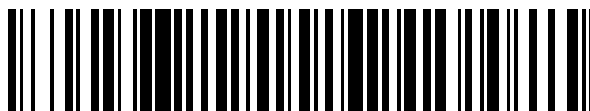


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 243**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)
C07K 14/02	(2006.01)
A61P 1/16	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2013 PCT/EP2013/073600**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072524**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2013 E 13796020 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2917231**

54 Título: **Lipopéptidos para su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas y enfermedades cardiovasculares**

30 Prioridad:

12.11.2012 US 201261725144 P
29.07.2013 US 201361859476 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2019

73 Titular/es:

RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG (50.0%)
Grabengasse 1
69117 Heidelberg, DE y
CLEEVES, VOLKER (50.0%)

72 Inventor/es:

CLEEVES, VOLKER;
URBAN, STEPHAN y
KUBITZ, RALF

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 728 243 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

Lipopéptidos para su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas y enfermedades cardiovasculares

La presente invención se refiere a compuestos basados en lipopéptidos para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección hepática, preferiblemente enfermedades metabólicas que involucran el hígado, así como en el control o modificación del nivel de colesterol o la captación de colesterol y, por tanto, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

Antecedentes de la invención

El virus de la hepatitis B humana (VHB) es un miembro de los hepadnaviridae. Los hepadnavirus son los virus de ADN con envoltura más pequeños que se replican a través de la transcripción inversa de un intermedio ARNpg. Durante el ensamblaje, la nucleocápside adquiere tres proteínas de envoltura viral denominadas grande (L), media (M) y pequeña (S). Son codificadas en un marco de lectura abierto y comparten el dominio S que se requiere para el anclaje de membrana. Además del dominio S, M contiene una extensión hidrófila N-terminal de 55 aminoácidos (preS2), mientras que L se extiende aún más por 107, 117 o 118 aminoácidos (dependiendo del genotipo) denominada preS1 (Urban 2008). El virus de la hepatitis D (HDV) es un virusoide satélite que utiliza las proteínas de la envoltura del VHB para la entrada en los hepatocitos. Se sabe que el dominio preS1 miristoilado de L desempeña un papel clave en la infectividad de VHB y VHD.

Los inventores han identificado previamente lipopéptidos derivados de la proteína L del VHB que bloquean la infección por VHB y VHDV de las células PHH y HepaRG (Gripon et al., 2005, Schulze et al., 2010, WO 2009/092611 A1). Representan los 47 aminoácidos N-terminales del dominio preS1 de HBV (HBVpreS/2-48^{myr}) e incluyen la modificación natural con ácido mirístico.

En los documentos WO 2009/092612 y WO 2012/107579, los inventores describen péptidos derivados de preS modificados hidrófobos del VHB y su uso como vehículos para el suministro específico de compuestos al hígado.

Lütgehetmann et al. (2012) describen el lipopéptido MyrcludexB y su capacidad para inhibir la infección por HDV *in vivo*.

Además, los inventores han identificado previamente el receptor responsable de la unión de estos lipopéptidos derivados de la proteína L del VHB, a saber, el polipéptido de cotransporte de taurocolato de sodio (NTCP/SLC10A1). (Solicitud internacional WO 2014/072526). LA NTCP es una proteína transmembrana integral, no expresada en HepG2, HuH7, inducida en células HepaRG después del tratamiento con DMSO (Kotani et al., 2012) y modulada por disminución en hepatocitos primarios durante la diferenciación (Doring et al., 2012).

En particular, los inventores han identificado un nuevo receptor específico de HBV preS1 que juega un papel clave en la infección por el virus de la Hepatitis B (HBV) y/o el virus de la Hepatitis D (HDV), el polipéptido transportador de taurocolato de sodio humano NTCP/ SLC10A1. La expresión de este receptor o de ciertas contrapartes no humanas permite transformar células que anteriormente no podían unirse al VHB y/o VHD y/o no susceptibles a la infección por VHB y/o VHD en células que se unen a VHB y/o VHD competente y/o susceptible a la infección por VHB y/o VHD. Las células que ya son susceptibles a la infección por VHB y/o VHD (células HepaRG) muestran una susceptibilidad significativamente mayor con la expresión de NTCP.

También Yan et al. (2012) identificaron NTCP/SLC10A1 como un receptor específico de preS en hepatocitos primarios Tupaia (PTH) y demuestran que la NTCP humana (h) promueve la entrada de VHB/VHD en el hepatoma.

Otro elemento de la técnica anterior, Mita et al, Drug Metabolism and Disposition, 34, 2006, 1575-1581, describe la inhibición del transporte de ácidos biliares a través de NTCP que expresa células LLC-PK1 por ciertos fármacos colestáticos.

El hígado desempeña un papel predominante en la biotransformación de medicamentos y la disposición del cuerpo. En vista de su función de barrera entre el tracto gastrointestinal y la sangre sistémica, está constantemente expuesto a xenobióticos ingeridos que entran en la circulación portal. La lesión hepática inducida por medicamentos representa hasta el 7% de todos los informes de efectos adversos de medicamentos informados voluntariamente a los registros de farmacovigilancia. Los medicamentos causan daño directo a los hepatocitos, conductos biliares o estructuras vasculares o pueden interferir con el flujo de bilis. Los fenotipos comúnmente encontrados incluyen hepatitis, colestasis, esteatosis, cirrosis, lesiones vasculares y neoplásicas e incluso insuficiencia hepática fulminante. Casi todos los medicamentos tienen el potencial de causar daño hepático, ya sea por la toxicidad directa del agente o por una respuesta idiosincrásica del individuo. La susceptibilidad del hígado a las lesiones por fármacos está influenciada por diversos factores como la edad, el sexo, el embarazo, la comedición, la función renal y los factores genéticos (Kullak-Ublick, 2000).

La enfermedad hepática colestásica inducida por fármacos es un subtipo de lesión hepática que se caracteriza por elevaciones predominantes de fosfatasa alcalina y bilirrubina secundaria a la administración de un agente hepatotóxico. Puede manifestarse como una hepatitis colestásica o como colestasis blanda, dependiendo del agente

- causal y el mecanismo de lesión. Los medicamentos que generalmente causan colestasis con hepatitis incluyen agentes psicotrópicos, antibióticos y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). El mecanismo es inmunoalérgico y resulta de la hipersensibilidad. La colestasis pura sin hepatitis se observa con mayor frecuencia con los esteroides androgénicos anticonceptivos y 17α -alquilados y el mecanismo más probable es la interferencia con los sistemas de flujo canalicular de hepatocitos para sales biliares, aniones orgánicos y fosfolípidos. La etapa limitante de la velocidad en la formación de bilis se considera la translocación mediada por la bomba de exportación de sales biliares (BSEP) de las sales biliares a través de la membrana de hepatocitos canaliculares. La inhibición de la función de BSEP por los metabolitos de la ciclosporina A, troglitazona, bosentan, rifampicina y esteroides sexuales es una causa importante de colestasis inducida por fármacos (Kullak-Ublick, 2000).
- 10 Existe la necesidad en la técnica de medios y procedimientos mejorados para tratar enfermedades metabólicas que involucran la toxicidad inducida por fármacos y enfermedades hepáticas colestásicas, así como enfermedades cardiovasculares.

Sumario de la invención

Según la presente invención, el objeto se resuelve como se reivindica en las reivindicaciones.

- 15 De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve proporcionando un compuesto basado en lipopéptidos para usar en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección hepática, en el que el compuesto basado en lipopéptidos comprende un péptido de fórmula general



en la que

- 20 P es la secuencia de aminoácidos NPLGF X_{aa} P (SEQ ID N.º: 1),
en la que X_{aa} es F o L, más preferiblemente F,
X es una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de m aminoácidos,
en la que m es al menos 4;
Y es una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de n aminoácidos,
25 en la que n es 0 o al menos 1;
y en la que $m + n \geq 11$;
R es una modificación C-terminal de dicho péptido modificado hidrófobo,
que es preferiblemente una fracción que protege de la degradación seleccionada de amida, D-aminoácido,
aminoácido modificado, aminoácido cíclico, albúmina, polímero natural y sintético, tal como PEG, glicano,
30 o es 0 o al menos 1,

en la que el péptido comprende

- 18 a 119 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID Nos. 18, 19 o 20, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia (preferiblemente al menos un 95% o un 99% de identidad) con cualquiera de las SEQ ID Nos. 18 a 20, y
35 una modificación hidrófoba N-terminal por acilación con miristoilo (C14), palmitoilo (C16) o estearoilo (C18), preferiblemente con miristoilo (C14),

en la que dicha enfermedad o afección hepática está relacionada con el transporte mediado por polipéptidos cotransportadores de taurocolato de sodio (NTCP) de los hepatocitos, y es una enfermedad metabólica con compromiso hepático seleccionada de

- 40 colestasis intrahepática,
envenenamiento del hígado (por toxinas del hígado)/hepatotoxicidad,
enfermedad hepática colestásica inducida por fármacos,
hipercolesterolemia,
colestasis posthepática.

- 45 De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve proporcionando un compuesto basado en lipopéptidos para su uso en la prevención y/o tratamiento *in vivo* de una enfermedad cardiovascular, que comprende el control o la modificación del nivel de colesterol o la captación de colesterol, en el que el tratamiento se lleva a cabo en un grupo de pacientes con hipercolesterolemia.

Descripción de las realizaciones preferentes de la invención

- 50 Antes de que la presente invención se describa con más detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos

y científicos utilizados en este documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica.

Las concentraciones, cantidades y otros datos numéricos se pueden expresar o presentar en este documento en un formato de rango. Debe entenderse que dicho formato de rango se usa simplemente por conveniencia y brevedad y, por lo tanto, debe interpretarse con flexibilidad para incluir no solo los valores numéricos explícitamente citados como los límites del rango, pero también para incluir todos los valores numéricos individuales o sub-rangos abarcados dentro de ese rango como si cada valor numérico y sub-rango se citaran explícitamente. Como ilustración, debe interpretarse que un rango numérico de "al menos 4 aminoácidos, preferiblemente de 4 a 19" incluye no solo los valores explícitamente citados de 4 a 19, sino que también incluye valores individuales y sub-rangos dentro del rango indicado. Por lo tanto, en este rango numérico se incluyen valores individuales tales como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y sub-rangos tales como de 4 a 10, de 6 a 15, de 10 a 19, de 8 a 19 y de 15 a 19, etc. Como ilustración, debe interpretarse un rango numérico de "al menos 1 aminoácido, preferiblemente de 1 a 78" para incluir no solo los valores explícitamente citados de 1 a 78, sino también valores individuales y sub-rangos dentro del rango indicado. Por lo tanto, en este rango numérico se incluyen valores individuales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ... 75, 76, 77, 78, y sub-rangos, como de 10 a 50, de 15 a 40, de 8 a 35, de 30 a 50 y de 20 a 40, etc. Este mismo principio se aplica a los rangos que citan solo un valor numérico. Además, dicha interpretación debe aplicarse independientemente de la amplitud del rango o las características que se describen.

Uso de lipopéptidos en el tratamiento de enfermedades hepáticas.

Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona un compuesto basado en lipopéptidos para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección hepática.

Dicha enfermedad o afección hepática está relacionada con el transporte de compuestos a hepatocitos mediado por el polipéptido transportador de taurocolato de sodio (NTCP).

De acuerdo con la invención, dicha enfermedad o afección hepática que está relacionada con el transporte mediado por NTCP de compuestos a hepatocitos, es una enfermedad metabólica con compromiso hepático seleccionada de

colestasis intrahepática,
envenenamiento del hígado (por toxinas del hígado)/hepatotoxicidad,
enfermedad hepática colestásica inducida por fármacos,
hipercolesterolemia,
colestasis posthepática.

- Compuesto basado en lipopéptidos

El compuesto basado en lipopéptidos comprende:

(a) una secuencia de péptidos o aminoácidos,
(b) una modificación hidrófoba o lipídica, preferiblemente en el péptido (a),
(c) opcionalmente, una fracción adicional o fracciones adicionales.

De acuerdo con la invención, la *secuencia de péptidos o aminoácidos (a)* tiene o comprende la fórmula general



en la que

P es la secuencia de aminoácidos NPLGFXaaP SEQ. ID N.º: 1,
(código de aminoácido de una sola letra)
en la que Xaa es F o L, preferiblemente F
(por lo tanto, **P** es NPLGFFP o NPLGFLP);
X es una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de m aminoácidos,
en la que m es al menos 4;
Y es una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de n aminoácidos,
en la que n es 0 o al menos 1;
y en la que $m + n \geq 11$;
R es una modificación C-terminal de dicho péptido modificado hidrófobo,
que es preferiblemente una fracción 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,
en la que el péptido comprende

18 a 119 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID Nos. 18, 19 o 20, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia (preferiblemente al menos un 95% o un 99% de identidad) con cualquiera de las SEQ ID Nos. 18 a 20,

5 y una modificación hidrófoba N-terminal por acilación con miristoilo (C14), palmitoilo (C16) o estearoilo (C18), preferiblemente con miristoilo (C14).

10 La secuencia de péptidos o aminoácidos (a) (que tiene el formato X-P-Y-R₀ general formal) se deriva del dominio preS del virus de la hepatitis B (VHB) (también denominado "péptido preS"). La envoltura del VHB incluye tres proteínas denominadas L (grande), M (media) y S (pequeña). Comparten el dominio S C-terminal con cuatro regiones transmembrana. Las proteínas M y L llevan extensiones N-terminales adicionales de 55 y, dependiendo del genotipo, de 107 o 118 aminoácidos (preS2- y preSI).

15 Una secuencia de péptidos o aminoácidos (a) se refiere preferiblemente a un péptido con una secuencia de aminoácidos que corresponde o se basa en las extensiones N-terminales de la proteína L del VHB, preSI, preferiblemente de los genotipos A a H, así como de virus de la hepatitis B del mono lanudo (WMHBV), orangután, chimpancé y gorila.

20 Como una secuencia indispensable o esencial, los residuos de aminoácidos que son importantes para la unión de los compuestos basados en lipopéptidos de la presente invención a NTCP, tal como se expone en la SEQ ID N.º: 1 (NPLGF_{Xaa}P) están presentes en la secuencia péptido/aminoácido (a) de los compuestos basados en lipopéptidos de la invención.

Dominio esencial (SEQ ID N.º: 1):

NPLGF_XP (en el que X o Xaa es F o L, preferiblemente F)

La presente divulgación también proporciona:

preS HBV-A (ID: M57663; SEQ ID N.º:2):

25 MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPQANQVGVGA
FGPGFTPPHGGVLGWSPQAQGILATVPAMPPPASTNRQSGRQPTPI SPPLRDSHPQA

preS HBV-B (ID: D00329, SEQ ID N.º:3)

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFKANSENPDWDLNPHKDNWPDAAHKVGVGA
FGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTSVPAAPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDTHPQA

PRES HBV-C (ID: AB048704, SEQ ID N.º:4)

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFKANSENPDWDLNPHKDNWPDAAHKVGVGA
FGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTSVPAAPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDTHPQA

30 PreS HBV-Chimpancé (ID: AB032432, SEQ ID N.º:5)

MGQNLSTSNPLGFFPEHQLDPAFKANTNNPDWDFNPKKDYWPEANKVGAGAFGPGFTPPHGG
LLGWSPQAQGILTTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDTHPQA

preS HBV-D (ID: AB048702, SEQ ID N.º:6)

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTNNPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGG
LLGWSPQAQGFQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRTHPQA

PRES HBV-E (ID: X65657, SEQ ID N.º:7)

35 MGLSWTVPLEWGKNI STTNPLGFFPDHQLDPAFRANTRNPDWDHNPNDHWTEANKVGVGAF
GPGFTPPHGGLLGWSPQAQGMKTLPADPPPASTNRQSGRQPTPI TPPLRDTHPQA

PRES HBV-F (ID: X69798@8, SEQ ID N.º:8)

MGAPLSTTRRGMGQNLSVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWDNFNTNKDSWPMANKVGVGG
YGPGFPPHGGLLGWSPOAQGVLTTLPADPPPASTNRRSGRKPTVSPPLRDTHPQA

PRES HBV-G (ID: AF160501, SEQ ID N.º:9)

MGLSWTVPLEWGKNLSASNPLGFLPDHQLDPAFRANTNNPDWDFNPKKDPWPEANKVGVGGAY
GPGFPPHGGLLGWSPOSQGTTLTLPADPPPASTNRQSGRQPTPI SPPLRDSHPQA

HBV Gibbon (ID: AJ131572, SEQ ID N.º:10)

MGQNHSVTNPLGFFPDHQLDPLFRANSNNPDWDFNPNKDTWPEATKVGVGAFGPGFPPHGG
5 LLGWSPOAQGILTTLPAAPPPASTNRQSGRKATPI SPPLRDTHPQA

HBV-H (ID: Q8JMY6, SEQ ID N.º: 11)

MGAPLSTARRMGQNLSVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWDNFNTNKDNWPMANKVGVGG
FGPGFPPHGGLLGWSPOAQGILTTSPPDPPPASTNRRSGRKPTVSPPLRDTHPQA

Orangután HBV (ID: AF 193864, SEQ ID N.º:12)

MGQNLVSSNPLGFFPEHQLDPLFRANTNNPDWDFNPNKDTWPEATKVGVGAFGPGFPPHGG
LLGWSPOAQGVTTILPAVPPPASTNRQSGRQPTPI SPPLRDTHPQA

10 Mono lanudo del VHB (ID: NC 001896, SEQ ID N.º:13)

MGLNQSTFPLGFFPSHQLDPLFKANAGSADWDKPKDPWPAHDTAVGAFGPGLVPPHGGLLG
WSSQAQGLSVTVPDTPPPPSTNRDKGRKPTPATPPLRDTHPQA

También existe una secuencia de consenso preS del VHB (para las posiciones de aminoácidos (-11) a 48) (SEQ ID N.º: 14):

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

15 Además, las secuencias de péptidos o aminoácidos son preferiblemente secuencias de L-aminoácidos, pero también pueden comprender D-aminoácidos o son secuencias de D-aminoácidos.

De acuerdo con la invención, el péptido del compuesto basado en lipopéptidos comprende al menos los aminoácidos que tienen la secuencia de la SEQ ID N.º: 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 SEQ ID Nos. 18 a 20.

Las variantes truncadas en el extremo N y/o en el extremo C comprenden preferiblemente al menos 18 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente al menos 19 aminoácidos consecutivos, incluso más preferiblemente al menos 20 y solo incluso más preferiblemente al menos 21 aminoácidos consecutivos de las SEQ ID Nos. 18 a 20.

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

30 En una realización, uno o uno o más aminoácidos de X tienen un grupo amino en una cadena lateral, que se selecciona/selecciona preferiblemente de entre lisina, α -amino glicina, ácido α,γ -diaminobutírico, ornitina, α,β -diaminopropiónica. ácido, más preferiblemente lisina. El(los) aminoácido(s) de X que tiene un grupo amino en una cadena lateral, está/están preferiblemente ubicados en el extremo N de X, en el que uno a once (1-11), preferiblemente uno a tres (1-3), los aminoácidos que tienen un grupo amino en una cadena lateral están ubicados en el extremo N de X.

35 En una realización, la secuencia X terminal N comprende preferiblemente la secuencia $NX_1SX_2X_3$ (SEQ ID N.º: 15), en la que X_1 , X_2 y X_3 pueden ser aminoácidos arbitrarios. Preferiblemente, X_1 de la SEQ ID N.º: 15 es L, I o Q, más preferiblemente L. Preferiblemente, X_2 de la SEQ ID N.º: 15 es T, V, A o no está presente, preferiblemente T o V,

más preferiblemente T. Preferiblemente, X₃ de la SEQ ID N.º: 15 es P, S, T o F, más preferiblemente P o S, incluso más preferiblemente S. Preferiblemente, la secuencia NX₁SX₂X₃ (SEQ ID N.º: 15) está unida directamente al extremo N de la secuencia de aminoácidos **P** (SEQ ID N.º: 1; NPLGFXaaP), que da como resultado un péptido que comprende la secuencia NX₁SX₂X₃NPLGFXaaP, en la que X₁, X₂, X₃ y Xaa se definen como anteriormente.

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

En una realización, la secuencia C-terminal Y consiste en al menos 4 aminoácidos (es decir, *n* es al menos 4), que preferiblemente tiene la secuencia X₄HQLDP (SEQ ID N.º: 16), en la que X₄ es un aminoácido arbitrario. Preferiblemente, X₄ de la SEQ ID N.º: 16 es D, E o S, más preferiblemente D o E, aún más preferiblemente D. Preferiblemente, la secuencia X₄HQLDP (SEQ ID N.º: 16) está directamente unido al término C de la secuencia de aminoácidos **P** (SEC. ID. N.º: 1; NPLGFXaaP), que da como resultado un péptido que comprende la secuencia NPLGFXaaPX₄HQLDP, en la que X₄ y Xaa se definen como anteriormente.

15 En una realización preferente, el péptido del compuesto basado en lipopéptidos de la presente invención comprende un péptido codificado por la secuencia de aminoácidos NX₁SX₂X₃NPLGFXaaP X₄HQLDP (SEQ ID N.º: 17), donde X₁, X₂, X₃, X₄ y Xaa se definen como anteriormente.

20 Las sustituciones conservadoras de aminoácidos típicamente se relacionan con sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Estas clases incluyen, por ejemplo,

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

Como se discutió anteriormente, las secuencias de péptidos o aminoácidos (a) son preferiblemente secuencias de L-aminoácidos, pero también pueden comprender D-aminoácidos o son secuencias de D-aminoácidos.

30 Preferiblemente, la secuencia de péptidos o aminoácidos (a), **X-P-Y-R_o**, se selecciona de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de

SEQ ID N.º 18 HBV preS/2-48 (genotipo C),

SEQ ID N.º 19 HBV preS/2-48 (genotipo D),

SEQ ID N.º 20 HBV preS/2-48 (consenso), o

una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (preferiblemente al menos 95% o 99% de identidad) con las secuencias anteriores.

35 En esta realización, *m* = 7 y *n* = 33 (*m* + *n* = 40), dando como resultado una secuencia peptídica o de aminoácidos de 47 aminoácidos.

SEQ ID N.º 18

GTNL SVPNP LGFFP DHQLD PAFGA NSNNP DWDFN PNKDH WPEAN KVG

SEQ ID N.º 19

GQNL STSNP LGFFP DHQLD PAFRA NTANP DWDFN PNKDT WPDAN KVG

40 SEQ ID N.º 20:

GTNL SVPNP LGFFP DHQLD PAFRA NSNNP DWDFN PNKDH WPEAN KVG

En una realización preferente, el lipopéptido es Myrcludex B:

(a) que tiene la secuencia de aminoácidos de HBV preS/ 2-48 (genotipo C) con la SEQ ID N.º 18.

El compuesto basado en lipopéptidos de acuerdo con la invención comprende:

(b) una modificación hidrófoba o lipídica, preferiblemente en el péptido (a).

De acuerdo con la invención, el péptido comprende una modificación hidrófoba o lipídica (b) por acilación con miristoilo (C14), palmitoilo (C16) o estearoilo (C18), preferiblemente con miristoilo (C14) en el extremo N-terminal.

5 En una realización, el péptido se modifica con al menos una fracción o grupo hidrófobo. En realizaciones preferentes de esta invención, el péptido se modifica con 1, 2, 3, 4 o más fracciones o fracciones o grupos hidrófobos. Es decir, el péptido puede modificarse con más de una fracción o grupo hidrófobo, tal como 2. Las fracciones o grupos hidrófobos pueden ser iguales o diferentes entre sí.

10 "N-terminal" se refiere al término N de un péptido, por lo tanto, en un péptido con la fórmula general X-P-Y-R_n, se refiere al término N de X, es decir, la primera fracción de aminoácido respectiva, pero comprende también la modificación hidrófoba cercana al término N, como los respectivos residuos de aminoácidos (-4), (-3), (-2), (-1), 1, 2 o 3 o 4. Por lo tanto, el acoplamiento de la modificación hidrófoba se puede obtener además, mediante la unión de una fracción hidrófoba en un sitio cercano al término N de X.

La modificación hidrófoba del compuesto basado en lipopéptidos de acuerdo con la presente invención agrega una fracción hidrófoba, preferiblemente a la secuencia péptido/aminoácido.

15 De acuerdo con la invención, la modificación hidrófoba 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 no muestra los efectos adversos del grupo estearoilo (respuesta inmune innata, etc.).

20 Por lo tanto, las secuencias de péptido/aminoácido (a) están modificadas hidrofóticamente, **en particular** aciladas y, por lo tanto, lipopéptidos debido a su grupo/fracción lipófilo o hidrófobo.

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

25 "C-terminal" se refiere a la modificación en el término C, es decir, el último residuo de aminoácido respectivo, pero comprende también la modificación en la proximidad cercana al término C, tal como el último excepto un residuo de aminoácido, el último excepto 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 materia podrá seleccionar las respectivas fracciones adecuadas en función de la aplicación correspondiente. Las fracciones 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 C-terminal (R) es opcional. Preferiblemente, o es 1. En realizaciones adicionales de esta invención o es 1, 2, 3, 4 o más. Es decir, el extremo C o su proximidad pueden modificarse con más de una fracción o grupo, tal como 2. Las fracciones o grupos pueden ser iguales o diferentes entre sí.

30

En una realización, la modificación C-terminal preferida es una amida.

35 En una realización de esta invención, la modificación hidrófoba y/o R están enlazados 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, hidratos de carbono, grupos (CH_n)_n. El experto en la materia podrá, por lo tanto, seleccionar el(los) enlazador(es) o espaciador(es) correspondiente(s) dependiendo de la aplicación respectiva.

En una realización preferente, el lipopéptido es Myrcludex B que tiene

40 (a) la secuencia de aminoácidos de HBV preS/2-48 (genotipo C) con la SEQ ID N.º 18;

(b) una miristoilación N-terminal

(c) una amida C-terminal.

Myr- GTNLSVPLGLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANKVG-amida

En una realización, el compuesto basado en lipopéptido de acuerdo con la invención comprende

45 (c) una fracción o fracciones adicionales.

Tales fracciones adicionales pueden ser

fármaco(s) o sus respectivos profármacos(s);

etiqueta(s);

marcador(es), como colorante(s) fluorescente(s), radioisótopo(s) y agente(s) de contraste;

virus(s) recombinante(s) o derivado(s) del mismo;

portador o depósito(s) de medicamento(s), profármaco(s) o marcador(s);

epítipo(s) inmunogénico(s);

hormonas (hormonas peptídicas, hormonas esteroideas, monoaminas, derivados de aminoácidos, eicosanoides).

- 5 En una realización, la fracción o fracciones adicionales se unen covalentemente al compuesto lipopeptídico (preferiblemente al péptido), tal como a través de un enlace, espaciador y/o grupo(s) de anclaje.

Los compuestos basados en lipopéptidos pueden contener además una fracción o grupos de anclaje que pueden servir como un punto o puntos adicionales de unión para otras fracciones (como un compuesto, etiqueta, marcador) y pueden ubicarse en un aminoácido de Y.

- 10 Un grupo de anclaje puede estar en una cadena lateral de aminoácido o puede ser la propia cadena lateral de aminoácido, es decir, el grupo de anclaje puede ser una cadena lateral o una cadena lateral modificada. El grupo de anclaje también puede ser un residuo de aminoácido modificado que se introdujo en la secuencia de aminoácidos del lipopéptido para servir como un grupo de anclaje. En otras realizaciones de la invención, el grupo de anclaje A está unido a la modificación hidrófoba y/o la modificación C-terminal R.

- 15 Los grupos de anclaje preferidos se seleccionan de éster, éter, disulfuro, amida, tiol, tioéster. El experto en la materia podrá seleccionar el(los) grupo(s) de anclaje(s) adecuado(s) correspondiente (s) dependiendo de la fracción adicional respectiva que se va a unir. El grupo de anclaje puede ser adecuado además para unir un componente formador de complejos, tal como el complejo de biotina/avidina, poliarginina /oligonucleótido (por ejemplo, ARNsi). En algunas realizaciones, hay más de un grupo de anclaje, tal como 2, 3, 4 o más, tal como 2. Los grupos de anclaje pueden ser iguales o diferentes entre sí, permitiendo la unión de varias fracciones adicionales.

- 20 En una realización, la fracción/fracciones adicionales es/son agentes de contraste que se acoplan a través de un agente quelante. De este modo, el agente de contraste se une/acopla en forma de un complejo con un agente quelante capaz de formar complejos con el agente de contraste respectivo. Dicho agente quelante puede ser ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N,N'-tetraacético (DOTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 1,4,7-triazaciclononan-1,4,7-triacético (NOTA), trietilentetramina (TETA), ácido iminodiacético, ácido dietilentriamina-N,N',N',N''-pentacético (DTP A) y ácido 6-hidrazinopiridin-3-carboxílico (HYNIC), tales como preferentemente DOTA. Ejemplos de agentes de contraste son agentes paramagnéticos, es decir Gd, Eu, W y Mn, preferiblemente complejados con un agente quelante. Otras opciones son complejos y partículas de hierro (Fe) supramagnéticos, compuestos que contienen átomos de alto número atómico, es decir, yodo para tomografía computarizada (TC), microburbujas (tales como para ultrasonido o potenciado con contraste (CEUS)) y portadores como liposomas que contienen estos agentes de contraste.

- 30 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 en secuencia y en bloque en fase sólida. Más detalles se pueden extraer de WO 2009/092612.

- NTCP

El cotransportador de sodio/ácido biliar también conocido como polipéptido transportador de sodio/Na⁺-taurocolato (NTCP) es una proteína que en los humanos es codificada por el gen SLC10A1 (familia de portadores de solutos 10 miembro 1).

- 40 Los cotransportadores de sodio/ácido biliar son glicoproteínas integrales de membrana que participan en la circulación enterohepática de los ácidos biliares. Dos transportadores homólogos participan en la reabsorción de ácidos biliares, uno que absorbe de la luz intestinal, el conducto biliar y el riñón con una localización apical (SLC10A2), y el otro cotransportador dependiente de sodio que se encuentra en las membranas basolaterales de hepatocitos (SLC10A1).

- 45 La formación de bilis es una función importante del hígado. Las sales biliares son un componente importante de la bilis y son secretadas por los hepatocitos a la bilis y son enviadas al intestino delgado, donde ayudan en la digestión de las grasas. En el hígado, los hepatocitos absorben las sales biliares (principalmente a través de NTCP) y las secretan nuevamente en la bilis (principalmente a través de la bomba de exportación de sales biliares (BSEP)) para la circulación enterohepática en curso. La captación de sales biliares en los hepatocitos se produce en gran medida de una manera dependiente de sodio por el polipéptido transportador de taurocolato de sodio, NTCP. Las propiedades de transporte de NTCP han sido ampliamente caracterizadas. Es un miembro electrogénico de la familia de transportadores de solutos (SLC10A1) y transporta predominantemente sales biliares y compuestos sulfatados, pero también es capaz de mediar en el transporte de sustratos adicionales, como hormonas tiroideas, fármacos y toxinas. Está altamente regulado en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. La regulación de NTCP

hace frente a los cambios de la carga de sales biliares en hepatocitos y evita la entrada de cantidades citotóxicas de sales biliares durante la enfermedad hepática.

Para una revisión de los transportadores de sales biliares, véase también Trauner y Boyer (2003).

5 Para la NTCP se pudo detectar una gran variedad de sustratos, transporta ácidos biliares no conjugados, así como conjugados con taurina y conjugados con glicina (Hagenbuch & Meier, 1994), también ácidos biliares sulfatados y, en contraste con el transportador de ácido biliar apical dependiente del sodio. (ASBT), también sulfatos de esteroides (Craddock et al 1998; Kramer et al, 1999; Schroeder et al 1998) y hormonas tiroideas (Friesema et al, 1999). También se ha demostrado que las fármacos como la rosuvastatina (Ho et al., 2006) y la micafungina (Yanni et al., 2010) tienen afinidad por la NTCP. Los datos recientes muestran que los medicamentos aprobados por la FDA están identificados como inhibidores de NTCP (Dong et al., 2013). La mayoría de ellos son medicamentos antifúngicos, antihiperlipidémicos (simvastatina), antihipertensivos, antiinflamatorios o glucocorticoides.

Preferiblemente, los compuestos que se transportan en hepatocitos a través de NTCP son

- ácidos biliares

15 tales como el colato
 ácidos biliares conjugados con taurina o glicina y sales de los mismos
 (sales biliares dihidroxi y trihidroxi conjugadas con taurina o glicina) tales como
 taurocolato
 glicocolato
 taurodesoxicolato
 20 tauroquenodesoxicolato
 taoursodesoxicolato
 ácidos biliares sulfatados y sus sales.

- esteroides esteroides-sulfato conjugados de estrógenos (por ejemplo, estrona-3-sulfato, 17 α -etinilestradiol-3-O sulfato) deshidroepiandrosterona sulfato
- 25 • hormonas tiroideas conjugadas y no conjugadas
- toxinas hepáticas
- compuestos que se unen covalentemente al taurocolato (por ejemplo, clorambucil-taurocolato)
- bromosulfotaleína,
- fármacos

30 tales como
 antifúngico (por ejemplo, micafungina),
 antihiperlipidémico (por ejemplo, simvastatina, rosuvastatina, pitavastatina, fluvastatina, atorvastatina),
 antihipertensivo,
 antiinflamatorio, o
 35 medicamentos glucocorticoides.

De acuerdo con la invención, dicha enfermedad o afección hepática que está relacionada con el transporte mediado por NTCP de compuestos a hepatocitos, es una enfermedad metabólica con compromiso hepático seleccionada de colestasis intrahepática, envenenamiento del hígado (por toxinas hepáticas)/hepatotoxicidad, enfermedad hepática colestásica inducida por fármacos, hipercolesterolemia, colestasis posthepática.

40 Una "enfermedad metabólica con compromiso hepático" cuando se usa en este documento se refiere a trastornos metabólicos que incluyen obesidad visceral, diabetes mellitus y dislipidemia que están influenciados por el metabolismo hepático de los lípidos y los ácidos biliares.

En general, la "colestasis" es una afección en la que los hepatocitos no pueden segregar los componentes de la bilis hacia el árbol biliar o donde la bilis no puede fluir del hígado al duodeno, lo que produce una acumulación de ácido biliar en los hepatocitos dentro de los hepatocitos.

45 "Colestasis" o "colestasis intrahepática" cuando se usa aquí se refiere a los efectos tóxicos intrahepáticos de la acumulación de ácidos biliares de hepatocitos relacionados con una expresión y/o actividad insuficiente de las bombas de sales biliares (como BSEP o MRP) en la membrana canalicular.

La "Colestasis posthepática", cuando se usa aquí, se refiere a una enfermedad hepática colestásica debida a la obstrucción de los conductos biliares grandes.

50 "Envenenamiento del hígado" o "hepatotoxicidad" o "enfermedad hepática tóxica", cuando se usa aquí, se refiere a los efectos tóxicos de los fármacos independientemente de la acumulación de ácidos biliares. Estos fármacos penetran en los hepatocitos a través del transporte mediado por NTCP y causan varios efectos tóxicos directos, dañando las mitocondrias o activando las enzimas en el sistema del citocromo P-450, lo que lleva al estrés oxidativo.

"Enfermedad hepática colestásica inducida por medicamentos" cuando se usa en este documento se refiere a la inhibición de la exportación de ácidos biliares de los hepatocitos debido a los efectos de los medicamentos en la bomba de exportación de sales biliares (BSEP). La colestasis inducida por fármacos puede ser causada por varios fármacos que inhiben la BSEP, como rifampicina, ciclosporina A, rifamicina SV, bosentán, troglitazona, eritromicina estolato y glibenclamida (Fattinger et al., 2001; Funk et al., 2001; Funk et al., 2001; Stieger et al., 2000; Dawson et al., 2012; Morgan et al., 2010; Ogimura et al., 2011). La BSEP es un miembro de la familia de transportadores de casete de unión a ATP (ABCs) (BSEP también se identifica como ABCB11) y está involucrada en el proceso de exportación de ácidos biliares de los hepatocitos, lo que reduce su toxicidad para estas células. Los medicamentos mencionados anteriormente causan los efectos tóxicos del exceso de acumulación de ácidos biliares porque la excreción del ácido biliar a través de BSEP está deshabilitada. La inhibición de la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP a través del compuesto basado en lipopéptidos (como MyrB) y NTCP contrarresta la inhibición de BSEP, y por lo tanto previene la hepatotoxicidad o es adecuada para el tratamiento y/o diagnóstico.

La "hiperlipidemia" (o hiperlipoproteinemia o hiperlipidemia) implica niveles anormalmente elevados de cualquiera o todos los lípidos y/o lipoproteínas en la sangre. Las hiperlipidemias se dividen en subtipos primarios y secundarios. La hiperlipidemia primaria generalmente se debe a causas genéticas (como una mutación en una proteína receptora), mientras que la hiperlipidemia secundaria se debe a otras causas subyacentes, como la diabetes. Las anomalías de lípidos y lipoproteínas son comunes en la población general y se consideran un factor de riesgo modificable para la enfermedad cardiovascular debido a su influencia en la aterosclerosis.

La "hipercolesterolemia" (o hipercolesterolemia) es la presencia de niveles altos de colesterol en la sangre. Es una forma de "hiperlipidemia".

"Hiperlipidemia" cuando se usa en el presente documento se refiere preferiblemente a hipercolesterolemia que incluye colesterol LDL elevado, colesterol HDL reducido, triglicéridos elevados, arterias obstruidas que conducen a presión arterial alta, enfermedad cardiovascular (ECV), ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares.

Preferiblemente, el transporte mediado por NTCP está disminuido o es bloqueado por el compuesto basado en lipopéptidos.

Los inventores han descubierto que el lipopéptido MyrB interfiere con el transporte de sales biliares mediado por NTCP. En particular, MyrB inhibe el transporte de sales biliares mediado por NTCP. Por lo tanto, la K_i para la inactivación del transportador (K_i para rNTCP ~ 4 nM) es mucho más alta en comparación con la IC_{50} observada para la inhibición de la infección por VHB/VHD (80 pM), que coincide con el hallazgo de que la infección por VHB ya se puede bloquear en concentraciones por debajo de la saturación del receptor. (Schulze et al., 2010). Una explicación plausible es la suposición de que, de forma similar a otros virus, el complejo L-proteína/hNTCP tiene que multimerizar. La unión de MyrB a una sola subunidad podría anular la entrada del virus, mientras que el transporte de sustrato puede continuar. Este supuesto está respaldado por informes que demuestran la oligomerización de NTCP (Doring et al., 2012).

Preferiblemente, el compuesto basado en lipopéptido se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto basado en lipopéptidos de esta invención se refiere a la cantidad que es suficiente para bloquear o inhibir el transporte de sal biliar mediado por NTCP.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto basado en lipopéptidos de esta invención se refiere además a la cantidad que es suficiente para diagnosticar, prevenir y/o tratar la enfermedad o trastorno hepático respectivo. La cantidad terapéuticamente efectiva preferida depende del compuesto respectivo que se va a administrar y su potencial terapéutico respectivo.

El compuesto basado en lipopéptidos se usa preferiblemente en una concentración tal que se alcanza una K_i de aproximadamente 1 a 10 nM en el sitio objetivo, es decir, el sitio de NTCP (hepatocitos).

En particular, para inhibir el transporte de sustrato, el compuesto basado en lipopéptidos se usa preferiblemente en una dosis tal que la concentración en el sitio objetivo esté por encima de la K_i de aproximadamente 1 a 10 nM.

En el caso de un valor de IC_{50} del compuesto basado en lipopéptidos usado de aproximadamente 10 nM, una cantidad terapéuticamente efectiva preferida es aproximadamente 100 μ g por kg de peso corporal o en el intervalo de 1 a 5 mg por paciente. La cantidad terapéuticamente efectiva preferida en el intervalo de 1 a 5 mg por paciente puede administrarse una vez al día o en otras realizaciones solo una vez cada 2-3 días, dependiendo de la estabilidad y el metabolismo del compuesto usado y la rotación del complejo de NTCP/compuesto.

Una cantidad terapéuticamente efectiva es preferiblemente una dosis diaria o una administración diaria en el intervalo de

- de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg por paciente, es decir, de aproximadamente 0,0014 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,7 mg/kg de peso corporal,

- preferiblemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg por paciente, es decir, de aproximadamente 0,014 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,28 mg/ kg de peso corporal.

El experto en la materia podrá determinar las cantidades terapéuticamente eficaces adecuadas.

5 Preferiblemente, la vía de administración o aplicación de la presente invención se selecciona de subcutánea, intravenosa, oral, nasal, intramuscular, transdérmica, por inhalación, por supositorio.

Una realización preferente para la administración o aplicación nasal es un aerosol nasal.

En una realización, el compuesto basado en lipopéptidos se disuelve en el suero del paciente y se aplica mediante inyección.

10 La cantidad terapéuticamente efectiva preferida depende de la aplicación respectiva y del resultado deseado de inhibición, diagnóstico, prevención y/o tratamiento.

Los compuestos basados en lipopéptidos pueden administrarse/aplicarse en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden:

- al menos un compuesto basado en lipopéptidos como se define aquí anteriormente;
 - y
 - opcionalmente, un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15

Dichas composiciones farmacéuticas son muy adecuadas para todos los usos y procedimientos descritos en el presente documento.

20 Un "portador o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier vehículo en el que o con el cual se puedan formular las composiciones farmacéuticas. Incluye una solución salina tal como solución salina con regulador fosfato. En general, un diluyente o vehículo se selecciona en función del modo y la vía de administración, y la práctica farmacéutica estándar.

Lipopéptidos para su uso en el control del nivel de colesterol y en enfermedades cardiovasculares.

Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona un compuesto basado en lipopéptidos para su uso en el control o modificación del nivel o la captación de colesterol de colesterol.

25 El nivel o la captación de colesterol se controla o modifica disminuyendo o bloqueando el transporte de sales biliares mediado por NCTP por el compuesto basado en lipopéptidos como se define en esta solicitud.

30 Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona un compuesto basado en lipopéptidos para su uso en la prevención y/o tratamiento *in vivo* de una enfermedad cardiovascular, comprende el control o modificación del nivel de colesterol o captación de colesterol. De acuerdo con la invención, el tratamiento se lleva a cabo en un grupo de pacientes con hipercolesterolemia.

Dichos usos comprenden el control o la modificación del nivel o la captación de colesterol de colesterol, en el que el nivel o la captación de colesterol se controla o modifica disminuyendo o bloqueando el transporte de sales biliares mediado por NCTP por el compuesto basado en lipopéptidos como se define en esta solicitud.

35 Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de morbilidad y muerte en el mundo occidental. Los niveles altos de colesterol se han asociado con la ECV como uno de los factores de riesgo. De particular importancia clínica es el depósito anormal de colesterol y lipoproteínas ricas en colesterol en las arterias coronarias. Dicha deposición, que eventualmente lleva a la aterosclerosis, es el factor contribuyente principal en las enfermedades de las arterias coronarias. En este caso, el tratamiento de la ECV es crítico y depende de las terapias para reducir los lípidos. Hay diferentes clases de medicamentos disponibles para este propósito, como las estatinas, 40 los inhibidores de la absorción de colesterol, las resinas de los ácidos biliares, los fibratos y el ácido nicotínico que actúan al reducir los niveles de colesterol por distintas vías (Schmitz & Langmann, 2006). Estos medicamentos tienen varios efectos secundarios y dependen de los niveles relativos de las enzimas metabolizadoras y de los transportadores que actúan sobre los medicamentos cardiovasculares.

45 El principal control del metabolismo del colesterol es causado por el ácido biliar como un importante regulador de la homeostasis del colesterol. Los niveles de ácido biliar y colesterol están vinculados por la regulación del metabolismo y la absorción del colesterol. La síntesis de los ácidos biliares es la principal ruta del catabolismo del colesterol en los mamíferos, ya que los productos finales de la utilización del colesterol son los ácidos biliares. La vía principal para la síntesis de los ácidos biliares se inicia a través de la hidroxilación del colesterol en la posición 7 a través de la acción de la 7 α -hidroxilasa del colesterol (CYP7A1). Eso significa que la síntesis de ácidos biliares es 50 uno de los mecanismos predominantes para la excreción del exceso de colesterol. Bajo condiciones fisiológicas, esta regulación es insuficiente para compensar una ingesta excesiva de colesterol. Sin embargo, si se bloquea la captación de ácidos biliares en los hepatocitos, la excreción de colesterol en forma de ácidos biliares será suficiente para compensar el consumo excesivo de colesterol en la dieta. El bloqueo de la captación de ácidos biliares a través

del compuesto basado en lipopéptidos de acuerdo con la invención y la NTCP conduce a una deficiencia intracelular de ácido biliar que se compensa con el aumento del metabolismo y la absorción del colesterol. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, los compuestos basados en lipopéptidos son adecuados para terapias hipolipemiantes para prevenir la ECV.

5 *Ensayo para el transporte mediado por NTCP de compuestos de prueba*

La presente divulgación también describe un ensayo o procedimiento *in vitro* e *in vivo* para probar o medir el transporte de compuesto(s) de prueba mediado por NTCP.

Dicho ensayo o procedimiento *in vitro* e *in vivo* comprende los pasos de

- 10 (a) proporcionar compuesto(s) de prueba y un compuesto basado en lipopéptidos, tal como se define en el presente documento;
- (b) proporcionar un sistema de prueba para la expresión de NTCP funcional y selectiva, que incluye la medición del transporte de ácidos biliares mediante NTCP;
- (c) agregar el(los) compuesto(s) de prueba, ya sea junto con o sin el compuesto basado en lipopéptidos, al sistema de prueba de NTCP de (b);
- 15 (d) determinar si los compuestos de prueba se transportan a través de NTCP comparando los resultados de las etapas (b) y (c), cada uno con o sin la adición del compuesto basado en lipopéptidos,

en el que se considera que un compuesto de prueba se transporta a través de NTCP cuando el(los) compuesto(s) disminuyen, bloquean o inhiben el transporte de sales biliares mediante NTCP (transporte competitivo) o cuando el transporte del(de los) compuesto(s) se puede reducir, bloquear o inhibir mediante la adición del compuesto basado en lipopéptidos.

20 Dicho sistema de prueba adecuado comprende la expresión de NTCP funcional y selectiva y, por lo tanto, un transporte de NTCP funcional, que puede ser bloqueado/inhibido selectivamente por un compuesto basado en lipopéptidos de la invención (como MyrB). Puede ser uno o más de los siguientes

- 25
- una línea celular transgénica que expresa un NTCP funcional,
 - un animal transgénico que expresa un NTCP funcional.

Ejemplos de sistemas de prueba *in vitro* o modelos de prueba adecuados son:

- líneas celulares de hepatocitos y hepatoma transducidas de manera estable con un lentivirus que codifica para NTCP, como se describe en los ejemplos y como se describe en la solicitud internacional WO 2014/072526.

Ejemplos de sistemas de prueba o modelos de prueba adecuados *in vivo* son:

- 30
- hígado perfundido aislado, por ejemplo ratón o rata, como se describe en vom Dahl et al., 1991 o Schulz et al., 1991;
 - ratón transgénico, como se describe en el ejemplo y como se describe en la solicitud internacional WO 2014/072526.

Procedimientos para el tratamiento de enfermedades hepáticas.

35 La presente divulgación también describe un procedimiento para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o afección hepática.

Dicha enfermedad o afección hepática está relacionada con el transporte de compuestos a hepatocitos mediado por el polipéptido transportador de taurocolato (NTCP).

40 El procedimiento comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto basado en lipopéptidos a un paciente.

Por ejemplo, el compuesto basado en lipopéptidos es como se define en esta solicitud.

La enfermedad o afección hepática relacionada con el transporte de compuestos a hepatocitos mediado por NTCP es una enfermedad metabólica con compromiso hepático seleccionada de

colestasis intrahepática,

45 envenenamiento del hígado (por toxinas del hígado)/hepatotoxicidad,

enfermedad hepática colestásica inducida por fármacos,

hiperlipidemia,

colestasis posthepática.

Los compuestos que se transportan a los hepatocitos a través de NTCP son

- ácidos biliares

5 tales como el colato

 ácidos biliares conjugados con taurina o glicina y sus sales.

 (sales de bilis dihidroxi y trihidroxi conjugadas con taurina o glicina) tales como

 taurocolato

 glicocolato

10 taurodeoxicolato

 tauroquenodeoxicolato

 tauroursodeoxicolato

 ácidos biliares sulfatados y sus sales.

- esteroides

15 sulfatos de esteroides

 conjugados de estrógeno (por ejemplo, estrona-3-sulfato, 17 α -etinilestradiol-3-O-sulfato)

 sulfato de deshidroepiandrosterona

- hormonas tiroideas conjugadas y no conjugadas
- toxinas hepáticas

20 • compuestos que se unen covalentemente al taurocolato (por ejemplo, clorambucilo-taurocolato)

- bromosulfoftaleína,

- fármacos

tales como

 antifúngico (por ejemplo, micafungina),

25 antihiperlipidémico (por ejemplo, simvastatina, rosuvastatina, pitavastatina, fluvastatina,

 atorvastatina),

 antihipertensivo,

 antiinflamatorio, o

 medicamentos glucocorticoides.

30 El transporte mediado por NCTP es disminuido o bloqueado por el compuesto basado en lipopéptidos.

La cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto basado en lipopéptidos está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg por paciente y por día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg por paciente por día.

Procedimientos para controlar el nivel de colesterol y tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

35 La presente divulgación también describe un procedimiento para el control o modificación del nivel o la captación de colesterol de colesterol.

El nivel o la captación de colesterol se controlan o modifican disminuyendo o bloqueando el transporte de sales biliares mediado por NCTP (por el compuesto basado en lipopéptidos).

El procedimiento comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto basado en lipopéptidos a un paciente.

Por ejemplo, el compuesto basado en lipopéptidos es como se define en esta solicitud.

5 La presente descripción también describe un procedimiento para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad cardiovascular (ECV), que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto basado en lipopéptidos a un paciente.

De este modo, el nivel o la captación de colesterol se controlan o modifican preferiblemente disminuyendo o bloqueando el transporte de sales biliares mediado por NTCP por el compuesto basado en lipopéptidos.

10 La captación de ácidos biliares mediante el bloqueo mediado por NTCP permite un aumento del colesterol a través de los hepatocitos. Por lo tanto, el colesterol LDL se reducirá y el colesterol HDL se elevará. Como consecuencia, se reducirá al mínimo el riesgo de que se obstruyan las arterias y se produzca presión arterial alta, ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares con ECV.

Descripción adicional de la invención.

15 Los inventores muestran que el lipopéptido Myrcludex B (MyrB) interfiere con el transporte de sales biliares mediado por NTCP.

MyrB:

Myr- GTNLSVNPPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANKVG-amida

Los análisis funcionales del receptor NTCP/SLC10A revelaron que:

- (i) NTCP humano (hNTCP) se une a MyrB;
- 20 (ii) los -sustratos de NTCP interfieren con la infección por VHB;
- (iii) MyrB inhibe el transporte de sal biliar mediada por NTCP.

MyrB es un fármaco novedoso interesante para atacar las NTCP, pero también para estudiar su función *in vivo*.

25 Cabe destacar que la K_i para la inactivación del transportador (K_i para rNTCP \sim 4nM) es mucho mayor en comparación con la IC_{50} observada para la inhibición de la infección por VHB/VHD (80 pM) (Schulze et al., 2010). Esto coincide con el hallazgo de que la infección por VHB ya se puede bloquear en concentraciones por debajo de la saturación del receptor (Schulze et al., 2010). Una explicación plausible es la suposición de que, de forma similar a otros virus, el complejo L-proteína/hNTCP tiene que multimerizar. Si solo una subunidad está vinculada a MyrB, la entrada puede ser abrogada aunque el transporte del sustrato puede progresar. Este supuesto está respaldado por informes que demuestran la oligomerización de NTCP (Doring et al., 2012). La observación de que los sustratos naturales de NTCP, cuando se aplican a altas concentraciones (Figuras 2C y D) interfieren con la unión de MyrB y la infección por VHB indican que el transporte impulsado por sodio está acoplado a la entrada efectiva de VHB.

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

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 hNTCP se une específicamente al lipopéptido MyrB.

35 La expresión de NTCP humana estable (hNTCP) en cinco líneas celulares de hepatoma se realizó mediante transducción lentiviral después de la selección de antibióticos.

(A) Inmunoprecipitación Western de lisados de células desglucosiladas de líneas celulares HuH7^{hNTCP}, HepG2^{hNTCP}, HepaRG^{hNTCP}, Hepal-6^{hNTCP} y Hep56.1D^{hNTCP} en comparación con células transducidas de forma simulada y dos muestras de PHH. Solo el 10% de la muestra se cargó en el carril HepaRG^{hNTCP} (*).

40 Se incubaron líneas celulares humanas que expresaban hNTCP (B-C) con el péptido MyrB^{atto} marcado con Atto488 (verde o 488 λ). La unión del péptido se analizó mediante la colocalización del péptido con hNTCP-IF utilizando un anticuerpo específico de hNTCP (rojo) (B) o FACS utilizando el péptido mutante MyrB^{attoAla11-15} o un exceso de MyrB sin marcar (C).

(D) Análisis FACS de la unión de MyrB como se describe en (C) para las líneas celulares HepG2^{mNtcp}.

45 (E) HepG2 ratNtcp-eGFP que expresan células (verdes) se incubaron con MyrB^{atto} (rojo) y se analizaron mediante microscopía confocal. Téngase en cuenta la colocalización de hNTCP/MyrB^{atto} en microvilli.

Figura 2 Influencia del lipopéptido MyrB en el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP; efecto de los ácidos biliares en la infección por VHB.

5 (A) rNtcp-eGFP que expresan células HepG2 se incubaron con concentraciones crecientes de MyrB o MyrB^{Ala11-15} mutante (un mutante con mutaciones de Ala en la región 9-NPLGFFP-15, concretamente 9-NPAAAAA-15) y ³H-taurocolato ascenso se cuantificó. La captación no competitiva se fijó al 100%.

(B) células HepG2 que expresaban hNtcp-eGFP se incubaron con concentraciones crecientes de MyrB, MyrB^{Ala11-15} mutante (o preS2-78 myr y la captación de taurocolato 3H se cuantificó. La captación no compensada se fijó al 100%).

10 (C-D) Se preincubaron células HepaRG (B) o HuH7^{hNTCP} diferenciadas (C) 2 horas antes y se coincubaron durante la infección por VHB con 5, 50 y 500 µM de TC, TDC o TCDC y se determinó el HBeAg secretado d7-9 pi. La infección se controló mediante adición de MyrB 2 horas antes y durante la infección.

(E) Las células HuH7^{hNTCP} se incubaron a las concentraciones de sal biliar indicadas durante la noche a 37°C, se tripsinizaron y se incubaron en presencia de sales biliares con MyrB^{atto} durante 30 minutos más. La unión se cuantificó mediante análisis FACS. Se usó MyrB sin etiquetar como control.

15 Ejemplos

1. Procedimientos

1.1 Plásmidos: el ADNc de hNTCP (Origen, USA) Y el ADNc de mNtcp (Rose et al., 2011) se subclonaron en el vector lentiviral pWPI-puro de coexpresión de puromicina. Las quimeras hNTCP, mNtcp y h/mNtcp se generaron mediante PCR superpuesta y se introdujeron en pWPI-GFP.

20 1.2 Células: los lentivirus se produjeron y usaron para transducir hNTCP en humanos (HepaRG, HepG2, HuH7), ratón (Hepa1-6, Hep56.1D) y la línea celular de hepatoma de rata TC5123. Las respectivas células simuladas transducidas se usaron como controles. Para generar líneas celulares estables, se logró la selección con 2,5 µg/ml de puromicina. La diferenciación de HepaRG transducido fue inducida por DMSO como se describe (Gripon et al., 2002). La línea celular HepG2-rNTCP y HepG2-rNTCP-eGFP se han descrito previamente para la expresión de Ntcp de rata con o sin eGFP fusionado (Stross et al., 2010).

25 1.3 Síntesis y marcaje de péptidos.

La síntesis de MyrB y el mutante MyrB y el péptido de control preS2-78myr se realizó mediante síntesis en fase sólida (Schieck et al., 2013). El etiquetado se logró mediante el acoplamiento de atto565-NHS-éster/atto488-NHS-éster (ATTO-TEC, Alemania) a los residuos de lisina de los péptidos. Los péptidos monolabélicos se agruparon después de la purificación por HPLC y se prepararon soluciones madre (100 µM) y se almacenaron a -80°C.

MyrB SEQ ID N.º: 18

Myr - GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPPEANKVG - amida

mutante MyrB^{Ala11-15} SEQ ID N.º: 21

35 Myr - GTNLSVPNPAAAAAADHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPPEANKVG - amida

preS2-78myr SEQ ID N.º: 22

Myr-

gqnlstsnplgffpdhqldpafnantanpdwdfnnpnkdtwpcankvgagafglgftpphgg1

lgwspqaqgilqtlp

40 1.4 Citometría de Flujo: las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C en un medio que contenía MyrB^{atto} 200 nM o el -mutante MyrB^{atto}. Las células se lavaron (PBS/BSA al 1%), se tripsinizaron y se suspendieron en regulador de Krebs-Henseleit. La citometría de flujo se realizó en un FACS Canto II (BD Bioscience, Heidelberg, Alemania); se utilizó el software FlowJo v7.61 (Treestar, Ashton, USA) Para el análisis. La compensación se realizó utilizando BD Compbeats (BD Bioscience, Heidelberg, Alemania).

45 1.5 IF: Las células se cultivaron en cubreobjetos (véase Meier et al., 2012), se lavaron e incubaron con MyrB 400 nM (37°C; 30 min). Las células se lavaron de nuevo (3x PBS/2% BSA), se fijaron con PFA, se lavaron con PBS/1 µg/ml de Hoechst 3342 y se montaron (FluoromountG). La tinción inmunitaria con NTCP se logró después de la permeabilización (10 min/RT) con TritonX 100 utilizando un anticuerpo α-SCL10A1/NTCP (Sigma, Alemania) diluido 1:750 en PBS/2% BSA (18 horas a 4°C). Se usó un antisuero policlonal de conejo H863 para la tinción con HBcAg,

un antisuero policlonal de conejo para la detección de MRP-2, suero derivado del paciente (M. Roggendorf, Essen) para H δ Ag. Como anticuerpos secundarios, se usó de cabra anti-conejo o -humano, con AlexaFluor488 o AlexaFluor546 (Invitrogen). La tinción con actina se realizó mediante la adición con faloidina marcada con atto63 3 diluida 1:2000 (ATTO-Tec, Alemania) a la segunda etapa de tinción. Las imágenes se tomaron en un microscopio confocal Leica DM IRB o Leica SP2 (Leica, Alemania), el análisis de imágenes se realizó con ImageJ.

1.6 Ensayo de captación de taurocolato: se usaron células HepG2-rNtcp para estudiar la captación de [3H] TC como se describió anteriormente (Kubitz et al., 2004). En resumen, las células HepG2-rNtcp se cultivaron durante 12 horas (en D-MEM/Ham's F12 w. El medio FCS al 10% que contenía G418 para selección) se preincubaron con concentraciones crecientes de MyrB durante 20 minutos antes de la adición de TC (150 μ M que contenía 450 cpm/fmol [3H] TC). La captación se detuvo después de 5 minutos retirando el medio y lavando tres veces con PBS helado. Las células se lisaron (NaOH 0,1 M y SDS al 0,05%). La radioactividad de los lisados celulares se midió en un contador de centelleo líquido (Packard Instruments, Frankfurt, Alemania) utilizando una solución de centelleo de Ultima Gold líquida (Perkin Elmer, Rodgau, Alemania).

1.7 Inmunoprecipitación Western: los lisados de células enteras se trataron con PNGasa F (New England Biolabs) y se analizaron mediante Inmunoprecipitación Western utilizando un anticuerpo de conejo anti-hNTCP (Sigma-Aldrich) o el anti-suero K9.

2. Unión de lipopéptido MyrB a hNTCP

Para evaluar si la expresión de hNTCP facilita la unión de MyrB, HuH7-, HepG2-, HepaRG- y las dos células de hepatoma de ratón Hepa1-6 y Hep56.1D se transdujeron de forma estable con un lentivirus que codifica hNTCP. La expresión de hNTCP fue verificada por Inmunoprecipitación Western (Figura 1A). HuH7^{hNTCP}, HepG2^{hNTCP}, Hepa1-6^{hNTCP} y Hep56.1D^{hNTCP} expresan cantidades comparables de hNTCP. HepaRG^{hNTCP}-expresión fue mayor por razones desconocidas. No se detectó hNTCP en células transducidas de forma simulada. Para examinar si la expresión de hNTCP hace que las células HuH7^{hNTCP}, HepG2^{hNTCP} y HepaRG^{hNTCP} sean capaces de unirse a HBVpreS, se analizó la asociación celular de MyrB (MyrB^{atto}) marcada con colorante atto- (Figura 1C). La especificidad se controló mediante la competencia de MyrB y el mutante MyrB^{attoAla11-15}. La expresión de hNTCP dio como resultado una unión específica a MyrB que indica un papel válido de hNTCP como un receptor específico de HBVpreS.

Ya que los hepatocitos de algunas especies no susceptibles al VHB (ratones (m), ratas (r)) se unen a MyrB (Meier et al., 2012) y acumulan el péptido en el hígado después de la inyección (Schieck et al., 2013), se espera que mNtcp y rNtcp también se unen a MyrB. Por lo tanto, se utilizaron células HepG2^{mNtcp} y células HepG2 que expresan una fusión ratTCP-eGFP y se analizó la unión de MyrB^{atto}. Se verificó la unión específica y competente de MyrB^{atto} a ambas líneas celulares (Figura 1D y E). Aprovechando la fluorescencia de la fusión ratNTCP-eGFP, se confirmó la colocalización del complejo MyrB/rNtcp en microvilli.

3. Inhibición del transporte de sales biliares.

3.1 El lipopéptido MyrB inhibe la función del transportador de sales biliares de NTCP.

El mero tamaño de MyrB como un ligando específico para algunas PCNP sugiere que varios sitios de contacto están involucrados en la unión. Para probar si MyrB interfiere con la función del transportador de sales biliares de las NTCP, se analizó la interferencia de MyrB con la captación de taurocolato marcado con ³H en las líneas celulares HepG2 de Flag-rNtcp-eGFP. MyrB inhibió rNtcp con una CI₅₀ de 4 nM (Figura 2A). Cabe destacar que las IC₅₀ para la inhibición de la infección por VHB (~100 pM) y del transporte de sales biliares (~5 nM) difieren sustancialmente en lo que respecta a las observaciones de que la inhibición de la infección no requiere la saturación de unión de NTCP (Schulze et al., 2010).

Además, se analizó la interferencia de MyrB con la captación de taurocolato marcado con ³H en Flag-hNtcp-eGFP que expresa líneas celulares HepG2 en comparación con dos péptidos de control: MyrB^{Ala11-15} mutante ((un mutante con mutaciones Ala en la región 9-NPLGFFP-15, a saber, 9-NPAAAAA-15)) y preS2-78myr (véase Figura 2B).

mutante MyrB^{Ala11-15} SEQ ID N.º: 21

Myr - GTNLSVNPNPAAAAADHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANKVG - amida

preS2-78myr ID SEC N.º: 22

Myr-

gqnlstsnplgffpdhqldpafrantandwdfnnpnkdtwpcdankvgagafglgftpphggl

lgwspqaqgilqtlp

3.2 Los sustratos de NTCP taurocolato (TC), taurodeoxicolato (TDC) y tauroquenodesoxi-colato (TCDC) inhiben la infección por VHB.

Para probar si los sustratos naturales de NTCP afectan la infección por VHB, se inocularon células HepaRG diferenciadas (Figura 2C) y HuH7^{hNTCP} (Figura 2D) con VHB a concentraciones crecientes de TC, TDC y TCDC. Los tres sustratos inhibieron la infección por VHB en concentraciones no fisiológicas (50 μ M y 500 μ M) en ambas líneas celulares, como se muestra en la secreción de HBeAg. Se observó una reducción marginal a 5 μ M, lo que indica que en condiciones fisiológicas (<5 μ M), el hNTCP sigue siendo un receptor funcional de VHB/VHD. Para probar si TC, TDC y TCDC interfieren con la unión de MyrB^{atto}, realizamos un ensayo de competición de unión (Figura 2E). En presencia de 500 μ M, todos los sustratos interfirieron profundamente con la unión a preS.

Referencias

- Craddock A. L., Love, M. W., Daniel, R. W., Kirby, L. C., Walters, H. C., Wong, M. H., and Dawson, P. A. (1998) *Am.J.Physiol* 274, G157-G169.
- Dawson S, et al. (2012) In vitro inhibition of the bile salt export pump correlates with risk of cholestatic drug-induced liver injury in humans. *Drug Metab Dispos* 40: 130-138.
- Doring B, Lutteke T, Geyer J, Petzinger E. The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr Top Membr* 2012;70:105-168.
- Dong Z, Ekins S, Polli JE. Structure-Activity Relationship for FDA Approved Drugs As Inhibitors of the Human Sodium Taurocolato Cotransporting Polypeptide (NTCP). *Mol. Pharmaceutics* 2013, 10, 1008-1019.
- Fattinger K, Funk C, Pantze M, et al. The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69:223-31.
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (1999) Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun* 254:497-501.
- Funk C, Pantze M, Jehle L, et al. Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt export pump (Bsep) by troglitazone and troglitazone sulfate. *Toxicology.* 2001; 167:83-98.
- Funk C, Ponelle C, Scheuermann G, et al. Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: in vivo and in vitro interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in the rat. *Mol Pharmacol.* 2001; 59:627-35.
- Gripon P, Rumin S, Urban S, LeSeyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15655-15660.
- Gripon P, Cannie I, Urban S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* 2005;79:1613-1622.
- Hagenbuch B, Meier PJ. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J. Clin. Invest.*, 93 (1994), pp. 1326-1331.
- Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Claeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB. Drug and acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression and pharmacogenetics. *Gastroenterology*, 130 (6) (2006), pp. 1793-1806
- Kotani N, Maeda K, Debori Y, Camus S, Li R, Chesne C, Sugiyama Y. Expression and Transport Function of Drug Uptake Transporters in Differentiated HepaRG Cells. *Mol Pharm* 2012.
- Kramer W, Stengelin S, Baringhaus KH, Enhnen A, Heuer H, Becker W, Corsiero D, Girbig F, Noll R, Weyland C (1999) Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na⁽⁺⁾/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J Lipid Res* 40:1604-1617.
- Kubitz R, Saha N, Kuhlkamp T, Dutta S, Vom DS, Wettstein M, Haussinger D. Ca²⁺-dependent protein kinase C isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol Chem* 2004;279:10323-10330.
- Kullak-Ublick, GA. Drug-Induced Cholestatic Liver Disease. *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000. Bookshelf ID: NBK6102.
- Lütgehetmann M, Mancke LV, Volz T, Helbig M, Allweiss L, Bornscheuer T, Pollok JM, Lohse AW, Petersen J, Urban S, Dandri M. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology.* 2012 Mar;55(3):685-94.

- Meier A, Mehrle S, Weiss TS, Mier W, Urban S. The myristoylated preS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology* 2013; 58(1): 31-42. [Epub ahead of print: 2012. Dec 5.]
- 5 Morgan RE, et al. (2010) Interference with bile salt export pump function is a susceptibility factor for human liver injury in drug development. *Toxicol Sci* 118: 485-500.
- Ogimura E, et al. (2011) Bile salt export pump inhibitors are associated with bile acid-dependent drug-induced toxicity in sandwich-cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 416: 313-317.
- 10 Rose AJ, Berriel Diaz M, Reimann A, Klement J, Walcher T, Kronen-Herzig A, Strobel O, Werner J, Peters A, Kleyman A, Tuckermann JP, Vegiopoulos A, Herzig S. Molecular control of systemic bile acid homeostasis by the liver glucocorticoid receptor. *Cell Metab.* 2011; 14(1):123-30.
- Schieck A, Schulze A, Gahler C, Muller T, Haberkorn U, Alexandrov A, Urban S, Mier W. Hepatitis B virus hepatotropism is mediated by specific receptor recognition in the liver and not restricted to susceptible hosts. *Hepatology* 2013; 58(1): 43-53. [Epub ahead of print: 2013. Jan 4.]
- 15 Schmitz G., Langmann T. Pharmacogenomics of cholesterol lowering therapy. *Vasc. Pharmacol.* (2006) 44: 75-89.
- Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Scheingart CD, Hofmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B (1998) Substrate specificity of the rat liver Na(+)-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *Am J Physiol* 274:G370-G375.
- 20 Schulz WA, Eickelmann P, Hallbrucker C, Sies H, Häussinger D. Increase of beta-actin mRNA upon hypotonic perfusion of perfused rat liver. *FEBS Lett.* 1991; 292(1-2):264-6.
- Schulze A, Schieck A, Ni Y, Mier W, Urban S. Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction. *J Virol* 2010;84:1989-2000.
- Stieger B, Fattinger K, Madon J, et al. Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology.* 2000; 118:422- 30.
- 25 Stross C, Helmer A, Weissenberger K, Gorg B, Keitel V, Haussinger D, Kubitz R. Protein kinase C induces endocytosis of the sodium taurocolato cotransporting polypeptide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G320-G328.
- Trauner M and Boyer JL. Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function, and Regulation. *Physiol Rev* April 1, 2003 83:633-671.
- 30 Urban S, *Future Virol.* 2008, 3(3), 253-264.
- vom Dahl S, Hallbrucker C, Lang F, Häussinger D. Regulation of cell volume in the perfused rat liver by hormones. *Biochem J.* 1991, 280:105-9.
- 35 Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocolato cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *elife* 2012;1:e00049. Epub 2012 Nov 13.
- Yanni SB, Augustijns PF, Benjamin Jr. DK, Brouwer KL, Thakker DR, Annaert PP. In vitro investigation of the hepatobiliary disposition mechanisms of the antifungal agent micafungin in humans and rats. *Drug Metab. Dispos.*, 38 (2010), pp. 1848-1856

Listado de secuencias

- 40 <110> Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- <120> Lipopéptidos para su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas y enfermedades cardiovasculares
- <130> U30515WO
- <150> US 61/859,476
- <151> 2013-07-29
- 45 <160> 22
- <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 728 243 T3

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

5 <220>

<221> características_misceláneas

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 1

10

Asn Pro Leu Gly Phe Xaa Pro
1 5

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

15 <400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Ser His Pro Gln Ala
          115
    
```

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

20 <213> virus de la Hepatitis B

<400> 3

ES 2 728 243 T3

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

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Thr His Pro Gln Ala
 115

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

5 <213> virus de la Hepatitis B

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Thr His Pro Gln Ala
 115

<210> 5

ES 2 728 243 T3

<211> 108

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

<400> 5

```

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

10 <400> 6

```

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7

ES 2 728 243 T3

<211> 118

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Thr Pro Pro Leu Arg

100

105

110

Asp Thr His Pro Gln Ala
115

5

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

10

<400> 8

ES 2 728 243 T3

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

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Thr His Pro Gln Ala
 115

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

5 <213> virus de la Hepatitis B

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ser His Pro Gln Ala
 115

<210> 10

ES 2 728 243 T3

<211> 108

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

<400> 10

```

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

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

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

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

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

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

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

```

5

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

10 <400> 11

```

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

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Thr His Pro Gln Ala
115

```

ES 2 728 243 T3

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

5 <400> 12

```

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 105

10 <212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

<400> 13

```

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

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

Lys Pro Lys Asp Pro Trp Pro Gln Ala His Asp Thr Ala Val Gly Ala
           35           40           45

Phe Gly Pro Gly Leu Val Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser
50           55           60

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

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

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

ES 2 728 243 T3

<210> 14

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> secuencia de consenso preS HBV (para posiciones de aminoácidos (-11) a 48)

<400> 14

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

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

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

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

10 <210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> secuencia N-terminal X del péptido del compuesto basado en lipopéptidos de la presente invención

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

20 <220>

<221> características_misceláneas

<222> (4) .. (5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 15

```
Asn Xaa Ser Xaa Xaa
1          5
```

25

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> secuencia C-terminal Y del péptido del compuesto basado en lipopéptidos de la presente invención

<220>

<221> características_miscláneas

<222> (1) .. (1)

5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 16

Xaa His Gln Leu Asp Pro
1 5

<210> 17

<211> 18

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido del compuesto basado en lipopéptidos de la presente invención

<220>

15 <221> características_miscláneas

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> características_miscláneas

20 <222> (4) .. (5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> características_miscláneas

<222> (11) .. (11)

25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> características_miscláneas

<222> (13) .. (13)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

30 <400> 17

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

Asp Pro

<210> 18

<211> 47

ES 2 728 243 T3

<212> PRT

<213> virus de la hepatitis B

<400> 18

```

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1          5          10          15
Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp
          20          25          30
Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
          35          40          45
    
```

5 <210> 19

<211> 47

<212> PRT

<213> virus de la hepatitis B

<400> 19

```

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1          5          10          15
Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp Asp
          20          25          30
Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
          35          40          45
    
```

10

<210> 20

<211> 47

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> posiciones de aminoácidos 2 a 48 de la secuencia de consenso preS del VHB

<400> 20

```

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1          5          10          15
Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp
          20          25          30
Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
          35          40          45
    
```

20 <210> 21

<211> 47

<212> PRT

ES 2 728 243 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del péptido de control mutante MyrB Alall-15

<400> 21

```
Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Ala Ala Ala Ala Ala Asp His
1          5          10          15
Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp
          20          25          30
Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
          35          40          45
```

5

<210> 22

<211> 77

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos del péptido de control preS2-78myr

<400> 22

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

12

REIVINDICACIONES

1. Compuesto basado en lipopéptidos para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección hepática,

en el que el compuesto basado en lipopéptidos comprende un péptido de fórmula general

5 X-P-Y-R_o

en la que

P es la secuencia de aminoácidos NPLGF X_{aa} P (SEQ ID N.º: 1),

en la que X_{aa} es F o L, más preferiblemente F,

10 X es una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de m aminoácidos,

en la que m es al menos 4;

Y es una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de n aminoácidos,

en la que n es 0 o al menos 1;

y en la que $m + n \geq 11$;

15 R es una modificación C-terminal de dicho péptido modificado hidrófobo,

que es preferiblemente una fracción 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,

en el que el péptido comprende

20 18 a 119 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO. 18, 19 o 20, o

una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia (preferiblemente al

menos un 95% o un 99% de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO. 18 a 20, y

una modificación hidrófoba N-terminal por acilación con miristoilo (C14), palmitoilo (C16) o estearoilo

(C18), preferiblemente con miristoilo (C14),

25 en el que dicha enfermedad o afección hepática está relacionada con el transporte mediado por polipéptidos

cotransportadores de taurocolato de sodio (NTCP) en los hepatocitos, y es una enfermedad metabólica con

compromiso hepático seleccionada de

colestasis intrahepática,

envenenamiento del hígado (por toxinas del hígado)/hepatotoxicidad,

enfermedad hepática colestásica inducida por fármacos,

30 hipercolesterolemia,

colestasis posthepática.

2. El compuesto basado en lipopéptidos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los compuestos que se transportan en los hepatocitos a través de NTCP son

- ácidos biliares

35 tales como colato

ácidos biliares conjugados con taurina o glicina y sus sales.

(sales de bilis dihidroxi y trihidroxi conjugadas con taurina o glicina) tales como

taurocolato

40 glicocolato

taurodeoxicolato

tauroquenoideoxicolato

tauroursodeoxicolato

ácidos biliares sulfatados y sus sales.

45 - esteroides, sulfatos esteroides, estrógenos conjugados (por ejemplo, estrona-3-sulfato, 17 α -etinilestradiol-3-O-sulfato)

sulfato de deshidroepiandrosterona

- hormonas tiroideas conjugadas y no conjugadas

- toxinas hepáticas

50 - compuestos que se unen covalentemente al taurocolato (por ejemplo, cloramucilo-taurocolato)

- bromosulfoftaleína,

- fármacos

tales como

antifúngico (por ejemplo, micafungina),

antihiperlipidémico (por ejemplo, simvastatina, rosuvastatina, pitavastatina, fluvastatina, atorvastatina),

55 antihipertensivo,

antiinflamatorio, o

medicamentos glucocorticoides.

3. El compuesto basado en lipopéptidos para su uso de acuerdo con 1 o 2, en el que el transporte mediado por NCTP es disminuido o bloqueado por el compuesto basado en lipopéptidos.
- 5 4. El compuesto basado en lipopéptidos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que $m = 4$ a 19 y/o $n = 0$ a 78.
5. El compuesto basado en lipopéptidos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el lipopéptido es Myrcludex B que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 18 con una miristoilación N-terminal y una amida C-terminal.
- 10 6. El compuesto basado en lipopéptidos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una fracción o fracciones adicionales, tales como
 fármaco(s) o sus respectivos profármacos(s);
 etiqueta (s);
 15 marcador(es), como colorante(s) fluorescente(s), radioisótopo(s) y agente(s) de contraste;
 virus recombinante(s) o derivado(s) del mismo;
 portador o depósito(s) de medicamento(s), profármaco(s) o etiqueta(s);
 epítipo(s) inmunogénico(s);
 hormonas.
- 20 7. El compuesto basado en lipopéptidos para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la fracción o fracciones adicionales están unidos covalentemente, tal como a través de un enlazador, espaciador y/o un grupo de anclaje.
- 25 8. El compuesto basado en lipopéptidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto basado en lipopéptidos se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva, preferiblemente en el intervalo de 0,1 mg a 50 mg por paciente y por día, preferiblemente de 1 mg a 20 mg por paciente por día.
9. Compuesto basado en lipopéptidos, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en la prevención y/o tratamiento *in vivo* de una enfermedad cardiovascular (ECV), que comprende el control o modificación del nivel de colesterol o la captación de colesterol, en el que el tratamiento se lleva a cabo en un grupo de pacientes con hipercolesterolemia.
- 30 10. Compuesto basado en lipopéptidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la vía de administración se selecciona de subcutánea, intravenosa, oral, nasal, intramuscular, transdérmica, por inhalación, por supositorio.

Figura 1 A, B

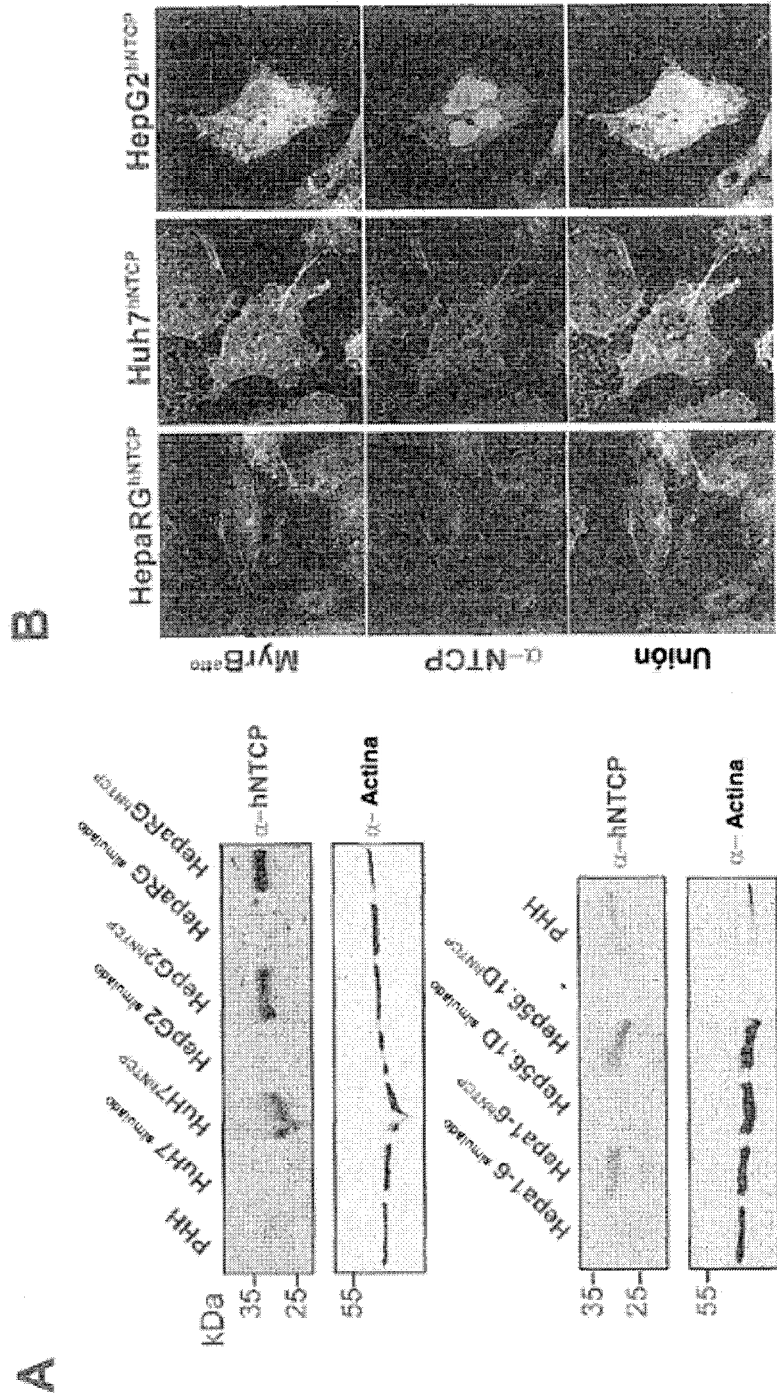


Figura 1 C-E

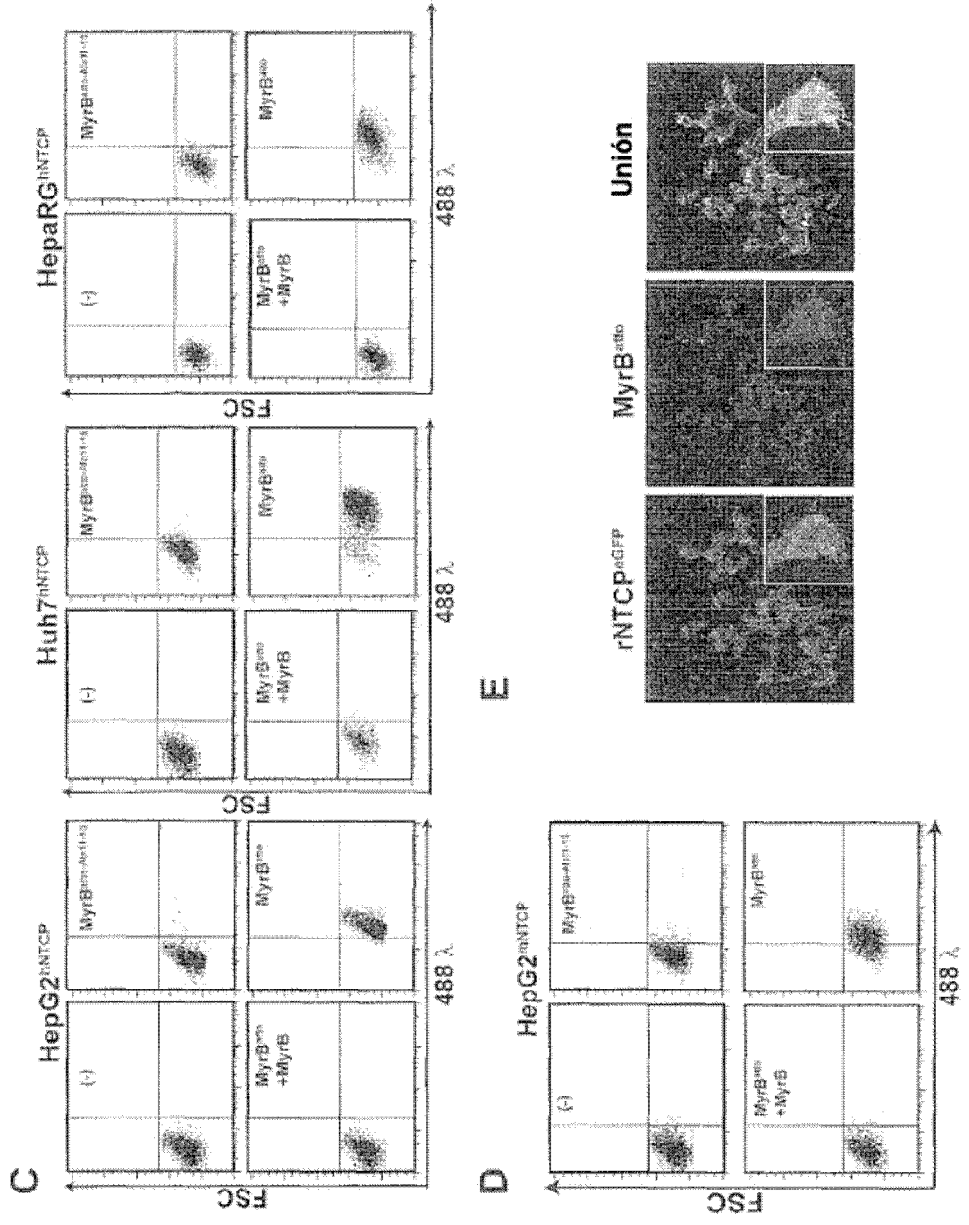


Figura 2 A

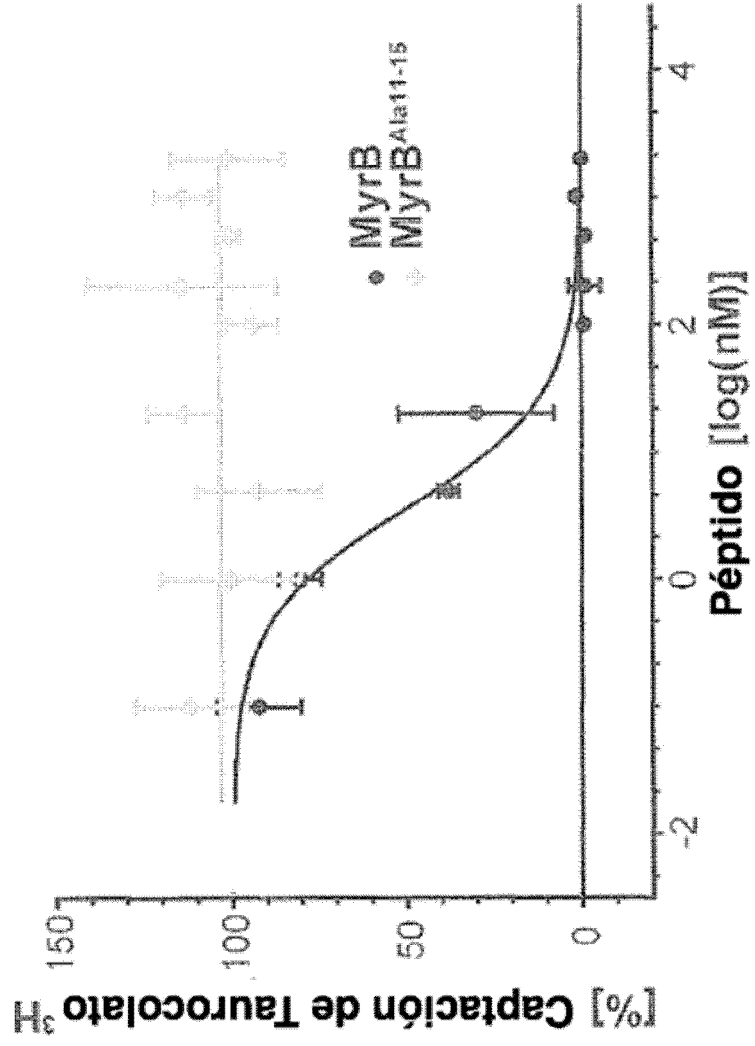


Figura 2 B

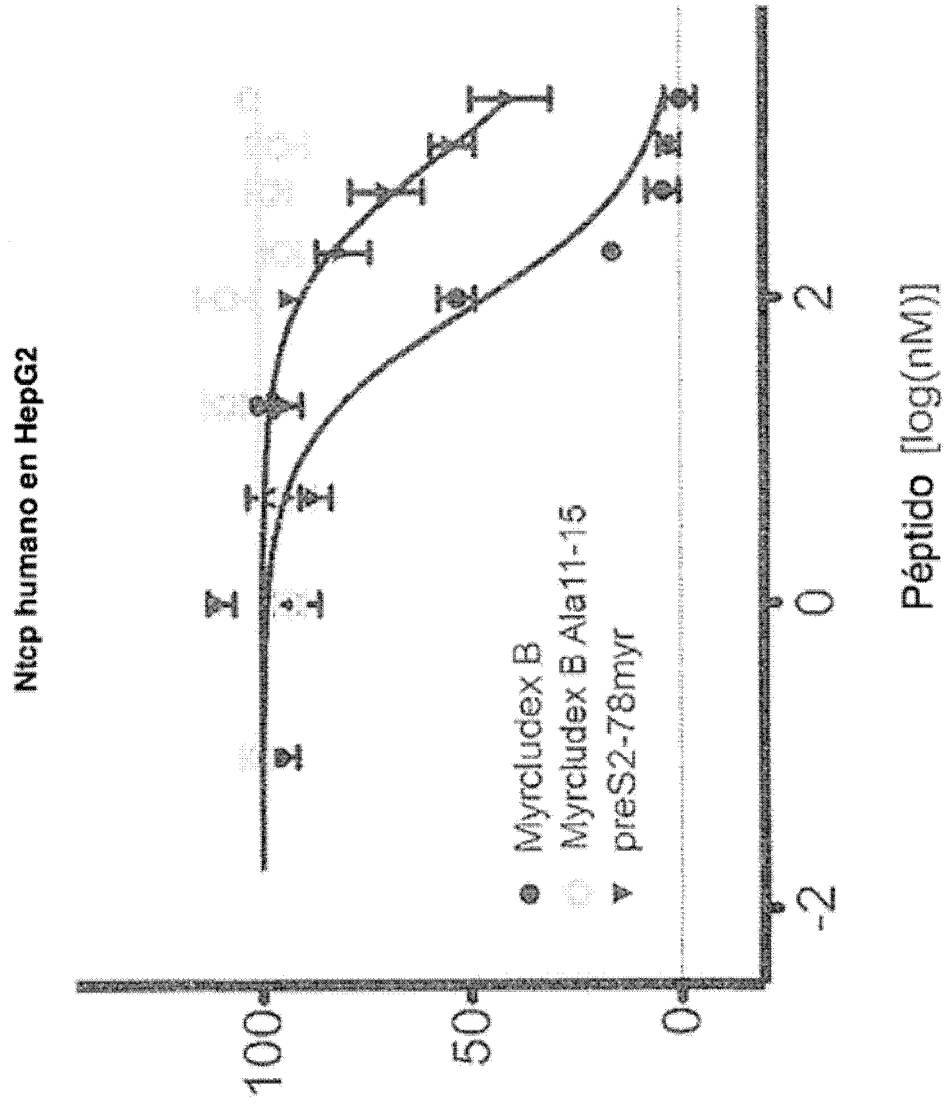


Figure 2 C, D

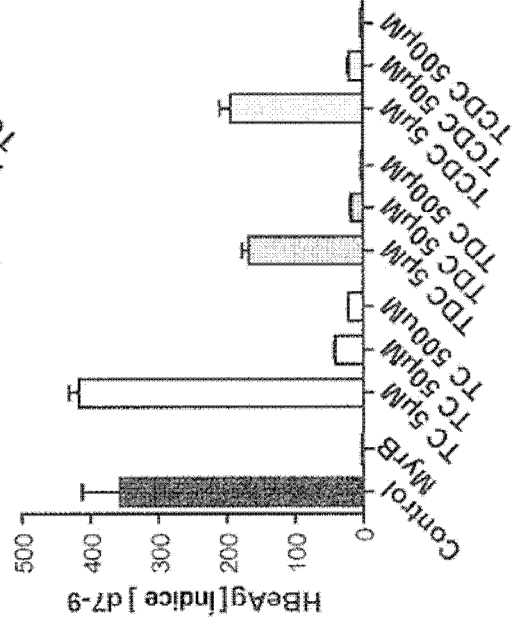
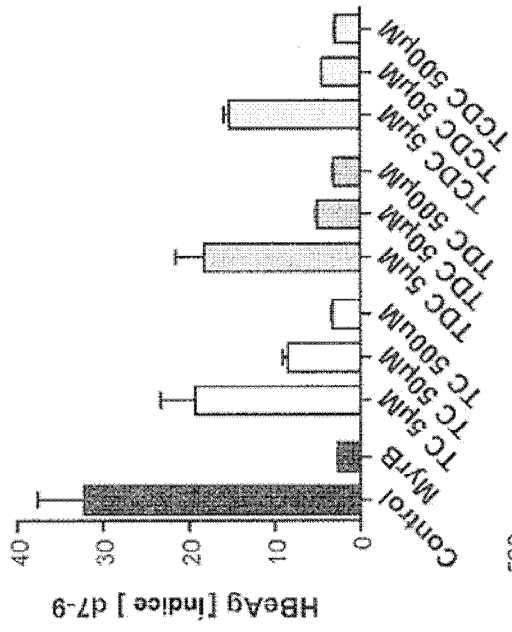


Figura 2 E

