica, tales como polialanina, poliglicina, carbohidratos, grupos (CH₂)_n o secuencias de aminoácidos. El experto en la técnica podrá seleccionar, así, el(los) enlazador(es) o espaciador(es) correspondiente(s) dependiendo de la aplicación respectiva. El espaciador o enlazador comprende preferentemente un sitio de reconocimiento para la activación específica de los hepatocitos, que se reconoce preferentemente por una proteína específica de hígado o tumor. El sitio de reconocimiento es preferentemente un sitio de escisión proteolítica. La proteína hepática es preferentemente, por lo tanto, una proteína hepatocelular, con mayor preferencia una enzima proteolítica hepatocelular o una enzima proteolítica que se sobreexpresa en un tumor, por ejemplo, MMP7. Así, el conjugado puede administrarse a un sujeto y se transportará a través del cuerpo, tal como en los fluidos corporales, sin que se escinda. Sin embargo, tan pronto como el conjugado alcanza su objetivo, el hígado o los hepatocitos, respectivamente, la proteína hepática, como una enzima proteolítica hepatocelular, escindirá el sitio de escisión proteolítica y liberará el marcador de su lanzadera, es decir, el péptido hidrofóbico modificado.

25 Otras proteínas del hígado preferidas son los citocromos, tales como el citocromo P450 o las liasas de la vía endocítica. La tecnología HepDirect (R) (de Metabasis Technologies, Inc.) como se usa en Adefovir o Pradevofir, es adecuada también para la presente invención.

30 De particular importancia para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades tumorales como las alteraciones neoplásicas por metástasis de carcinomas, por ejemplo, carcinomas de colon, es el intercambio entre el tejido maligno y el tejido circundante. Existe la necesidad de la activación de células epiteliales sanas o el reclutamiento de células inmunitarias, que es un requisito previo para la formación de una metástasis distante de un tumor primario. El análisis de tejidos ha demostrado que los niveles de expresión de ARNm de las metaloproteasas específicas de tumores (MMP1, MMP2, MMP7, MMP9 y MMP12) se asocian con un mal pronóstico de los pacientes con tumores (Gentner B. y otros, *Anticancer Res.* 2009 Jan; 29 (1): 67-74). De estas proteasas, especialmente, la MMP7 es de gran interés, ya que se expresa principalmente por las células tumorales. El acoplamiento del marcador a la secuencia peptídica descrita a través de una secuencia enlazadora que contiene un sitio de unión proteolítico específico para MMP7 (por ejemplo, una secuencia de péptidos corta GCHAK o RPLALWRS) pero también todos los otros sustratos de MMP 7 (por ejemplo, fibronectina, elastina, caseína u otros) pueden dejar administrar un marcador inactivo al hígado mediante la modificación del péptido original por los medios descritos anteriormente. En el hígado, los péptidos modificados pueden escindirse después preferentemente en el entorno directo del tejido tumoral y puede activarse el marcador inactivo. Este método de suministro de marcadores a carcinomas hepatocelulares primarios dirigidos al hígado o metástasis en el hígado que sobreexpresa una de las MMP enumeradas anteriormente (por ejemplo, metástasis de carcinoma de colon) presenta una nueva forma de direccionar los marcadores a los tejidos tumorales.

45 En una modalidad, el conjugado de marcador y péptido derivado modificado e hidrófobo se forma mediante la formación de complejos. Los complejos preferidos útiles en la invención son biotina/avidina, poliarginina/oligonucleótido (por ejemplo, ARNip). El experto en la técnica podrá determinar los componentes complejos adecuados y en consecuencia, diseñar el compuesto y el péptido hidrofóbico modificado.

50 Diagnóstico de las enfermedades hepáticas

En una modalidad preferida de la invención, los péptidos hidrofóbicos modificados anteriores, en particular sus conjugados con marcadores, se proporcionan para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno hepático.

55 En dependencia de la enfermedad o trastorno hepático que se diagnosticará, se seleccionará el marcador respectivo y se suministrará específicamente al hígado. Una "enfermedad hepática" o un "trastorno hepático" de acuerdo con la presente invención se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que tiene un efecto sobre o involucra el órgano del hígado, tejido hepático o hepatocitos.

60 Los ejemplos de enfermedades hepáticas son:

- Cáncer de hígado: carcinoma hepatocelular primario (HCC) o colangiocarcinoma y cánceres metastásicos, generalmente de otras partes del tracto gastrointestinal; preferentemente carcinoma colorrectal
- Hepatitis: inflamación del hígado, causada principalmente por varios virus pero además por ciertos venenos, autoinmunidad o afecciones hereditarias;

- Cirrosis: la formación de tejido fibroso en el hígado, que reemplaza a las células hepáticas muertas. La muerte de las células hepáticas puede ser causada, por ejemplo, por hepatitis viral, alcoholismo o contacto con otras sustancias químicas tóxicas para el hígado;
- 5 - Hemocromatosis: una enfermedad hereditaria que causa la acumulación de hierro en el cuerpo, que eventualmente conduce al daño hepático;
- Enfermedad de Wilson: una enfermedad hereditaria que hace que el cuerpo retenga el cobre;
- Colangitis esclerosante primaria: una enfermedad inflamatoria del conducto biliar, de naturaleza autoinmune;
- Cirrosis biliar primaria: enfermedad autoinmune de los conductos biliares pequeños;
- 10 - Síndrome de Budd-Chiari: obstrucción de la vena hepática;
- Síndrome de Gilbert: un trastorno genético del metabolismo de la bilirrubina, que se encuentra en aproximadamente el 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 corporales, particularmente en el corazón, los músculos esqueléticos, el hígado y el sistema nervioso.;
- 15 - enfermedad pediátrica del hígado, como atresia biliar, deficiencia de alfa-1 -antitripsina, síndrome de alagille y colestasis intrahepática familiar progresiva;
- enfermedades metabólicas.

Además, se incluyen también las enfermedades hepáticas de los animales, como las mascotas o el ganado, en particular las enfermedades que pueden transmitirse a los seres humanos, tal como toxoplasmosis.

La enfermedad o trastorno hepático a diagnosticar se selecciona preferentemente entre carcinoma hepatocelular primario, metástasis de otros tumores, hepatitis, cirrosis, hemocromatosis, preferentemente hepatitis causada por virus de hepatitis A, B, C, D, E, F, G y H. La enfermedad o trastorno hepático a diagnosticar puede ser también una hepatitis concomitante causada por virus, tales como virus de la familia Herpesviridae, por ejemplo, el virus del herpes, el virus citomegálico (CMV) pero también el virus de la varicela zoster (VZV), el virus de Epstein Barr (EBV), virus coxsackie, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue.

La enfermedad o trastorno hepático a diagnosticar también puede ser una enfermedad que involucra un estadio hepático de un virus o un patógeno no viral, tales como en muchas enfermedades tropicales. Dado que el estadio hepático de algunos patógenos es un estadio temprano, la infección respectiva puede tratarse de forma selectiva, específicamente en dicho estadio temprano. Tales virus son los virus de la hepatitis A, B, C, D, E, F, G y H, los virus del herpes.

Dichos patógenos no virales son bacterias, parásitos y/o gusanos. Los parásitos son, por ejemplo, parásitos protozoarios del género Plasmodium que causan malaria, como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* y especies relacionadas (por ejemplo, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*). Tales gusanos son, por ejemplo, gusanos planos del género *Schistosoma* que causan esquistosomiasis o bilharziosis, tales como *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* y *Schistosoma mekongi*. Dichos parásitos también son, por ejemplo, protozoos de Leishmania tripanosoma del género Phlebotomus y Lutzomyia que son responsables de la enfermedad de la leishmaniasis. Por lo tanto, la malaria, la esquistosomiasis (bilharziosis) y/o la leishmaniasis pueden diagnosticarse por medio de esta invención. Por lo tanto, ciertas enfermedades tropicales pueden diagnosticarse por medio de esta invención.

Las enfermedades o trastornos hepáticos a diagnosticar son preferentemente tumores hepáticos, preferentemente carcinoma hepatocelular (HCC) o alteraciones neoplásicas por metástasis de tumores sólidos, por ejemplo, carcinoma colorrectal.

En una modalidad preferida de la invención, los péptidos hidrofóbicos modificados descritos anteriormente se usan para el diagnóstico y la clasificación temprana de lesiones neoplásicas primarias del hígado, tales como, el carcinoma hepatocelular en estadio temprano.

Otra modalidad preferida de la invención es el uso de los péptidos hidrofóbicos modificados descritos anteriormente para el diagnóstico temprano de lesiones metastásicas en el hígado, tales como metástasis de carcinoma colorrectal (CRC). La enfermedad o trastorno hepático a diagnosticar puede ser también una enfermedad metabólica, como diabetes, hiperlipidemia, síndrome metabólico y obesidad, hiperglucemia crónica, síndrome metabólico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) (ver también (9)).

En una modalidad preferida de la invención, los péptidos derivados hidrofóbicos modificados, preferentemente acilados, descritos anteriormente, en particular sus conjugados con marcadores, pueden usarse para la fabricación de un medicamento para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno hepático.

Imágenes médicas

Los péptidos hidrofóbicos modificados de la presente invención pueden usarse en imágenes médicas conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos adecuados son imágenes de rayos X, imágenes de resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) tomografía

computarizada por rayos X (CT) y combinaciones de estos métodos (por ejemplo, PET CT, CT-MRI). Los expertos en la técnica conocen las condiciones específicas para llevar a cabo estos métodos de formación de imágenes médicas.

Composiciones farmacéuticas

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido hidrofóbico modificado como se define en la presente y al menos un compuesto para ser administrado específicamente al hígado como se define en la presente y opcionalmente un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende:

- al menos un péptido hidrofóbico modificado como se definió en la presente descripción anteriormente; y
- opcionalmente un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

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

Un "portador o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier vehículo en donde o con el cual se puede formular las composiciones farmacéuticas o de vacunas de acuerdo con la invención. Incluye una solución salina, tal como solución salina con tampón fosfato, un tampón de citrato, NaCl, glucósido de octilo y/o un poloxámero. En general, un diluyente o portador se selecciona en función del modo y la vía de administración, y de la práctica farmacéutica estándar.

Método de diagnóstico

Además, y como se describió anteriormente, la presente invención proporciona métodos para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno hepático utilizando el(los) péptido(s) hidrofóbico(s) modificados descritos anteriormente o la(s) composición(es) farmacéuticas de la invención.

La presente invención proporciona también un método para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno hepático mediante la administración a un sujeto de un péptido hidrofóbico modificado derivado y un marcador, o una composición farmacéutica como se define en la presente invención. El método para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno hepático de acuerdo con la presente invención comprende administrar a un sujeto en una cantidad diagnósticamente eficaz

- (a) un péptido hidrofóbico modificado como se definió anteriormente y que comprende al menos un marcador como se definió anteriormente en la presente, o
- (b) una composición farmacéutica como se definió anteriormente en la presente.

Vía de administración

Preferentemente, la vía de administración de los péptidos hidrofóbicos modificados o composiciones farmacéuticas de la presente invención, en particular en el método de tratamiento, se selecciona de la vía subcutánea, intravenosa, oral, nasal, intramuscular, transdérmica, inhalativa, por supositorio. Una modalidad preferida para la administración o aplicación nasal es un aerosol nasal.

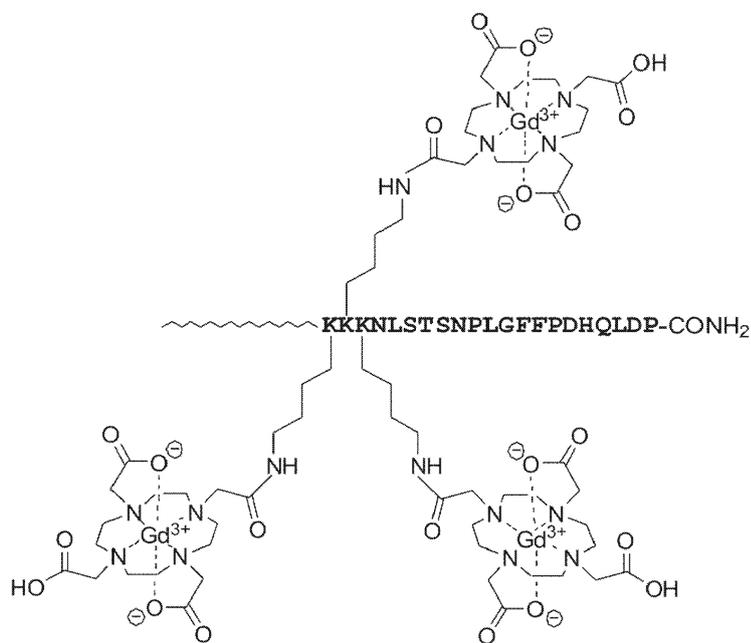
En una modalidad preferida adicional, el péptido hidrofóbico modificado de la invención que comprende un marcador se disuelve en el suero del paciente y se aplica a través de la inyección.

Cantidad diagnósticamente eficaz

Una "cantidad diagnósticamente eficaz" de un péptido hidrofóbico modificado o una composición farmacéutica de esta invención se refiere a la cantidad que es suficiente para diagnosticar la enfermedad o trastorno hepático respectivo. La cantidad diagnósticamente eficaz preferida depende del compuesto respectivo que se va a administrar y su potencial de diagnóstico respectivo. El experto en la técnica será capaz de determinar las cantidades adecuadas diagnósticamente eficaces. En una modalidad preferida, la cantidad diagnósticamente eficaz está en el intervalo de 10 pmol por kg a 20 μ mol por kg de peso corporal. Para su uso como agente de diagnóstico (es decir, un marcador se acopla al péptido hidrofóbico modificado), la cantidad que debe aplicarse a un paciente está preferentemente en el intervalo de 100 nmol a 2 μ mol, con mayor preferencia aproximadamente de 500 nmol por kg de peso corporal. Cuando se utiliza la MRI como método de obtención de imágenes médicas, el péptido hidrofóbico modificado respectivo se aplica preferentemente a un paciente en una cantidad que varía de 300 nmol a 800 nmol por kg de peso corporal, con mayor preferencia de 400 a 600 nmol por kg de peso corporal.

Péptidos hidrofóbicos modificados preferidos de la invención.

A continuación, se proporcionan los péptidos hidrofóbicos modificados preferidos de la invención. Estos péptidos hidrofóbicos modificados se basan en la secuencia de aminoácidos KKKNLSTSNPLGFFPDHQLDP (sec. con núm. de ident. 14) o KKKNLSTSNPLGFFPDHQLDP (sec. con núm. de ident. 15), en donde una o dos de las lisinas N-terminales (K) pueden eliminarse o sustituirse por otro aminoácido. Un péptido hidrofóbico modificado preferido ilustrativo tiene la siguiente estructura química:



La secuencia de aminoácidos del compuesto que tiene la estructura química ejemplificada anteriormente es: Estearoil-K(DOTA[Gd])K(DOTA[Gd])K(DOTA[Gd])NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida, en donde cada uno de los tres agentes quelantes ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N',N'-tetraacético (DOTA) se acompleja con un catión Gd y se une a una de las tres lisinas N-terminales (KKK), mientras que la primera lisina N-terminal se modifica aún más con un grupo estearoil hidrofóbico. En este sentido, se debe tener en cuenta que las fórmulas de los péptidos hidrofóbicos modificados de la invención se simplifican en el texto, de manera que el péptido hidrofóbico modificado ejemplificado anteriormente puede denominarse también "estearoil -[K(DOTA[Gd])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida"

Se proporcionan los siguientes péptidos hidrofóbicos modificados preferidos de la invención, así como su uso específico en el diagnóstico de enfermedades o trastornos del hígado:

- Estearoil-[K(DOTA[Gd])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP
- Estearoil-[K(DOTA[⁶⁸Ga])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP
- Estearoil-[K(DOTA[¹¹¹In])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP
- Estearoil-[K(DOTA[Gd])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLPD
- Estearoil-[K(DOTA[⁶⁸Ga])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLPD
- Estearoil-[K(DOTA[¹¹¹In])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLPD
- Estearoil-[K(DOTA[Gd])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida
- Estearoil-[K(DOTA[⁶⁸Ga])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida
- Estearoil-[K(DOTA[¹¹¹In])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida
- Estearoil-[K(DOTA[Gd])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLPD-amida
- Estearoil-[K(DOTA[⁶⁸Ga])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLPD-amida
- Estearoil-[K(DOTA[¹¹¹In])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLPD-amida

Tabla 1 Péptidos hidrofóbicos modificados preferidos

	Péptido hidrofóbico modificado	Marcador / Agente acoplado	Aplicación
5	estearoil-[K(DOTA[Gd]) ₃ -NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida	Gd	Diagnóstico
	estearoil-[K(DOTA[⁶⁸ Ga]) ₃ -NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida	⁶⁸ Ga	Diagnóstico
	estearoil-[K(DOTA[¹¹¹ In]) ₃ -NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida	¹¹¹ In	Diagnóstico
10	estearoil-[K(DOTA[Gd]) ₃ -NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida	Gd	Diagnóstico
	estearoil-[K(DOTA[⁶⁸ Ga]) ₃ -NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida	⁶⁸ Ga	Diagnóstico
	estearoil-[K(DOTA[¹¹¹ In]) ₃ -NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida	¹¹¹ In	Diagnóstico
15	estearoil se refiere a la esterificación del extremo N-terminal		

Los siguientes ejemplos y dibujos ilustran la presente invención sin limitar, sin embargo, los mismos.

20 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática de la partícula de HBV y de las proteínas L-, M- y S- del VHB. El ADN parcialmente bicatenario está covalentemente asociado con el complejo de la polimerasa viral, que consiste en la proteína terminal, (TP), la transcriptasa inversa (RT) y la RNasaH. El genoma está encapsulado por una cubierta icosaédrica, construida con 120 dímeros de proteínas nucleares. Las 3 proteínas de superficie L-, M- y S- de HBV se integran en una bicapa lipídica derivada del RE. Las proteínas L- y M- contienen el dominio-S completo que sirve como anclaje de membrana. Representación esquemática del genoma de ADN parcialmente bicatenario del HBV; C = proteína del núcleo que forma la cápside viral; X = proteína X, un transactivador pleiotrópico con función indefinida; P = polimerasa viral; combinaciones preS1 / preS2 / S de estos forman la proteína de superficie HBV grande (preS1/preS2/S) (proteína L), la proteína de superficie HBV media (preS2/S) y la proteína de superficie HBV pequeña (S).

Figura 2: Diagrama esquemático de la fórmula general del péptido hidrofóbico modificado de la presente invención y un ejemplo de un péptido hidrofóbico modificado de la invención.

35 Figura 3: Diagrama esquemático de la unión de un péptido hidrofóbico modificado de la invención a la superficie de un hepatocito.

Figura 4. Imagen PET de una rata portadora de tumor. Figura 4A Enriquecimiento específico de 400 nmol/kg de estearoil-[K(DOTA [⁶⁸Ga])₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida en el hígado de una rata WAG/Rji cinco minutos después de la inyección iv. Figura 4B Contraste con el uso de 18F-FDG 24 horas después de la medición inicial, 18F-FDG se enriquece en órganos que consumen grandes cantidades de glucosa, en la imagen del corazón (masa gris en la parte superior) y el tumor rico en glucosa (18F-FDG enriquecido en el cerebro no se muestra por razones técnicas). Figura 4C Unión de ambas imágenes que demuestran la especificidad de los péptidos que tiñen solo el tejido del hígado pero no el tejido tumoral.

La Figura 5 muestra una serie de imágenes representativas de MRI de una rata antes de la inyección de 600 nmol/kg de peso corporal de estearoil-[K(DOTA[Gd])₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP (Figura 5A), así como 20 (Figura 5B) y 30 minutos (Figura 5C) posterior a la inyección.

La Figura 6 muestra la mejora del contraste determinada por la medición de MRI en el hígado, tejido muscular y corazón.

Figura 7: Relajación R1 del péptido estearoil-[K(DOTA[Gd])₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP (Péptido X), Primovist™, Magnevist™ y Vasovist™ disueltos en PBS en cantidades equimolares (1mM).

Figura 8: Relajación R2 del péptido estearoil-[K(DOTA[Gd])₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP (Péptido X), Primovist™, Magnevist™ y Vasovist™ disueltos en PBS en cantidades equimolares (1mM).

Figura 9: Distribución en los órganos del péptido hidrofóbico modificado marcado con ¹¹¹In en ratones.

Figura 10: Estabilidad de estearoil-[K(DOTA[⁶⁸Ga])₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida en suero humano no inactivado.

EJEMPLOS

En los siguientes ejemplos, los péptidos hidrofóbicos que llevan Gd, ⁶⁸Ga o ¹¹¹In como marcadores acomplejados con DOTA (estearoil-[K(DOTA[Gd])₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida, estearoil-[K(DOTA[⁶⁸Ga])₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida o estearoil-[K(DOTA[¹¹¹In])₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida) se usaron como

productos ejemplares de la presente invención. Si no se indica lo contrario, los experimentos in vivo con el uso de diferentes métodos de imágenes médicas se han realizado utilizando ratas WAG/Rij.

Ejemplo 1

Síntesis del péptido hidrofóbico modificado

La síntesis de los péptidos se llevó a cabo con el uso del método Fmoc como se describe en (10) Gripon, P. y otros. *J Virol* 79, 1613-1622 (2005).

Síntesis DOTA-DFP

Se disolvió diisopropilcarbodiimida (5 mmol, 631 mg, 774 μ l) en piridina (15 ml) y se adicionó gota a gota durante 10 minutos a una solución de DOTA (5 mmol, 2,02 g) y difluorofenol (5 mmol, 650 mg) en agua (60 ml) mientras se agita. 30 min después de la adición, la mezcla de reacción se extrajo tres veces con diclorometano y la fase acuosa se evaporó hasta la sequedad con el uso de un evaporador giratorio. El producto crudo se disolvió en una mezcla de agua (11 ml) y acetonitrilo (3 ml) y se purificó mediante RP-HPLC preparativa. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se concentraron por liofilización. Rendimiento: 1,0633 g (41 %).

Acoplamiento al péptido

El péptido estearoil-KKKNLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida (140 mg, 0,055 mmol) se disolvió en 5 ml de DMF. Se añadió DOTA-DFP (129 mg, 0,25 mmol) y, además, se añadió DIPEA (410 μ l, 2,5 mmol). La mezcla se agitó durante una noche a 50 °C. Se añadió dietiléter hasta la precipitación; el precipitado se separó con el uso de una centrifuga y se lavó dos veces con dietiléter. El producto bruto se purificó utilizando RP-HPLC. La purificación se efectuó con el uso de un gradiente de agua y acetonitrilo, ambos comprenden ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se concentraron por liofilización. Rendimiento: 112 mg (55%).

Complejamiento de Gd³⁺

El péptido estearoil-[K(DOTA)]₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida (112 mg, 0,030 mmol) se disolvió en tampón de acetato de sodio 0,4 M (pH 5) y se añadió GdCl₃·6 H₂O (335 mg, 0,90 mmol). La mezcla se calentó durante 1 h en un baño de agua mientras que se agita. La mezcla resultante de productos se purificó con el uso de RP-HPLC. La purificación se efectuó con el uso de un gradiente de agua y acetonitrilo, ambos comprenden ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones de HPLC que contenían el producto (estearoil-[K(DOTA[Gd])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida) se concentraron por liofilización. Rendimiento: 94 mg (77%).

Ejemplo 2

Imágenes en PET

El péptido estearoil-[K(DOTA[⁶⁸Ga])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida se disolvió en tampón de citrato (pH 8,0) BSA al 4% y se inyectó vía i.v. en la vena de la cola de ratas portadoras de tumores. Las ratas se inyectaron ortopáticamente con 1x10⁶ células de carcinoma de colon sintético (células CC531) 10 días antes de las mediciones. En el día de la medición, las ratas recibieron el péptido en una concentración de 400 nmol/kg de peso corporal. Durante los experimentos, las ratas se anestesiaron con isoflurano y se mantuvieron a 37°C. Las imágenes de PET se realizaron con el uso de un PET de Inveon para animales pequeños de Siemens, las imágenes se iniciaron inmediatamente después de la inyección del péptido vía i.v. 24h después de la medición inicial con el uso de estearoil-[K(DOTA[⁶⁸Ga])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida, las ratas se inyectaron con ¹⁸F-FDG (Fluodeoxiglucosa (¹⁸F) en una concentración de 5 milicurios como control. La Figura 4A-C muestra una imagen de PET representativa de una rata portadora de tumores. Figura 4A Enriquecimiento específico de 400 nmol / kg de estearoil-[K(DOTA[⁶⁸Ga])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida en el hígado de una rata WAG/Rji cinco minutos después de la inyección por vía i.v. Figura 4B Contraste con el uso de ¹⁸F-FDG 24 horas después de la medición inicial. ¹⁸F-FDG se enriquece en los órganos que consumen grandes cantidades de glucosa, en la imagen del corazón (masa gris en la parte superior) y el tumor rico en glucosa (¹⁸F-FDG enriquecido en el cerebro no se muestra por razones técnicas). Figura 4C Unión de ambas imágenes que demuestran la especificidad de los péptidos que tiñen solamente el tejido hepático pero no el tejido tumoral.

Ejemplo 3

Imágenes en resonancia magnética

El péptido estearoil-[K(DOTA[Gd])]3-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida se disolvió en tampón de citrato (pH 8,0) BSA al 4% y se inyectó vía i.v. en la vena de la cola de ratas portadoras de tumores en una concentración de 600 nmol/kg de peso corporal. Durante los experimentos, las ratas se anestesiaron con isoflurano. Tras la aplicación del péptido, las ratas se examinaron en MRI con secuencias sensibles al contraste T1 (Siemens ViBE ®). La medición se realizó en un escáner

de resonancia magnética Siemens Avanto 1.5 T. La Figura 5 muestra una imagen representativa de una tasa saludable antes, así como 20 y 30 minutos después de la inyección por vía i.v.

Ejemplo 4

5

Escalada de dosis

Las ratas anestesiadas con isoflurano recibieron cantidades crecientes de estearoil-[K(DOTA[Gd])]₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida en inyecciones posteriores por vía i.v. El intervalo entre las inyecciones posteriores fue de 20 minutos. En el tiempo entre dos inyecciones, se realizaron mediciones continuas de MRI del hígado con secuencias sensibles al contraste T1 (Siemens ViBE®) y se determinó el aumento del contraste en el hígado, tejido muscular y corazón. En paralelo, se determinaron los valores de contraste de la dosis clínica relevante de Primovist™. El resultado se muestra en la Figura 6.

Ejemplo 5

Determinación de la relajación de R1/R2 por NMR.

El péptido estearoil-[K(DOTA[Gd])]₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP ("Péptido X"; 1mM), Primovist™ (1mM), Magnevist™ (1mM) así como Vasovist™ (1mM) se disolvieron en cantidades equimolares de PBS a temperatura ambiente y las relajaciones R1/r2 se midieron en una NMR Varian de 300MHz. Con el uso de la transformación de Fourier, los valores de contraste único se determinaron a partir de los datos resultantes del experimento. Los resultados se muestran en las Figura 7 y Figura 8.

Ejemplo 6

Estudios de distribución de órganos

Para examinar la distribución de órganos, el péptido marcado con ¹¹¹In estearoil-[K(¹¹¹In DOTA)]₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP se disolvió en tampón de citrato (pH 8,0) BSA al 4% y se inyectó vía i.v. en la vena de la cola de ratones en una concentración de 400 nmol/kg de peso corporal. Los ratones se sometieron a eutanasia en el intervalo de tiempo dado y se extrajeron la sangre y los órganos. La señal radiactiva de cada órgano se determinó mediante un contador gamma. Los resultados se muestran en la Figura 9.

Ejemplo 7

Estabilidad en el suero

Estearoil-[K(DOTA[⁶⁸Ga])]₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida se incubó a 37°C en suero humano no inactivado de donantes voluntarios sanos durante el período indicado. La detección de productos de degradación se realizó mediante la purificación de los péptidos con el uso de cromatografía de afinidad por HPLC y la determinación de radioactividad posterior se realizó en un contador gamma en los intervalos de tiempo indicados. La masa correcta de las fracciones de los picos radiactivos eluidos de la columna se confirmó mediante espectrometría de masas (datos no mostrados). Los resultados se muestran en la Figura 10. Solo se observó desintegración radioactiva pero no se observó escisión.

Las características descritas en la descripción anterior, en las reivindicaciones y/o en los dibujos acompañantes pueden ser material, tanto por separado como en cualquiera de sus combinaciones, para realizar la invención en sus diversas formas.

Referencias

1. Seeger, C. & Mason, W.S. Virus de la Hepatitis B biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 51- 68 (2000).
2. Nassal, M. Virus de la Hepatitis B morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 214, 297- 337 (1996).
3. Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S. & Guguen-Guillouzo, C. Myristylation of the Virus de la Hepatitis B 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- SI 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 y 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. y 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 Ene;6(1):39-52. Review. PubMed PMID: 19236207.
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 ago;21(8):885-90. Epub 2003 jun 29. PubMed PMID: 12833071

10. Gripon, P., Cannie, I. & Urban, S. Efficient inhibition of Virus de la Hepatitis B infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* 79, 1613-1622 (2005).

5 11. (1998). "A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators." *Hepatology* 28(3): 751-755.

12. Bruix, J. and M. Sherman (2005). "Management of hepatocellular carcinoma." *Hepatology* 42(5): 1208-1236.

13. Llovet, J. M., J. Bustamante, y otros. (1999). "Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials." *Hepatology* 29(1): 62-67.

10 14. Gogel, B. M., R. M. Goldstein, y otros. (2000). "Diagnostic evaluation of hepatocellular carcinoma in a cirrhotic liver." *Oncology (Williston Park)* 14(6 Suppl 3): 15-20.

15 15. Fearon, E.R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767 (1990).

16. Winawer, S.J., y otros. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 112, 594-642 (1997).

17. Johnson, F.E., y otros. How tumor stage affects surgeons' surveillance strategies after colon cancer surgery. *Cancer* 76, 1325-1329 (1995).

18. Johnson, F.E., y otros. Geographic variation in patient surveillance after colon cancer surgery. *J Clin Oncol* 14, 183-187 (1996).

20 19. Johnson, F.E., y otros. How practice patterns in colon cancer patient follow-up are affected by surgeon age. *Surg Oncol* 5, 127-131 (1996).

20. Vernava, A.M., 3rd, y otros. Current follow-up strategies after resection of colon cancer. Results of a survey of members of the American Society of Colon and Rectal Surgeons. *Dis Colon Rectum* 37, 573-583 (1994).

21. Virgo, K.S., y otros. Surveillance after curative colon cancer resection: practice patterns of surgical subspecialists. *Ann Surg Oncol* 2, 472-482 (1995).

25 22. Khatri, V.P., Petrelli, N.J. & Belghiti, J. Extending the frontiers of surgical therapy for hepatic colorectal metastases: is there a limit? *J Clin Oncol* 23, 8490-8499 (2005).

Listado de Secuencias

30 <110> Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

<120> PÉPTIDOS HIDROFÓBICOS MODIFICADOS PARA EL DIAGNÓSTICO HEPÁTICO ESPECÍFICO

35 <130> 789-1 PCT

<150> US 61/441,499

<151> 2011-02-10

40 <160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

45 <211> 7

<212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<220>

50 <221> VARIANTE

<222> (6).(6)

<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente F o L, más preferentemente F

<400> 1

55 **Asn Pro Leu Gly Phe Xaa Pro**

1 5

<210> 2

<211> 119

60 <212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 2

65

ES 2 708 662 T3

1 Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Lys Gly Met Gly Thr Asn Leu
 5 Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
 10 Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Ile
 15 Lys Asp His Trp Pro Gln Ala Asn Gln Val Gly Val Gly Ala Phe Gly
 20 Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Val Leu Gly Trp Ser Pro Gln
 25 Ala Gln Gly Ile Leu Ala Thr Val Pro Ala Met Pro Pro Pro Ala Ser
 Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu
 30 Arg Asp Ser His Pro Gln Ala
 <210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Virus de la Hepatitis B
 <400> 3
 35 Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Lys Gly Met Gly Thr Asn Leu
 40 Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
 45 Ala Phe Lys Ala Asn Ser Glu Asn Pro Asp Trp Asp Leu Asn Pro His
 50 Lys Asp Asn Trp Pro Asp Ala His Lys Val Gly Val Gly Ala Phe Gly
 55 Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln
 60 Ala Gln Gly Ile Leu Thr Ser Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser
 Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Leu Ser Pro Pro Leu
 65 Arg Asp Thr His Pro Gln Ala

ES 2 708 662 T3

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

5

<400> 4

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

Arg Asp Thr His Pro Gln Ala
 115

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

40

<400> 5

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 708 662 T3

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

5
 <400> 6

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

10
 His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Asn Asn Pro Asp Trp
 20 25 30

15
 Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
 35 40 45

20
 Ala Gly Ala Phe Gly Leu Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu
 50 55 60

25
 Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Met Gln Thr Leu Pro Ala Asn
 65 70 75 80

30
 Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro
 85 90 95

30
 Leu Ser Pro Pro Leu Arg Thr Thr His Pro Gln Ala
 100 105

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Virus de la Hepatitis B

35
 <400> 7

40
 Met Gly Leu Ser Trp Thr Val Pro Leu Glu Trp Gly Lys Asn Ile Ser
 1 5 10 15

45
 Thr Thr Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala
 20 25 30

50
 Phe Arg Ala Asn Thr Arg Asn Pro Asp Trp Asp His Asn Pro Asn Lys
 35 40 45

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

55
 Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala
 65 70 75 80

60
 Gln Gly Met Leu Lys Thr Leu Pro Ala Asp Pro Pro Pro Ala Ser Thr
 85 90 95

60
 Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Thr Pro Pro Leu Arg
 100 105 110

65
 Asp Thr His Pro Gln Ala
 115

ES 2 708 662 T3

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

5
 <400> 8

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

15
 Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
 20 25 30

20
 Leu Phe Arg Ala Asn Ser Ser Ser Pro Asp Trp Asp Phe Asn Thr Asn
 35 40 45

25
 Lys Asp Ser Trp Pro Met Ala Asn Lys Val Gly Val Gly Gly Tyr Gly
 50 55 60

30
 Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln
 65 70 75 80

35
 Ala Gln Gly Val Leu Thr Thr Leu Pro Ala Asp Pro Pro Pro Ala Ser
 85 90 95

40
 Thr Asn Arg Arg Ser Gly Arg Lys Pro Thr Pro Val Ser Pro Pro Leu
 100 105 110

45
 Arg Asp Thr His Pro Gln Ala
 115

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

5
 <400> 9

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

15
 Ala Ser Asn Pro Leu Gly Phe Leu Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala
 20 25 30

20
 Phe Arg Ala Asn Thr Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Lys Lys
 35 40 45

ES 2 708 662 T3

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

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

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

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

15 Asp Ser His Pro Gln Ala
 115

20 <210> 10
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Virus de la Hepatitis B

25 <400> 10

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

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

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

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

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

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

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

55 <210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Virus de la Hepatitis B

60

65

ES 2 708 662 T3

<400> 11

5 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
 10 Leu Phe Arg Ala Asn Ser Ser Ser Pro Asp Trp Asp Phe Asn Thr Asn
 35 40 45
 15 Lys Asp Asn Trp Pro Met Ala Asn Lys Val Gly Val Gly Gly Phe Gly
 50 55 60
 20 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
 25 Thr Asn Arg Arg Ser Gly Arg Lys Pro Thr Pro Val Ser Pro Pro Leu
 100 105 110

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 12

35 Met Gly Gln Asn Leu Ser Val Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Glu
 1 5 10 15
 40 His Gln Leu Asp Pro Leu Phe Arg Ala Asn Thr Asn Asn Pro Asp Trp
 20 25 30
 45 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
 50 Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Val Thr Thr Ile Leu Pro Ala Val
 65 70 75 80
 55 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

60

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

65 <213> Virus de la Hepatitis B

ES 2 708 662 T3

<400> 13

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

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

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

15 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

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

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

<210> 14

<211> 21

30 <212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 14

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

40 His Gln Leu Pro Asp
20

<210> 15

<211> 21

45 <212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 15

50 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

55 <210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

60 <220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente L , I o Q, más preferentemente L

65

ES 2 708 662 T3

- 5 <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
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente P, S, T o F, más preferentemente P o S, incluso más preferentemente S
- <400> 16
- Asn Xaa Ser Xaa Xaa**
1 5
- 15 <210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Virus de la Hepatitis B
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente D, E o S, más preferentemente D o E, incluso más preferentemente D
- 25 <400> 17
- Xaa His Gln Leu Asp Pro**
1 5
- 30 <210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> Virus de la Hepatitis B
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente L, I o Q, más preferentemente L
- 40 <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
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente P, S, T o F, más preferentemente P o S, incluso más preferentemente S
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente F o L, más preferentemente F
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente F o L, más preferentemente F
- 60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> Aminoácido arbitrario, preferentemente D, E o S, más preferentemente D o E, incluso más preferentemente D

ES 2 708 662 T3

<400> 18

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

Asp Pro

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Reivindicaciones

1. Péptido hidrofóbico modificado de la fórmula

5 [X - P - Y - Ro]Ap

en donde

P es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos NPLGFXaaP, en donde Xaa es un aminoácido arbitrario; 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 donde X_1, X_2 y X_3 es un aminoácido arbitrario y

10 en donde uno o más de los aminoácidos portan uno o más grupos para la modificación hidrofóbica seleccionados de la acilación, preferentemente con ácidos carboxílicos, ácidos grasos, ácidos grasos de C_8 a C_{22} , aminoácidos con cadenas laterales lipofílicas, y la adición de porciones hidrofóbicas seleccionadas de colesterol, derivados de colesterol, fosfolípidos, glicolípidos, ésteres de glicerol, esteroides, ceramidas, derivados de isopreno, adamantano, farnesol, grupos alifáticos, compuestos poliaromáticos;

15 Y es una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de n aminoácidos, en donde n es al menos 1 ; $m + n \geq 11$;

R es una modificación C-terminal de dicho péptido hidrofóbico modificado, que es preferentemente una porción que protege de la degradación seleccionada de amida, D-aminoácido, aminoácido modificado, aminoácido cíclico, albúmina, polímero natural y sintético, tales como PEG, glicano, en donde o es 0 o al menos 1 ;

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

25 en donde uno o más marcadores está/están acoplado(s) a uno o más aminoácidos de X, preferentemente a través de un enlazador o espaciador, y en donde el marcador se selecciona de un colorante fluorescente, un isótopo emisor de fluorescencia, un radioisótopo y un agente de contraste.

2. Péptido hidrofóbico modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

30 (a) m es $5, 6, 7$ u 8 y/o n es 3 a 78 ; o

(b) Xaa es F o L, preferentemente F.

3. Péptido hidrofóbico modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el enlazador o espaciador se separa del péptido hidrofóbico modificado por una proteína hepática, preferentemente una enzima proteolítica hepatocelular.

35 4. Péptido hidrofóbico modificado de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el enlazador o espaciador se escinde por enzimas seleccionadas a partir de citocromos, tales como el citocromo P450, proteasas y liasas de la vía endocítica, matriz-metaloproteasas MMP1, MMP2, MMP7, MMP9 y MMP12, preferentemente MMP7.

40 5. Péptido hidrofóbico modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde uno o más marcadores se acopla(n) a uno o más aminoácido(s) de X que tienen un grupo amino en una cadena lateral, que se selecciona preferentemente a partir de lisina, α -aminoglicina, ácido α,γ -diaminobutírico, ornitina, ácido α,β -diaminopropiónico, en donde preferentemente el(los) aminoácido(s) que tiene(n) un grupo amino en una cadena lateral es/son lisina.

45 6. Péptido hidrofóbico modificado de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el(los) aminoácido(s) que tiene(n) un grupo amino en una cadena lateral se localizan en el N-terminal de X, en donde preferentemente 1 a 11 aminoácidos tienen un grupo amino en una cadena lateral se encuentran en el N-terminal de X.

50 7. Péptido hidrofóbico modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la modificación hidrofóbica es mediante acilación seleccionada de la acilación con miristoilo (C 14), palmitoilo (C 16) o estearoilo (C 18).

55 8. Péptido hidrofóbico modificado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho péptido comprende una variante de la sec. con núm. de ident.: 2 a 13 y en donde la variante tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 2 a 13 .

60 9. El péptido hidrofóbico modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, seleccionado del grupo que consiste en

estearoil-[K(DOTA[Gd])]₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,
estearoil-[K(DOTA^[68Ga])]₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,
estearoil-[K](DOTA^[111In])₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP,
estearoil-[K-(DOTA[Gd])]₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida,
65 estearoil-[K(DOTA^[68Ga])]₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida,
estearoil-[K(DOTA^[111In])]₃-NLSTSNPLGFFPDHQLDP-amida.

10. Composición farmacéutica que comprende:
al menos un péptido hidrofóbico modificado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9; y, opcionalmente, un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 11. Péptido hidrofóbico modificado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para uso en
- 10 (i) el suministro específico de un marcador al hígado, y/o
(ii) imágenes médicas seleccionadas del grupo que consiste en rayos X, imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), tomografía computarizada por rayos X (CT) y combinaciones de estos métodos, en donde el uso es preferentemente en la visualización intraoperatoria, y/o
(iii) el diagnóstico o monitoreo del tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático.
- 15 12. Péptido hidrofóbico modificado o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la enfermedad o trastorno hepático:
- 20 (i) se selecciona de hepatitis, cirrosis, hemocromatosis, preferentemente hepatitis causada por virus de hepatitis A, B, C, D, E, F, G y H o hepatitis concomitante causada por virus,
(ii) es una enfermedad que involucra un estadio hepático de un virus o un patógeno no viral,
(iii) es una enfermedad tropical, malaria, esquistosomiasis, leishmaniasis,
(iv) es un tumor hepático, preferentemente carcinoma hepatocelular (HCC),
(v) es metástasis hepática, preferentemente de carcinoma colorrectal, o
25 (vi) es una enfermedad metabólica, preferentemente obesidad, síndrome metabólico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- 30 13. Péptido hidrofóbico modificado o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en donde el péptido hidrofóbico modificado se aplica al paciente en una dosis que varía de 10 pmol por kg a 20 μ mol por kg de peso corporal.
- 35 14. Péptido hidrofóbico modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la vía de administración se selecciona a partir de la vía subcutánea, intravenosa, oral, nasal, intramuscular, transdérmica, inhalativa o por supositorio.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Figura 1

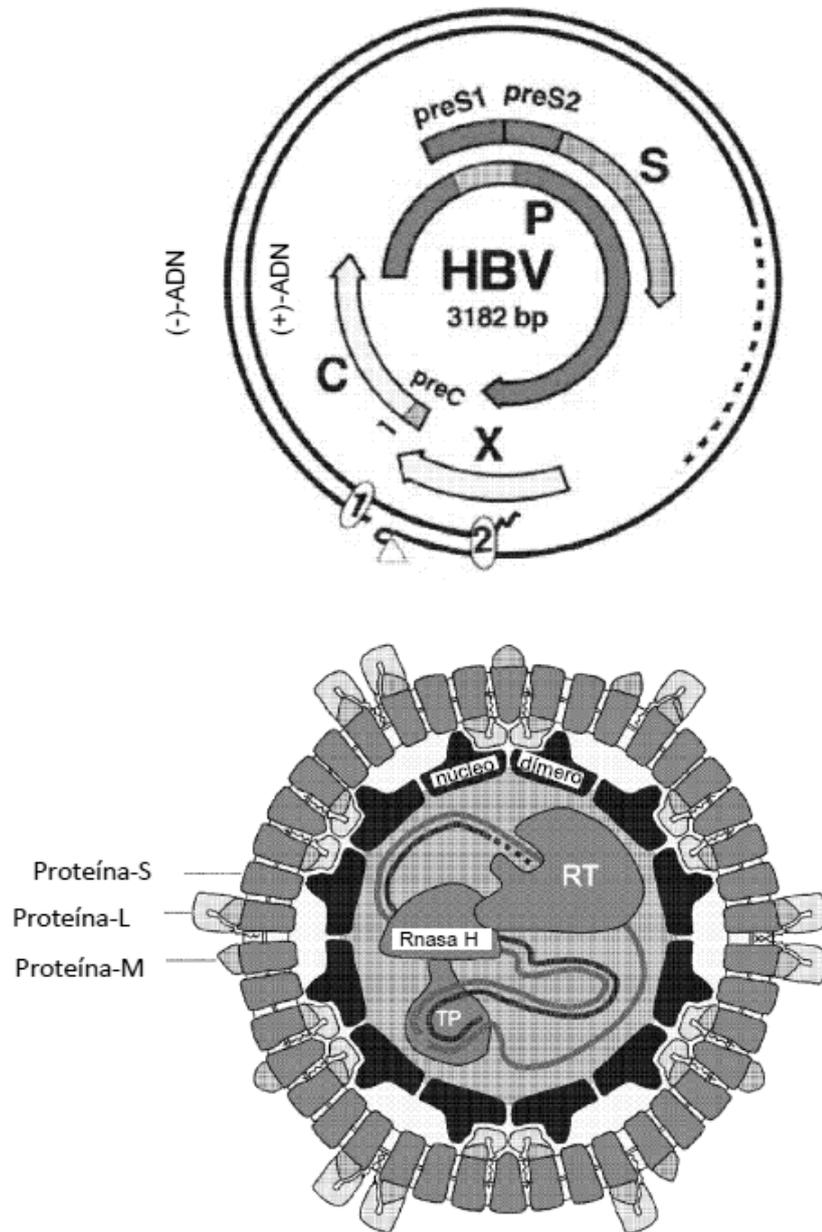


Figura 2

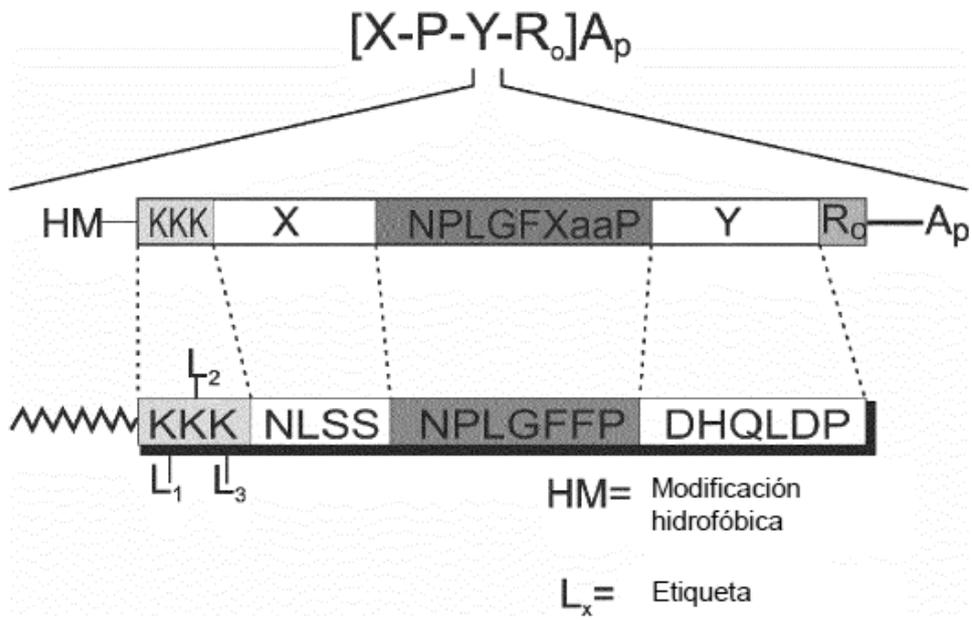


Figura 3

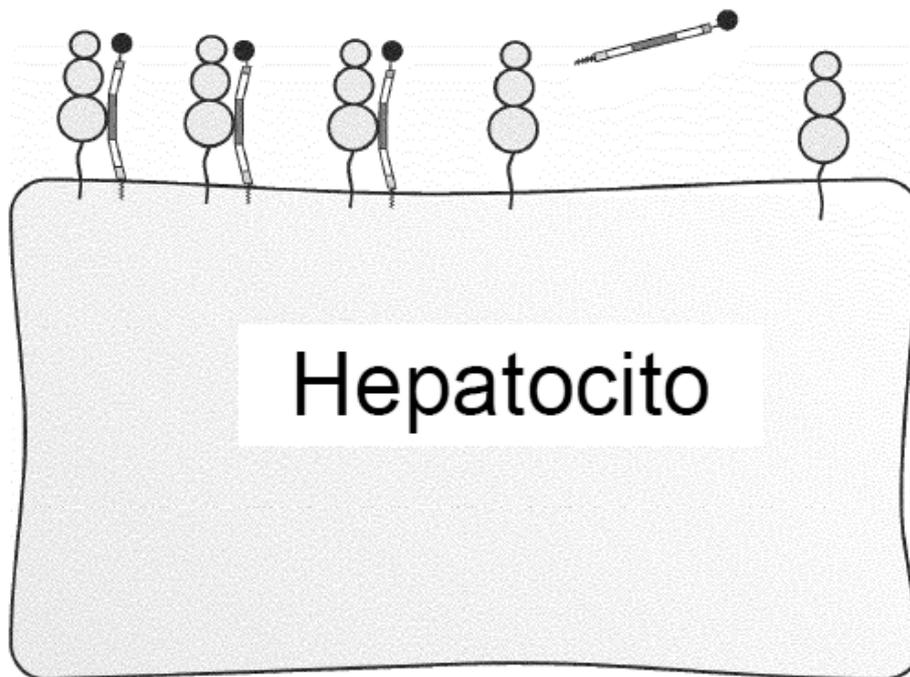


Figura 4

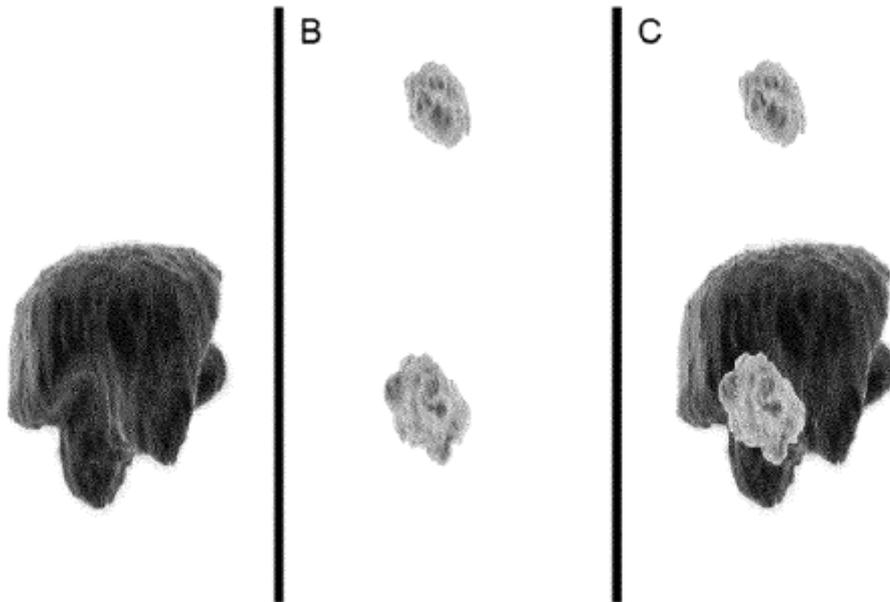


Figura 5

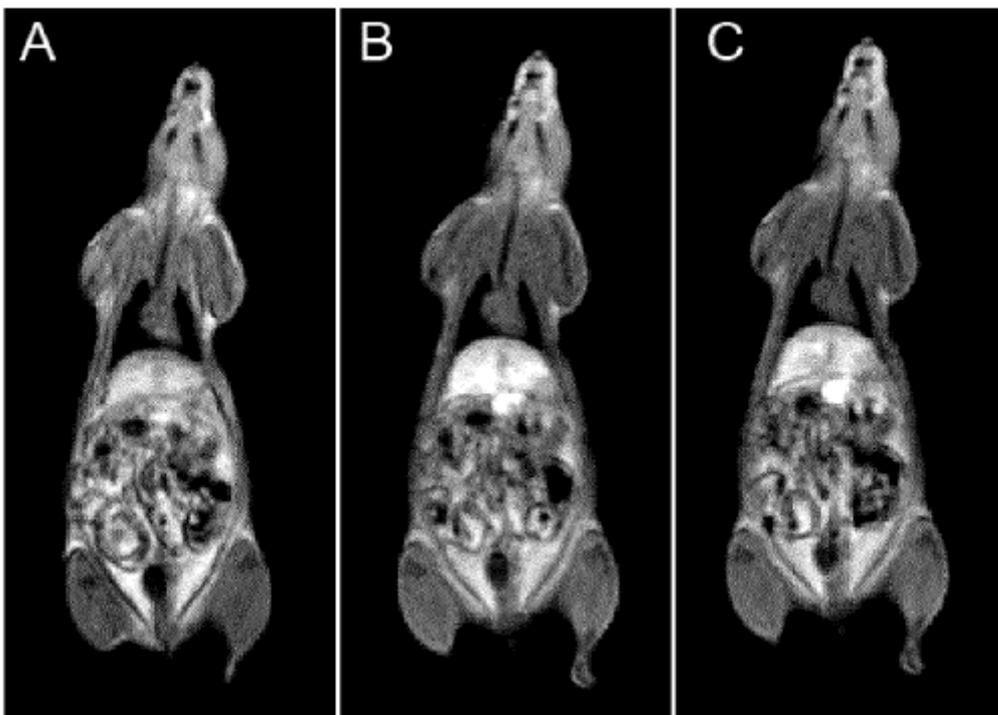


Figura 6

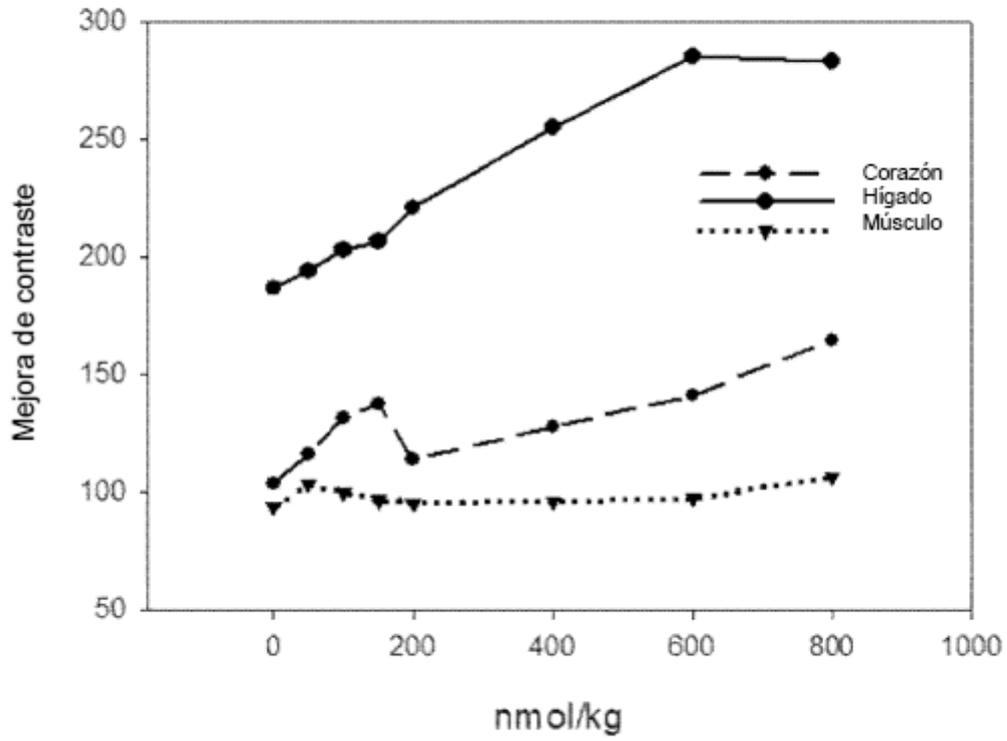


Figura 7

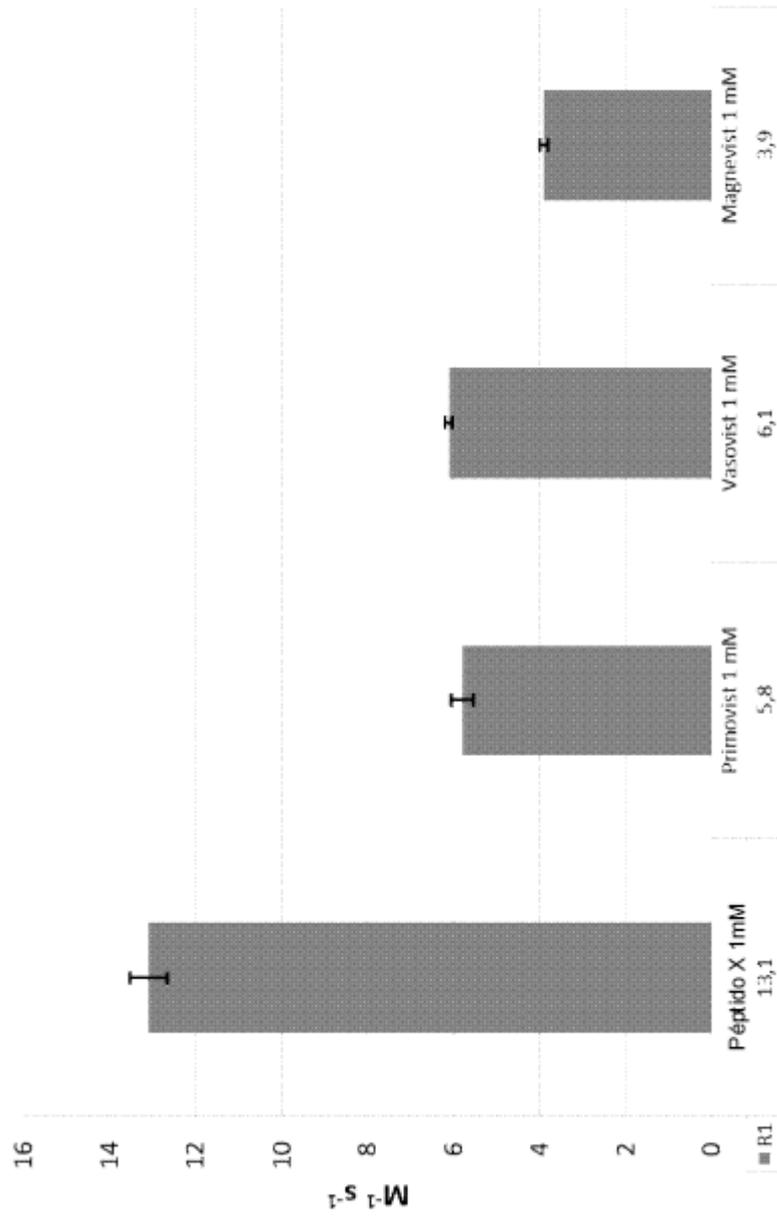


Figura 8

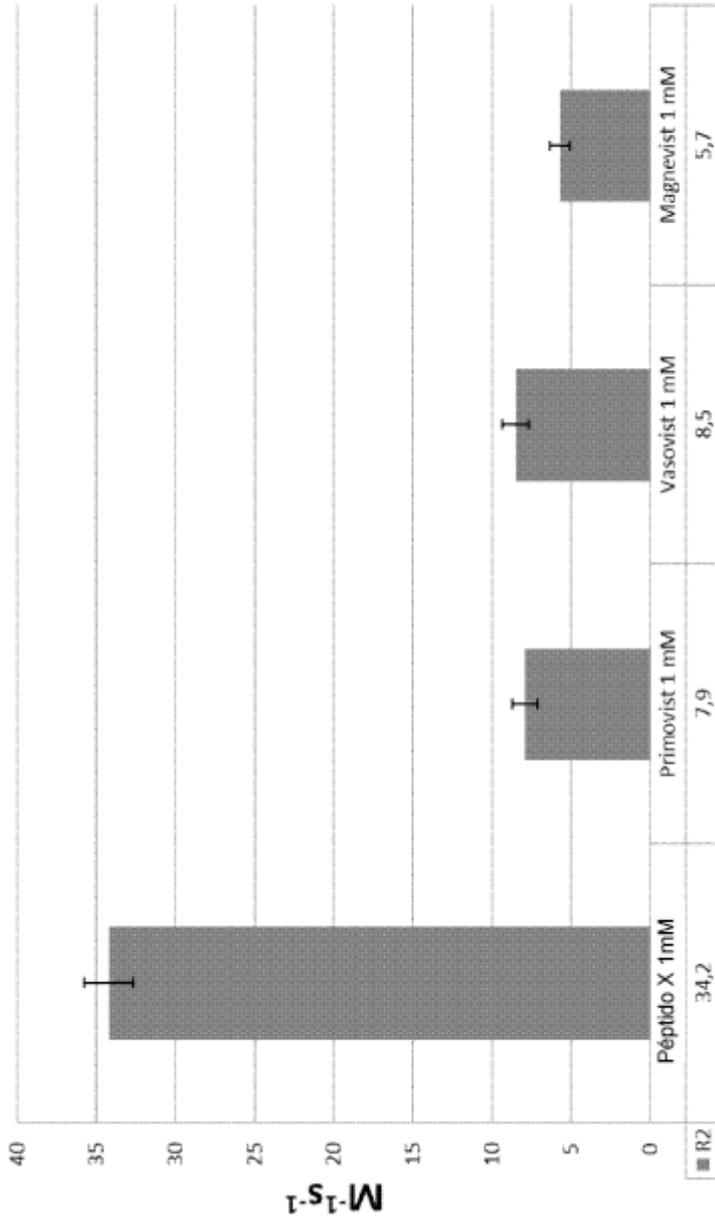


Figura 9

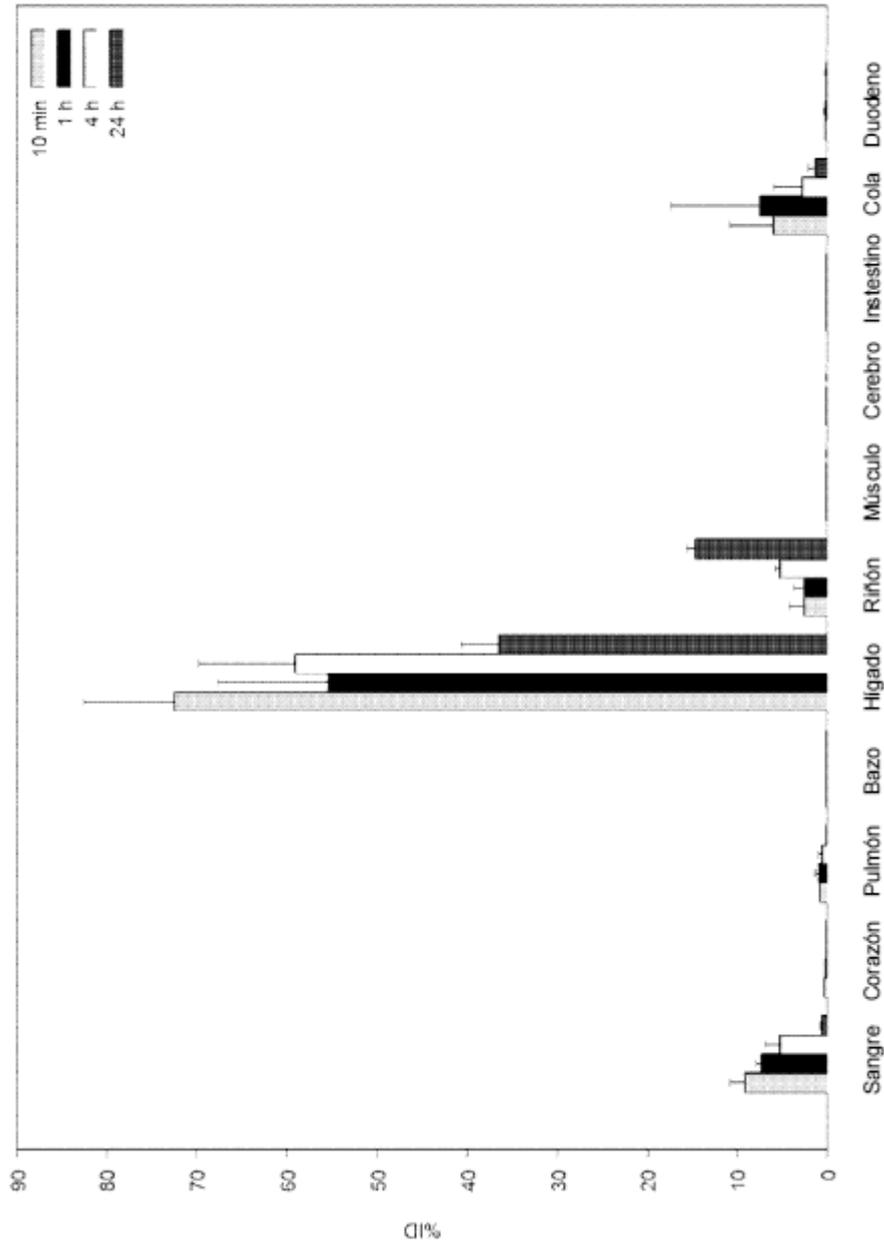


Figura 10

