

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 979 305**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61P 3/00** (2006.01)  
**A61P 3/06** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01)  
**C07K 14/02** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2017 PCT/CN2017/086558**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2017 WO17206898**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2017 E 17805843 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024 EP 3463422**

(54) Título: **Composiciones y métodos para tratar enfermedades metabólicas**

(30) Prioridad:

**30.05.2016 CN 201610370442**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.09.2024**

(73) Titular/es:

**SHANGHAI HEP PHARMACEUTICAL CO., LTD.**  
(100.0%)  
**Room 601 Building 1 No. 720 Cailun Rd.**  
**Pudong New Area, Shanghai 201203, CN**

(72) Inventor/es:

**LIU, HONGLI**

(74) Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

### Observaciones:

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

**ES 2 979 305 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

Composiciones y métodos para tratar enfermedades metabólicas

- 5 Esta solicitud contiene un listado de secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 14 de abril de 2016, se denomina 13230.0001\_SL.txt y tiene un tamaño de 56.034 bytes.

Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad como se especifica en la reivindicación 1 de un sujeto humano. En determinadas realizaciones, la invención se refiere al uso de un polipéptido procedente del virus de la hepatitis B como se define en la reivindicación 1 para el tratamiento de una enfermedad metabólica como se define en la reivindicación 1.

15 Las enfermedades metabólicas están provocadas por un desequilibrio de los metabolitos, que incluyen hidratos de carbono, grasas, lípidos y minerales que son fundamentales para el bienestar de un organismo vivo. Por ejemplo, la diabetes de tipo II y la hiperlipidemia representan dos de las enfermedades metabólicas más comunes. El desequilibrio de los metabolitos puede ocurrir como resultado de varios factores, incluido el envejecimiento, el comportamiento, la genética y las influencias ambientales y, a menudo, múltiples factores en combinación contribuyen a la manifestación 20 de la enfermedad. Los pacientes que padecen enfermedades metabólicas pueden presentar una amplia gama de síntomas que incluyen, por ejemplo, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, resistencia a la insulina y desregulación de otros metabolitos, tales como aminoácidos y minerales. A menudo es difícil identificar la causa subyacente de las enfermedades metabólicas, haciéndolas difíciles de tratar de manera eficaz. De manera adicional, 25 los pacientes que padecen enfermedades metabólicas pueden tener riesgo de desarrollar complicaciones graves asociadas con las enfermedades, tales como hipertensión, enfermedades cardiovasculares, daños renales y daños nerviosos.

30 Debido a la heterogeneidad de estas enfermedades, los pacientes que padecen enfermedades metabólicas pueden necesitar varios medicamentos diferentes, dirigidos a múltiples vías metabólicas en un intento de abordar múltiples síntomas a la vez. Por ejemplo, un estudio mostró que los pacientes con diabetes de tipo II encuestados en el estudio tomaban un promedio de 8,4 compuestos farmacológicos diferentes por día (véase, por ejemplo, Bauer *et al.*, Diabetic Medicine, 31:1078-85 (2014)). Una de las razones por las que los pacientes que padecen enfermedades metabólicas tienen que tomar varios medicamentos diferentes es porque esos medicamentos a menudo están especializados para abordar un síntoma o vía particular de la enfermedad metabólica y, por lo tanto, no son capaces de abordar otros 35 síntomas relacionados. Desafortunadamente, tomar múltiples medicamentos puede afectar la calidad de vida de los pacientes y, en última instancia, empeorar el curso de la progresión de la enfermedad. De hecho, como muestran las estadísticas, los pacientes con diabetes de tipo II experimentan dificultades para cumplir con sus tratamientos de medicación, en parte debido a la complejidad de estos tratamientos (véase, por ejemplo, García-Pérez *et al.*, Diabetes Therapy, 4:175-94 (2013)).

40 De manera adicional, las enfermedades metabólicas a menudo implican una red complicada de vías de señalización y, por lo tanto, dirigir un agente a una vía particular no siempre conduce a un efecto terapéuticamente adecuado en los pacientes. Por ejemplo, se ha demostrado que la ciclosporina A (CsA), un fármaco inmunodepresor ampliamente utilizado en trasplantes de órganos para prevenir el rechazo, inhibe la absorción de ácidos biliares y la entrada del VHB en hepatocitos cultivados mediada por el polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP, del inglés sodium taurocholate cotransporting polypeptide), que es un transportador de ácidos biliares dependiente de Na<sup>+</sup> que transporta ácidos biliares desde el torrente sanguíneo a los hepatocitos (Watashi *et al.*, Hepatology, 59:1726-37 (2014)). Sin embargo, el tratamiento con CsA puede producir efectos nocivos en el metabolismo de la glucosa y alterar la respuesta a la insulina (Dresner *et al.*, Surgery, 106(2): 163-69 (1989)). De manera adicional, la CsA puede inducir 45 hiperlipidemia en pacientes mediante el aumento del nivel de colesterol total, principalmente debido a un aumento en el nivel de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Ballantyne *et al.*, JAMA, 262(I):53-56 (1989)). Se ha demostrado que varios otros compuestos se unen al NTCP, pero no producen un efecto uniforme en el NTCP ya que algunos de esos compuestos funcionan como inhibidores mientras que otros funcionan como potenciadores (Kim *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 291(3): 1204-09 (1999)). Si bien hasta la fecha la mayoría de esos medicamentos no 50 han sido validados por sus resultados terapéuticos en el tratamiento de enfermedades metabólicas, algunos potenciadores de NTCP producen efectos opuestos en el metabolismo de la glucosa o los lípidos (véase, por ejemplo, Beaudoin *et al.*, Appl. Physiol. Nutr. Metab. 38(2): 140-47 (2013); Thelle *et al.*, N. Engl. J. Med. 308(24): 1454-57 (1983); Phillips *et al.*, Br. Med. J. 292:1319-21 (1986); Boden *et al.*, Circulation, 85(6):2039-44 (1992)). Tampoco está claro si la regulación del NTCP *in vivo* produciría algún efecto terapéuticamente importante, porque los sujetos con 55 deficiencia de NTCP no mostraron ningún fenotipo clínico claro (véase Vaz *et al.*, Hepatology, 61(I):260-267 (2015)). Por tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar un nuevo medicamento para las enfermedades metabólicas, potencialmente capaz de abordar múltiples síntomas a la vez con una potente eficacia terapéutica.

60 La envoltura viral del VHB contiene tres proteínas antígenicas de superficie: grande (L, del inglés *large*), mediana (M) y pequeña (S, del inglés *small*). Estas proteínas están codificadas por un único marco de lectura abierto en el gen S, a partir de tres sitios diferentes de inicio de la traducción, es decir, L (Pre-S1 + Pre-S2 + S), M (Pre-S2 + S) y S (S). El

VHB se divide en cuatro serotipos principales (adr, adv, ayr, ayw) en función de epítopos antigenicos presentes en las proteínas de su envoltura, y en ocho genotipos (A a H) de acuerdo con la variación general de la secuencia de nucleótidos del genoma. Durante la infección vírica, se demostró que la región Pre-S1 de la proteína L del VHB se une a NTCP (Yan et al., eLife, 1:e00049 (2012)). El documento WO 2014/072524 muestra que Myrcludex B interfiere con el transporte de sales biliares mediado por NTCP.

5 Esta divulgación proporciona composiciones y métodos para tratar una enfermedad metabólica como se especifica en la reivindicación 1 con un polipéptido procedente del VHB en donde el polipéptido es como se define en la reivindicación 1. De acuerdo con la invención, los polipéptidos incluyen polipéptidos procedentes de la región pre-S1

10 de uno cualquiera de los genotipos del VHB A, B, C, D, E, F, G y H. La divulgación proporciona además polipéptidos procedentes del VHB que son capaces de alterar el metabolismo, tal como el metabolismo de la glucosa y los lípidos en un sujeto, incluidos seres humanos y modelos animales farmacéuticamente oportunos.

15 En algunos aspectos, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido descrito en el presente documento, en donde cuando se administra a un sujeto que lo necesita, la composición farmacéutica proporciona concentraciones en suero del polipéptido que permiten la regulación bidireccional de la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto.

20 En algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos para tratar una enfermedad metabólica como se especifica en la reivindicación 1 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de manera que las concentraciones en suero del polipéptido administrado permitan la regulación bidireccional de la absorción de ácidos biliares procedentes del virus de la hepatitis B (VHB).

25 En algunos aspectos, la divulgación se refiere a métodos para reducir el nivel de lípidos en suero en un sujeto que lo necesita mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento o de una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de manera que las concentraciones en suero del polipéptido administrado permitan la regulación bidireccional de la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto. En algunas realizaciones, el lípido en suero puede incluir, por ejemplo, colesterol total ("CT"), triglicéridos ("TG") y LDL-C.

30 En determinados aspectos, la divulgación también se refiere a métodos para reducir el nivel de glucosa en sangre en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido.

35 En algunas realizaciones, cuando la concentración en suero del polipéptido administrado en el sujeto es igual o inferior a 93 nmol/l, el polipéptido mejora la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto. En algunas realizaciones, cuando la concentración en suero del polipéptido administrado en el sujeto es superior a 93 nmol/l, el polipéptido inhibe la captación de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto. En algunas realizaciones, la concentración en suero del polipéptido en el sujeto alcanza una concentración máxima (es decir,  $C_{\text{máx}}$ ) aproximadamente 20 minutos después de la administración. Por tanto, en algunas realizaciones,  $T_{\text{máx}}$  del polipéptido descrito en el presente documento es de aproximadamente 20 minutos. En algunas realizaciones, la concentración máxima es superior a 93 nmol/l.

40 En algunas realizaciones, un sujeto al que se le administra el polipéptido descrito en el presente documento padece o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad metabólica. En algunas realizaciones, la enfermedad metabólica implica la desregulación del metabolismo de los lípidos. En algunas realizaciones, la enfermedad metabólica es un trastorno relacionado con el colesterol. En algunas realizaciones, la enfermedad metabólica es hiperlipidemia (por ejemplo, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia o una combinación de las mismas). En algunas realizaciones, la enfermedad metabólica implica la desregulación del metabolismo de la glucosa. En algunas realizaciones, la enfermedad metabólica es la hiperglucemía. En algunas realizaciones, la enfermedad metabólica es diabetes u obesidad. En algunas realizaciones, el sujeto padece o tiene riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, enfermedades ateroescleróticas), enfermedades cardíacas o insuficiencia renal.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento es capaz de reducir o estabilizar el nivel o la actividad de una o más moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo en el sujeto. La molécula química o biológica asociada al metabolismo se elige de glucosa, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, aminoácidos, hormonas, LDL-C, HDL-C, HbA1c, nitrógeno ureico en sangre y minerales. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento también es capaz de reducir o estabilizar el nivel o valor de uno o más parámetros fisiológicos que miden los cambios metabólicos. El parámetro fisiológico se elige de glucemia, tensión arterial, peso corporal, grasa corporal, índice de masa corporal (IMC), inflamación, índice de aterosclerosis, índice cardíaco, índice renal, índice de grasa total e índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA, del inglés *homeostatic model assessment*).

55 De acuerdo con la invención, el polipéptido es como se define en la reivindicación 1. En algunas realizaciones, el

- polipéptido descrito en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos procedente de la región pre-S1 del genotipo del VHB A, B, C, D, E, F, G o H. En determinadas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento comprende la secuencia de aminoácidos 13 a 59 de la región pre-S1 del genotipo C del VHB. En realizaciones adicionales, el polipéptido descrito en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos procedente de la región pre-S1 de cualquier otro genotipo del VHB que corresponde a los aminoácidos 13 a 59 de la región pre-S1 del genotipo C del VHB.
- De acuerdo con la invención, siempre que el polipéptido comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 21 a 40, en determinadas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos flanqueante natural de la región pre-S1 del genotipo del VHB A, B, C, D, E, F, G o H. De acuerdo con la invención, siempre que el polipéptido comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 21 a 40, en algunas realizaciones, el polipéptido comprende la glicina correspondiente al aminoácido 13 de la región pre-S1 del genotipo C del VHB y/o la asparagina correspondiente al aminoácido 20 de la región pre-S1 del genotipo C del VHB.
- En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento comprende una modificación aminoterinal con un grupo hidrófobo y/o una modificación carboxiterinal que es capaz de estabilizar el polipéptido. El grupo hidrófobo se elige de ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, colesterol y ácido araquidónico. La modificación carboxiterinal se elige entre amidación (aminación) e isopentanodiolización. En determinadas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento comprende una modificación aminoterinal con ácido mirístico y/o una modificación carboxiterinal con aminación. El polipéptido descrito en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos elegida de las SEQ ID NO: 21 a 40. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.
- En un aspecto, el polipéptido descrito en el presente documento es capaz de reducir uno o más síntomas asociados con la enfermedad metabólica como se especifica en la reivindicación 1. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento o la composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido se administra al sujeto antes, simultáneamente o después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un segundo agente. El segundo agente se puede elegir de, por ejemplo, un agente antihiperlipidémico, un agente antihiperglucemante, un agente antidiabético, un agente contra la obesidad y un análogo de ácidos biliares. Por ejemplo, el segundo agente se puede elegir de, por ejemplo, insulina, metformina, sitagliptina, colesevelam, glipizida, simvastatina, atorvastatina, ezetimiba, fenofibrato, ácido nicotínico, orlistat, lorcaserina, fentermina, topiramato, ácido obeticólico y ácido ursodesoxicólico.
- En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento o la composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido se administra al sujeto mediante al menos un modo que incluye, por ejemplo, administración parenteral, intrapulmonar, intranasal, intralesional, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y subcutánea. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento o la composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido se administra al sujeto por vía subcutánea.
- Breve descripción de los dibujos**
- En la **figura 1A** se muestra un gráfico ilustrativo que representa la pureza de Cmyr-47 medida mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). En la **figura 1B** se muestra un gráfico ilustrativo que representa el peso molecular de Cmyr-47 confirmado por espectrometría de masas.
- En la **figura 2A** se muestra que Cmyr-47 marcado con FIFC se une a los hepatocitos primarios de *Tupaia*. En la **figura 2B** se muestra que Cmyr-47 marcado con FIFC se une a las células HepG2, una estirpe celular procedente de hepatocitos humanos.
- En la **figura 3** se ilustra que Cmyr-47 marcado con FIFC se une a células L02 que expresan NTCP ("NTCP-L02"), pero no se une a células L02 de control ("BLANCO-L02").
- En la **figura 4** se muestra que Cmyr-47 marcado con FIFC se une a células HEK293 que expresan NTCP ("NTCP-293"), pero se une a células HEK293 de control ("BLANCO-293"). Un polipéptido procedente del VHB de garza, marcado con FIFC, se utilizó como polipéptido de control.
- En la **figura 5A** se muestra el efecto de Cmyr-47 en la absorción de ácidos biliares *in vitro*. Se utilizó ciclosporina A ("CsA") como control positivo. En la **figura 5B** se ilustra el efecto bidireccional de Cmyr-47 sobre la absorción de ácidos biliares. En las **figuras 5C y 5D** se muestra el efecto de la CsA en la absorción de ácidos biliares *in vitro* y se confirma el efecto inhibidor de la CsA. En las **figuras 5E y 5F** se muestra el efecto de los polipéptidos procedentes del VHB en la absorción de ácidos biliares *in vitro* a una concentración molar baja equivalente a 62,5 ng/ml (11,58 nmol/l) de Cmyr-47 y a una concentración molar elevada equivalente a 1 µg/ml (185,23 nmol/l) de Cmyr-47, respectivamente.
- En la **figura 6** se muestran los cambios del colesterol total ("CT") en suero en hámsteres dorados hiperlipidémicos

- tratados con Cmyr-47 o CsA durante 4 semanas. Los hámsteres dorados alimentados con una dieta regular se trajeron con PBS y se utilizaron como "control normal", mientras que los hámsteres dorados hiperlipidémicos tratados con PBS se utilizaron como "control modelo". Se utilizaron como control positivo hámsteres dorados hiperlipidémicos tratados con fenofibrato ("tratamiento positivo").
- 5 En la **figura 7A** se muestra el nivel de CT en suero antes de los tratamientos con polipéptidos procedentes del VHB. En la **figura 7B** se muestra el nivel de CT en suero después de 4 semanas de tratamientos.
- 10 En la **figura 8** se representan los cambios de los triglicéridos ("TG") en suero de hámsteres dorados hiperlipidémicos durante 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47.
- En la **figura 9A** se muestra el nivel de TG en suero antes de los tratamientos con polipéptidos procedentes del VHB. En la **figura 9B** se muestra el nivel de TG en suero después de 4 semanas de tratamientos.
- 15 En la **figura 10** se representa el nivel de LDL-C en suero de hámsteres dorados hiperlipidémicos después de 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47.
- En la **figura 11A** se muestra el nivel de LDL-C en suero antes del tratamiento con polipéptidos procedentes del VHB. En la **figura 11B** se muestra el nivel de LDL-C en suero después de 4 semanas de tratamientos.
- 20 En la **figura 12** se muestra el nivel de HDL-C en suero de hámsteres dorados hiperlipidémicos después de 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47.
- 25 En la **figura 13** se representa el índice de aterosclerosis ("IA") de hámsteres dorados hiperlipidémicos después de 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47.
- En la **figura 14** se muestran los cambios de los ácidos biliares totales (ABT) en suero de hámsteres dorados hiperlipidémicos después de 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47. También se analizaron con fenofibrato y CsA para comparar.
- 30 En la **figura 15** se muestran los cambios de CT en suero de hámsteres dorados hiperlipidémicos tratados con tres dosis diferentes (1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg) de Cmyr-47 durante 4 semanas. Los hámsteres dorados alimentados con una dieta regular se trajeron con PBS y se utilizaron como "control normal", mientras que los hámsteres dorados hiperlipidémicos tratados con PBS se utilizaron como "modelo de control".
- 35 En la **figura 16** se muestran los cambios de TG en suero de hámsteres dorados hiperlipidémicos tratados con 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de Cmyr-47 durante 4 semanas.
- 40 En la **figura 17** se muestran los cambios de glucosa ("GLU") en suero en ratas Zucker obesas diabéticas durante 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47 o CsA. Se utilizaron ratas Zucker delgadas tratadas con PBS como "control normal", mientras que ratas Zucker obesas diabéticas tratadas con PBS se utilizaron como "modelo de control". Se utilizaron como control positivo ratas Zucker obesas diabéticas tratadas con metformina ("Tratamiento positivo").
- 45 En la **figura 18A** se muestra el nivel de GLU en suero antes de ser tratado con polipéptidos procedentes del VHB. En la **figura 18B** se muestra el nivel de GLU en suero después de 4 semanas de tratamientos.
- En la **figura 19** se muestran los cambios de HbA1c de ratas Zucker obesas diabéticas durante 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47.
- 50 En la **figura 20A** se muestra el nivel de HbA1c previo a los tratamientos con polipéptidos procedentes del VHB. En la **figura 20B** se muestra el nivel de HbA1c después de 4 semanas de tratamientos.
- En la **figura 21** se muestran los cambios de insulina en ratas Zucker obesas diabéticas durante 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47.
- 55 En la **figura 22** se muestran los cambios de CT en suero en ratas Zucker obesas diabéticas durante 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47.
- En la **figura 23A** se muestra el nivel de CT en suero antes de los tratamientos con polipéptidos procedentes del VHB. En la **figura 23B** se muestra el nivel de CT en suero después de 4 semanas de tratamientos.
- 60 En la **figura 24** se muestran los cambios de TG en suero en ratas Zucker obesas diabéticas durante 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47.
- 65 En la **figura 25A** se muestra el nivel de TG en suero antes de los tratamientos con polipéptidos procedentes del VHB. En la **figura 25B** se muestra el nivel de TG en suero después de 4 semanas de tratamientos.

En la **figura 26** se muestra el nivel de nitrógeno ureico sanguíneo ("NUS") en ratas Zucker obesas diabéticas después de 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47.

- 5 En las **figuras 27A a C** se representa el índice cardíaco, el índice renal y el índice de grasa total de ratas Zucker obesas diabéticas después de 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47. "Cmyr-47(Ba)" indica la dosis de 10 mg/kg/d de Cmyr-47 mientras que "Cmyr-47(AI)" indica la dosis de 30 mg/kg/d de Cmyr-47.
- 10 En la **figura 28** se muestra el nivel de ABT en suero en ratas Zucker obesas diabéticas después de 4 semanas de tratamiento con Cmyr-47.

#### **Descripción detallada**

15 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Para los fines de la presente divulgación, se definen a continuación los siguientes términos.

- 20 Los artículos "un" y "uno/a" hacen referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. Por ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.
- 25 El término "o" significa, y se utiliza indistintamente con, el término "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.
- 30 En la medida en que el término "contiene", "incluye", "tiene", o variantes gramaticales de dichos términos se utilizan ya sea en la divulgación o en las reivindicaciones, dicho término es inclusivo de una manera similar al término "que comprende", ya que "que comprende" se interpreta cuando se emplea como palabra de transición en una reivindicación. El término "que incluye" o sus variantes gramaticales significan, y se utilizan indistintamente con, la expresión "incluido pero no limitado a".
- 35 El término "aproximadamente" significa una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía como mucho en un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. Cuando el término "aproximadamente" se utiliza junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "aproximadamente" pretende modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado mediante una variación de  $\leq 10\%$ .

#### **I. Polipéptidos**

- 40 Determinados aspectos de la presente divulgación proporcionan polipéptidos procedentes del VHB para tratar una enfermedad metabólica que incluye, por ejemplo, diabetes e hiperlipidemia. Los polipéptidos pueden proceder de la región pre-S1 del VHB y pueden ser capaces de unirse a NTCP *in vitro*, tal como, por ejemplo, en una solución o en un sistema sin células (por ejemplo, un lisado celular o en un sistema reconstituido), o en una célula, tal como, por ejemplo, *ex vivo* en una célula en cultivo (por ejemplo, una célula que expresa NTCP o un hepatocito), o *in vivo* en una célula dentro de un sujeto. De acuerdo con la invención, el sujeto es un ser humano.
- 45 Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína" se utilizan indistintamente y abarcan proteínas de longitud completa y fragmentos, así como variantes de las proteínas de longitud completa y de los fragmentos. Sólo las variantes que caen dentro de la definición del polipéptido como se define en la reivindicación 1 están dentro del alcance de la invención. Dichos fragmentos y variantes del polipéptido descrito en el presente documento conservan al menos las actividades biológicas del polipéptido para unirse a NTCP y regular bidireccionalmente el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos. El "polipéptido", "péptido", y "proteína" pueden incluir restos de aminoácidos naturales y/o no naturales. Esos términos también incluyen proteínas modificadas posttraduccionalmente, que incluyen, por ejemplo, proteínas glucosiladas, sialiladas, acetiladas y/o fosforiladas. Los términos también incluyen proteínas modificadas químicamente en el extremo N y/o en el extremo C. Por ejemplo, el extremo N del polipéptido divulgado en el presente documento puede modificarse mediante un grupo hidrófobo seleccionado de ácido mirístico, ácido palmitíco, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, colesterol y ácido araquidónico. En algunas realizaciones, el extremo C del polipéptido divulgado en el presente documento se puede modificar para estabilizar el polipéptido. La modificación del extremo C se elige de amidación (aminación) e isopentanodiolización.
- 55 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "polipéptido procedente del VHB" o "polipéptido procedente de VHB" se refiere al origen o fuente del polipéptido como procedente del VHB, y puede incluir polipéptidos naturales, recombinantes, sintetizados o purificados. La expresión "polipéptido procedente del VHB" o "polipéptido procedente de VHB" se refiere a un polipéptido del VHB natural de longitud completa o fragmentos del mismo, así como a variantes del polipéptido natural de longitud completa o sus fragmentos. En algunas realizaciones, el fragmento puede consistir en al menos 3 a 5 aminoácidos, al menos 5 a 10 aminoácidos, al menos 10 a 20 aminoácidos, al menos 20 a 30 aminoácidos, al menos 30 a 50 aminoácidos o los aminoácidos completos de la secuencia natural, o puede ser

identificable de otro modo por un experto en la materia como si tuviera su origen en la secuencia natural. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede proceder de la región pre-S1 de la proteína L de cualquier subtipo de VHB. En alguna realización, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender la región pre-S1 completa de la proteína L de cualquier subtipo de VHB. En determinadas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede proceder de la región pre-S1 de la proteína L de uno cualquiera de los genotipos del VHB A, B, C, D, E, F, G y H. Las secuencias genómicas de estos genotipos de VHB se pueden encontrar en los números de registro de GenBank KC875260 (SEQ ID NO: 41), AY220704 (SEQ ID NO: 42), AF461363 (SEQ ID NO: 43), AY796030 (SEQ ID NO: 44), AB205129 (SEQ ID NO: 45), DQ823095 (SEQ ID NO: 46), HE981176 (SEQ ID NO: 47) y AB179747 (SEQ ID NO: 48), respectivamente. En determinadas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede proceder de la región pre-S1 de la proteína L del genotipo C del VHB. El polipéptido procedente del VHB descrito en el presente documento conserva una o más actividades biológicas descritas en el presente documento del correspondiente polipéptido natural del VHB, incluidas al menos las actividades biológicas del polipéptido para unirse a NTCP y regular bidireccionalmente el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos.

"Variante", como se utiliza en el presente documento en relación con el polipéptido descrito en el presente documento, un polipéptido procedente del VHB o un polipéptido procedente de VHB, significa un polipéptido que difiere de un polipéptido dado (es decir, el polipéptido descrito en el presente documento, el polipéptido procedente del VHB, o el polipéptido procedente de VHB) en la secuencia de aminoácidos, pero conserva una o más actividades biológicas descritas en el presente documento del polipéptido dado. El polipéptido variante descrito en el presente documento conserva al menos las actividades biológicas del polipéptido para unirse a NTCP y regular bidireccionalmente el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos. El polipéptido variante descrito en el presente documento puede tener una o más adiciones (por ejemplo, inserción), eliminaciones o sustituciones de aminoácidos del polipéptido dado. En algunas realizaciones, el polipéptido variante descrito en el presente documento puede tener de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 10, de 1 a 8, de 1 a 5 o de 1 a 3 adiciones (por ejemplo, inserciones), eliminaciones o sustituciones de aminoácidos del polipéptido dado, incluidos todos los números enteros entre estos intervalos. Por ejemplo, la secuencia polipeptídica puede contener una sustitución conservadora de aminoácidos. Una sustitución conservativa de un aminoácido, es decir, el reemplazo de un aminoácido por un aminoácido diferente de propiedades similares (por ejemplo, hidrofilia y grado y distribución de regiones cargadas), normalmente implica un cambio menor y, por lo tanto, no altera significativamente la actividad biológica del polipéptido. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos basándose en una consideración de la hidrofobia y la carga del aminoácido. Los aminoácidos de índices hidropáticos y valores de hidrofilia similares se pueden sustituir y aún conservar la función proteica. Tanto el índice de hidrofobia como el valor de hidrofilia de los aminoácidos están influenciados por la cadena lateral particular de dicho aminoácido. De manera coherente con esta observación, las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos y, en particular, de las cadenas laterales de estos aminoácidos, como se revela por la hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y otras propiedades.

El término "variante" también incluye un polipéptido que tiene determinada identidad, tal como, por ejemplo, al menos aproximadamente un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad con el polipéptido dado. "Variante", como se utiliza en el presente documento, también incluye un polipéptido que comprende la parte del polipéptido dado que corresponde a una secuencia natural de proteínas VHB. "Variante" también puede referirse a una proteína de fusión o proteína quimérica, que comprende polipéptidos procedentes de dos o más fuentes diferentes. Los ejemplos no limitantes de la proteína de fusión descrita en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, una proteína de fusión de un polipéptido procedente del VHB y otro polipéptido procedente de una proteína que no es del VHB, una proteína de fusión de dos polipéptidos procedentes de diferentes subtipos del VHB, y una proteína de fusión de dos polipéptidos procedentes de diferentes regiones de la proteína L de uno cualquiera de los subtipos de VHB, o de diferentes secuencias en la región pre-S1 de la proteína L de uno cualquiera de los subtipos del VHB.

El término "variante" también incluye un polipéptido que comprende la misma secuencia de aminoácidos de un polipéptido dado (es decir, el polipéptido descrito en el presente documento, el polipéptido procedente del VHB, o el polipéptido procedente de VHB) y conserva una o más actividades biológicas del polipéptido dado, pero modificado química y/o posttraduccionalmente de una manera diferente del polipéptido dado. "Variante" también se puede utilizar para describir un polipéptido o un fragmento del mismo que se ha procesado de manera diferencial, tal como mediante proteólisis, fosforilación u otra modificación post-traduccional, y que aún conserva su actividad biológica de unión a NTCP y regulación bidireccional del transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos. El uso de "variante" en el presente documento pretende abarcar fragmentos de una variante a menos que el contexto lo contradiga. El término "variante" también abarca las secuencias polipeptídicas homólogas encontradas en las diferentes especies, cepas o subtipos víricos del género hepadnavirus. El VHB se divide en cuatro serotipos principales (adr, adv, ayr, ayw) en función de epítopos antigenicos presentes en las proteínas de su envoltura, y en ocho genotipos (A a H) de acuerdo con la variación general de la secuencia de nucleótidos del genoma. Por lo tanto, el término "variante" incluye polipéptidos homólogos que se encuentran en cualquiera de estos subtipos del VHB. "Variante" también puede incluir polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos flanqueantes naturales de cualquiera de estos subtipos del VHB añadidos al extremo N y/o C.

Las expresiones "sustituciones conservadoras de aminoácidos" y "sustituciones conservadoras" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a los intercambios de aminoácidos previstos en un grupo de aminoácidos en donde un aminoácido se intercambia por un aminoácido diferente de tamaño, estructura, carga y/o polaridad similar. En la materia se conocen familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, en algunas realizaciones, un resto de aminoácido en un polipéptido se puede remplazar por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. En otras realizaciones, una serie de aminoácidos se puede remplazar por una serie estructuralmente similar que difiere en el orden y/o la composición de los miembros de la familia de cadena lateral. Incluso en otras realizaciones, las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente a lo largo de todo o parte del polipéptido. Ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen, por ejemplo, intercambio de uno de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu e Ile por uno de los otros aminoácidos de ese grupo de cuatro; intercambio entre los restos que contienen hidroxilo Ser y Thr; intercambio entre los restos ácidos Asp y Glu; intercambio entre los restos amida Asn y Gln; intercambio entre los restos básicos Lys, Arg e His; intercambio entre los restos aromáticos Phe, Tyr y Trp; e intercambio entre los aminoácidos de pequeño tamaño Ala, Ser, Thr, Met y Gly. No cabe esperar que las sustituciones conservadoras, tal como la sustitución de un aminoácido conservado por un aminoácido similar y estructuralmente relacionado, tengan una influencia sustancial en la actividad biológica del polipéptido.

La expresión "identidad de secuencia" (por ejemplo, una "secuencia 50 % idéntica a") se refiere al grado en que una secuencia es idéntica aminoácido por aminoácido en una ventana de comparación. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a la secuencia de un polipéptido dado y aún conservar una o más actividades biológicas del polipéptido dado. Se puede calcular un "porcentaje de identidad" (o "% de identidad") mediante la comparación de dos secuencias ópticamente alineadas en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparecen aminoácidos idénticos en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación o multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede realizar mediante implementaciones computarizadas de algoritmos disponibles en la materia, tal como, por ejemplo, la familia de programas BLAST®, o mediante inspección visual y seleccionar la mejor alineación (es decir, que da como resultado el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos. Para comparar secuencias, una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se pueden diseñar coordenadas de subsecuencia, en caso necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula la identidad de secuencia presente para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros designados del programa. La designación de los parámetros del programa del algoritmo de secuencia está dentro del conocimiento de la materia. Por ejemplo, la ventana de comparación puede designarse como a lo largo de toda la longitud de una o ambas secuencias de comparación, tal como, por ejemplo, en toda la longitud de la secuencia de referencia, y podrán permitirse espacios de hasta un 5 % del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Como se utiliza en el presente documento, la "actividad biológica" de los polipéptidos descritos en el presente documento abarca la capacidad de los polipéptidos para unirse a NTCP y regular bidireccionalmente la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en los hepatocitos. Como se utiliza en el presente documento, "regulación bidireccional" de una molécula o vía significa que los polipéptidos procedentes del VHB descritos en el presente documento potencian la actividad de la molécula o vía (es decir, funcionan como un potenciador) a una determinada concentración o por debajo de ella, e inhiben la actividad de la molécula o vía (es decir, funciona como inhibidor) por encima de la concentración. Por ejemplo, el polipéptido descrito en el presente documento puede unirse a NTCP y promover la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en los hepatocitos (es decir, funciona como un "potenciador" de NTCP) a una determinada concentración o por debajo de ella. El mismo polipéptido también puede unirse a NTCP, pero inhibir la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP (es decir, funciona como un "inhibidor" de NTCP) por encima de esa concentración. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede funcionar como un potenciador de NTCP a 93 nmol/l o menos y como un inhibidor de NTCP por encima de 93 nmol/l. Por ejemplo, el polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento puede funcionar como un potenciador de NTCP a 500 ng/ml o menos y como un inhibidor de NTCP por encima de 500 ng/ml.

En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede regular bidireccionalmente la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en los hepatocitos *in vitro*. El polipéptido descrito en el presente documento puede promover *in vitro* la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en una determinada concentración o por debajo de ella, mientras que el polipéptido puede inhibir *in vitro* la absorción de ácidos biliares

mediada por NTCP por encima de esa concentración. En alguna realización, el polipéptido descrito en el presente documento puede promover *in vitro* la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP a 93 nmol/l o menos, mientras que el polipéptido puede inhibir *in vitro* la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP por encima de 93 nmol/l. Por ejemplo, el polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento puede promover *in vitro* la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP a 500 ng/ml o menos, e inhibir *in vitro* la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP por encima de 500 ng/ml.

En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede promover la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en un sujeto tratado con el polipéptido a una determinada concentración en suero o por debajo de ella del polipéptido administrado. El polipéptido puede inhibir la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en un sujeto tratado con el polipéptido por encima de esa concentración en suero del polipéptido administrado. En algunas realizaciones, cuando la concentración en suero del polipéptido descrito en el presente documento es igual o inferior a 93 nmol/l en un sujeto tratado con el polipéptido, el polipéptido es capaz de mejorar la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto. En algunas realizaciones, cuando la concentración en suero del polipéptido descrito en el presente documento es superior a 93 nmol/l en un sujeto tratado con el polipéptido, el polipéptido es capaz de inhibir la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto. Por ejemplo, el polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento puede ser capaz de mejorar la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto a una concentración en suero de 500 ng/ml o por debajo de ella, e inhibir la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto a una concentración en suero por encima de 500 ng/ml.

La actividad biológica del polipéptido descrito en el presente documento también puede incluir la capacidad de tratar una enfermedad metabólica o de mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad metabólica. La actividad biológica puede incluir además la capacidad del polipéptido descrito en el presente documento para prevenir el desarrollo de una enfermedad metabólica. En algunas realizaciones, la actividad biológica del polipéptido descrito en el presente documento puede incluir la capacidad del polipéptido para modular el nivel o la actividad de una o más moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo, y/o para modular el nivel o valor de uno o más parámetros fisiológicos que miden cambios metabólicos. En algunas realizaciones, la "actividad biológica" del polipéptido descrito en el presente documento incluye la capacidad del polipéptido para reducir o estabilizar el nivel o la actividad de una o más de dichas moléculas químicas o biológicas o parámetros fisiológicos. En algunas realizaciones, metabolismo se refiere al metabolismo de los ácidos biliares, al metabolismo de la glucosa, al metabolismo de lípidos y/o al metabolismo de aminoácidos. Las moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo pueden incluir, por ejemplo, glucosa, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, ácidos biliares, aminoácidos, hormonas, tal como, por ejemplo, insulina, LDL-C, HDL-C, nitrógeno ureico en sangre y minerales. Los parámetros fisiológicos que miden los cambios metabólicos pueden incluir, por ejemplo, glucemia, tensión arterial, peso corporal, grasa corporal, índice de masa corporal (IMC), inflamación, índice de aterosclerosis (IA), índice cardíaco, índice renal, índice de grasa total e índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA).

En determinadas realizaciones, la "actividad biológica" del polipéptido descrito en el presente documento incluye la capacidad del polipéptido para aumentar el nivel de ácidos biliares en suero en un sujeto. En determinadas realizaciones, la "actividad biológica" del polipéptido descrito en el presente documento incluye la capacidad del polipéptido para mejorar la eliminación del colesterol mediante la síntesis de ácidos biliares en los hepatocitos.

En algunas realizaciones, la actividad biológica del polipéptido descrito en el presente documento puede incluir la capacidad de reducir el nivel en suero de una o más moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo de los lípidos en un sujeto al que se le administra el polipéptido. En algunas realizaciones, la actividad biológica de los polipéptidos descritos en el presente documento puede incluir la capacidad de reducir el nivel en suero de lípidos séricos, tal como, por ejemplo, triglicéridos, colesterol total o LDL-C en un sujeto al que se le administra el polipéptido.

En algunas realizaciones, la actividad biológica del polipéptido descrito en el presente documento puede incluir la capacidad de reducir el nivel en suero de una o más moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo de la glucosa en un sujeto al que se le administra el polipéptido. En algunas realizaciones, la actividad biológica de los polipéptidos descritos en el presente documento puede incluir la capacidad de reducir el nivel en suero de glucosa o HbA1c en un sujeto al que se le administra el polipéptido. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser capaces de estabilizar el nivel en suero de insulina en un sujeto.

En determinadas realizaciones, la "actividad biológica" del polipéptido descrito en el presente documento incluye la capacidad del polipéptido para tratar un trastorno metabólico en un sujeto. En algunas realizaciones, el trastorno metabólico implica la desregulación del metabolismo de los lípidos. La enfermedad metabólica puede incluir un trastorno relacionado con el colesterol, tal como, por ejemplo, hiperlipidemia (incluida la hipertrigliceridemia, la hipercolesterolemia o ambas). En algunas realizaciones, el trastorno metabólico implica la desregulación del metabolismo de la glucosa. La enfermedad metabólica puede incluir, por ejemplo, diabetes y obesidad.

En determinadas realizaciones, la "actividad biológica" del polipéptido descrito en el presente documento incluye la capacidad del polipéptido para mejorar o prevenir uno o más síntomas o complicaciones de dichos trastornos. En determinadas realizaciones, la "actividad biológica" del polipéptido descrito en el presente documento incluye la capacidad del polipéptido para mitigar el impacto negativo de dichos trastornos en la salud de un paciente o reducir el

riesgo de desarrollar dichos trastornos. En determinadas realizaciones, la "actividad biológica" del polipéptido descrito en el presente documento también incluye la capacidad del polipéptido para reducir la gravedad o el riesgo de desarrollar otras enfermedades asociadas, tal como, por ejemplo, la aterosclerosis y/o enfermedades cardiovasculares, cardiopatías, insuficiencia renal u obesidad.

- 5 Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que estas actividades biológicas del polipéptido descrito en el presente documento pueden resultar de la regulación bidireccional de la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto por el polipéptido a las concentraciones en suero después de la administración del polipéptido al sujeto. En algunas realizaciones, cuando la concentración del polipéptido descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo de un sujeto al que se le administra dicho polipéptido es igual o inferior a una determinada concentración, mejora la absorción de ácidos biliares en el sujeto. En algunas realizaciones, cuando la concentración del polipéptido descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo del sujeto está por encima de una determinada concentración, se inhibe la absorción de ácidos biliares en el sujeto. En algunas realizaciones, cuando la concentración del polipéptido descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo de un sujeto al que se le administra dicho polipéptido es igual o inferior a 93 nmol/l, mejora la absorción de ácidos biliares en el sujeto. En algunas realizaciones, cuando la concentración del polipéptido descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo del sujeto es superior a 93 nmol/l, se inhibe la absorción de ácidos biliares en el sujeto. Por ejemplo, cuando la concentración del polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo de un sujeto al que se le ha administrado dicho polipéptido es igual o inferior a 500 ng/ml, mejora la absorción de ácidos biliares en el sujeto.
- 10 Cuando la concentración del polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo del sujeto es superior a 500 ng/ml, se inhibe la absorción de ácidos biliares en el sujeto.
- 15
- 20

Se contemplan varios ensayos *in vivo*, *in vitro*, y *ex-vivo* para confirmar la actividad biológica del polipéptido descrito en el presente documento. La actividad biológica del polipéptido descrito en el presente documento puede confirmarse *in vivo*, mediante la recogida de una muestra de un sujeto tratado con el polipéptido descrito en el presente documento. La muestra puede ser una muestra de biopsia recogida de un tejido específico tal como, por ejemplo, hígado, músculo, grasa y páncreas, o un tejido ultracongelado recogido de la autopsia de un animal. La muestra puede ser una muestra de suero recogida de sangre extraída de un sujeto. Se conocen en la materia varios métodos para recoger una muestra de suero de un sujeto e incluyen, por ejemplo, sangrado de cola, punción retroorbitaria y cardiopunción. La actividad biológica del polipéptido descrito en el presente documento puede confirmarse *in vitro*, mediante la puesta en contacto del polipéptido descrito en el presente documento con una célula que es de una estirpe celular transformada o una célula aislada de un animal. La célula puede ser un hepatocito primario aislado de un animal.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

375

380

385

390

395

400

405

410

415

420

425

430

435

440

445

450

455

460

465

470

475

480

485

490

495

500

505

510

515

520

525

530

535

540

545

550

555

560

565

570

575

580

585

590

595

600

605

610

615

620

625

630

635

640

645

650

655

660

665

670

675

680

685

690

695

700

705

710

715

720

725

730

735

740

745

750

755

760

765

770

775

780

785

790

795

800

805

810

815

820

825

830

835

840

845

850

855

860

865

870

875

880

885

890

895

900

905

910

915

920

925

930

935

940

945

950

955

960

965

970

975

980

985

990

995

1000

1005

1010

1015

1020

1025

1030

1035

1040

1045

1050

1055

1060

1065

1070

1075

1080

1085

1090

1095

1100

1105

1110

1115

1120

1125

1130

1135

1140

1145

1150

1155

1160

1165

1170

1175

1180

1185

1190

1195

1200

1205

1210

1215

1220

1225

1230

1235

1240

1245

1250

1255

1260

1265

1270

1275

1280

1285

1290

1295

1300

1305

1310

1315

1320

1325

1330

1335

1340

1345

1350

1355

1360

1365

1370

1375

1380

1385

1390

1395

1400

1405

1410

1415

1420

1425

1430

1435

1440

1445

1450

1455

1460

1465

1470

1475

1480

1485

1490

1495

1500

1505

1510

1515

1520

1525

1530

1535

1540

1545

1550

1555

1560

1565

1570

1575

1580

1585

1590

1595

1600

1605

1610

1615

1620

1625

1630

1635

1640

1645

1650

1655

1660

1665

1670

1675

1680

1685

1690

1695

1700

1705

1710

1715

1720

1725

1730

1735

1740

1745

1750

1755

1760

1765

1770

1775

1780

1785

1790

1795

1800

1805

1810

1815

1820

1825

1830

1835

1840

1845

1850

1855

1860

1865

1870

1875

1880

1885

1890

1895

1900

1905

1910

1915

1920

1925

1930

1935

1940

1945

1950

1955

1960

1965

1970

1975

1980

1985

1990

1995

2000

2005

2010

2015

2020

2025

2030

2035

2040

2045

2050

2055

2060

2065

2070

2075

2080

2085

2090

2095

2100

2105

2110

2115

2120

2125

2130

2135

2140

2145

2150

2155

2160

2165

2170

2175

2180

2185

2190

2195

2200

2205

2210

2215

2220

2225

2230

2235

2240

2245

2250

2255

2260

2265

2270

2275

2280

2285

2290

2295

2300

2305

2310

2315

2320

2325

2330

2335

2340

2345

2350

2355

2360

2365

2370

2375

2380

2385

2390

2395

2400

2405

2410

2415

2420

2425

2430

2435

2440

2445

2450

2455

2460

2465

2470

2475

2480

2485

2490

2495

2500

2505

2510

2515

2520

2525

2530

2535

2540

2545

2550

2555

2560

2565

2570

2575

2580

2585

2590

2595

2600

2605

2610

2615

2620

2625

2630

2635

2640

2645

2650

2655

2660

2665

2670

2675

2680

2685

2690

2695

2700

2705

2710

2715

2720

2725

2730

2735

2740

2745

2750

2755

2760

2765

2770

2775

2780

2785

2790

2795

2800

2805

2810

2815

2820

2825

2830

2835

2840

2845

2850

2855

2860

2865

2870

2875

2880

2885

2890

2895

2900

2905

2910

2915

2920

2925

2930

2935

2940

2945

2950

2955

2960

2965

2970

2975

2980

2985

2990

2995

3000

3005

3010

3015

3020

3025

3030

3035

3040

3045

3050

3055

3060

3065

3070

3075

3080

3085

3090

3095

3100

3105

3110

3115

3120

3125

3130

3135

3140

3145

3150

3155

3160

3165

3170

3175

3180

3185

3190

3195

3200

3205

3210

3215

3220

3225

3230

3235

3240

3245

3250

3255

3260

3265

3270

3275

3280

3285

3290

3295

3300

3305

3310

3315

3320

3325

3330

3335

3340

3345

3350

3355

3360

3365

3370

3375

3380

3385

3390

3395

3400

3405

3410

3415

3420

3425

3430

3435

3440

3445

3450

3455

3460

3465

3470

3475

3480

3485

3490

3495

3500

3505

3510

3515

3520

3525

3530

3535

3540

3545

3550

3555

3560

3565

3570

3575

3580

3585

3590

3595

3600

3605

3610

3615

3620

3625

3630

3635

3640

3645

3650

3655

3660

3665

3670

3675

3680

3685

3690

3695

3700

3705

3710

3715

3720

3725

3730

3735

3740

3745

3750

3755

3760

3765

3770

3775

3780

3785

3790

3795

3800

3805

3810

3815

3820

3825

3830

3835

3840

3845

3850

3855

3860

3865

3870

3875

3880

3885

3890

3895

3900

3905

3910

3915

3920

3925

3930

3935

3940

3945

3950

3955

3960

3965

3970

3975

3980

3985

3990

3995

4000

4005

4010

4015

4020

4025

4030

4035

4040

4045

4050

4055

4060

4065

4070

4075

4080

4085

4090

4095

4100

4105

4110

4115

4120

4125

4130

4135

4140

4145

4150

4155

4160

4165

4170

4175

4180

4185

4190

4195

4200

4205

4210

4215

4220

4225

4230

4235

4240

4245

4250

4255

4260

4265

4270

4275

4280

4285

4290

4295

4300

4305

4310

4315

4320

4325

4330

4335

4340

4345

4350

4355

4360

4365

4370

4375

4380

4385

4390

4395

4400

4405

4410

4415

4420

4425

4430

4435

4440

4445

4450

4455

4460

4465

4470

4475

4480

4485

4490

4495

4500

4505

4510

4515

4520

4525

4530

4535

4540

4545

4550

4555

4560

4565

4570

4575

4580

4585

4590

4595

4600

4605

4610

4615

4620

4625

4630

4635

4640

4645

4650

4655

4660

4665

4670

4675

4680

4685

4690

4695

4700

4705

4710

4715

4720

4725

4730

4735

4740

4745

4750

4755

4760

4765

4770

4775

4780

4785

4790

4795

4800

4805

4810

4815

4820

4825

4830

4835

4840

4845

4850

4855

4860

4865

4870

4875

4880

4885

4890

4895

4900

4905

4910

4915

4920

4925

4930

4935

4940

4945

4950

4955

4960

4965

4970

4975

4980

4985

4990

4995

5000

5005

5010

5015

5020

5025

5030

5035

5040

5045

5050

5055

5060

5065

5070

5075

5080

5085

5090

5095

5100

5105

5110

5115

5120

5125

5130

5135

5140

5145

5150

5155

5160

5165

5170

5175

5180

5185

5190

5195

5200

5205

5210

5215

5220

5225

5230

5235

5240

5245

5250

5255

5260

5265

5270

5275

5280

5285

5290

5295

5300

5305

5310

5315

5320

5325

5330

5335

5340

5345

5350

5355

5360

5365

5370

5375

5380

5385

5390

5395

5400

5405

5410

5415

5420

5425

5430

5435

5440

5445

5450

5455

5460

5465

5470

5475

5480

5485

5490

5495

5500

5505

5510

5515

5520

5525

5530

5535

5540

5545

5550

5555

5560

5565

5570

5575

5580

5585

5590

5595

5600

5605

5610

5615

5620

5625

5630

5635

5640

5645

5650

5655

5660

5665

5670

5675

5680

5685

5690

5695

5700

5705

5710

5715

5720

<p

los aminoácidos 13 a 59 de pre-S1 del genotipo B del VHB: GTNFSVPNPGFFPDHQFDPAFKANSENPDWDFNPKNWDANKVG (SEQ ID NO: 35), los aminoácidos 2-48 de pre-S1 del genotipo D del VHB: GQNFSTSVPNPGFFPDHQFDPAFRANTANPDWDFNPKNKTWPDANKVG (SEQ ID NO: 36), los aminoácidos 12 a 58 de pre-S1 del genotipo E del VHB: GKNISTTNPLGFFPDHQLDPAFRANTRNPWDHNPKNHDWTEANKVG (SEQ ID NO: 37), los aminoácidos 13 a 59 de pre-S1 del genotipo F del VHB: GQNLSVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWFNTNKDSWPMANKVG (SEQ ID NO: 38), los aminoácidos 12 a 58 de pre-S1 del genotipo G del VHB: GKNLSASNPLGFLPDHQLDPAFRANTNNPDWDFNPKKDPWPEANKVG (SEQ ID NO: 39) o los aminoácidos 13 a 59 de pre-S1 del genotipo H del VHB: GQNLSVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWFNTNKDNWPMANKVG (SEQ ID NO: 40).

- En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender una parte de la región pre-S1 del VHB, comprendiendo dicha parte al menos una secuencia de aminoácidos elegida de las SEQ ID NO: 23 y 34 a 40. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender toda la región pre-S1 del VHB.
- En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede tener de 10 a 100 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, el polipéptido puede tener una longitud de 15 a 100, 15 a 80, 20 a 100, 20 a 80, 20 a 60, 25 a 60, 30 a 60, 35 a 60 o 40 a 60 aminoácidos, incluidos todos los números enteros entre estos intervalos. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede tener al menos 20, tal como, por ejemplo, al menos 25, 30, 35 o 40, aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede tener 20, 25, 30, 35, 40, 47, 55 o 60 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento que difieren en longitud conservan una o más actividades biológicas asociadas con los polipéptidos correspondientes, incluida al menos la actividad biológica de unión a NTCP y la regulación bidireccional del transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos.
- En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender una modificación N-terminal con un grupo hidrófobo. El grupo hidrófobo se elige de ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, colesterol y ácido araquidónico. En algunas realizaciones, el grupo hidrófobo puede elegirse de ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico y colesterol. En algunas realizaciones, el grupo hidrófobo puede ser ácido mirístico. En determinadas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de aminoácidos elegida de las SEQ ID NO: 23 y 34 a 40, en donde el extremo N puede modificarse con un grupo hidrófobo elegido de ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico y colesterol. En determinadas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de aminoácidos elegida de las SEQ ID NO: 23 y 34 a 40, en donde el extremo N puede estar miristoilado. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, en donde el extremo N puede estar miristoilado. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender una modificación carboxiterminal para estabilizar el polipéptido. La modificación carboxiterminal se elige entre amidación (aminación) e isopentanodiolización. En algunas realizaciones, la modificación carboxiterminal puede ser amidación (aminación). Por ejemplo, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, en donde el extremo N puede estar miristoilado y/o el extremo C puede estar amidado (aminado). En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (Cmyr-47). En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de aminoácidos elegida de las SEQ ID NO: 34 a 40, en donde el extremo N puede estar miristoilado y/o el extremo C puede modificarse mediante amidación (aminación). En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de aminoácidos elegida de las SEQ ID NO: 14 a 20. Las variantes del polipéptido descrito en el presente documento que se modifican en el extremo N y/o en el extremo C conservan una o más actividades biológicas de los polipéptidos correspondientes que no se modifican de la misma manera, incluida al menos la actividad biológica de unión a NTCP y la regulación bidireccional del transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos.
- El polipéptido descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de aminoácidos elegida de las SEQ ID NO: 21, 22 y 24 a 28. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento se puede elegir de uno cualquiera de los polipéptidos modificados químicamente enumerados en la tabla 1.

# ES 2 979 305 T3

Tabla 1. Lista de polipéptidos ilustrativos

SEQ ID NO:	Nombre de la sec.	Modificación aminoterminal	Secuencia de aminoácidos 123456789012345678901234567890	Modificación carboxiterminal	Origen de la sec.
1	Cmyr-60	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGFTPHG	NH2	Pre-S1(13-72) del genotipo C
2	Cmyr-55	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGF	NH2	Pre-S1(13-67) del genotipo C
3	Cmyr-47	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVG	NH2	Pre-S1(13-59) del genotipo C
4	Cmyr-40	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHW	NH2	Pre-S1(13-52) del genotipo C
5	Cmyr-35	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNP	NH2	Pre-S1(13-47) del genotipo C
6	Cmyr-30	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD	NH2	Pre-S1(13-42) del genotipo C
7	Cmyr-25	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGAN	NH2	Pre-S1(13-37) del genotipo C
8	Cmyr-20	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDP	NH2	Pre-S1(13-32) del genotipo C
9	Cmyr-47+(-10)	Myr	GGWSSKPRQGMGTNLSPNPLGFFPDHQLD PAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVG	NH2	Pre-S1(2-59) del genotipo C
10	Cmyr-47+(-9)	Myr	GLSWTVPLEWGTNLSPNPLGFFPDHQLD AFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVG	NH2	Pre-S1(2-11) del genotipo E o G + Pre-S1(13-59) del genotipo C
11	Cplam-47	Plam	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVG	NH2	Pre-S1(13-59) del genotipo C
12	Cstea-47	Estearoilo	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVG	NH2	Pre-S1(13-59) del genotipo C
13	Cchol-47	Chol	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVG	NH2	Pre-S1(13-59) del genotipo C
14	Amyr-47	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPVKDDWPAANQVG	NH2	Pre-S1(13-59) del genotipo A
15	Bmyr-47	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFKANSENPD WDLNPNKDNWPDKANG	NH2	Pre-S1(13-59) del genotipo B
16	Dmyr-47	Myr	GQNLSTSNSPLGFFPDHQLDPAFRANTANPD WDFNPNKDTWPDKANG	NH2	Pre-S1(2-48) del genotipo D

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre de la sec.	Modificación aminoterminal	Secuencia de aminoácidos 123456789012345678901234567890	Modificación carboxiterminal	Origen de la sec.
17	Emyr-47	Myr	GKNISTTNPLGFFPDHQLDPAFRANTRNPD WDHNPNKDHWTEANKVG	NH2	Pre-S1(12-58) del genotipo E
18	Fmyr-47	Myr	GQNLSPVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPD WDFNTNPKDWPWPMANKVG	NH2	Pre-S1(13-59) del genotipo F
19	Gmyr-47	Myr	GKNLSASNPLGFPLPDHQLDPAFRANTNNPD WDFNPKKDPWPEANKVG	NH2	Pre-S1(12-58) del genotipo G
20	Hmyr-47	Myr	GQNLSPVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPD WDFNTNPKDNWPWPMANKVG	NH2	Pre-S1(13-59) del genotipo H

De acuerdo con la invención, siempre que el polipéptido comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 21 a 40, aspectos de la presente divulgación también incluyen variantes de los polipéptidos descritos en el presente documento que tienen una secuencia de aminoácidos flanqueante natural de la proteína L del VHB, tal como, por ejemplo, de la región pre-S1 de la proteína L, añadida al extremo N y/o C. La secuencia de aminoácidos flanqueante natural se refiere a la secuencia natural que flanquea el extremo N o C del polipéptido descrito en el presente documento en la región pre-S1 del genotipo del VHB correspondiente o cualquier otro genotipo del VHB. En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de aminoácidos elegida de las SEQ ID NO: 23 y 34 a 40, y una secuencia de aminoácidos flanqueante natural en el extremo N y/o C procedente de la región pre-S1 de uno cualquiera de los genotipos A a H del VHB. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos flanqueante nativa puede proceder de la secuencia consenso de una cepa del VHB con el número de registro de GenBank KC875260 (genotipo A; SEQ ID NO: 41), AY220704 (genotipo B; SEQ ID NO: 42), AF461363 (genotipo C; SEQ ID NO: 43), AY796030 (genotipo D; SEQ ID NO: 44), AB205129 (genotipo E; SEQ ID NO: 45), DQ823095 (genotipo F; SEQ ID NO: 46), HE981176 (genotipo G; SEQ ID NO: 47) o AB179747 (genotipo H; SEQ ID NO: 48), en donde solo los polipéptidos de este conjunto comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 21 a 40 están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, y una secuencia de aminoácidos flanqueante natural en el extremo N y/o C procedente de la región pre-S1 del genotipo C del VHB. Como alternativa, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, y una secuencia de aminoácidos flanqueante natural en el extremo N y/o C procedente de la región pre-S1 de uno cualquiera de los genotipos del VHB A, B, D, E, F, G y H. En algunas realizaciones, el extremo N y/o C del polipéptido descrito en el presente documento pueden comprender independientemente una secuencia de aminoácidos flanqueante natural que tiene una longitud de 1 a 10, tal como, por ejemplo, de 1 a 8, de 1 a 5 o de 1 a 3 aminoácidos, incluidos todos los números enteros entre estos intervalos. Por ejemplo, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una secuencia de aminoácidos flanqueante natural de 10 aminoácidos en el extremo N de la región pre-S1 del genotipo C del VHB. En otras palabras, el polipéptido puede comprender los aminoácidos 2 a 59 de la región pre-S1 del genotipo C del VHB (SEQ ID NO: 29). Como otro ejemplo, el polipéptido descrito en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una secuencia de aminoácidos flanqueante natural de 9 aminoácidos en el extremo N de la región pre-S1 del genotipo E o G del VHB. En otras palabras, el polipéptido puede comprender los aminoácidos 13 a 59 de la región pre-S1 del genotipo C del VHB y los aminoácidos 2 a 11 de la región pre-S1 del genotipo E o G del VHB (SEQ ID NO: 30). Se apreciará que, cualquier polipéptido descrito en el presente documento puede tener secuencias de aminoácidos flanqueantes natural de cualquier longitud extendida desde el extremo N y/o C, y los polipéptidos resultantes conservan una o más actividades biológicas de los polipéptidos originales, incluida al menos la actividad biológica de unión a NTCP y la regulación bidireccional del transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos.

En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento son capaces de regular bidireccionalmente el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos. Cuando los hepatocitos están en contacto con el polipéptido descrito en el presente documento una determinada concentración o por debajo de ella, el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos puede potenciarse en comparación con los hepatocitos que no están en contacto con dicho polipéptido. Cuando los hepatocitos están en contacto con el polipéptido descrito en el presente documento por encima de determinada concentración, el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos puede inhibirse en comparación con los hepatocitos que no están en contacto con dicho polipéptido. En algunas realizaciones, cuando los hepatocitos están en contacto con 93 nmol/l o

menos del polipéptido descrito en el presente documento, el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos puede potenciarse en comparación con los hepatocitos que no están en contacto con dicho polipéptido. En algunas realizaciones, cuando los hepatocitos están en contacto con más de 93 nmol/l del polipéptido descrito en el presente documento, el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos puede inhibirse en comparación con los hepatocitos que no están en contacto con dicho polipéptido. Por ejemplo, cuando los hepatocitos están en contacto con 500 ng/ml o menos del polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento, el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos puede potenciarse en comparación con los hepatocitos que no están en contacto con dicho polipéptido. En algunas realizaciones, cuando los hepatocitos están en contacto con más de 500 ng/ml del polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento, el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP hacia los hepatocitos puede inhibirse en comparación con los hepatocitos que no están en contacto con dicho polipéptido.

En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser capaces de modular, tal como, por ejemplo, reducir o estabilizar, el nivel o actividad de una o más moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo en un sujeto. En algunas realizaciones, el metabolismo puede incluir, por ejemplo, metabolismo de los ácidos biliares, metabolismo de la glucosa, metabolismo de lípidos o metabolismo de aminoácidos. En algunas realizaciones, la molécula química o biológica se elige de glucosa, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, ácidos biliares, aminoácidos, hormonas, LDL-C, HDL-C, HbA1c, nitrógeno ureico en sangre y minerales. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser capaces de modular, tal como, por ejemplo, reducir o estabilizar, el nivel o valor de uno o más parámetros fisiológicos que miden cambios metabólicos, tales como, por ejemplo, glucemia, tensión arterial, peso corporal, grasa corporal, índice de masa corporal (IMC), inflamación, índice de aterosclerosis (IA), índice cardíaco, índice renal, índice de grasa total e índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA). En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser capaces de aumentar el nivel en suero de los ácidos biliares en un sujeto. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser capaces de reducir el nivel en suero de los lípidos en un sujeto. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser capaces de reducir el nivel en suero del colesterol total en un sujeto. En realizaciones adicionales, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser capaces de reducir el nivel en suero del colesterol LDL en un sujeto. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser capaces de reducir el nivel en suero de triglicéridos en un sujeto. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser capaces de reducir el nivel en suero de la glucosa en un sujeto. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser capaces de reducir el nivel en suero de HbA1c en un sujeto. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser capaces de estabilizar el nivel en suero de insulina en un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto puede padecer una enfermedad metabólica o puede estar en riesgo de desarrollar dicha enfermedad.

Como se utiliza en el presente documento, "modular" o "alterar" todos utilizados indistintamente, incluyen "que reduce" "que disminuye", "que rebaja", "que regula a la baja", o "que inhibe" uno o más parámetros cuantificables opcionalmente por una cantidad definida y/o estadísticamente significativa. El término "modular" también incluye "mejorar", "incrementar", "elevar", "regular al alta", o "promover" uno o más parámetros cuantificables opcionalmente por una cantidad definida y/o estadísticamente significativa.

Los términos "reducir", "disminuir", "rebajar", "regular a la baja", e "inhibir", todos utilizados indistintamente en el presente documento, significa que el nivel o actividad de una o más moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo, tales como, por ejemplo, glucosa, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, ácidos biliares, aminoácidos u hormonas, que incluyen, por ejemplo, insulina, LDL-C, HDL-C, HbA1c, nitrógeno ureico en sangre y minerales, se reduce por debajo del nivel o actividad observada en ausencia de los polipéptidos descritos en el presente documento o por debajo de un polipéptido de control. En algunas realizaciones, "reducir" puede significar que el nivel o valor de uno o más parámetros fisiológicos que miden los cambios metabólicos, tal como, por ejemplo, glucemia, tensión arterial, peso corporal, grasa corporal, índice de masa corporal (IMC), inflamación, índice de aterosclerosis (IA), índice cardíaco, índice renal, índice de grasa total e índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA), se reducen por debajo del nivel o actividad observada en ausencia de los polipéptidos descritos en el presente documento o por debajo de un polipéptido de control. En determinadas realizaciones, la reducción con un polipéptido descrito en el presente documento está por debajo del nivel o actividad observada en presencia de una molécula inactiva o atenuada. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento son capaces de reducir el nivel de glucosa, insulina, colesterol o triglicéridos en el suero y/o en otro tejido u órgano, tal como, por ejemplo, hígado, corazón, músculo, grasa visceral, grasa subcutánea, intestino y cerebro.

Como se utiliza en el presente documento, el valor del índice de masa corporal (IMC) de un sujeto se puede calcular con la siguiente fórmula: IMC = (Masa del sujeto expresada en kg)/[(altura del sujeto expresada en m)<sup>2</sup>]. El nivel de inflamación se puede medir mediante diversas pruebas clínicas disponibles en la materia. Por ejemplo, el nivel de proteína C-reactiva (PCR) en sangre se puede medir para medir cuantitativamente el nivel de inflamación en un sujeto. Una prueba de velocidad de sedimentación globular (VSG) es otro ejemplo de pruebas que miden el nivel de inflamación en un sujeto. La prueba de VSG mide la velocidad de sedimentación de eritrocitos en un período determinado. Al obtener los niveles (tales como, por ejemplo, en mmol/l) de colesterol total (CT) y HDL-C en un sujeto,

el valor del índice de aterosclerosis (IA) se puede calcular mediante la fórmula de IA = (CT - HDL-C)/HDL-C. Tal como se utiliza en el presente documento, el índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA) puede referirse al índice HOMA-IR (que cuantifica el nivel de resistencia a la insulina) y/o al índice HOMA-β (que cuantifica el nivel de función de las células β). El valor de HOMA-IR se puede calcular mediante la fórmula de: HOMA-IR = [(glucosa en sangre expresada en mmol/l) × (insulina en suero expresada en mU/l)]/22,5. El valor de HOMA-β se puede calcular mediante la fórmula de: HOMA-β = [(20 × insulina en suero expresada en mU/l)/(glucosa en sangre expresada en mmol/l - 3,5)] %. El valor del índice cardíaco se refiere a la relación entre el peso del corazón y el peso corporal total y se puede calcular mediante la fórmula de: índice cardíaco (g/kg) = peso del corazón en g/peso corporal en kg. El valor del índice renal se refiere a la relación entre el peso del riñón y el peso corporal total y se puede calcular mediante la fórmula de: índice renal (g/kg) = peso del riñón en g/peso corporal en kg. El valor del índice de grasa total se refiere a la relación entre el peso de la grasa (por ejemplo, grasa abdominal y/o escapular) y el peso corporal total. Como se utiliza en el presente documento, el índice de grasa se puede calcular mediante la fórmula de: índice de grasa total (g/kg) = peso total de grasa abdominal y grasa escapular en g/peso corporal en kg.

Igualmente, los términos "mejorar", "aumentar", "elevar", "regular al alza", y "promover", todos utilizados indistintamente, significan que el nivel o actividad de una o más moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo, tal como, por ejemplo, glucosa, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, ácidos biliares, aminoácidos, hormonas, que incluyen, por ejemplo, insulina, LDL-C, HDL-C, HbA1c, nitrógeno ureico en sangre y minerales, aumenta por encima del nivel o actividad observado en ausencia de los polipéptidos descritos en el presente documento o por encima de un polipéptido de control. En algunas realizaciones, "mejorar" puede significar que el nivel del valor de uno o más parámetros fisiológicos que miden los cambios metabólicos, tal como, por ejemplo, glucemia, tensión arterial, peso corporal, grasa corporal, índice de masa corporal (IMC), inflamación, índice de aterosclerosis (IA), índice cardíaco, índice renal, índice de grasa total e índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA), aumentan por encima del nivel o actividad observado en ausencia de los polipéptidos descritos en el presente documento o por encima de un polipéptido de control. En determinadas realizaciones, el aumento con un polipéptido descrito en el presente documento está por encima del nivel o actividad observado en presencia de una molécula inactiva o atenuada. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento son capaces de aumentar el nivel de ácidos biliares en el suero y/o en otro tejido u órgano, tal como, por ejemplo, hígado, corazón, músculo, grasa visceral, grasa subcutánea, intestino y cerebro.

Los términos "estabilizar", "mantener", "sostener", y "conservar" se utilizan indistintamente junto con una o más moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo, y significan que el nivel o actividad de una o más moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo, tal como, por ejemplo, glucosa, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, ácidos biliares, aminoácidos, hormonas, que incluyen, por ejemplo, insulina, LDL-C, HDL-C, HbA1c, nitrógeno ureico en sangre y minerales, muestra una diferencia mínima con respecto al nivel o actividad observada en un sujeto sano o en un sujeto que no padece una enfermedad metabólica, o con respecto al nivel o actividad observada en presencia de un polipéptido de control positivo. En algunas realizaciones, "estabilizar" puede significar que el nivel o valor de uno o más parámetros fisiológicos que miden los cambios metabólicos, tal como, por ejemplo, glucemia, tensión arterial, peso corporal, grasa corporal, índice de masa corporal (IMC), inflamación, índice de aterosclerosis (IA), índice cardíaco, índice renal, índice de grasa total e índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA), muestra una diferencia mínima con respecto al nivel o valor observado en un sujeto sano o un sujeto que no padece una enfermedad metabólica, o con respecto al nivel o valor observado en presencia de un polipéptido de control positivo. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento son capaces de estabilizar el nivel de insulina en el suero y/o la producción de insulina del páncreas.

Los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden preparar mediante síntesis química o mediante tecnología recombinante.

Cuando se seleccionan procedimientos recombinantes, un gen sintético puede construirse *de novo* o un gen natural puede mutarse mediante, por ejemplo, mutagénesis de casete. Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante. Estas técnicas contemplan, en forma simplificada, tomar el gen, ya sea natural o sintético, codificar el péptido; insertarlo en un vector adecuado; insertar el vector en una célula hospedadora adecuada; cultivar la célula hospedadora para provocar la expresión del gen; y recuperar o aislar el péptido producido de ese modo. En algunas realizaciones, el péptido recuperado se purifica a continuación hasta un grado adecuado.

Por ejemplo, la secuencia de ADN que codifica un polipéptido descrito en el presente documento se clona y manipula para que pueda expresarse en un hospedador conveniente. El ADN que codifica los polipéptidos originales se puede obtener de una biblioteca genómica del VHB, a partir del ADNc procedente del ARNm de células que expresan el polipéptido, o mediante la construcción sintética de la secuencia de ADN. A continuación, el ADN original se inserta en un plásmido o vector adecuado que se utiliza para transformar una célula hospedadora. En general, en relación con esos hospedadores se utilizan vectores plásmidos que contienen secuencias de replicación y control que proceden de especies compatibles con la célula hospedadora. El vector normalmente lleva un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas o péptidos que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. El vector puede ser de los comúnmente utilizados en la materia, o construidos con técnicas convencionales mediante la combinación de fragmentos funcionales de los vectores comúnmente utilizados en la

materia.

La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Por ejemplo, las células hospedadoras procariotas pueden incluir *E. coli*, *Bacillus subtilis* y otras enterobacterias, tales como, por ejemplo, *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans*, y varias especies de Pseudomonas. Además de procariotas, se pueden utilizar organismos eucariotas,

tales como cultivos de levadura o células procedentes de organismos multicelulares, tales como cultivos de células de insectos o de mamíferos. Ejemplos de dichas estirpes celulares hospedadoras eucariotas incluyen células VERO y HeLa, estirpes celulares de ovario de hámster chino (CHO), estirpes celulares W138, 293, BHK, COS-7 y MDCK.

En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden preparar mediante síntesis en fase sólida u otras síntesis químicas equivalentes conocidas en la materia. En algunas realizaciones, la síntesis en fase sólida se inicia desde el extremo C del péptido mediante el acoplamiento de un α-aminoácido protegido a una resina adecuada. Dicho material de partida se puede preparar mediante la unión de un aminoácido α-amino protegido mediante un enlace éster a una resina clorometilada o una resina hidroximetilada, o mediante un enlace amida a una resina BHA o resina MBHA. Los aminoácidos se acoplan a la cadena peptídica mediante técnicas bien conocidas en la materia para la formación de enlaces peptídicos. Un método implica convertir el aminoácido en un derivado que hará que el grupo carboxilo sea más susceptible a reaccionar con el grupo amino aminoterminal libre del fragmento peptídico. Por ejemplo, el aminoácido se puede convertir en un anhídrido mixto mediante la reacción de un aminoácido protegido con cloroformiato de etilo, cloroformiato de fenilo, cloroformiato de sec-butilo, cloroformiato de isobutilo, cloruro de pivaloilo o cloruros ácidos similares. Como alternativa, el aminoácido se puede convertir en un éster activo, tal como un éster de 2,4,5-triclorofenilo, un éster de pentaclorofenilo, un éster de pentafluorofenilo, un éster de p-nitrofenilo, un éster de N-hidroxisuccinimida o un éster formado a partir de 1-hidroxibenzotriazol. Otro método de acoplamiento implica el uso de un agente de acoplamiento adecuado, tal como N,N'-diciclohexilcarbodiimida o N,N'-diisopropilcarbodiimida.

En algunas realizaciones, el grupo α-amino de cada aminoácido empleado en la síntesis de péptidos puede protegerse durante la reacción de acoplamiento para evitar reacciones secundarias que impliquen su función α-amino activa. Por ejemplo, determinados aminoácidos que contienen grupos funcionales de cadena lateral reactiva (por ejemplo, sulfhidrilo, amino, carboxilo e hidroxilo) pueden protegerse con grupos protectores adecuados para evitar que se produzca una reacción química en ese sitio durante las etapas de acoplamiento inicial y posterior. La selección de un grupo protector de cadena lateral adecuado está dentro de los conocimientos de la materia. El grupo protector será fácilmente eliminable una vez completado el péptido aminoácido deseado en condiciones de reacción que no alteren la estructura de la cadena peptídica.

Después de la eliminación del grupo protector α-amino, los aminoácidos α-amino restantes y los protegidos con cadena lateral se acoplan paso a paso en el orden deseado. Como alternativa a añadir cada aminoácido por separado en la síntesis, algunos pueden acoplarse entre sí antes de su adición al sintetizador de fase sólida. La selección de un reactivo de acoplamiento adecuado está dentro de los conocimientos de la materia.

Cada aminoácido o secuencia de aminoácidos protegida se introduce en exceso en el reactor de fase sólida y el acoplamiento se realiza adecuadamente en un medio de dimetilformamida (DMF) o  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o mezclas de los mismos. Si se produce un acoplamiento incompleto, el procedimiento de acoplamiento se repite antes de la eliminación del grupo protector N-amino antes del acoplamiento del siguiente aminoácido. Se puede controlar el éxito de la reacción de acoplamiento en cada etapa de la síntesis. Las reacciones de acoplamiento se pueden realizar automáticamente usando métodos bien conocidos, por ejemplo, un sintetizador de péptidos BIOSEARCH 9500™.

Una vez completada la secuencia peptídica deseada, el péptido protegido debe escindirse del soporte de resina y deben eliminarse todos los grupos protectores. La reacción de escisión y eliminación de los grupos protectores se lleva a cabo adecuadamente de forma simultánea o gradual. Cuando el soporte de resina es una resina de poliestireno clorometilada, el enlace que ancla el péptido a la resina es un enlace éster formado entre el grupo carboxilo libre del resto carboxiterminal y uno de los muchos grupos clorometilo presentes en la matriz de la resina. Se apreciará que el enlace de anclaje puede escindirse mediante reactivos que se sabe que son capaces de romper un enlace éster y de penetrar la matriz de resina. También se reconocerá que los polipéptidos pueden modificarse (tal como, por ejemplo, modificarse en el extremo N con un grupo hidrófobo, seleccionado de ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, colesterol, ácido araquidónico; modificarse en el extremo C por amidación (aminación) o isopentanodiolización) antes o después de que el polipéptido se escinda del soporte.

La purificación de los polipéptidos de la invención se puede lograr con procedimientos convencionales, tales como HPLC preparativa (incluyendo HPLC en fase inversa) u otras técnicas cromatográficas conocidas, tales como permeación en gel, intercambio iónico, cromatografía de partición, cromatografía de afinidad (incluidas columnas de anticuerpos monoclonales) o distribución en contracorriente.

## II. Composiciones farmacéuticas

La presente divulgación también proporciona composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, que comprenden un polipéptido descrito en el presente documento. En determinadas realizaciones, la composición puede

- comprender uno cualquiera o más polipéptidos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, cuando se administra a un sujeto que lo necesita, la composición farmacéutica proporciona concentraciones en suero del polipéptido descrito en el presente documento que permiten la regulación bidireccional de la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto.
- Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente inactivo, tal como, por ejemplo, materia de relleno sólido, semisólido o líquido, diluyente, material de encapsulación, auxiliar de formulación, excipiente o vehículo, para su uso con un agente terapéutico que juntos comprenden una "composición farmacéutica" para administración a un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable no es tóxico para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. El vehículo farmacéuticamente aceptable es adecuado para la formulación empleada. Por ejemplo, si el agente terapéutico se va a administrar por vía oral, el vehículo puede ser una cápsula de gel. Si el agente terapéutico se va a administrar por vía subcutánea, lo ideal es que el vehículo no sea irritable para la piel y no provoque reacciones en el lugar de la inyección.
- Las composiciones farmacéuticas de los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden preparar mediante la mezcla de dicho polipéptido que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir, por ejemplo: tampones (tales como, por ejemplo, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos); antioxidantes (tales como, por ejemplo, ácido ascórbico y metionina); conservantes (tales como, por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencílamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, parabenos de alquilo, tales como parabeno de metilo o propilo, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (tales como, por ejemplo, de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas (tales como, por ejemplo, seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas); polímeros hidrófilos (tales como, por ejemplo, polivinilpirrolidona); aminoácidos (tales como, por ejemplo, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina); monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluidas glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes (tales como, por ejemplo, EDTA); azúcares (tales como, por ejemplo, sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol); contraiones formadores de sales (tales como, por ejemplo, sodio); complejos metálicos (tales como, por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos (tales como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG)).
- Los vehículos farmacéuticos ilustrativos también pueden incluir agentes aglutinantes (tales como, por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetylcelulosa, etc.); material de relleno (tal como, por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (tales como, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzonato de sodio, acetato de sodio, etc.); desintegrantes (tales como, por ejemplo, almidón, almidón glicolato de sodio, etc.); y agentes humectantes (tales como, por ejemplo, lauril sulfato de sodio, etc.).
- Los vehículos farmacéuticamente aceptables ilustrativos pueden incluir además agentes de dispersión de fármacos intersticiales, tales como glucoproteínas de hialuronidasa activas neutras solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tal como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter Internacional, Inc.). En algunas realizaciones, se puede combinar una sHASEGP en la composición farmacéutica con una o más glucosamogluconanas adicionales, tales como, por ejemplo, condroitinas.
- Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender más de un principio activo adecuado para la indicación particular que se está tratando, por ejemplo, aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Dichos principios activos pueden estar adecuadamente presentes en combinación en cantidades que sean eficaces para el fin previsto.
- En algunas realizaciones, los ingredientes activos pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, tales como, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetylcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (tales como, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.
- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen, por ejemplo, matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen los polipéptidos descritos en el presente documento, matrices que pueden estar en forma de artículos moldeados, tales como, por ejemplo, películas o microcápsulas.
- En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden utilizarse para administración *in vivo* y pueden ser estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.
- Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles, tales como, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, polvos o gránulos. Las composiciones farmacéuticas

también pueden formularse como soluciones, suspensiones, emulsiones o medios mixtos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden formularse como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden formularse como una solución. Por ejemplo, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden administrarse en una solución no tamponada, tal como, por ejemplo, en solución salina o en agua. En algunas realizaciones, los polipéptidos también pueden administrarse en una solución tampón adecuada. Por ejemplo, la solución tampón puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la solución tampón puede ser solución salina tamponada con fosfato (PBS). El pH y la osmolalidad de la solución tampón que contiene los polipéptidos se pueden ajustar para que sea adecuada para su administración a un sujeto.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden formularse como emulsiones. Las emulsiones ilustrativas incluyen sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de nanogotas que normalmente superan los 0,1 µm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas y el fármaco activo que puede estar presente en una solución en la fase acuosa, la fase oleosa o él mismo como una fase separada. También se incluyen microemulsiones como una realización de la presente divulgación. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas también pueden formularse como formulaciones liposomales.

### **III. Métodos de uso**

La presente divulgación incluye usos terapéuticos de los polipéptidos descritos en el presente documento. En un aspecto, se proporciona el uso de los polipéptidos descritos en el presente documento como medicamento. De acuerdo con la invención, los polipéptidos se utilizan en el tratamiento o prevención de una enfermedad metabólica como se enumera en la reivindicación 1.

En una realización, la enfermedad metabólica es la diabetes de tipo II.

El tratamiento de una enfermedad metabólica en un sujeto comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los polipéptidos descritos en el presente documento o de una composición farmacéutica de dicho polipéptido. En determinadas realizaciones, el sujeto puede padecer una enfermedad metabólica o puede estar en riesgo de desarrollar dicha enfermedad. El sujeto es un ser humano. Los métodos y usos descritos en el presente documento pueden comprender además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional.

En el presente documento se divulga un método para reducir el nivel de lípidos en suero, tal como, por ejemplo, el nivel de colesterol total, de triglicéridos totales o de colesterol LDL, en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento o de una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido. El sujeto puede padecer o en riesgo de desarrollar una enfermedad metabólica que implica una desregulación del metabolismo de los lípidos. El sujeto puede padecer o en riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con el colesterol. El sujeto puede padecer o en riesgo de desarrollar hiperlipidemia. El sujeto puede padecer o en riesgo de desarrollar hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la enfermedad metabólica es la diabetes de tipo II.

En el presente documento se divulga un método para reducir el nivel de glucosa en sangre o HbA1c en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento o de una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido. En algunos aspectos, en el presente documento se divulga un método para estabilizar el nivel en suero de la insulina en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento o de una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido. En algunas realizaciones, el sujeto padece o corre riesgo de desarrollar una enfermedad metabólica que implica una desregulación del metabolismo de la glucosa. En algunas realizaciones, el sujeto padece o corre riesgo de desarrollar diabetes. En algunas realizaciones, el sujeto padece o corre riesgo de desarrollar diabetes de tipo II. En algunas realizaciones, el sujeto padece o corre riesgo de desarrollar obesidad.

Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que el polipéptido descrito en el presente documento puede ser capaz de tratar las enfermedades metabólicas o modular el nivel en suero de moléculas asociadas al metabolismo en el sujeto mediante la regulación bidireccional de la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto después de la administración del polipéptido al sujeto. En algunas realizaciones, cuando la concentración del polipéptido descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo de un sujeto al que se le administra dicho polipéptido es

igual o inferior a una determinada concentración, mejora la absorción de ácidos biliares en el sujeto. En algunas realizaciones, cuando la concentración del polipéptido descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo del sujeto está por encima de una determinada concentración, se inhibe la absorción de ácidos biliares en el sujeto. En algunas realizaciones, cuando la concentración del polipéptido descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo de un sujeto al que se le administra dicho polipéptido es igual o inferior a 93 nmol/l, mejora la absorción de ácidos biliares en el sujeto. En algunas realizaciones, cuando la concentración del polipéptido descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo del sujeto es superior a 93 nmol/l, se inhibe la absorción de ácidos biliares en el sujeto. Por ejemplo, cuando la concentración del polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo de un sujeto al que se le ha administrado dicho polipéptido es igual o inferior a 500 ng/ml, mejora la absorción de ácidos biliares en el sujeto. Cuando la concentración del polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo del sujeto es superior a 500 ng/ml, se inhibe la absorción de ácidos biliares en el sujeto. En algunas realizaciones, la concentración en suero del polipéptido descrito en el presente documento se puede medir al menos aproximadamente 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240 o 360 minutos después de la administración. En algunas realizaciones, la concentración en suero del polipéptido descrito en el presente documento es superior a 93 nmol/l en un determinado momento después de la administración. En algunas realizaciones, la concentración en suero del polipéptido descrito en el presente documento es igual o inferior a 93 nmol/l después de ese tiempo tras la administración. Por ejemplo, la concentración en suero del polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento es superior a 500 ng/ml en un determinado momento después de la administración. En algunas realizaciones, la concentración en suero del polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento es igual o inferior a 500 ng/ml después de ese tiempo tras la administración. En algunas realizaciones, dicha concentración en suero umbral del polipéptido se produce aproximadamente 20 minutos después de la administración.

Como se utiliza en el presente documento, una "enfermedad metabólica" o "trastorno metabólico" incluye cualquier enfermedad que se pueda provocar por una desregulación de las vías metabólicas, tal como, por ejemplo, las vías implicadas en el metabolismo de los ácidos biliares, metabolismo de la glucosa, metabolismo de lípidos y metabolismo de aminoácidos.

De acuerdo con el alcance de la invención, la enfermedad se elige entre la hiperglucemia y la diabetes de tipo II.

En el contexto de la invención, la expresión "enfermedad metabólica" incluye diabetes de tipo II e hiperglucemia.

El término "diabetes" se refiere a una enfermedad o afección generalmente caracterizada por defectos metabólicos en la producción y/o utilización de glucosa que dan lugar a la imposibilidad de mantener niveles adecuados de azúcar en sangre en el cuerpo. Los resultados de estos defectos incluyen niveles elevados de glucosa en sangre, denominado "hiperglucemia". Dos formas principales de diabetes son la diabetes de tipo I y la diabetes de tipo II. La diabetes de tipo I suele ser el resultado de una deficiencia absoluta de insulina (por ejemplo, la producción de células β pancreáticas es extremadamente baja o está completamente anulada), por lo que no consigue regular la utilización de glucosa. La diabetes de tipo II a menudo ocurre ante niveles normales o incluso elevados de insulina, y puede ser el resultado de la incapacidad de los tejidos para responder adecuadamente a la insulina. La mayoría de los pacientes diabéticos de tipo II son resistentes a la insulina y tienen una deficiencia relativa de insulina en el sentido de que la secreción de insulina no puede compensar la resistencia de los tejidos periféricos a responder a la insulina.

El término "hiperlipidemia" se refiere a una afección caracterizada por un aumento anormal de los lípidos en suero. Las fracciones de lípidos en la sangre circulante incluyen, por ejemplo, colesterol total, determinadas lipoproteínas y triglicéridos. Las lipoproteínas en suero sirven como transportadores de lípidos en la circulación y se clasifican según su densidad, que incluyen: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad ("VLDL", del inglés *very low density lipoproteins*), lipoproteínas de densidad intermedia ("IDL", del inglés *intermediate density lipoproteins*), lipoproteínas de baja densidad ("LDL", del inglés *low density lipoproteins*) y lipoproteínas de alta densidad ("HDL", del inglés *high density lipoproteins*). El término "hiperlipidemia" abarca la hiperlipidemia primaria y secundaria. La hiperlipidemia primaria suele estar provocada por defectos genéticos, mientras que la hiperlipidemia secundaria suele estar provocada por otros factores, tales como varios cuadros clínicos, medicamentos y factores dietéticos. Por ejemplo, la hiperlipidemia secundaria puede estar provocada por diabetes. Como alternativa, la hiperlipidemia puede deberse a una combinación de causas primarias y secundarias. La hiperlipidemia puede abarcar hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia o una combinación de las mismas. El término "hipertrigliceridemia", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una afección en la cual los niveles en suero totales de triglicéridos están elevados por encima de un nivel deseado. El término "hipercolesterolemia", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una afección en la cual los niveles de colesterol en suero están elevados por encima de un nivel deseado. En determinadas realizaciones, los niveles de colesterol total, colesterol de las HDL ("HDL-C") o colesterol de las LDL ("LDL-C") en suero están elevados por encima del nivel deseado en la hipercolesterolemia. La hiperlipidemia también impone un riesgo y puede abarcar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis. La expresión "enfermedad cardiovascular" abarca una enfermedad de los vasos sanguíneos del sistema circulatorio provocada por concentraciones anormalmente elevadas de lípidos en los vasos. El término "aterosclerosis" se refiere a una enfermedad de las arterias en la que se desarrollan placas de grasa en las paredes internas, con eventual obstrucción del flujo sanguíneo.

En el contexto de la invención, "paciente" y "sujeto" pueden utilizarse indistintamente para referirse a un ser humano

que se está tratando o evaluando por una enfermedad, trastorno o afección, que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o condición, o que tiene o padece una enfermedad, trastorno o condición como se define en la reivindicación 1. Dicha enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad metabólica como se especifica en la reivindicación 1. En una realización, la enfermedad metabólica es la diabetes de tipo II.

5 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de un polipéptido descrito en el presente documento o una composición que comprende dicho polipéptido se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o el tratamiento de un trastorno para cuyo tratamiento el polipéptido o la composición es eficaz. La expresión puede incluir una cantidad del polipéptido descrito en el presente documento que sea eficaz para aumentar el nivel en suero de ácidos biliares en un sujeto que padece una enfermedad metabólica o corre el riesgo de desarrollarla. La expresión puede incluir una cantidad del polipéptido descrito en el presente documento que es eficaz para reducir el nivel de glucosa en sangre o HbA1c o estabilizar el nivel en suero de la insulina en un sujeto que padece una enfermedad metabólica o tiene riesgo de desarrollarla, tal como, por ejemplo, diabetes y obesidad. La expresión también puede incluir una cantidad del polipéptido descrito en el presente documento que es eficaz para reducir el nivel de lípidos en suero, tal como, por ejemplo, el nivel de colesterol total, de triglicéridos totales y de colesterol de las LDL, en un sujeto que padece una enfermedad metabólica o corre el riesgo de desarrollarla, tal como, por ejemplo, hiperlipidemia, incluida hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o ambas. La expresión también incluye una cantidad de un polipéptido descrito en el presente documento que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad metabólica, tal como, por ejemplo, diabetes e hiperlipidemia (por ejemplo, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o ambas), es suficiente para efectuar el tratamiento de la enfermedad, por ejemplo, mediante la disminución, mejora o mantenimiento de la enfermedad existente o uno o más síntomas de la enfermedad, o mediante la inhibición de la progresión de la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" puede variar dependiendo del polipéptido, la vía de administración, la enfermedad y su intensidad, y la salud, la edad, el peso, los antecedentes familiares, los caracteres genéticos, la etapa de los procesos patológicos, los tipos de tratamientos precedentes o simultáneos, en su caso, y otras características individuales del sujeto a tratar.

30 La "cantidad terapéuticamente eficaz" del polipéptido descrito en el presente documento puede permitir que el polipéptido administrado alcance una concentración en el torrente sanguíneo del sujeto en la que el polipéptido sea capaz de inhibir la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento puede permitir que el polipéptido administrado alcance al menos aproximadamente 93 nmol/l en el torrente sanguíneo de un sujeto al que se le administra esa cantidad. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento puede permitir que el polipéptido administrado alcance al menos aproximadamente 500 ng/ml en el torrente sanguíneo de un sujeto al que se le administra esa cantidad.

35 En determinadas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento se refiere a una cantidad tal que las concentraciones en suero del polipéptido administrado permiten la regulación bidireccional de la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP en el sujeto. Por ejemplo, cuando a un sujeto se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento, la concentración en suero inicial del polipéptido en el sujeto puede estar por encima de una determinada concentración en la que el polipéptido inhibe la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP. La concentración en suero del polipéptido en el sujeto puede reducirse gradualmente y caer hasta o por debajo de un valor en el que el polipéptido comienza a mejorar la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP. La concentración en suero del polipéptido administrado se puede evaluar al menos aproximadamente 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240 o 360 minutos después de la administración. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento permite que el polipéptido alcance una concentración en suero superior a 93 nmol/l en un determinado momento después de la administración. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento permite que el polipéptido alcance una concentración en suero igual o inferior a 93 nmol/l después de ese determinado tiempo tras de la administración. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento permite que el polipéptido alcance una concentración en suero superior a 500 ng/ml en un determinado momento después de la administración. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido Cmyr-47 descrito en el presente documento permite que el polipéptido alcance una concentración en suero igual o inferior a 500 ng/ml después de ese determinado tiempo tras de la administración. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito en el presente documento produce dicha concentración en suero umbral del polipéptido aproximadamente 20 minutos después de la administración.

60 En diversas realizaciones, el término "tratamiento" incluye el tratamiento de un sujeto humano para alterar el curso actual del sujeto. El tratamiento incluye, por ejemplo, la administración de un polipéptido descrito en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido, y puede realizarse de forma profiláctica o posterior al inicio de un acontecimiento patológico o al entrar en contacto con un agente etiológico. También se incluyen tratamientos "profilácticos", que pueden estar dirigidos a reducir la tasa de progresión de la enfermedad o afección que se está tratando, retrasar la aparición de esa enfermedad o afección, o reducir la intensidad de su aparición. "Tratamiento" o "profilaxis" no necesariamente indican erradicación completa, cura o prevención de la enfermedad o afección o de los síntomas asociados. En diversas realizaciones, el término "tratamiento" puede incluir aliviar, ralentizar o revertir los procesos o síntomas patológicos en un sujeto que padece una enfermedad metabólica,

tal como, por ejemplo, diabetes e hiperlipidemia (por ejemplo, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o ambas). En algunas realizaciones, el término "tratamiento" puede incluir la mejora de al menos un síntoma o parámetro medible de una enfermedad metabólica. Será evidente para un experto en la materia qué parámetros biológicos y/o fisiológicos se pueden utilizar para acceder al proceso patológico de la enfermedad metabólica. Dichos procesos o síntomas 5 patológicos pueden incluir, por ejemplo, niveles excesivos o aumentados en comparación con sujetos sanos de una o más moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo, tal como, por ejemplo, glucosa, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, ácidos biliares, aminoácidos, hormonas, que incluyen, por ejemplo, insulina, LDL-C, HDL-C, HbA1c, nitrógeno ureico en sangre y minerales; o de uno o más parámetros fisiológicos que miden cambios metabólicos, tal como, por ejemplo, glucemia, tensión arterial, peso corporal, grasa corporal, índice de masa corporal 10 (IMC), inflamación, índice de aterosclerosis (IA), índice cardíaco, índice renal, índice de grasa total e índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA).

El término "administrar" incluye la entrega del polipéptido descrito en el presente documento a un sujeto mediante administración local o sistémica. La administración puede ser tópica (incluida oftálmica y en las mucosas, incluida la 15 administración vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluido mediante nebulizador, intratraqueal, intranasal), epidérmica, transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.

20 En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona el uso de los polipéptidos descritos en el presente documento para modular, tal como, por ejemplo, reducir o estabilizar, el nivel o actividad de una o más moléculas químicas o biológicas asociadas con el metabolismo, tal como, por ejemplo, glucosa, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, ácidos biliares, aminoácidos, hormonas, LDL-C, HDL-C, HbA1c, nitrógeno ureico en sangre y minerales en un sujeto. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona el uso de los polipéptidos descritos en el 25 presente documento para modular, tal como, por ejemplo, reducir o estabilizar, el nivel o valor de uno o más parámetros fisiológicos que miden cambios metabólicos, tales como, por ejemplo, glucemia, tensión arterial, peso corporal, grasa corporal, índice de masa corporal (IMC), inflamación, índice de aterosclerosis (IA), índice cardíaco, índice renal, índice de grasa total e índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA).

30 La invención requiere el uso de los polipéptidos definidos en la reivindicación 1 en un método para tratar o prevenir la hiperglucemia o la diabetes de tipo II. En algunos casos, la presente divulgación proporciona el uso de los polipéptidos descritos en el presente documento para reducir el nivel de lípidos en suero en un sujeto. En algunos casos, la presente divulgación proporciona el uso de los polipéptidos descritos en el presente documento para reducir el nivel de colesterol total en suero en un sujeto. En otros casos, la presente divulgación proporciona el uso de los polipéptidos descritos 35 en el presente documento para reducir el nivel de colesterol de las LDL en suero en un sujeto. En algunos casos, la presente divulgación proporciona el uso de los polipéptidos descritos en el presente documento para reducir el nivel de triglicéridos en suero en un sujeto. En algunos casos, la presente divulgación proporciona el uso de los polipéptidos descritos en el presente documento para reducir el nivel de glucosa en suero en un sujeto. En algunos casos, la presente divulgación proporciona el uso de los polipéptidos descritos en el presente documento para estabilizar el 40 nivel de insulina en suero en un sujeto. De acuerdo con la invención, el sujeto es un ser humano.

En algunos casos, la presente divulgación proporciona el uso de los polipéptidos descritos en el presente documento para reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad metabólica que es diabetes de tipo II o hiperglucemia. Los 45 síntomas o complicaciones asociados con la enfermedad metabólica pueden incluir, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares, tales como ateroesclerosis, cardiopatías, insuficiencia renal u obesidad, en un sujeto que tiene dicha enfermedad metabólica.

La presente divulgación también proporciona métodos para llevar a cabo los usos anteriores de los polipéptidos descritos en el presente documento en un sujeto. Dichos métodos pueden comprender administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido descrito en el presente documento o de una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido. De acuerdo con la invención, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto puede padecer una enfermedad metabólica o puede estar en riesgo de desarrollar dicha enfermedad. 50

55 En determinadas realizaciones, el trastorno tratado puede ser cualquier enfermedad o afección tal como se define en la reivindicación 1 que se pueda mejorar, recuperar, inhibir o prevenir mediante la regulación bidireccional de la actividad de NTCP. En determinadas realizaciones, los trastornos o enfermedades que pueden beneficiarse de la regulación de la ingesta de ácidos biliares por parte de los hepatocitos también pueden tratarse mediante los polipéptidos descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, los sujetos tratables con los polipéptidos y los métodos y usos descritos en el presente documento pueden incluir sujetos indicados para aféresis de las LDL, sujetos con diabetes, sujetos con hiperlipidemia primaria (incluida hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o una combinación de las mismas) que son intolerantes o no están controlados por otro agente terapéutico, y sujetos en riesgo de desarrollar hiperlipidemia que pueden ser tratados de manera preventiva. Otras indicaciones incluyen dislipidemia asociada a causas secundarias, tales como diabetes mellitus de tipo 2, enfermedades colestásicas del hígado (cirrosis biliar primaria), síndrome nefrítico, hipotiroidismo, obesidad y la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, enfermedades ateroescleróticas), enfermedades cardíacas y deterioro 60 65

renal.

En determinadas realizaciones, los métodos y usos descritos en el presente documento pueden comprender además administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En determinadas realizaciones,

- 5 el agente terapéutico adicional puede ser para prevenir y/o tratar una o más enfermedades asociadas con las enfermedades metabólicas descritas en el presente documento, tal como, por ejemplo, una o más enfermedades asociadas con diabetes o hiperlipidemia. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede ser para prevenir y/o tratar enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, enfermedades ateroescleróticas). En determinada realización, el agente terapéutico adicional puede ser para reducir el riesgo de acontecimientos 10 cardiovasculares recurrentes. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede ser para prevenir y/o tratar enfermedades cardíacas, insuficiencia renal u obesidad. Los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden utilizar solos o junto con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento puede administrarse antes, simultáneamente o después de la administración de 15 al menos un agente terapéutico adicional. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede elegirse de, por ejemplo, un agente antihiperlipidémico, un agente antihiperglucemante, un agente antidiabético, un agente contra la obesidad y un análogo de ácidos biliares.

En alguna realización, el agente antihiperglucemante puede elegirse de, por ejemplo, una biduanida (por ejemplo, metformina, fenformina y buformina), insulina (por ejemplo, insulina humana regular, insulina NPH, insulina aspart,

- 20 insulina lispro, insulina glargina, insulina detemir e insulina levemir), un agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1RA; por ejemplo, albiglutida, dulaglutide, exenatida, liraglutida, lixisenatida y glucagón de liberación prolongada), un inhibidor del cotransportador 2 de sodio-glucosa (SGLT2I; por ejemplo, canaglifloicina, empaglifloicina, dapaglifloicina, empaglifloicina e ipraglifloicina), un inhibidor de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4I; por ejemplo, bromocriptina, sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, linagliptina, anagliptina, tenagliptina, alogliptina, treagliptina, 25 gemigliptina, dutagliptina, omarigliptina, berberina y lupeol), un inhibidor de la α-glucosidasa (AGI; por ejemplo, miglitol, acarbosa y voglibosa), una tiazolidinediona (TZD; por ejemplo, pioglitazona, rosiglitazona, lobeglitazona, troglitazona, cigitazona, darglitazona, englitazona, netoglitzona, rivoglitzona y mifepristona), una meglitinida (por ejemplo, repaglinida, nateglinida y mitiglinida), una sulfonilurea (SU; por ejemplo, carbutamida, acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glipicida (glucotrol), gliclacida, glibenclamida, gliburida (por ejemplo, Micronase), glibornurida, 30 gliquidona, glisoxepida, glucopiramida, glimepirida, amarilo y glimiprima), un análogo de amilina (por ejemplo, pramlinitida), un inhibidor de la proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9I; por ejemplo, evolocumab, bococizumab, alirocumab, ID05-IgG2, RG-7652, LY3015014, ARNi terapéutico ALN-PCS02, AMG-145 y REGN727/SAR236553), un activador de glucocinasa (GKA; por ejemplo, MK-0941, RO-28-1675 y AZD1656), un 35 agonista/modulador de PPAR, un antagonista del receptor de glucagón, un antagonista del receptor de quimiocina C-C de tipo 2 (CCR2), un modulador de interleucina-1, un agonista del receptor acoplado a proteína G, un agonista peptídico gastrointestinal distinto del GLP-1, un inhibidor SGLT1 y doble SGLT1/SGLT2 (excluyendo un inhibidor solo SGLT2), un inhibidor de 11beta-HSD1, un inhibidor de la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT)-1, un cannabinoido, un inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) hepática, un agonista del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-21, un antagonista del receptor de glucocorticoides, un inductor de proteína de choque térmico (HSP), un 40 agonista del receptor de melanocortina-4 (MC4R), un antidiabético oral que contiene tetrahidrotriacina, glimina, un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa IB (PTP1B), un activador sirtuini (SIRT1) y un modulador del microbioma.

En alguna realización, el agente terapéutico adicional es un agente antihiperlipidémico y puede elegirse de, por ejemplo, una estatina (por ejemplo, inhibidor de la HMG-CoA reductasa; por ejemplo, simvastatina, atorvastatina,

- 45 rosuvastatina, pravastatina, pitavastatina, lovastatina, atorvastatina, fluvastatina, cerivastatina, mevastatina, pantetina, elastasa y probucol), un ácido fíbrico (por ejemplo, bezafibrato (por ejemplo, Bezalip), ciprofibrato (por ejemplo, Modalim), clofibrato, gemfibrozilo (por ejemplo, Lopid), fenofibrato (por ejemplo, TriCor), clinofibrato (por ejemplo, Lipocin), lifibrato, alufibrado, sinfibrato, clofibrato de etofilina y gemfibrozilo), un ácido nicotínico (por ejemplo, niacina, hexanicotinato de inositol, nicotinamida y acipimox), un secuestrante de ácidos biliares (por ejemplo, colestiramina (por ejemplo, Questran®), colesevelam (por ejemplo, Welchol®), colestipol (por ejemplo, Colestid®), polidexida, dolestiramina y divistiramina), ezetimiba (por ejemplo, Zetia), un inhibidor de la proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9I; por ejemplo, evolocumab, bococizumab, alirocumab, ID05-IgG2, RG-7652, LY3015014, ARNi terapéutico ALN-PCS02, AMG-145 y REGN727/SAR236553), un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTTP); por ejemplo, lomitapida y JTT-130), un inhibidor de la apolipoproteína 50 B (apoB1; por ejemplo, mipomersen (por ejemplo, Kynamro)), un inhibidor de la diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1) (por ejemplo, pradigastat), un inhibidor de la proteína 3 similar a la angiopojetina (por ejemplo, REGN1500), un inhibidor de la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP) (por ejemplo, anacetrapib y evacetrapib), un agonista α/y del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR), un inhibidor de acil-CoA, un inhibidor de los miméticos de incretina, un inhibidor de la proteína similar a la angiopojetina 3 (ANGPTL3), un inhibidor de la 55 proteína similar a la angiopojetina 4 (ANGPTL4), un inhibidor dirigido a apoC-III y un modulador selectivo del receptor activado por proliferador de peroxisomas (SPPARM).

En alguna realización, el agente terapéutico adicional es un agente antiobesidad y puede elegirse de, por ejemplo, orlistat (por ejemplo, Xenical), lorcasirina (por ejemplo, Belviq), fentermina, topiramato, dietilpropión, fendimetracina, benzofetamina y una combinación de fendimetracina y benzofetamina.

En alguna realización, el agente terapéutico adicional es un análogo de ácido biliar y puede elegirse de, por ejemplo, ácido obeticólico, ácido ursodesoxicólico y colilsarcosina.

5 En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional también puede elegirse de, por ejemplo, un agonista del receptor farnesoide X (FXR), un inhibidor de FXR, un agonista del receptor 5 acoplado a proteína G transmembrana (TGR5) y un inhibidor de TGR5.

10 En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede elegirse de insulina, metformina, sitagliptina, colesevelam, glipizida, simvastatina, atorvastatina, ezetimiba, fenofibrato, ácido nicotínico, orlistat, lorcaserina, fentermina, topiramato, ácido obeticólico y ácido ursodesoxicólico.

15 Dichas terapias combinadas descritas en el presente documento pueden abarcar la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración por separado, en cuyo caso, la administración de los polipéptidos descritos en el presente documento puede ocurrir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico adicional.

20 Los polipéptidos descritos en el presente documento (y cualquier agente terapéutico adicional) se pueden administrar por cualquier medio adecuado, incluidos parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea, para tratamiento local o administración intralesional. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden administrarse por vía parenteral. La administración parenteral puede incluir administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden administrarse por vía subcutánea. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden administrarse por vía intravenosa. La dosificación puede realizarse por cualquier vía adecuada, tal como, por ejemplo, mediante inyecciones o infusiones, tal como inyecciones o infusiones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. También se contemplan varios programas de dosificación que incluyen, por ejemplo, administraciones únicas o múltiples a lo largo de varios puntos temporales, administración en bolo e infusión en pulsos.

30 Los polipéptidos descritos en el presente documento se formularían, dosificarían y administrarían de manera coherente con la práctica médica común. Los factores a considerar en este contexto pueden incluir, por ejemplo, el trastorno concreto que se está tratando, el mamífero concreto que se está tratando, la dolencia clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los profesionales sanitarios. Los polipéptidos descritos en el presente documento no necesitan formularse, pero pueden formularse opcionalmente con uno o más agentes utilizados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad del polipéptido descrito en el presente documento presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores comentados anteriormente.

40 Para la prevención o tratamiento de enfermedades, la dosis adecuada de un polipéptido descrito en el presente documento (cuando se utiliza solo o junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales) puede depender del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y curso de la enfermedad, si el polipéptido se administra con fines preventivos o terapéuticos, el tratamiento previo, la anamnesis del paciente y la respuesta al polipéptido, y el criterio del médico tratante. Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden administrarse de manera adecuada al paciente de una sola vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la intensidad de la enfermedad, el polipéptido descrito en el presente documento puede administrarse al paciente, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, el tratamiento puede ser sostenido hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El polipéptido descrito en el presente documento puede administrarse de forma intermitente, por ejemplo, cada día, cada dos días, cada tres días, cada semana, o cada dos o tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de más de una, tal como, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del polipéptido). Puede administrarse una dosis de carga inicial más elevada, seguida de una o más dosis más bajas.

55 En determinadas realizaciones, se puede utilizar una pauta posológica fija para administrar el polipéptido descrito en el presente documento a un sujeto. Sin embargo, otras pautas posológicas también pueden ser útiles dependiendo de los factores comentados anteriormente. El progreso de esta terapia puede controlarse fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales para la enfermedad o afección tratada.

60 Los siguientes ejemplos pueden utilizarse con fines ilustrativos y no deben considerarse que limitan el alcance de la invención.

### Ejemplo 1

#### Ejemplo 1.1. Síntesis de polipéptidos

65 Los polipéptidos, como se muestran en la tabla 1, se sintetizaron de acuerdo con el protocolo Fmoc convencional para

la síntesis de polipéptidos. En general, los restos de aminoácidos individuales se extendieron desde el extremo C al extremo N, partiendo de una resina MBHA. A continuación, el extremo N se modificó mediante miristoilación. Una vez completada la síntesis de péptidos, los polipéptidos se escindieron de la resina mediante una solución de escisión y el extremo C de los polipéptidos se modificó adicionalmente mediante aminación. La resina se eliminó mediante filtración con un embudo de núcleo de arena G6 y el filtrado que contenía los polipéptidos se secó al vacío. El producto polipeptídico se disolvió en agua desionizada y se purificó en un cromatógrafo de líquidos de presión media tipo AKTA explorer 100 equipado con una columna C18. Los máximos principales se recuperaron paso a paso. Las muestras recogidas del máximo diana se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) de fase inversa de tipo Agilent 1100 equipada con una columna C18 para determinar su pureza y se confirmaron mediante espectrometría de masas para determinar sus pesos moleculares. Las soluciones recogidas purificadas mediante cromatografía de líquidos de presión media se liofilizaron para su almacenamiento. Las muestras secas se disolvieron en PBS y después se filtraron a través de una membrana de 0,20 µM. Las reservas de polipéptido disueltas en PBS se almacenaron a -80 °C antes de su uso. En la figura 1A se muestra un gráfico ilustrativo que representa la pureza del polipéptido sintetizado, Cmyr-47, medida mediante HPLC. En la figura 1B se muestra un gráfico ilustrativo que confirma el peso molecular correcto de Cmyr-47 (5398,8 Da) medido mediante espectrometría de masas.

#### Ejemplo 1.2. Ensayo de unión de Cmyr-47 y NTCP

Para demostrar que un polipéptido procedente del VHB puede unirse a NTCP, se trataron varias estirpes celulares que expresaban NTCP con Cmyr-47. Para visualizar Cmyr-47, el polipéptido se marcó con FITC. Debido a que NTCP se expresa altamente en el hígado, para el estudio se prepararon hepatocitos primarios de *Tupaia* y células de la estirpe celular de hepatocitos humanos HepG2. Como se muestra en las figuras 2A y 2B, Cmyr-47 marcado con FITC se une a hepatocitos de dos especies diferentes (Figura 2A que muestra la unión de Cmyr-47 a hepatocitos primarios de *Tupaia*; Figura 2B que representa la unión de Cmyr-47 a células HepG2). Para demostrar que Cmyr-47 se une específicamente a NTCP, se establecieron células L02 que expresan NTCP (NTCP-L02) transfectando el vector que expresa NTCP. Se utilizaron como control negativo células L02 transfectadas con un vector que no expresa NTCP (BLANCO-L02). Como se muestra en la figura 3, Cmyr-47 marcado con FITC se une a las células NTCP-L02, pero no pudo unirse a las células BLANCO-L02. Para confirmar la especificidad de Cmyr-47, se prepararon para el estudio células HEK293, una estirpe celular que no procede del hígado. Se establecieron células HEK293 que expresan NTCP (NTCP-293) transfectando las células con un vector que expresa NTCP. Se utilizaron como control negativo células HEK293 transfectadas con un vector de control que no expresa NTCP (BLANCO-293). Como se muestra en la figura 4, Cmyr-47 marcado con FITC se une a las células NTCP-293, pero no las células BLANCO-293. En cambio, como se esperaba basándose en un hallazgo previo de que un VHB aviar no infecta a los mamíferos (Gripon *et al.*, J. Virol. 79(3): 1613-22 (2005)), un polipéptido de control de 47 restos de aminoácidos procedente de la región pre-S1 del VHB de garza (miristoilada-GLNQSTFNPLGFFPSHQQLDPLFKANAGSADWDKNPNKDPWPQAHDTA-amidada, SEQ ID NO: 49) no logró unirse a las células NTCP-293. Estos resultados demuestran que Cmyr-47 se une específicamente a NTCP.

#### Ejemplo 1.3. Ensayo *in vitro* de ácidos biliares de Cmyr-47

Para estudiar más a fondo el efecto del polipéptido procedente del VHB sobre el transporte de ácidos biliares, se incubaron células NTCP-293 con ácidos biliares marcados con  $^3\text{H}$ -TA (taurocolato). Mediante el uso  $^3\text{H}$ -TA, la cantidad de ácidos biliares absorbidos por las células se puede cuantificar mediante la medición del nivel de radiactividad de las células. Dado que las células HEK293 no son capaces de absorber ácidos biliares sin expresión de NTCP, cualquier ácido biliar absorbido por las células NTCP-293 puede contribuir al NTCP. Se añadieron simultáneamente TA a 10 µmol/l (marcado radiactivamente como  $^3\text{H}$ -TA a 0,5 µCi/ml) y cantidades crecientes de Cmyr-47 a las células cultivadas durante 10 minutos. Se utilizó ciclosporina A (CsA), conocida por inhibir el transporte de ácidos biliares, como control positivo a una concentración de 50 µM. Como se muestra en la figura 5A, en comparación con las células BLANCO-293, las células NTCP-293 fueron capaces de absorber una cantidad significativa de ácidos biliares. Cuando las células NTCP-293 se trataron con Cmyr-47, la absorción de ácidos biliares se reguló bidireccionalmente a diferentes concentraciones de Cmyr-47. Como se muestra en la figura 5B, Cmyr-47 mejoró el transporte mediado por NTCP de ácidos biliares a los hepatocitos en una concentración igual o inferior a 500 ng/ml, mientras que Cmyr-47 redujo significativamente la absorción de TA a una concentración superior a 500 ng/ml. Cabe destacar que, 62,5 ng/ml de Cmyr-47 aumentaron la absorción de TA en más de un 50 %, mientras que 2 µg/ml de Cmyr-47 inhibieron de manera eficaz la absorción de ácidos biliares en comparación con el control positivo, CsA. En función del estudio de dosis creciente que se muestra en la figura 5B, se determinó que Cmyr-47 tenía un valor de  $\text{IC}_{50}$  de 0,15 µM para bloquear el transporte de ácidos biliares.

En contraste con la regulación bidireccional del transporte mediado por NTCP de ácidos biliares mediante Cmyr-47, la CsA indujo una inhibición unidireccional de la absorción de TA (Figuras 5C y 5D). La CsA no mejoró el transporte de TA mediado por NTCP ni a una concentración baja de 10 ng/ml ni a una concentración elevada de 100 µg/ml. En función del estudio de dosis creciente que se muestra en la figura 5D, el valor de  $\text{IC}_{50}$  calculado de CsA para inhibir el transporte de ácidos biliares fue de 3,05 µM.

**Ejemplo 1.4. Ensayo *in vitro* de ácidos biliares de polipéptidos adicionales procedentes del VHB**

Para analizar más a fondo el efecto bidireccional de los polipéptidos procedentes del VHB sobre la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP, se probaron dos concentraciones diferentes (62,5 ng/ml como concentración baja representativa y 1 µg/ml como concentración elevada representativa) de Cmyr-47 y otros polipéptidos procedentes del VHB en el ensayo *in vitro* de ácidos biliares siguiendo el protocolo descrito anteriormente. También se probaron para comparar dos tratamientos de control, CsA y quinidina. La quinidina es un agente antiarrítmico de clase I y previamente se demostró que mejora la absorción de TA mediada por NTCP (véase Kim *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 291(3): 1204-09 (1999)). CsA y quinidina se adquirieron de Sigma-Aldrich (Sigma-30024 y Sigma-Q3625, respectivamente).

Como se muestra en la figura 5E, la CsA a 100 ng/ml no tuvo ningún efecto significativo en la absorción de TA, mientras que la quinidina mejoró la absorción de TA a 0,1 µmol/l. Los polipéptidos procedentes del VHB enumerados en la tabla 1 (Cmyr-60, Cmyr-55, Cmyr-47, Cmyr-40, Cmyr-35, Cmyr-30, Cmyr-25, Cmyr-20, Cmyr-47+(-10), Cmyr-47+(-9), Cplam-47, Cstea-47, Cchol-47, Amyr-47, Bmyr-47, Dmyr-47, Emyr-47, Fmyr-47, Gmyr-47 o Hmyr-47) mejoraron la absorción de TA a una baja concentración molar equivalente a 62,5 ng/ml (11,58 nmol/l) de Cmyr-47, lo que confirma que los polipéptidos procedentes del VHB son capaces de mejorar la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP a una concentración baja.

En cambio, cuando los polipéptidos procedentes del VHB (Cmyr-60, Cmyr-55, Cmyr-47, Cmyr-40, Cmyr-35, Cmyr-30, Cmyr-25, Cmyr-20, Cmyr-47+(-10), Cmyr-47+(-9), Cplam-47, Cstea-47, Cchol-47, Amyr-47, Bmyr-47, Dmyr-47, Emyr-47, Fmyr-47, Gmyr-47 o Hmyr-47) se probaron a una concentración molar superior equivalente a 1 µg/ml (185,23 nmol/l) de Cmyr-47, todos los polipéptidos inhibieron de manera eficaz la absorción de TA (Figura 5F), lo que confirma que los polipéptidos procedentes del VHB son capaces de inhibir la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP a una determinada concentración elevada. Con fines comparativos, la CsA a 50 µg/ml inhibió la absorción de TA, mientras que la quinidina a 20 µmol/l mejoró la absorción de TA. Estos resultados confirman que los polipéptidos procedentes del VHB son capaces de regular bidireccionalmente la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP de una manera dependiente de la dosis.

**Ejemplo 2****Ejemplo 2.1. Análisis de toxicidad y ácidos biliares, colesterol total, triglicéridos y glucemia de ratas tratadas con Cmyr-47**

Para determinar la toxicidad de Cmyr-47 y confirmar que Cmyr-47 puede regular la absorción de ácidos biliares *in vivo*, 190 ratas Sprague Dawley, con igual número de machos y hembras, se sometieron a una prueba de toxicidad crónica durante 6 meses. A cada rata se le inyectó por vía subcutánea diariamente PBS como control o Cmyr-47 a 1, 3 o 9 mg/kg durante 180 días. El esquema experimental se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Esquema de diseño experimental de una prueba de toxicidad crónica de 180 días en ratas

Grupo	Dosis/inyección (mg•kg <sup>-1</sup> )	Concentración (mg•ml <sup>-1</sup> )	Dosis clínica equivalente multiplicada por	Número de ratas (n)	
				♀	♂
I. Control	0	0	0	20	20
II. Dosis baja	1	0,4	2,3	20+5	20+5
III. Dosis media	3	1,2	7,0	20+5	20+5
IV. Dosis alta	9	3,6	20,9	20+5	20+5

Al final del experimento, se recogió una muestra de sangre de cada rata mediante sangrado de la cola. Los sueros de las muestras de sangre se separaron adicionalmente mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos. Despues, las muestras de suero se analizaron con un kit de ensayo de ácidos biliares totales (Instituto de Bioingeniería Nanjing Jiancheng) para determinar el nivel de ácidos biliares totales (ABT). Como se muestra en las tablas 3 y 4, las ratas tanto hembras como los machos tratadas con Cmyr-47 mostraron un mayor nivel de ácidos biliares totales en el suero en comparación con el grupo de control, lo que indica que Cmyr-47 es capaz de bloquear de manera eficaz la absorción de ácidos biliares *in vivo*. El aumento de los ácidos biliares totales dependió de la dosis.

# ES 2 979 305 T3

Tabla 3. Concentraciones en suero de ABT de la prueba de toxicidad crónica de 180 días en ratas (Machos,  $\mu\text{M/l}$ )

Grupo	N	Media	Intervalo de confianza del 95 % para la media					
			Desviación estándar	Error estándar	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
Control	10	7,920	3,5401	1,5832	3,524	12,316	5,2	14,0
Dosis baja	10	15,480	6,5975	2,9505	7,288	23,672	9,5	23,6
Dosis media	10	17,240	8,3575	3,7376	6,863	27,617	11,1	30,9
Dosis alta	10	20,640	11,5881	5,1823	6,252	35,028	13,5	41,2

Tabla 4. Concentraciones en suero de ABT en una prueba de toxicidad crónica de 180 días en ratas (Hembras,  $\mu\text{M/l}$ )

Grupo	N	Media	Intervalo de confianza del 95 % para la media					
			Desviación estándar	Error estándar	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
Control	10	13,180	3,4354	1,5364	8,914	17,446	7,8	16,8
Dosis baja	10	16,460	5,1189	2,2892	10,104	22,816	11,1	22,5
Dosis media	10	21,860	7,5477	3,3754	12,488	31,232	12,9	32,7
Dosis alta	10	26,800	15,4932	6,9288	7,563	46,037	13,8	51,0

## Ejemplo 2.2. Colesterol total, triglicéridos y glucemia de ratas tratadas con Cmyr-47

Los niveles de colesterol total (CT), triglicéridos (TG) y de glucemia (GLU) de cada animal analizado en el ejemplo 2.1 se resumen en las tablas 5 y 6. Como se muestra en las tablas 5 y 6, la dosis baja, la dosis media o la dosis alta de Cmyr-47 no tuvieron ningún efecto significativo en el CT, los TG o la GLU en suero, en comparación con el grupo de control (todos los valores de  $P > 0,05$ ). Por lo tanto, Cmyr-47 no afecta los niveles normales de CT, TG o GLU en suero en condiciones fisiológicas.

Tabla 5. Concentraciones en suero de CT, TG y GLU de la prueba de toxicidad crónica de 180 días en ratas (Machos,  $\text{mmol/l}$ ,  $\bar{x} \pm \text{EEM}$ )

Grupo	n	CT	TG	GLU
Control	10	1,62±0,37	0,56±0,20	7,15±1,74
Dosis baja	10	1,58±0,21	0,61±0,26	6,89±1,24
dosis media	10	1,51±0,18	0,49±0,18	6,76±1,05
Dosis alta	10	1,58±0,33	0,56±0,26	6,69±0,53

Nota: en comparación con el grupo de control normal,  $^{\#}P < 0,05$ ,  $^{##}P < 0,01$ ; en comparación con el grupo de control modelo,  $^{*}P < 0,05$ ,  $^{**}P < 0,01$

Tabla 6. Concentraciones en suero de CT, TG y GLU de la prueba de toxicidad crónica de 180 días en ratas  
(Hembras, mmol/l,  $\bar{x} \pm EEM$ )

Grupo	n	CT	TG	GLU
Control	10	2,28±0,54	0,78±0,25	6,41±0,38
Dosis baja	10	1,97±0,36	0,68±0,33	6,34±0,55
dosis media	10	1,98±0,49	0,75±0,29	6,17±0,69
Dosis alta	10	1,80±0,50	0,56±0,21	6,11±0,42

Nota: en comparación con el grupo de control normal,  $^{\#}P < 0,05$ ,  $^{##}P < 0,01$ , en comparación con el grupo de control modelo,  $^{*}P < 0,05$ ,  $^{**}P < 0,01$

5 **Ejemplo 2.3. Análisis de toxicidad y ácidos biliares, colesterol total, triglicéridos y glucemia de perros tratados con Cmyr-47**

10 Para determinar adicionalmente la toxicidad de Cmyr-47 y confirmar si Cmyr-47 puede regular la absorción de ácidos biliares *in vivo*, 56 perros Beagle, con igual número de machos que de hembras, se sometieron a una prueba de toxicidad crónica de 9 meses. A cada perro se le inyectó por vía subcutánea diariamente PBS como control o Cmyr-47 a 0,25, 0,75 o 2 mg/kg por inyección durante 270 días. El esquema experimental se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Esquema de diseño experimental de una prueba de toxicidad crónica de 270 días en perros

Grupo	Dosis/inyección (mg·kg <sup>-1</sup> )	Dosis clínica equivalente multiplicada por	Número de perros (n)	
			♀	♂
I. Control	0	0	7	7
II. Dosis baja	0,25	2	7	7
III. Dosis media	0,75	6	7	7
IV. Dosis alta	2	16	7	7

15 Al final del experimento, se recogió una muestra de sangre de cada perro mediante punción venosa y se separó el suero de las muestras de sangre recogidas como se describe anteriormente. A continuación, se analizaron las muestras de suero para determinar la concentración de los niveles totales de ácidos biliares como se describió anteriormente. Como se muestra en la tabla 8, Cmyr-47 aumentó el nivel en suero de ácidos biliares totales en perros de manera dosis dependiente en comparación con el grupo de control. Los niveles de colesterol total (CT), triglicéridos (TG) y de la glucemia (GLU) de cada animal se resumen en la tabla 9. Como se muestra en la tabla 9, la dosis baja, la dosis media o la dosis alta de Cmyr-47 no tuvieron ningún efecto significativo en el CT, los TG o la GLU en suero, en comparación con el grupo de control (todos los valores de  $P > 0,05$ ). Por lo tanto, Cmyr-47 no afecta los niveles normales de CT, TG o GLU en suero en condiciones fisiológicas.

20 25 Tabla 8. Concentración en suero de ABT de la prueba de toxicidad crónica de 270 días de duración en perros para la detección en fases del día 91 ( $\mu\text{M/l}$ )

Género	N. <sup>o</sup> de animal	Grupo			
		control	Dosis baja	Dosis media	Dosis alta
	1	2,6	3,2	2,4	2,1
	2	1,2	3,7	1,0	1,1

(continuación)

Género	N.º de animal	Grupo			
		control	Dosis baja	Dosis media	Dosis alta
Hembra	3	1,0	7,8	1,0	20,4
	4	0,9	2,2	1,8	13,2
	5	1,0	2,3	4,1	4,2
	6	2,1	22,3	2,3	1,4
	7	1,6	3,0	2,9	7,3
Macho	8	1,4	1,8	1,9	1,2
	9	1,7	1,7	2,1	1,7
	10	1,4	3,2	3,7	3,0
	11	0,8	2,9	1,2	1,3
	12	1,3	1,6	2,4	3,0
	13	0,8	1,1	15,3	5,9
	14	1,9	1,2	2,1	2,4
	$\bar{x} \pm S$	1,41±0,53	4,14±5,48	3,16±3,61	4,87±5,56
Valor de <i>P</i>		-	0,086	0,084	0,037

Tabla 9. Concentración en suero de CT, TG y GLU de la prueba de toxicidad crónica de 270 días de duración en perros para la detección en fases del día 91 (mmol/l,  $\bar{x} \pm EEM$ )

Grupo	n	CT	TG	GLU
Control	14	2,93±0,66	0,39±0,08	4,50±0,68
Dosis baja	14	3,07±0,44	0,49±0,13	4,26±0,51
dosis media	14	3,20±0,61	0,45±0,10	4,52±0,41
Dosis alta	14	3,16±0,36	0,46±0,12	4,69±0,41

5 Nota: en comparación con el grupo de control normal,  $^{\#}P < 0,05$ ,  $^{##}P < 0,01$ ; en comparación con el grupo de control modelo,  $^{*}P < 0,05$ ,  $^{**}P < 0,01$

#### Ejemplo 2.4. Análisis farmacocinético de perros tratados con Cmyr-47

- 10 Cincuenta y seis perros Beagle, con igual número de machos que de hembras, se sometieron a una prueba de toxicidad crónica de 1 meses. A cada perro se le inyectó por vía subcutánea cada día PBS como control o Cmyr-47 a 0,4, 1,2 o 3,6 mg/kg por inyección durante 30 días. El esquema experimental se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Esquema de diseño experimental de análisis farmacocinético en perros

Grupo	Dosis/inyección (mg·kg <sup>-1</sup> )	Número de perros (n)	
		♀	♂
I.	Control	0	3
II.	Dosis baja	0,4	3
III.	Dosis media	1,2	3
IV.	Dosis alta	3,6	3

Durante el experimento, se recogieron muestras de sangre de cada perro mediante punción venosa a los 0, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 1440 minutos después de la primera dosis y la última dosis. El suero de las muestras de sangre recogidas se separó como se describe anteriormente. A continuación, se analizaron las muestras de suero para determinar la concentración de Cmyr-47 mediante radioinmunoensayo (RIA) utilizando el anticuerpo anti-PreS1 125E11 (Wei *et al.*, Clínica. Chimica. Acta. 317:159-69 (2002)). Las tablas 11 a 13 muestran las concentraciones en suero de cada animal al que se le administraron 0,4, 1,2 o 3,6 mg/kg, respectivamente. Como se muestra en la tabla 13, los perros a los que se les administró 3,6 mg/kg de Cmyr-47 toleraron bien la dosis y no se observó toxicidad grave. La concentración máxima (es decir,  $C_{\text{máx}}$ ) de Cmyr-47 en el torrente sanguíneo se alcanzó a los 20 minutos (es decir,  $T_{\text{máx}}$ ) después de la administración. Una  $C_{\text{máx}}$  se refiere a la concentración en suero máxima que alcanza un fármaco después de una dosis. Un  $T_{\text{máx}}$  se refiere al momento en que la  $C_{\text{máx}}$  es observada. Como se muestra en la tabla 13, por ejemplo, la dosis más alta de Cmyr-47 pudo alcanzar la  $C_{\text{máx}}$  superior a 500 ng/ml a los 20 minutos, lo que indica que el  $T_{\text{máx}}$  de Cmyr-47 es de aproximadamente 20 minutos en esta condición de prueba. Como se muestra en las tablas 11 a 13, sólo la dosis más alta, 3,6 mg/kg, fue capaz de alcanzar la concentración máxima por encima de 500 ng/ml.

Tabla 11. La concentración en suero de Cmyr-47 en perros Beagle con 0,4 mg·kg<sup>-1</sup> s.c.

Tiempo después de la dosis	Concentración en suero de Cmyr-47 (ng·ml <sup>-1</sup> )							Media ± DE	% de cv
	min	L7	L8	L9	L10	L11	L12		
PRIMERA DOSIS	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
	10	86,9	91,3	82,7	103,1	126,5	123,2	102,3±18,8	18,4
	20	165,2	142,7	116,7	162,1	155,8	137,2	146,6±18,3	12,5
	40	108,9	100,0	78,6	112,2	97,4	108,4	100,9±12,3	12,2
	60	50,5	60,2	48,1	62,0	47,5	69,5	56,3±8,9	15,9
	90	34,6	31,1	37,4	32,3	36,4	30,3	33,7±2,9	8,7
	120	23,3	21,6	24,4	21,6	24,2	19,7	22,5±1,8	8,1
	180	11,6	12,9	13,3	11,1	10,9	13,9	12,3±1,2	10,1
	240	2,4	1,5	2,3	2,0	2,6	1,9	2,1±0,4	17,7
	360	0,62	0,59	0,33	0,43	0,31	0,72	0,50±0,17	33,7
	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

# ES 2 979 305 T3

(continuación)

Tiempo después de la dosis	Concentración en suero de Cmyr-47 (ng·ml <sup>-1</sup> )							Media ± DE	% de cv
	min	L7	L8	L9	L10	L11	L12		
ÚLTIMA DOSIS	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
	10	98,8	76,5	81,0	75,3	124,3	78,9	89,1±19,2	21,6
	20	139,0	127,3	134,0	180,1	146,5	117,7	140,8±21,7	15,4
	40	95,6	112,2	90,4	100,8	137,2	96,3	105,4±17,2	16,3
	60	59,0	47,5	56,9	50,7	56,8	58,9	55,0±4,8	8,6
	90	45,0	24,8	22,7	25,8	38,5	29,9	31,1±8,8	28,4
	120	20,9	21,6	26,0	19,4	25,8	17,4	21,8±3,5	15,8
	180	14,3	9,9	13,2	8,7	8,2	10,9	10,8±2,5	22,7
	240	2,3	2,0	2,9	2,9	2,7	2,0	2,5±0,4	16,8
	360	0,59	0,53	0,34	0,39	0,35	0,61	0,47±0,12	26,3
	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

Nota: ND=no detectable

Tabla 12. La concentración en suero de Cmyr-47 en perros Beagle con 1,2 mg·kg<sup>-1</sup> s.c.

Tiempo después de la dosis	Concentración en suero de Cmyr-47 (ng·ml <sup>-1</sup> )							Media ± DE	% de cv
	min	M13	M14	M15	M16	M17	M18		
PRIMERA DOSIS	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
	10	289,9	340,3	249,3	374,1	272,9	327,2	308,9±46,4	15,0
	20	433,6	450,2	365,0	540,9	457,4	422,1	444,9±57,3	12,9
	40	333,9	323,0	259,9	314,9	287,1	292,8	302,0±27,2	9,0
	60	140,9	166,6	180,7	127,3	123,3	198,5	156,2±30,5	19,5
	90	90,6	108,9	113,2	82,4	78,9	122,6	99,4±17,9	18,0
	120	57,2	67,4	54,3	70,9	50,2	61,0	60,2±7,9	13,1
	180	41,8	35,2	31,6	38,6	33,9	49,0	38,3±6,4	16,6
	240	5,6	2,2	7,0	7,9	4,5	6,6	5,6±2,1	36,7
	360	2,0	1,6	1,8	2,2	1,6	1,9	1,8±0,2	13,5
	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

# ES 2 979 305 T3

(continuación)

Tiempo después de la dosis	Concentración en suero de Cmyr-47 (ng·ml <sup>-1</sup> )							Media ± DE	% de CV
	min	M13	M14	M15	M16	M17	M18		
ÚLTIMA DOSIS	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
	10	300,6	301,8	235,7	335,3	305,4	344,9	304,0±38,3	12,6
	20	374,1	418,2	327,2	492,8	407,6	392,8	402,1±54,8	13,6
	40	300,9	279,6	235,7	283,7	266,3	259,9	271,0±22,4	8,3
	60	128,1	149,5	162,1	112,5	109,0	170,9	138,7±26,0	18,8
	90	79,1	90,9	90,5	71,6	68,6	108,3	84,8±14,8	17,4
	120	51,0	59,9	48,3	63,4	45,0	54,3	53,6±7,0	13,1
	180	37,4	30,5	27,2	34,8	29,0	41,8	33,4±5,6	16,7
	240	3,3	4,7	5,7	6,9	5,1	4,5	5,0±1,2	23,7
	360	1,7	1,4	1,6	2,0	1,4	1,7	1,6±0,2	13,4
	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

Nota: ND=no detectable

Tabla 13. La concentración en suero de Cmyr-47 en perros Beagle con 3,6 mg·kg<sup>-1</sup> s.c.

Tiempo después de la dosis	Concentración en suero de Cmyr-47 (ng·ml <sup>-1</sup> )							Media ± DE	% de CV
	min	H19	H20	H21	H22	H23	H24		
PRIMERA DOSIS	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
	10	617,8	510,6	739,4	542,7	569,9	697,1	612,9±89,8	14,7
	20	958,4	739,4	698,7	1117,3	1206,0	849,6	928,2±204,1	22,0
	40	810,7	620,0	739,4	646,3	840,6	543,6	700,1±116,0	16,6
	60	305,4	344,9	340,4	382,7	425,0	286,4	347,5±50,6	14,6
	90	218,9	237,5	262,8	201,9	190,3	187,4	216,5±29,5	13,6
	120	132,9	109,0	156,0	117,0	148,5	90,7	125,7±24,8	19,7
	180	68,5	44,5	83,2	56,9	75,4	66,0	65,8±13,7	20,8
	240	12,8	16,2	11,2	15,0	10,1	13,2	13,1±2,3	17,4
	360	3,1	3,3	2,6	3,5	3,0	3,1	3,1±0,3	9,6
	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

(continuación)

Tiempo después de la dosis	Concentración en suero de Cmyr-47 (ng·ml <sup>-1</sup> )							Media ± DE	% de CV
	min	H19	H20	H21	H22	H23	H24		
ÚLTIMA DOSIS	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
	10	543,6	433,2	635,1	490,3	501,2	588,1	531,9±72,6	13,6
	20	874,7	673,9	620,0	921,7	1129,9	746,1	827,7±187,5	22,7
	40	730,7	545,5	674,4	562,1	746,4	493,1	625,4±105,9	16,9
	60	272,3	293,4	272,8	343,2	394,0	252,8	304,7±53,6	17,6
	90	195,9	209,4	236,5	173,7	197,5	166,2	196,5±25,3	12,9
	120	112,5	92,2	132,9	104,5	127,9	97,2	111,2±16,4	14,8
	180	53,6	25,9	72,2	56,0	70,3	53,6	55,3±16,7	30,1
	240	10,9	13,8	10,0	13,2	8,6	11,7	11,4±1,9	17,0
	360	2,4	3,6	2,4	3,2	3,2	2,8	2,9±0,5	16,3
	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

Nota: ND=no detectable

**Ejemplo 3**

- 5                   **Ejemplo 3.1. Métodos y materiales en el tratamiento del modelo de hámster dorado hiperlipidémico con Cmyr-47**
- 10                  Para analizar los efectos *in vivo* de Cmyr-47 en el metabolismo de los lípidos, se estableció un modelo de hámster dorado hiperlipidémico alimentando a los hámsteres con una dieta rica en grasas durante 2 semanas (después de una alimentación adaptativa durante 10 días). Se compraron hámsteres dorados machos ( $N = 70$ , de 90 a 110 g) en Beijing Vital River (SCXK (Jing) 2012-0001) con el certificado de calidad animal número 11400700093338. Los animales se alojaron a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  con un 50-70 % de humedad en un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas (150-200 Lx), en una habitación con ruido controlado (<50 dB) en el Zhejiang Traditional Chinese Medicine University Animal Experimental Research Center (SYXK (Zhe) 2013-0184). La composición de la dieta rica en grasas incluía 1,25 % de colesterol y 20,06 % de grasa (aceite de soja 2,79 %, manteca de cacao 17,27 %) y la dieta se compró en Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ) y se almacenó a 4 °C. Como control normal no hiperlipidémico ("un grupo de control normal"), se alimentó a un grupo de hámsteres dorados con una dieta regular. Se utilizó un pellet nutricional completo para ratas como dieta normal después de la esterilización con irradiación de  $^{60}\text{Co}$ . Los animales recibieron agua del grifo filtrada y esterilizada a demanda. Toda la comida estaba disponible a demanda y los animales se alojaron de 4 a 5 por jaula. El peso y el consumo de alimentos de cada hámster alimentado con la dieta rica en grasas se controlaron semanalmente. Todos los animales se trataron de forma humanitaria y se tuvo cuidado de minimizar el dolor y el sufrimiento de acuerdo con el principio de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento).
- 20                  Despues de 2 semanas de tratamiento con una dieta rica en grasas, el fenotipo hiperlipidémico de los hámsteres se confirmó cuando los animales tenían niveles en suero de colesterol total (CT) superiores a 10 mmol/l. Un total de 40 hámsteres hiperlipidémicos se estratificaron aleatoriamente en 5 grupos ( $N = 8/\text{grupo}$ ): un grupo de control modelo (10 ml/kg de PBS, administración subcutánea (s.c.)), un grupo de control de tratamiento positivo (fenofibrato, 50 mg/kg/día, administración intragástrica peroral (p.o.)), un grupo de tratamiento de dosis baja (Cmyr-47, 10 mg/kg/día, s.c.), un grupo de tratamiento con dosis altas (30 mg/kg/día de Cmyr-47, s.c.) y un grupo de tratamiento con CsA (CsA, 5 mg/kg/día, p.o.). Se utilizaron 10 hámsteres alimentados con la dieta normal como grupo de control normal (10 ml/kg de PBS, s.c.).
- 30                  Siguiendo el protocolo descrito anteriormente, Cmyr-47 se sintetizó como un polvo blanco por HEP Pharmaceutical (Shanghai, China; número de lote: 14011801). Para cada tratamiento, Cmyr-47 se preparó fresco en PBS y se utilizó inmediatamente después de la preparación. El PBS se preparó mediante la formulación de una solución de PB 20× ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (64,4652 g) y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3,1202 g) en agua hasta 500 ml). A continuación, se mezclaron 1 volumen de PB 20×, 4 volúmenes de agua pura y 15 volúmenes de solución salina normal al 0,9 % para obtener PBS para disolver el fármaco de prueba. El fenofibrato (FENO) del comprimido de Fenolip utilizado como control positivo

en este estudio se adquirió de Laboratoires FOURNIER S.A. CsA (Sandimmune®) se adquirió de Novartis.

El PBS, Cmyr-47, FENO y CsA se administraron respectivamente durante 4 semanas consecutivas. Durante el experimento, todos los animales en el grupo de control modelo, el grupo de dosis baja y alta y el grupo de control positivo fueron alimentados con la dieta rica en grasas, mientras que el grupo de control normal fue alimentado con la dieta normal. Se inyectó por vía subcutánea Cmyr-47 o PBS a los hámsteres dos veces al día (de 9:00 a 10:00 de la mañana y de 16:00 a 17:00 de la tarde). A un grupo de control de tratamiento positivo se le proporcionó FENO mediante administración intragástrica peroral. El grupo de tratamiento con CsA recibió CsA mediante administración intragástrica peroral. Cada mañana se controló el consumo de alimentos y agua, las heces y el aseo de los animales. Todos los animales se pesaron semanalmente.

Después de 2 semanas de tratamiento, se midieron los niveles en suero de CT y triglicéridos (TG) de todos los animales. Después de 4 semanas de tratamiento, se midieron los niveles en suero de CT, TG, LDL-C y HDL-C de todos los animales. Antes de la medición, todos los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 h con acceso a agua antes de la extracción de sangre. Se obtuvo una muestra de sangre (0,3 ml) de cada animal a través del plexo retroorbitario y los sueros de las muestras se aislaron adicionalmente mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos. Los kits para medir lípidos se adquirieron en Shenneng DESAY Diagnostic Technology Co. Ltd. (Shanghai, China) y todas las mediciones se realizaron siguiendo los protocolos del fabricante. Para las mediciones se utilizó el analizador bioquímico automático 7020. Se calculó un índice de ateroesclerosis (IA) de cada animal siguiendo la fórmula de IA = (CT - HDL-C)/HDL-C. El IA se considera uno de los indicadores más fiables de un mayor riesgo de desarrollar ateroesclerosis.

Se utilizó una báscula electrónica SQP de Sartorius Scientific Instruments Co., Ltd. (Beijing, China), al igual que una cámara esterilizadora de alta presión MLS-3750 de Sanyo Company (Japón). Un sistema de agua ultrapura RO-MB-50 era de Yongjieda Purification Technology Co. Ltd. (Hangzhou, Zhejiang, China). El ultrasonido KQ-300DE se adquirió de Kunshan Ultrasonic Instrument Co., Ltd. (Kunshan, Jiangsu, China) y un analizador bioquímico automático Hitachi 7020 de Hitachi Ltd. (Japón). La máquina ELISA multifuncional era de Thermo Fisher Scientific Inc. (EE. UU.).

Se utilizó el programa informático SPSS19.0 para analizar los datos, expresados como media ± desviación estándar o media ± EEM. Se utilizó el análisis de varianza ANOVA para evaluar los datos de los resultados de la prueba. Se utilizó la prueba LSD para comparaciones por pares. Los valores de los análisis estadísticos se redondearon a 2 decimales.

### Ejemplo 3.2. Efecto de Cmyr-47 y polipéptidos adicionales procedentes del VHB en el colesterol total (CT) en suero

Como se muestra en la tabla 14 y la figura 6, los niveles en suero de CT en los controles modelo fueron significativamente más elevados que los de los controles normales durante el experimento, lo que confirma que los animales alimentados con la dieta rica en grasas eran hiperlipidémicos (todos los valores de P <0,01). La administración de FENO redujo significativamente los niveles en suero de CT en comparación con el grupo de control modelo (todos los valores de P inferiores a 0,01). Los animales hiperlipidémicos tratados con Cmyr-47 también mostraron niveles en suero de CT más bajos que el grupo de control modelo, y el efecto de Cmyr-47 dependió de la dosis. En cambio, los animales hiperlipidémicos tratados con CsA mostraron niveles en suero de CT significativamente elevados en comparación con el grupo de control modelo.

Tabla 14. Efecto de Cmyr-47 en el CT en suero (mmol/l,  $\bar{x} \pm S$ )

Grupo	Dosis/inyección	n	Antes de la dosificación	Nivel de CT después de semanas de dosificación	
				2s	4s
Control normal	10 ml/kg PBS	10	4,25±0,41	4,09±0,34	4,39±0,43
Control modelo	10 ml/kg PBS	8	11,12±0,47##	19,67±4,05##	19,58±4,72##
Control positivo	50 mg/kg FENO	8	11,34±0,50	6,63±4,40**	7,42±1,70**
Dosis baja	10 mg/kg Cmyr-47	8	11,10±0,44	15,53±4,51*	16,00±5,17*
Dosis alta	30 mg/kg Cmyr-47	8	11,10±0,46	12,67±2,98**	11,54±1,67**
Tratamiento con CsA	5 mg/kg CsA	8	11,24±0,40	22,53±2,50	24,46±3,35*

Nota: en comparación con el grupo de control normal, \*P <0,05, \*\*P <0,01; en comparación con el grupo de control modelo, \*P <0,05, \*\*P <0,01

También se probaron polipéptidos adicionales procedentes del VHB enumerados en la tabla 1 para confirmar sus

efectos sobre el CT en suero *in vivo*. El experimento se realizó siguiendo el mismo protocolo experimental descrito anteriormente. Todo el polipéptido se administró a una dosis molar equivalente a 30 mg/kg/día de Cmyr-47.

Las figuras 7A y 7B confirmaron que los animales alimentados con la dieta rica en grasas eran hiperlipidémicos (compárense los niveles en suero de CT de los controles normales y los controles modelo). Como se mostró anteriormente, FENO fue capaz de disminuir los niveles en suero de CT en los animales. En la semana 4, los animales tratados con otros péptidos procedentes del VHB (Cmyr-60, Cmyr-55, Cmyr-40, Cmyr-35, Cmyr-30, Cmyr-25, Cmyr-20, Cmyr-47+(-10), Cmyr-47+(-9), Cplam-47, Cstea-47, Cchol-47, Amyr-47, Bmyr-47, Dmyr-47, Emry-47, Fmyr-47, Gmyr-47 o Hmyr-47) también mostraron niveles en suero de CT más bajos que los de los controles modelo.

#### 10 Ejemplo 3.3. Efecto de Cmyr-47 y polipéptidos adicionales procedentes del VHB en los triglicéridos (TG) en suero

Como se muestra en la tabla 15 y la figura 8, los niveles en suero de TG en los controles modelo fueron significativamente más elevados que los controles normales durante el experimento (todos los valores de P <0,01). Las mediciones en las semanas 2 y 4 confirmaron que FENO disminuyó significativamente los niveles en suero de TG en los animales (todos los valores de P inferiores a 0,01). La dosis elevada de Cmyr-47 también redujo significativamente los niveles en suero de TG en los animales en comparación con los controles modelo. De manera similar al efecto en el CT en suero, el efecto de Cmyr-47 en los TG en suero también dependió de la dosis. Cabe destacar que, el tratamiento con CsA aumentó los niveles en suero de TG en los animales en comparación con los controles modelo.

Tabla 15. Efecto de Cmyr-47 en los TG en suero (mmol/l,  $\bar{x} \pm S$ )

Grupo	Dosis/inyección	n	Antes de la dosificación	Nivel de TG después de semanas de dosificación	
				2s	4s
Control normal	10 ml/kg PBS	10	2,85±1,24	2,23±0,76	2,29±0,84
Control modelo	10 ml/kg PBS	8	5,65±1,78##	7,81±3,24##	7,54±3,10##
Control positivo	50 mg/kg FENO	8	6,16±1,30	3,14±0,4**	2,68±0,30**
Dosis baja	10 mg/kg Cmyr-47	8	6,15±1,14	6,29±2,48	4,39±1,21
Dosis alta	30 mg/kg Cmyr-47	8	6,35±2,00	5,31±1,76*	3,81±0,95*
Tratamiento con CsA	5 mg/kg CsA	8	6,23±0,90	8,81±0,50	10,23±0,61**

Nota: en comparación con el control normal, #P <0,05, ##P <0,01; en comparación con el control modelo, \*P <0,05, \*\*P <0,01

Los niveles en suero de TG de animales tratados con polipéptidos adicionales procedentes del VHB (Cmyr-60, Cmyr-55, Cmyr-40, Cmyr-35, Cmyr-30, Cmyr-25, Cmyr-20, Cmyr-47+(-10), Cmyr-47+(-9), Cplam-47, Cstea-47, Cchol-47, Amyr-47, Bmyr-47, Dmyr-47, Emry-47, Fmyr-47, Gmyr-47 o Hmyr-47) también se midieron siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Como se muestra en las figuras 9A y 9B, los niveles en suero de TG de los animales tratados con estos polipéptidos procedentes del VHB fueron más bajos que los de los controles modelo, lo que indica que todos los polipéptidos probados procedentes del VHB son capaces de reducir los TG en suero *in vivo*.

#### 35 Ejemplo 3.4. Efecto de Cmyr-47 y polipéptidos adicionales procedentes del VHB en el LDL-C en suero

En la tabla 16 y la figura 10 se resumen las mediciones de los niveles en suero de LDL-C de los animales tratados con PBS, FENO o Cmyr-47. Como se esperaba, los niveles en suero de LDL-C en los controles modelo aumentaron significativamente en comparación con los controles normales, lo que confirma el fenotipo hiperlipidémico (P <0,01). Los controles positivos tratados con FENO mostraron niveles en suero de LDL-C significativamente más bajos que los controles modelo. De acuerdo con el efecto de Cmyr-47 en el CT y los TG en suero, los animales tratados con Cmyr-47 (en particular con la dosis elevada de 30 mg/kg) mostraron niveles en suero de LDL-C significativamente disminuidos en comparación con los controles modelo.

Tabla 16. Efecto de Cmyr-47 en LDL-C en suero (4 semanas después del tratamiento)

Grupo	Dosis/inyección	n	LDL-C (mmol/l)
Control normal	10 ml/kg PBS	10	1,09±0,11
Control modelo	10 ml/kg PBS	8	9,38±3,75##
Control positivo	50 mg/kg FENO	8	1,88±0,40**
Dosis baja	10 mg/kg Cmyr-47	8	7,33±3,40
Dosis alta	30 mg/kg Cmyr-47	8	4,34±1,36**

Nota: en comparación con el control normal,  $^{\#}P <0,05$ ,  $^{##}P <0,01$ ; en comparación con el control modelo,  $^{*}P <0,05$ ,  $^{**}P <0,01$

- 5 Los niveles en suero de FDF-C de animales tratados con polipéptidos adicionales procedentes del VHB (Cmyr-60, Cmyr-55, Cmyr-40, Cmyr-35, Cmyr-30, Cmyr-25, Cmyr-20, Cmyr-47+(-10), Cmyr-47+(-9), Cplam-47, Cstea-47, Cchol-47, Amyr-47, Bmyr-47, Dmyr-47, Emyr-47, Fmyr-47, Gmyr-47 o Hmyr-47) también se midieron siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Como se muestra en las figuras 11A y 11B, los niveles en suero de LDL-C de esos animales eran más bajos que los de los controles modelo.

10

#### Ejemplo 3.5. Efecto de Cmyr-47 en el HDL-C en suero y el IA

- 15 En la tabla 17 y la figura 12 se proporcionan las mediciones de los niveles en suero de HDL-C. En función de los valores obtenidos en este estudio, se calculó un valor del IA de cada animal siguiendo la fórmula analizada anteriormente. El valor promedio del IA de cada grupo se proporciona en la tabla 17 y la figura 13. Aunque Cmyr-47 no redujo el HDL-C en suero *in vivo*, el valor promedio del IA de los animales tratados con Cmyr-47 fue significativamente menor que el valor promedio de los controles modelo, lo que indica que Cmyr-47 puede proteger contra la ateroesclerosis y otras enfermedades vasculares, incluidas las enfermedades cardiovasculares provocadas por la acumulación de grasa.

20

Tabla 17. Efecto de Cmyr-47 en el HDL-C en suero y el IA (4 semanas después del tratamiento)

Grupo	Dosis/inyección	n	HDL-C (mmol/l)	IA
Control normal	10 ml/kg PBS	10	2,29±0,27	0,92±0,11
Control modelo	10 ml/kg PBS	8	3,44±0,19##	4,75±1,59##
Control positivo	50 mg/kg FENO	8	3,13±0,30**	1,36±0,38**
Dosis baja	10 mg/kg Cmyr-47	8	3,45±0,22	3,62±1,49*
Dosis alta	30 mg/kg Cmyr-47	8	3,41±0,18	2,39±0,55**

Nota: en comparación con el control normal,  $^{\#}P <0,05$ ,  $^{##}P <0,01$ ; en comparación con el control modelo,  $^{*}P <0,05$ ,  $^{**}P <0,01$

25

#### Ejemplo 3.6. Efecto de Cmyr-47 en los ácidos biliares totales en suero (ABT)

- En la tabla 18 y la figura 14 se proporcionan las mediciones de los niveles en suero de ABT. Como se esperaba, los niveles en suero de los ABT en los controles modelo fueron más elevados que los de los controles normales. En comparación con el grupo de control modelo, los niveles en suero de los ABT de los animales tratados con Cmyr-47 se elevaron aún más de forma dependiente de la dosis, lo que confirma que Cmyr-47 es capaz de inhibir la absorción de ácidos biliares *in vivo*. Las mediciones en la semana 4 confirmaron que la dosis elevada de Cmyr-47 aumentó significativamente los niveles en suero de los ABT (valores de P inferiores a 0,05). La CsA y la dosis baja de Cmyr-47 también elevaron moderadamente los niveles en suero de los ABT después de 4 semanas de tratamiento, aunque no se alcanzó la significación.

35

Tabla 18. Efecto de Cmyr-47 en los ABT en suero (mmol/l,  $\bar{x} \pm S$ )

Grupo	Dosis/inyección	n	Antes de la dosificación	Nivel de TG después de semanas de dosificación	
				2s	4s
Control normal	10 ml/kg PBS	10	24,61±3,69	23,14±2,65	18,13±3,81
Control modelo	10 ml/kg PBS	8	36,19±7,00	39,35±12,04##	41,63±18,61##
Control positivo	50 mg/kg FENO	8	35,74±4,47	25,74±4,25*	24,45±2,52*
Dosis baja	10 mg/kg Cmyr-47	8	37,28±7,55	39,42±11,18	53,94±32,15
Dosis alta	30 mg/kg Cmyr-47	8	32,15±7,82	40,43±5,96	64,08±5,47*
Tratamiento con CsA	5 mg/kg CSA	8	34,55±6,67	41,38±11,83	52,73±9,83

Nota: en comparación con el control normal, \*P <0,05, \*\*P <0,01; en comparación con el control modelo, \*P <0,05, \*\*P <0,01

##### 5 Ejemplo 3.7. Efecto de Cmyr-47 en la glucosa (GLU) en suero

Como se muestra en la tabla 19, los animales hiperlipidémicos no mostraron ningún fenotipo hiperglucémico significativo en comparación con los controles normales (todos los valores de P >0,05). Las dosis elevadas y bajas de Cmyr-47 no redujeron los niveles en suero de GLU por debajo de la glucemia normal mostrada en los controles normales y en los controles modelo (todos los valores de P >0,05).

Tabla 19. Efecto de Cmyr-47 en la GLU en suero en hámster dorado (mmol/l,  $\bar{x} \pm EEM$ )

Grupo	Dosis/inyección	n	Antes de la dosificación	Nivel de GLU después de semanas de dosificación	
				2s	4s
Control normal	10 ml/kg PBS	10	4,09±0,3	4,63±0,8	4,99±1,4
Control modelo	10 ml/kg PBS	8	3,99±0,4	4,52±0,9	4,34±0,7
Dosis baja	10 mg/kg Cmyr-47	8	4,18±0,3	3,87±0,7	4,55±1,0
Dosis alta	30 mg/kg Cmyr-47	8	4,11±0,5	4,10±0,7	4,38±0,4

Nota: en comparación con el grupo de control normal, \*P <0,05, \*\*P <0,01, en comparación con el grupo de control modelo, \*P <0,05, \*\*P <0,01

Como se ha indicado anteriormente, Cmyr-47 fue capaz de revertir el fenotipo hiperlipidémico en hámsteres dorados alimentados con una dieta rica en grasas. En particular, la dosis elevada de Cmyr-47 fue capaz de reducir todos los indicadores biológicos medidos en este estudio. En cambio, CsA, un inhibidor de la absorción de ácidos biliares, no logró producir un efecto similar. De manera adicional, a pesar de la inhibición eficaz de la absorción de ácidos biliares demostrada por CsA *in vitro*, el tratamiento con CsA *in vivo* provocó un aumento de los niveles en suero de TG y CT, lo que confirma el efecto hiperlipidémico de la CsA.

De acuerdo con los efectos en los niveles en suero del CT y los TG de Cmyr-47, los valores del IA de los animales tratados con Cmyr-47 fueron significativamente más bajos que los de los animales hiperlipidémicos no tratados, demostrando aún más la eficacia de Cmyr-47 como medicina preventiva en enfermedades cardiovasculares. De manera adicional, otros polipéptidos procedentes del VHB mostraron una eficacia similar para reducir los TG, el CT y LDL-C en suero, lo que indica que esos polipéptidos también son capaces de revertir el fenotipo hiperlipidémico *in vivo*.

##### 30 Ejemplo 3.8. Efectos de varias dosis de Cmyr-47 en el CT y los TG en suero

El modelo de hámster dorado hiperlipidémico se estableció como se describe en el ejemplo 3.1. Después de 2 semanas de tratamiento con una dieta rica en grasas, el fenotipo hiperlipidémico de los hámsteres se confirmó cuando los animales tenían niveles en suero de colesterol total (CT) superiores a 10 mmol/l. Un total de 32 hámsteres hiperlipidémicos se estratificaron aleatoriamente en 4 grupos (N = 8/grupo): un grupo de control modelo (10 ml/kg de PBS, vía subcutánea (s.c.), un grupo de tratamiento de dosis baja (Cmyr-47, 1 mg/kg/día, s.c.), un grupo de tratamiento de dosis media (Cmyr-47, 3 mg/kg/día, s.c.) y un grupo de tratamiento de dosis elevada (10 mg/kg/día Cmyr-47, s.c.).

Se utilizaron ocho hámsteres alimentados con la dieta normal como grupo de control normal (10 ml/kg de PBS, s.c.).

Siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 3.1, se administró Cmyr-47 durante 4 semanas consecutivas. Durante el experimento, todos los animales en el grupo de control modelo, y los grupos de dosis baja, media y elevada fueron alimentados con la dieta rica en grasas, mientras que el grupo de control normal fue alimentado con la dieta normal. Se inyectó por vía subcutánea Cmyr-47 o PBS a los hámsteres dos veces al día (de 9:00 a 10:00 de la mañana y de 16:00 a 17:00 de la tarde). Cada mañana se controló el consumo de alimentos y agua, las heces y el aseo de los animales. Los niveles en suero de CT y TG de todos los animales se midieron en la semana 2 y la semana 4 del tratamiento como se describe en el ejemplo 3.1 y los resultados se resumen en las tablas 20 y 21. Los datos se analizaron como se describe en el ejemplo 3.1.

Como se muestra en la tabla 20 y la figura 15, los niveles en suero de CT en los controles modelo fueron significativamente más elevados que los de los controles normales durante el experimento (todos los valores de  $P < 0,01$ ). El tratamiento con Cmyr-47 a una dosis de 1 mg/kg o 3 mg/kg no tuvo efecto en el CT en suero. Sin embargo, los animales hiperlipidémicos tratados con 10 mg/kg de Cmyr-47 durante 4 semanas mostraron niveles moderadamente reducidos de CT en suero en comparación con el grupo de control modelo ( $P < 0,05$ ).

Tabla 20. Efecto de Cmyr-47 en el CT en suero (mmol/l,  $\bar{x} \pm S$ )

Grupo	Dosis/inyección	n	Antes de la dosificación	Nivel de CT después de semanas de dosificación	
				2s	4s
Control normal	10 ml/kg PBS	8	2,21±0,3	4,31±0,3	4,25±0,3
Control modelo	10 ml/kg PBS	8	13,45±1,6##	19,47±4,9##	19,88±3,9##
Dosis baja	1 mg/kg Cmyr-47	8	13,42±1,5	19,75±2,5	20,88±4,0
Dosis media	3 mg/kg Cmyr-47	8	13,33±1,4	18,88±2,1	20,99±6,9
Dosis alta	10 mg/kg Cmyr-47	8	13,34±1,4	16,47±5,1	16,21±4,2*

Nota: en comparación con el grupo de control normal, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; en comparación con el grupo de control modelo, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$

Como se muestra en la tabla 21 y la figura 16, los niveles en suero de TG en los controles modelo fueron significativamente más elevados que los controles normales durante el experimento (todos los valores de  $P < 0,01$ ). El tratamiento con Cmyr-47 a dosis de 1 mg/kg o 3 mg/kg no tuvo efecto sobre los TG en suero. Los animales hiperlipidémicos tratados con 10 mg/kg de Cmyr-47 durante 4 semanas expresaron niveles en suero de TG moderadamente reducidos en comparación con el grupo de control modelo ( $P < 0,05$ ). Estos datos sugieren que la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de Cmyr-47 para alcanzar concentraciones en suero de Cmyr-47 capaces de regular bidireccionalmente la absorción de ácidos biliares mediada por NTCP puede ser beneficiosa para reducir los niveles en suero de CT y TG en pacientes hiperlipidémicos.

Tabla 21. Efecto de Cmyr-47 en los TG en suero (mmol/l,  $\bar{x} \pm S$ )

Grupo	Dosis/inyección	n	Antes de la dosificación	Nivel de TG después de semanas de dosificación	
				2s	4s
Control normal	10 ml/kg PBS	8	2,04±0,8	1,46±0,3	1,11±0,2
Control modelo	10 ml/kg PBS	8	5,28±1,0##	6,48±1,6##	7,92±5,2##
Dosis baja	1 mg/kg Cmyr-47	8	4,78±0,8	7,11±2,1	7,41±2,1
Dosis media	3 mg/kg Cmyr-47	8	5,37±1,3	7,21±2,7	6,91±1,9
Dosis alta	10 mg/kg Cmyr-47	8	5,52±1,3	5,55±2,4	4,44±2,1*

Nota: en comparación con el grupo de control normal, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; en comparación con el grupo de control modelo, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$

### 35 Ejemplo 4

#### Ejemplo 4.1. Métodos y materiales utilizados en el tratamiento de ratas Zucker obesas diabéticas con Cmyr-47

Se probó la eficacia de Cmyr-47 como agente antidiabético, antihiperlipidémico y/o antihipercolesterolémico en ratas

- Zucker obesas diabéticas (ZDF, del inglés *Zucker Diabetic Fatty*), un modelo animal de diabetes espontánea de tipo II. Se adquirieron ratas ZDF macho de 60 días ( $n = 40$ ) y ratas Zucker Lean (ZL) ( $n = 6$ ) de Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. (SCXK (Beijing) 2012-0001) con número de certificación de calidad animal S11400700109970 y 11400700109972. Todos los animales se alojaron a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  con un 50 a un 70 % de humedad en un ambiente libre de patógenos específicos (SPF, del inglés *specific-pathogen-free*) y en un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas (150 a 200 Lx), en una habitación con ruido controlado (<50 dB) en el Zhejiang Traditional Chinese Medicine University Animal Experimental Research Center [SYXK(Zhe)2013-0184]. Los animales tuvieron acceso libre a agua filtrada y esterilizada en una botella de agua esterilizada en autoclave. Las ratas ZDF se alimentaron con dieta Purina n.º 5008 comprada en Specialty Feeds, Inc. (Memphis, TN; Purina 5008; número de catálogo SF06-019). Las ratas ZL se alimentaron con una dieta normal (pienso básico) esterilizada con irradiación gamma con  $\text{Co}^{60}$ . Se alojaron dos ratas ZDF o ZL en cada jaula y el lecho de la jaula se cambió una vez cada 2 días. La cría experimental de ratas y todas las demás operaciones se realizaron de acuerdo con el principio de las 3R con cuidado humano.
- Después de 2 semanas de la dieta Purina n.º 5008 o la dieta normal, todos los animales estuvieron en ayunas durante 10 h con acceso a agua. A continuación, se pesó a cada animal y se le extrajo sangre de la cola para recoger 0,3 ml de sangre. Las muestras de sangre se analizaron adicionalmente para determinar la hemoglobina glucosilada (HbA1c). Se recogieron 0,5 ml adicionales de sangre y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para separar el suero. Se midieron los niveles de HbA1c, glucosa (GLU) en suero e insulina en los animales mediante los kits que se proporcionan a continuación. Para todas las mediciones se utilizó el analizador bioquímico automático Hitachi 7020.
- Se seleccionaron 30 animales con niveles en suero de GLU en ayunas cercanos al nivel promedio y se dividieron aleatoriamente en 5 grupos: un grupo de control modelo ( $10 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$  de PBS), un grupo de tratamiento con dosis bajas ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de Cmyr-47), un grupo de tratamiento con dosis elevadas ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de Cmyr-47), un grupo de control positivo ( $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de metformina) y un grupo de tratamiento con CsA ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de CSA) con 6 animales por grupo. Se utilizaron seis ratas ZL como grupo de control normal ( $10 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$  de PBS). Se inyectó PBS o Cmyr-47 a los animales por vía subcutánea dos veces al día (a las 09:00 y 17:00). Las soluciones de metformina (MET) y CsA se administraron mediante sonda oral dos veces al día, por la mañana y por la tarde. La dosificación se realizó durante 4 semanas. Durante el experimento, las ratas ZDF se alimentaron con la dieta Purina n.º 5008 mientras que las ratas ZL se alimentaron con la dieta normal.
- Cmyr-47 se sintetizó como se describe anteriormente, se purificó como un polvo blanco por Shanghai HEP Pharmaceutical Co., Ltd (Shanghái, China; número de lote 14011801) y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ . Cmyr-47 se pesó y se disolvió en PBS justo antes de su uso. MET se fabricó por Bristol-Myers Squibb Co., Ltd. (Shanghai, China) con número de aprobación H20023370 y número de lote AAD7878. CsA (Sandimmune®) se adquirió de Novartis.
- En la segunda semana de dosificación, los animales se mantuvieron en ayunas durante 10 h con libre acceso al agua, y se recogieron 0,3 ml de sangre de cada animal mediante sangrado de la vena de la cola para medir la GLU en suero, el colesterol total (CT), los triglicéridos (TG) y el nitrógeno ureico en sangre (NUS). En la cuarta semana de dosificación, los animales se dejaron en ayunas durante 10 h y después se recogió la sangre para medir la GLU en suero, el CT, los TG y el NUS, la HbA1c y la insulina. Después de la última dosis de medicamentos, los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 h y después se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico al 3 % y dislocación cervical. Se diseccionaron el corazón, los riñones, la grasa escapular y la grasa abdominal de cada animal para observación visual y se pesaron para calcular el índice cardíaco, renal y de grasa total.
- El pentobarbital sódico (contenido  $\geq 95,0\%$ ; número de lote 20130112) se compró a Merck. Los kits de CT, TG, GLU y NUS se adquirieron en DiaSys Diagnostic Systems (Shanghai, China). El reactivo de detección de HbA1c se adquirió de Trinity Biotech Inc., Irlanda. El kit de detección de insulina ELISA (Número de lote: 0469636-1) se adquirió de Bertin Pharma (Francia). Todas las mediciones que utilizan los kits comprados se realizaron siguiendo los protocolos de los fabricantes proporcionados en los kits.
- La balanza electrónica SQP se adquirió de Sartorius Scientific Instruments (Beijing) Co., Ltd. (Pekín, China). El autoclave MLS-3750 se compró a Sanyo, Japón. El sistema de agua ultrapura RO-MB-50 fue fabricado por Hangzhou Yongjieda Cleaning Science and Technology, Co., Ltd. (Zhejiang, China). El ultrasonido KQ-300DE se adquirió de Kunshan Ultrasonic Instruments Co., Ltd. (Jiangsu, China). El analizador bioquímico automático Hitachi 7020 se compró a Hitachi, Japón. El analizador de hemoglobina glucosilada Hb9210 de Trinidad Biotech Inc, Irlanda. Se adquirió un lector de microplacas multifuncional de Thermo Fisher Scientific, Co. (MA, EE. UU.).
- Se utilizó el programa informático SPSS19.0 (SPSS, Chicago, IL) para el análisis estadístico. Todos los datos se presentaron como media  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm \text{EEM}$ ). Se utilizó el análisis de varianza ANOVA para evaluar los datos de los resultados de la prueba. Se utilizó la prueba LSD para comparaciones por pares. Los valores de los análisis estadísticos se redondearon a 2 decimales.
- Ejemplo 4.2. Efecto de Cmyr-47 y polipéptidos adicionales procedentes del VHB sobre la glucosa (GLU) en suero**
- La hiperglucemia (es decir, aumento de la glucosa en sangre) es uno de los síntomas más destacados de la diabetes

de tipo II. Como se muestra en la tabla 22 y la figura 17, el fenotipo hiperglucémico de las ratas ZDF se confirmó mediante la comparación de los niveles en suero de GLU de los controles modelo con los controles normales (todos los valores de  $P < 0,01$ ). La MET es un agente antidiabético bien conocido que reduce de manera eficaz la glucemia en pacientes diabéticos. Como se esperaba, las ratas ZDF tratadas con MET mostraron una disminución significativa de la GLU en suero en ayunas en comparación con los controles modelo. Cmyr-47 también fue capaz de reducir la glucemia en ratas ZDF. En particular, a las 4 semanas de tratamientos, tanto las dosis bajas como las elevadas de Cmyr-47 redujeron de manera eficaz los niveles en suero de GLU en los animales. El efecto de Cmyr-47 en la glucemia dependió de la dosis. En cambio, el tratamiento con CsA elevó significativamente los niveles en suero de GLU en los animales en comparación con el modelo de control.

10

Tabla 22. Efecto de Cmyr-47 en la GLU en suero en ayunas en ratas ZDF (mmol/l,  $\bar{x} \pm$  EEM)

Grupo	Dosis/inyección	Nivel de GLU después de semanas de dosificación		
		0	2	4
Control normal	10 ml/kg PBS	6,91±0,22	6,23±0,27	6,51±0,19
Control modelo	10 ml/kg PBS	9,68±0,90 <sup>#</sup>	19,36±3,35 <sup>##</sup>	27,03±1,07 <sup>##</sup>
Control positivo	300 mg/kg Met	9,71±0,96	7,98±1,02 <sup>**</sup>	8,35±0,58 <sup>**</sup>
Cmyr-47Ba	10 mg/kg Cmyr-47	9,82±1,19	14,74±0,68	19,16±1,23 <sup>**</sup>
Cmyr-47Al	30 mg/kg Cmyr-47	9,73±1,01	9,50±1,72 <sup>*</sup>	10,50±2,34 <sup>**</sup>
Tratamiento con CsA	20 mg/kg CsA	9,76±1,22	22,38±3,08	33,75±6,68 <sup>*</sup>

Nota: comparado con el grupo de control normal,  $^{\#}P < 0,05$ ,  $^{##}P < 0,01$ ; comparado con el grupo de control modelo,  $^{*}P < 0,05$ ,  $^{**}P < 0,01$

15 También se probaron polipéptidos adicionales procedentes del VHB enumerados en la tabla 1 para analizar sus efectos en la glucemia *in vivo* siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Todo el polipéptido se administró a una dosis molar equivalente a 30 mg/kg/día de Cmyr-47.

20 Como se muestra en las figuras 18A y 18B, se confirmó el fenotipo hiperglucémico de las ratas ZDF. Como se observa en el estudio anterior, el tratamiento con MET disminuyó significativamente la GLU en suero en ayunas *in vivo*. Después de 4 semanas de tratamiento con péptidos procedentes del VHB (Cmyr-60, Cmyr-55, Cmyr-40, Cmyr-35, Cmyr-30, Cmyr-25, Cmyr-20, Cmyr-47+(-10), Cmyr-47+(-9), Cplam-47, Cstea-47, Cchol-47, Amyr-47, Bmyr-47, Dmyr-47, Emry-47, Fmyr-47, Gmyr-47 o Hmyr-47), los niveles en suero de GLU en ayunas de ratas ZDF disminuyeron en comparación con los controles modelo, lo que indica la eficacia de los polipéptidos como agente antidiabético.

25

#### Ejemplo 4.3. Efecto de Cmyr-47 y polipéptidos adicionales procedentes del VHB en la HbA1c

30 HbA1c se refiere a la hemoglobina glucosilada y su nivel aumenta significativamente cuando un sujeto experimenta hiperglucemia crónica. Como se muestra en la tabla 23 y la figura 19, de acuerdo con el fenotipo hiperglucémico de ratas ZDF, los niveles de HbA1c en los controles modelo fueron significativamente más elevados que los del control normal durante todo el estudio (todos los valores de  $P < 0,01$ ). Asimismo, de acuerdo con el efecto de MET en la glucemia, el tratamiento con MET disminuyó significativamente los niveles de HbA1c en ratas ZDF ( $P < 0,01$ ). Las ratas ZDF tratadas con Cmyr-47 también mostraron niveles de HbA1c significativamente reducidos en comparación con los controles modelo de una manera dependiente de la dosis, lo que confirma la eficacia de Cmyr-47 como agente antidiabético que regula la glucemia *in vivo*. De acuerdo con el efecto de la CsA en los niveles en suero de la GLU, el tratamiento con CsA aumentó significativamente la HbA1c en suero después de 4 semanas de tratamiento.

35

Tabla 23. Efecto de Cmyr-47 en el nivel de HbA1c en ratas ZDF (%),  $\bar{x} \pm$  EEM

Grupo	Dosis/inyección	Nivel de HbA1c después de semanas de dosificación	
		0	4
Control normal	10 ml/kg PBS	4,28±0,02	4,55±0,02
Control modelo	10 ml/kg PBS	6,27±0,25 <sup>##</sup>	9,33±0,40 <sup>##</sup>
Control positivo	300 mg/kg Met	6,25±0,31	5,07±0,23 <sup>**</sup>

(continuación)

Grupo	Dosis/inyección	Nivel de HbA1c después de semanas de dosificación	
		0	4
Cmyr-47Ba	10 mg/kg Cmyr-47	6,27±0,24	6,82±0,44**
Cmyr-47AI	30 mg/kg Cmyr-47	6,25±0,31	5,73±0,39**
Tratamiento con CsA	20 mg/kg CsA	6,23±0,44	11,60±1,03**

Nota: comparado con el control normal, \*P <0,05, \*\*P <0,01; comparado con el control modelo, \*P <0,05, \*\*P <0,01

Los polipéptidos adicionales procedentes del VHB enumerados en la tabla 1 también mostraron un efecto similar en la HbA1c cuando se probaron en el mismo modelo animal descrito anteriormente. Como se muestra en las figuras 20A y 20B, los niveles de HbA1c de los controles modelo eran más elevados que los de las ratas ZDF tratadas con los polipéptidos. Estos resultados demuestran que los polipéptidos procedentes del VHB son capaces de reducir de manera eficaz la glucemia y la HbA1c, y confirman el efecto hiperglucémico de la CsA.

#### 10 Ejemplo 4.4. Efecto de Cmyr-47 en la insulina en suero

Los pacientes con diabetes de tipo II experimentan resistencia a la insulina, sobreproducción de insulina y, en última instancia, privación de insulina debido al daño pancreático. Para confirmar que Cmyr-47 es capaz de modular la insulina previniendo el daño pancreático, los niveles de insulina de los animales tratados con Cmyr-47 se compararon con los animales tratados con PBS o MET. Como se muestra en la tabla 24 y la figura 21, los niveles iniciales de insulina en suero de las ratas ZDF fueron significativamente más elevados que los de los controles normales. Si bien los niveles de insulina de las ratas ZDF se mantuvieron más elevados que los de los controles normales en la semana 4, los niveles absolutos disminuyeron significativamente en comparación con los niveles iniciales. Este cambio indica que la resistencia a la insulina en ratas ZDF progresó durante el estudio, lo que dio como resultado insuficiencia pancreática. El tratamiento con MET pareció proteger contra la pérdida de insulina en suero, aunque la diferencia entre los niveles de insulina en ayunas de los controles modelo y los controles positivos no fue estadísticamente significativa (P >0,05). Sin embargo, el tratamiento con Cmyr-47 estabilizó completamente la secreción de insulina, si no aumentó, en ambas dosis, lo que indica la diferencia significativa entre los controles modelo y los animales tratados con Cmyr-47 (todos los valores de P <0,05). Estos resultados demuestran que Cmyr-47 puede prevenir el daño pancreático y, por lo tanto, ayudar a un paciente diabético a mantener una secreción adecuada de insulina.

Tabla 24. Efecto de Cmyr-47 en la insulina en suero en ratas ZDF (ng/ml,  $\bar{x} \pm EEM$ )

Grupo	Dosis/inyección	Nivel de insulina después de semanas de dosificación	
		0	4
Control normal	10 ml/kg PBS	0,46±0,06	0,84±0,06
Control modelo	10 ml/kg PBS	7,15±1,38##	3,85±1,25##
Control positivo	300 mg/kg Met	6,74±0,62	8,36±3,68
Cmyr-47Ba	10 mg/kg Cmyr-47	7,99±1,17	8,57±2,18*
Cmyr-47AI	30 mg/kg Cmyr-47	8,55±1,07	9,56±4,26*

Nota: en comparación con el grupo de control normal, #P <0,05, ##P <0,01; en comparación con el grupo de control modelo, \*P <0,05, \*\*P <0,01

#### 30 Ejemplo 4.5. Efecto de Cmyr-47 y polipéptidos adicionales procedentes del VHB en el colesterol total (CT) en suero

Como se ha indicado anteriormente, los fenotipos diabéticos incluyen desregulación de lípidos, incluido colesterol y triglicéridos elevados en el torrente sanguíneo. Como se muestra en la tabla 25 y la figura 22, los niveles en suero de CT en los controles modelo se elevaron sistemáticamente en comparación con los controles normales (todos los valores de P <0,05). Sin embargo, en contraste con el efecto de la MET en la glucemia, la MET pareció ser completamente ineficaz para reducir los niveles en suero de CT en ratas ZDF. La CsA tampoco fue eficaz para reducir los niveles en suero de CT en ratas ZDF y a las 4 semanas de tratamiento, la CsA aumentó significativamente los niveles en suero de CT en comparación con el modelo de control. Cabe destacar que, la dosis elevada de Cmyr-47 redujo significativamente los niveles en suero de CT en ratas ZDF en comparación con los controles modelo, lo que confirma que Cmyr-47 puede regular una amplia gama de biomarcadores que están gravemente elevados en

pacientes diabéticos.

Tabla 25. Efecto de Cmyr-47 en el CT en suero en ratas ZDF (mmol/ml,  $\bar{x} \pm$  EEM)

Grupo	Dosis/inyección	Nivel de CT después de semanas de dosificación		
		0	2	4
Control normal	10 ml/kg PBS	2,85±0,03	3,18±0,06	3,22±0,04
Control modelo	10 ml/kg PBS	3,68±0,46#	4,95±0,15 ##	6,95±0,21 ##
Control positivo	300 mg/kg Met	3,82±0,11	5,24±0,35	6,95±0,54
Cmyr-47Ba	10 mg/kg Cmyr-47	3,72±0,15	4,97±0,19	6,63±0,18
Cmyr-47AI	30 mg/kg Cmyr-47	3,60±0,18	4,25±0,27*	5,52±0,41**
Tratamiento con CsA	20 mg/kg CsA	3,65±0,48	6,54±0,63**	8,33±0,65**

Nota: en comparación con el grupo de control normal, #P <0,05, ##P <0,01; en comparación con el grupo de control modelo, \*P <0,05, \*\*P <0,01

Los animales tratados con polipéptidos adicionales procedentes del VHB también mostraron que esos polipéptidos son capaces de reducir el CT en suero *in vivo*. Como se muestra en las figuras 23A y 23B, después de 4 semanas de tratamiento con péptidos procedentes del VHB (Cmyr-60, Cmyr-55, Cmyr-40, Cmyr-35, Cmyr-30, Cmyr-25, Cmyr-20, Cmyr-47+(-10), Cmyr-47+(-9), Cplam-47, Cstea-47, Cchol-47, Amyr-47, Bmyr-47, Dmyr-47, Emyr-47, Fmyr-47, Gmyr-47 o Hmyr-47), los niveles en suero de CT de las ratas ZDF fueron más bajos que los de los controles modelo. Estos resultados demuestran que, si bien MET puede apuntar solo a un síntoma en particular, un polipéptido procedente del VHB es capaz de apuntar a múltiples vías y, por lo tanto, es beneficioso para controlar los síntomas relacionados con la diabetes simultáneamente.

#### Ejemplo 4.6. Efecto de Cmyr-47 y polipéptidos adicionales procedentes del VHB en los triglicéridos (TG) en suero

Además del CT en suero, los TG en suero también son un biomarcador de hiperlipidemia que puede estar provocado por la diabetes. Como se esperaba, en la tabla 26 y la figura 24 se muestra que los niveles en suero de TG en los controles modelo fueron significativamente más elevados que los de los controles normales durante todo el estudio (todos los valores de P <0,01). Cabe destacar que, la MET elevó significativamente los niveles en suero de TG en ratas ZDF en la semana 2 (P <0,01). Si bien la diferencia no fue significativa, los niveles en suero de TC en ratas ZDF tratadas con MET permanecieron más elevados que los controles modelo en la semana 4. De acuerdo con el efecto en los niveles en suero de CT, la CsA aumentó aún más los niveles en suero de los TG en ratas ZDF. En cambio, ambas dosis de Cmyr-47 fueron capaces de reducir los niveles en suero de TG de ratas ZDF y el efecto de Cmyr-47 dependió de la dosis.

Tabla 26. Efecto de Cmyr-47 en los TG en suero en ratas ZDF (mmol/ml,  $\bar{x} \pm$  EEM)

Grupo	Dosis/inyección	Nivel de TG después de semanas de dosificación		
		0	2	4
Control normal	10 ml/kg PBS	0,58±0,03	0,96±0,08	1,47±0,15
Control modelo	10 ml/kg PBS	9,80±2,95##	12,23±1,36##	13,43±2,21##
Control positivo	300 mg/kg Met	8,32±0,65	17,10±2,02**	14,74±1,99
Cmyr-47Ba	10 mg/kg Cmyr-47	9,78±0,48	9,50±0,58	8,62±0,41*
Cmyr-47AI	30 mg/kg Cmyr-47	8,11±0,72	6,42±0,92**	6,26±0,64**
Tratamiento con CsA	20 mg/kg CsA	9,04±0,84	14,34±1,88**	19,03±2,65**

Nota: en comparación con el control normal, #P <0,05, ##P <0,01; en comparación con el control modelo, \*P <0,05, \*\*P <0,01

Los polipéptidos adicionales procedentes del VHB también fueron capaces de reducir los TG en suero *in vivo* cuando se prueba en el mismo modelo animal descrito anteriormente. Como se muestra en las figuras 25A y 25B, los niveles

en suero de TG de los controles modelo permanecieron más elevados que los de las ratas ZDF tratadas con péptidos procedentes del VHB (Cmyr-60, Cmyr-55, Cmyr-40, Cmyr-35, Cmyr-30, Cmyr-25, Cmyr-20, Cmyr-47+(-10), Cmyr-47+(-9), Cplam-47, Cstea-47, Cchol-47, Amyr-47, Bmyr-47, Dmyr-47, Emry-47, Fmyr-47, Gmyr-47 o Hmyr-47), lo que confirma además que los polipéptidos procedentes del VHB son capaces de regular el metabolismo de la glucosa y el metabolismo de los lípidos simultáneamente.

#### Ejemplo 4.7. Efecto de Cmyr-47 en el nitrógeno ureico en sangre (NUS) en suero

El NUS en suero elevado refleja una función renal alterada, que ocurre a menudo en pacientes diabéticos humanos. En el modelo ZDF, los fenotipos diabéticos conducen a disfunción renal y elevación correlativa del NUS en suero. Como se esperaba, en la tabla 27 y la figura 26 se muestra que los niveles en suero de NUS en los controles modelo fueron significativamente más elevados que los de los controles normales durante todo el estudio. El tratamiento de MET no fue capaz de revertir la disfunción renal ya que no se encontraron diferencias significativas de NUS entre los controles modelo y los controles positivos. Sin embargo, la dosis elevada de Cmyr-47 redujo significativamente los niveles en suero de NUS en ratas ZDF en la semana 4 ( $P < 0,01$ ), lo que indica que Cmyr-47 puede proteger a un sujeto diabético contra el daño renal y la disfunción renal.

Tabla 27. Efecto de Cmyr-47 en los BUN en suero en ratas ZDF (mmol/ml,  $\bar{x} \pm$  EEM)

Grupo	Dosis/inyección	Nivel de NUS después de semanas de dosificación		
		0	2	4
Control normal	10 ml/kg PBS	4,71±0,22	5,54±0,06	4,48±0,09
Control modelo	10 ml/kg PBS	6,13±0,51#	6,62±0,35	7,96±0,18##
Control positivo	300 mg/kg Met	5,52±0,21	6,58±0,52	7,09±0,36
Cmyr-47Ba	10 mg/kg Cmyr-47	5,26±0,29	6,83±0,48	7,93±0,38
Cmyr-47AI	30 mg/kg Cmyr-47	5,83±0,37	6,44±0,45	6,65±0,20**

Nota: en comparación con el grupo de control normal,  $^{\#}P < 0,05$ ,  $^{##}P < 0,01$ ; en comparación con el grupo de control modelo,  $^{*}P < 0,05$ ,  $^{**}P < 0,01$

#### Ejemplo 4.8. Efecto de Cmyr-47 en el índice de órganos

Los pacientes diabéticos tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, disfunción renal y obesidad. Como se ha indicado anteriormente, varios índices, tales como el índice cardíaco (IC), el índice renal (IR) y el índice de grasa total (IGT) se pueden utilizar como indicadores cuantitativos del riesgo. Como se muestra en la tabla 28 y la figura 27A, los valores del IC de los controles modelo fueron más elevados que los de los controles normales. El tratamiento con MET no tuvo efecto en los valores del IC. Sorprendentemente, ambas dosis de Cmyr-47 redujeron significativamente los valores del IC de ratas ZDF, lo que indica que Cmyr-47 puede ser beneficioso para prevenir acontecimientos cardiovasculares adversos.

Como se muestra en la tabla 28 y la figura 27B, los valores del IR de los controles modelo fueron significativamente más elevados que los de los controles normales ( $P < 0,01$ ), lo que confirma que las ratas ZDF desarrollaron disfunción renal durante el estudio. De acuerdo con el efecto de Cmyr-47 en el NUS en suero, el tratamiento con Cmyr-47 también redujo los valores del IR en ratas ZDF, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística.

En la tabla 28 y la figura 27C se muestra que los valores del IGT de los controles modelo fueron significativamente más elevados que los de los controles normales ( $P < 0,01$ ), lo que indica que las ratas ZDF alcanzaron obesidad mórbida. Aunque no es significativo, las ratas ZDF tratadas con Cmyr-47 mostraron una tendencia de valores del IGT más bajos que los controles modelo. Cabe destacar que MET no mostró una tendencia similar y, más bien, pareció aumentar los valores del IGT en ratas ZDF.

Tabla 28. Efecto de Cmyr-47 en el índice de órganos en ratas ZDF después de 4 semanas de tratamiento (g/kg,  $\bar{x} \pm$  EEM)

Grupo	Dosis/inyección	Índice cardíaco	Índice renal	Índice de grasa total
Control normal	10 ml/kg PBS	3,48±0,09	6,64±0,13	27,47±1,63
Control modelo	10 ml/kg PBS	3,63±0,19	8,39±0,41#	93,70±5,01##

(continuación)

Grupo	Dosis/inyección	Índice cardíaco	Índice renal	Índice de grasa total
Control positivo	300 mg/kg Met	3,63±0,24	7,26±0,55	94,64±3,79
Cmyr-47Ba	10 mg/kg Cmyr-47	2,90±0,13*	7,86±0,63	89,18±4,95
Cmyr-47Al	30 mg/kg Cmyr-47	3,05±0,10*	7,36±0,44	86,61±5,03

Nota: en comparación con el control normal, <sup>#</sup>P <0,05, <sup>##</sup>P <0,01; en comparación con el control modelo, \*P <0,05, \*\*P <0,01

##### 5 Ejemplo 4.9. Efecto de Cmyr-47 en los ácidos biliares totales en suero (ABT)

Para confirmar que Cmyr-47 es capaz de regular el nivel en suero de ABT, se midió el nivel de ABT en suero de cada animal. Como se muestra en la tabla 29 y la figura 28, los niveles en suero de los ABT en los controles modelo fueron más elevados que los de los controles normales. En comparación con el grupo de control modelo, los niveles en suero de ABT de ratas ZDF tratadas con Cmyr-47 se elevaron aún más de forma dependiente de la dosis. Las mediciones en la semana 4 confirmaron que la dosis elevada de Cmyr-47 aumentó significativamente los niveles en suero de los ABT (valores de P inferiores a 0,05). Asimismo, La CsA elevó significativamente los niveles en suero de ABT después de 4 semanas de tratamiento (valores de P inferiores a 0,01).

15 Tabla 29. Efecto de Cmyr-47 en los ABT en suero en ratas ZDF (mmol/ml,  $\bar{x} \pm EEM$ )

Grupo	Dosis/inyección	Nivel de ABT después de semanas de dosificación		
		0	2	4
Control normal	10 ml/kg PBS	42,61±10,94	44,52±8,62	28,51±8,13
Control modelo	10 ml/kg PBS	55,51±36,96	76,24±31,22	59,15±22,38#
Control positivo	300 mg/kg Met	32,83±12,29	82,48±27,02	82,97±15,82*
Cmyr-47Ba	10 mg/kg Cmyr-47	37,51±13,17	74,04±33,35	74,38±28,53
Cmyr-47Al	30 mg/kg Cmyr-47	44,09±12,20	85,47±24,03	114,58±45,31*
Tratamiento con CsA	20 mg/kg CsA	40,29±6,69	78,53±7,38	117,35±9,33**

Nota: en comparación con el grupo de control normal, <sup>#</sup>P <0,05, <sup>##</sup>P <0,01; en comparación con el grupo de control modelo, \*P <0,05, \*\*P <0,01

20 La MET es un fármaco antidiabético ampliamente utilizado que puede modular de manera eficaz la glucemia *in vivo*. Como se presentó anteriormente, en este estudio también se confirmó la eficacia de MET en la regulación de la glucemia. Sin embargo, la MET no logró proporcionar beneficios contra la desregulación de lípidos y las enfermedades asociadas, como lo demuestran los resultados de que MET no fue capaz de reducir los niveles de CT, TG y NUS en suero y los valores del IC en ratas ZDF. Como se muestra en modelos de animales hiperlipidémicos, el tratamiento con CsA no solo aumentó los niveles en suero de TG y CT, sino que aumentó aún más los niveles en suero de GLU, 25 lo que sugiere que la inhibición eficaz de la absorción de ácidos biliares *in vitro* no siempre se traduce en un efecto terapéutico en el metabolismo de los lípidos y la glucosa *in vivo*. En cambio, Cmyr-47 tuvo un buen desempeño en todas las pruebas. Como se ha demostrado anteriormente, Cmyr-47 fue capaz de modular la glucemia y el metabolismo de los lípidos al tiempo que brindaba protección contra el daño del páncreas, la disfunción renal y enfermedades cardiovasculares. Por tanto, Cmyr-47 tuvo un desempeño superior como agente antihiperglucémico, 30 antihipercolesterolemia, antihiperlipidemia y antiadiposidad que el MET y mostró un efecto integral en múltiples fenotipos diabéticos simultáneamente.

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido o una composición farmacéutica que comprende el polipéptido para usar en un método para tratar o prevenir la hiperglucemia o la diabetes de tipo II en un sujeto humano que lo necesita, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en:
- 5 (1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 21 a 40; y  
 (2) un polipéptido modificado químicamente del polipéptido (1), modificado químicamente para tener una modificación aminoterinal con un grupo hidrófobo y/o una modificación carboxiterminal que es capaz de estabilizar el polipéptido, en donde el grupo hidrófobo se elige de ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, colesterol y ácido araquidónico, y la modificación carboxiterminal es amidación (aminación) o isopentanodiolización.
- 10 2. El polipéptido o composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido (1) comprende en el extremo N y/o en el extremo C de la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 21 a 40 una secuencia de aminoácidos flanqueantes natural de la región pre-S1 del VHB.
- 15 3. El polipéptido o composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la secuencia de aminoácidos flanqueante natural de la región pre-S1 del VHB tiene una longitud de 1 a 10, 1 a 8, 1 a 5 o 1 a 3 aminoácidos.
- 20 4. El polipéptido o composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido modificado químicamente se selecciona de uno cualquiera de los siguientes polipéptidos con modificación aminoterinal y modificación carboxiterminal:

Modificación aminoterinal	Secuencia de aminoácidos	Modificación carboxiterminal
Myr	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGFTPPHG	NH <sub>2</sub>
Myr	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGF	NH <sub>2</sub>
Myr	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVG	NH <sub>2</sub>
Myr	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHW	NH <sub>2</sub>
Myr	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNP	NH <sub>2</sub>
Myr	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNP	NH <sub>2</sub>
Myr	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGAN	NH <sub>2</sub>
Myr	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDP	NH <sub>2</sub>
Myr	GGWSSKPRQGMGTNLSPVNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVG	NH <sub>2</sub>
Myr	GLSWTVPLEWTGNLSPVNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVG	NH <sub>2</sub>
Plam	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVG	NH <sub>2</sub>
Estearolio	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVG	NH <sub>2</sub>
Chol	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVG	NH <sub>2</sub>
Myr	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPVKDDWPAANQVG	NH <sub>2</sub>
Myr	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFKANSENPDWLNPNKDNWPANKVG	NH <sub>2</sub>
Myr	GQNLSTSNPLGFFPDHQLDPLFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVG	NH <sub>2</sub>
Myr	GKNISTTNPLGFFPDHQLDPAFRANTRNPWDHNPNKDHWTANKVG	NH <sub>2</sub>
Myr	GQNLSVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWFNTNKDSWPMANKVG	NH <sub>2</sub>
Myr	GKNLSASNPLGFLPDHQLDPAFRANTNNPDWDFNPKKDPWPEANKVG	NH <sub>2</sub>
Myr	GQNLSVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWFNTNKDNWPMANKVG	NH <sub>2</sub>

- 25 5. El polipéptido o composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido

comprende la SEQ ID NO: 23, y en donde el polipéptido comprende además una modificación aminoterminal con ácido mirístico y una modificación carboxiterminal con aminación; o en donde el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 3.

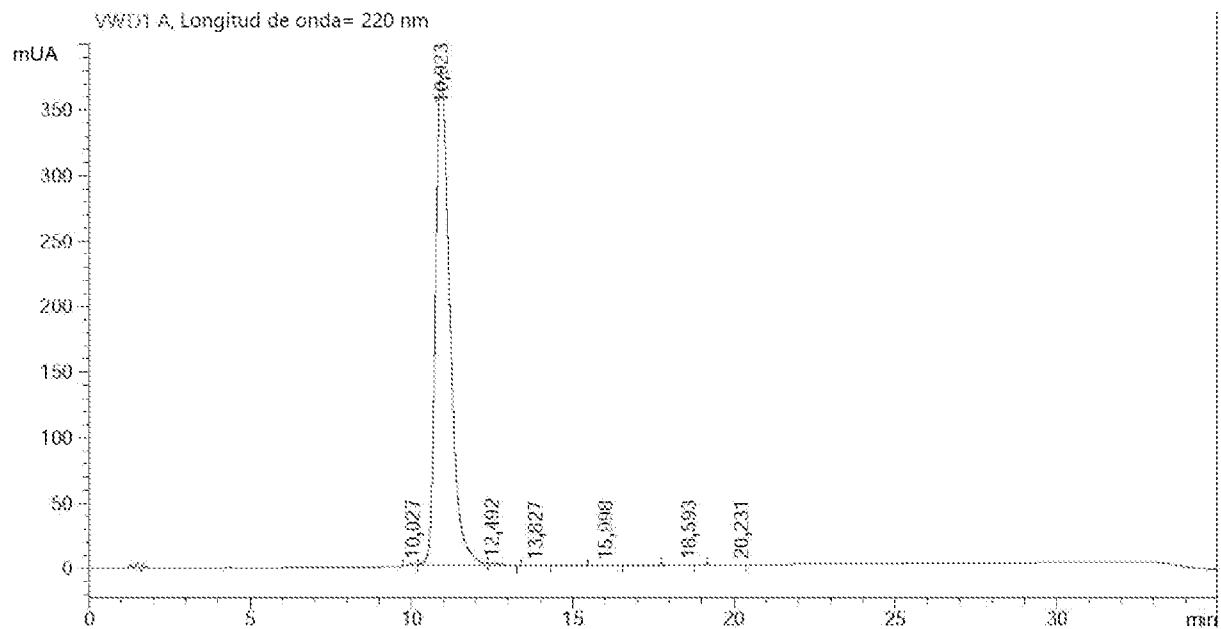
- 5      6. El polipéptido o composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido o la composición farmacéutica que comprende el polipéptido se administra al sujeto antes, simultáneamente o después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un segundo agente.
- 10     7. El polipéptido o composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el segundo agente se elige de un agente antihiperlipidémico, un agente antihiperglucemiante, un agente antidiabético, un agente contra la obesidad y un análogo de ácidos biliares.
- 15     8. El polipéptido o composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el segundo agente se elige de insulina, metformina, sitagliptina, colesevelam, glipizida, simvastatina, atorvastatina, ezetimiba, fenofibrato, ácido nicotínico, orlistat, lorcaserina, fentermina, topiramato, ácido obeticólico y ácido ursodesoxicólico.
- 20     9. El polipéptido o composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido o la composición farmacéutica que comprende el polipéptido se administra al sujeto mediante al menos un modo elegido de administración parenteral, intrapulmonar, intranasal, intralesional, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y subcutánea.

20

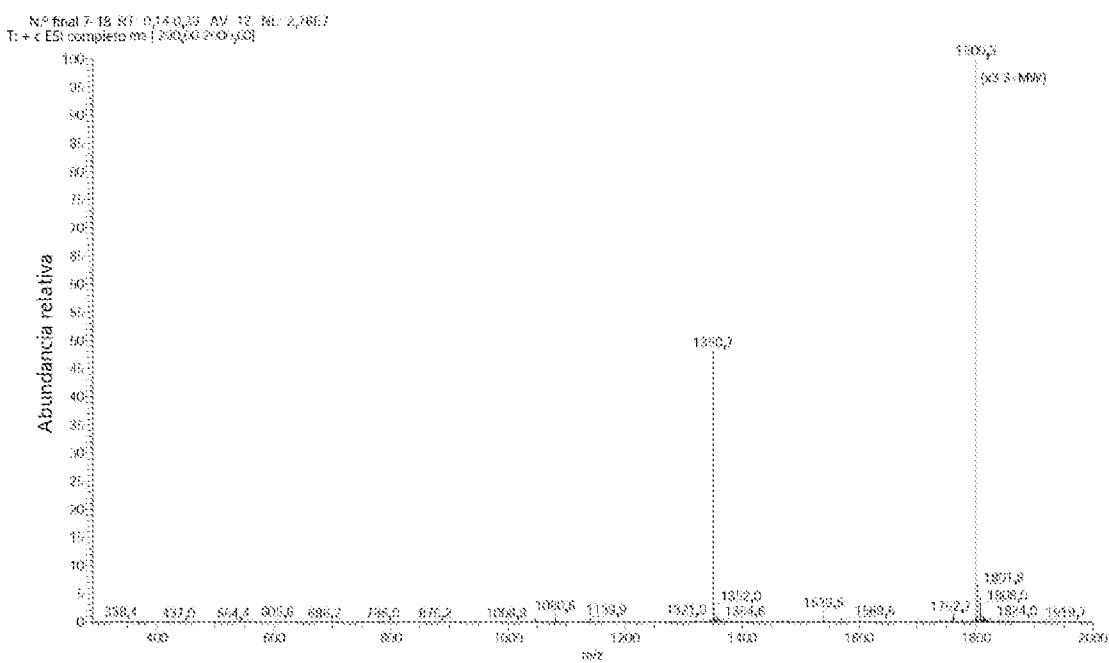
# ES 2 979 305 T3

**FIG. 1**

**A.**

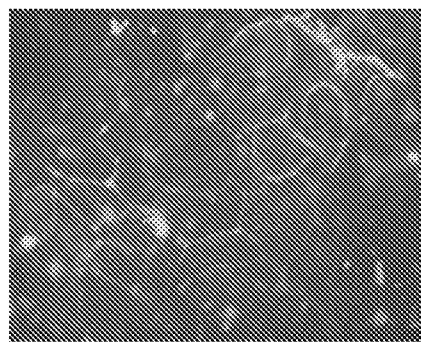


**B.**

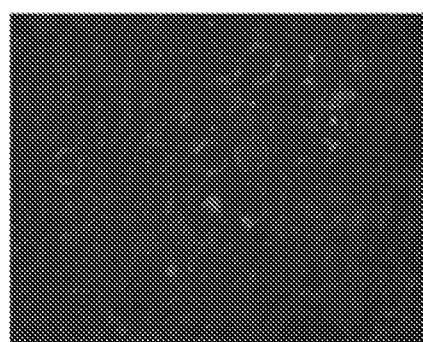


**FIG. 2**

**A.**



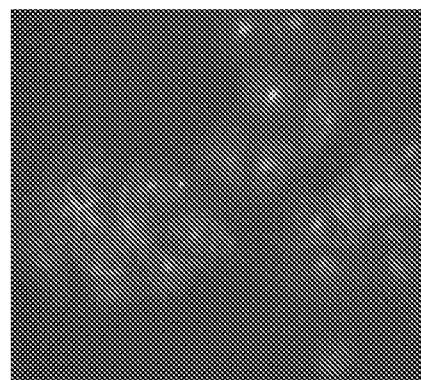
**B.**



**FIG. 3**

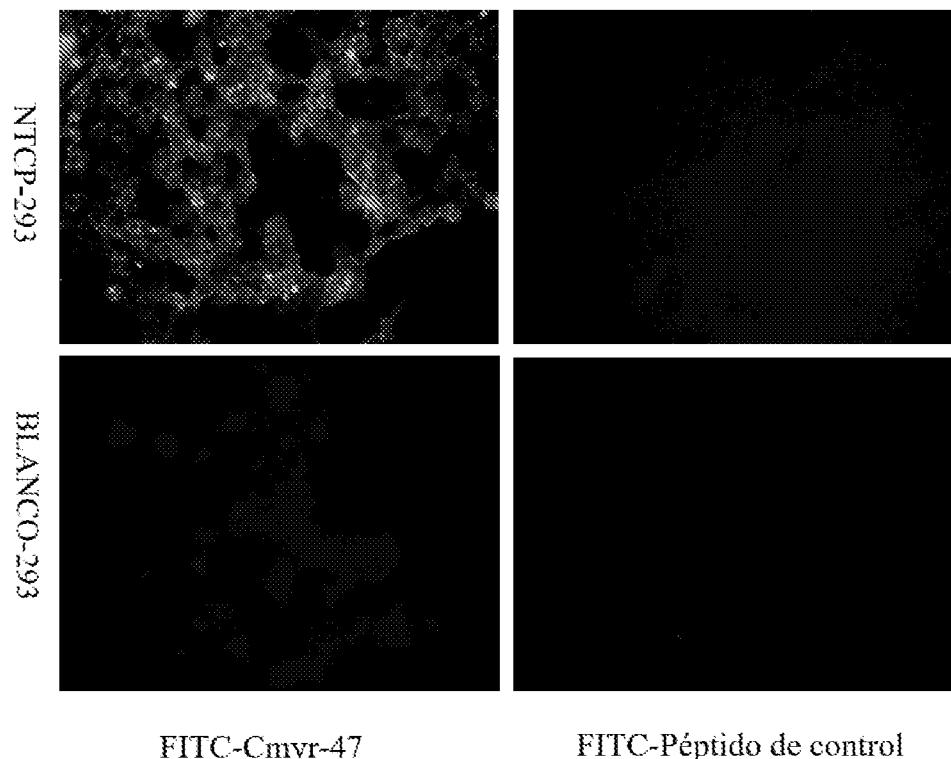


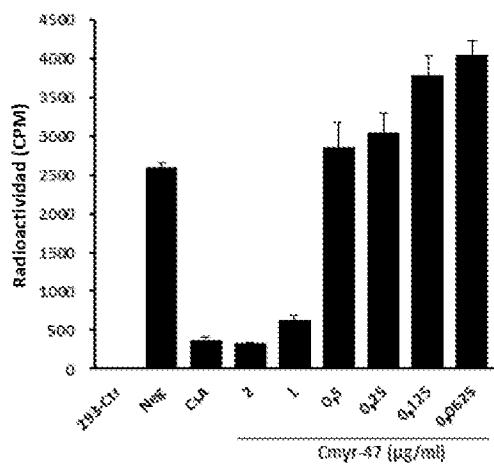
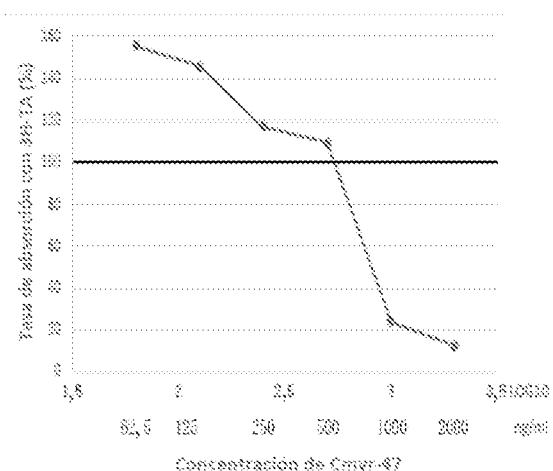
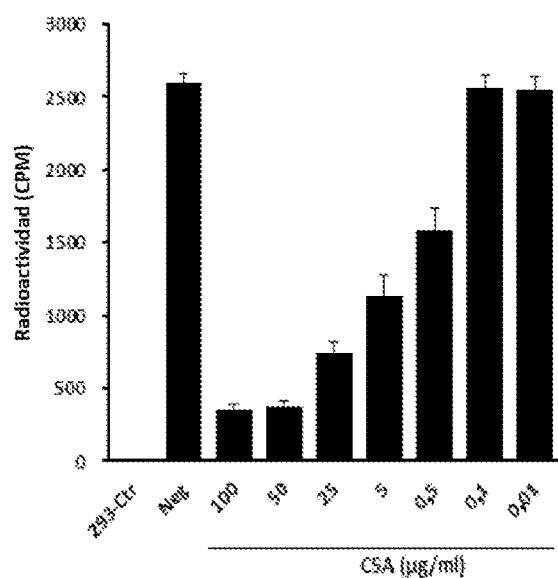
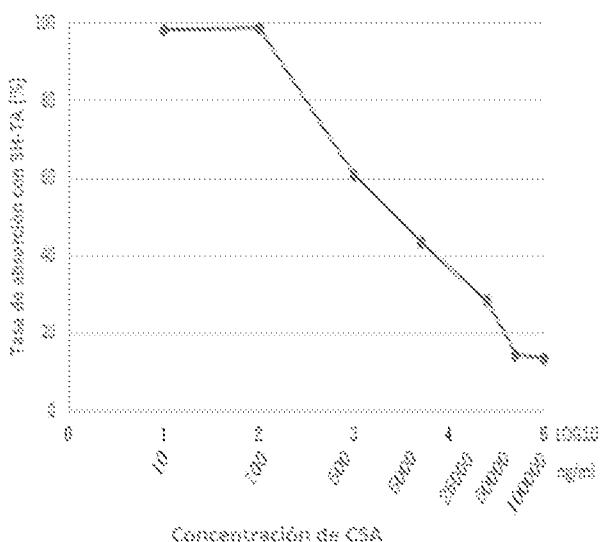
BLANCO-L02



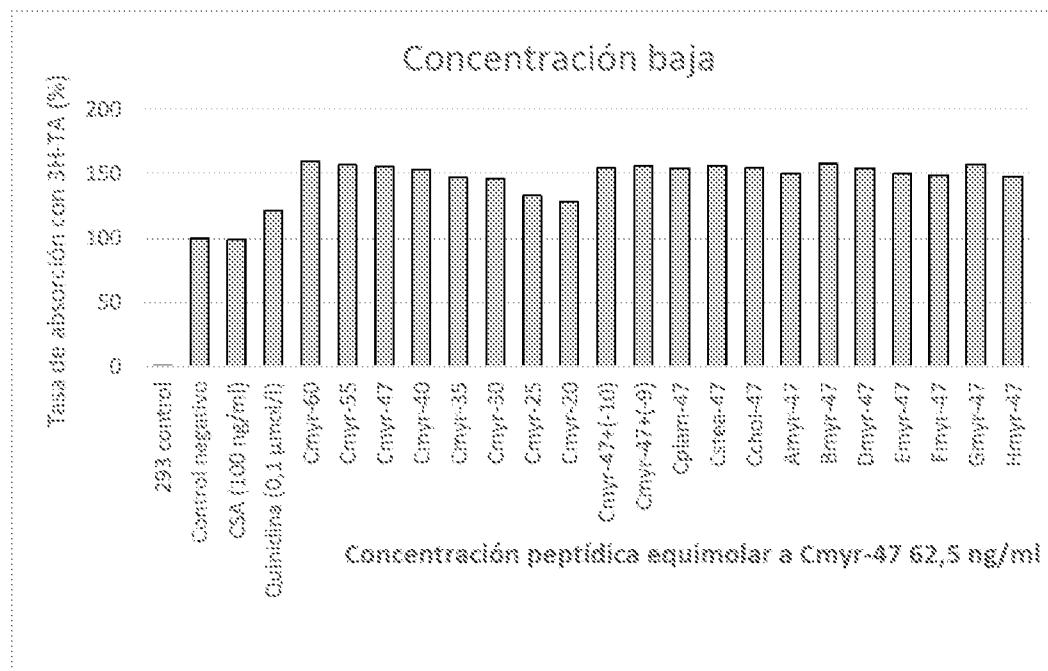
NTCP-L02

FIG. 4

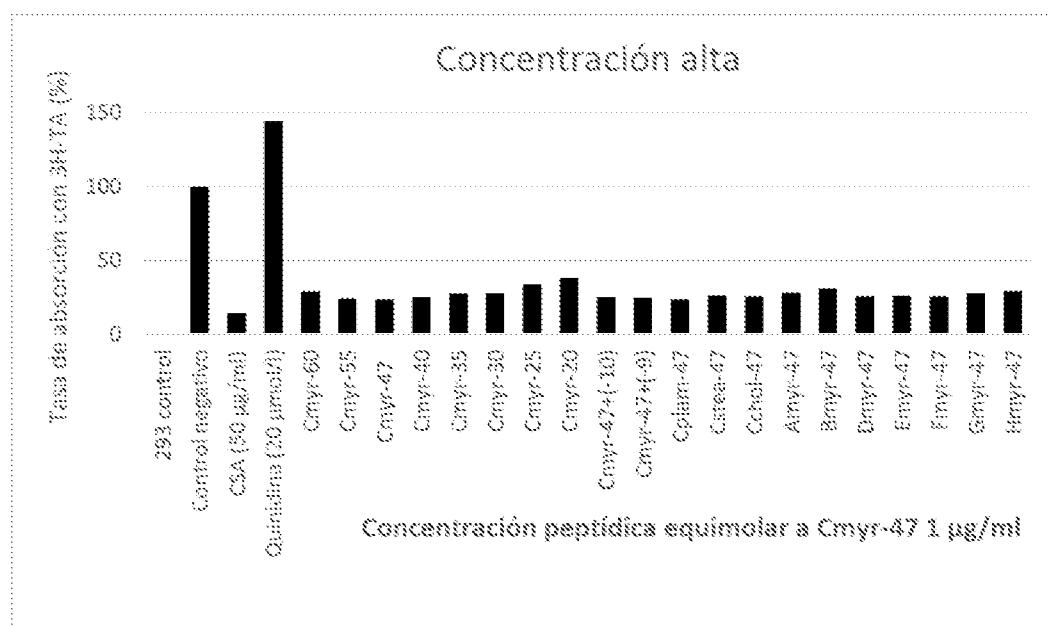


**FIG. 5****A.****B.****C.****D.**

E.



F.



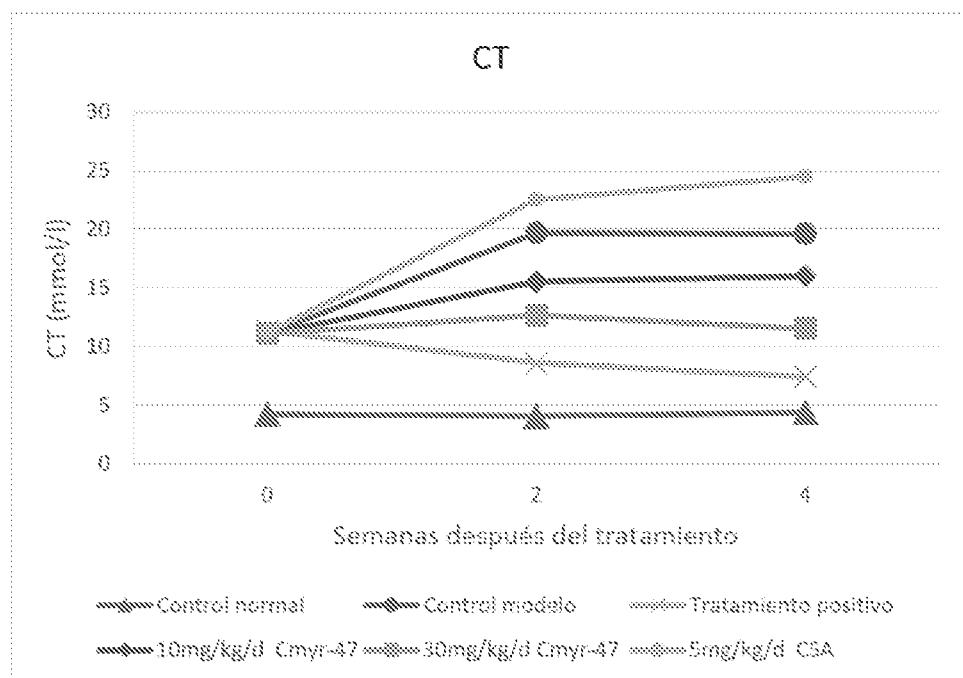
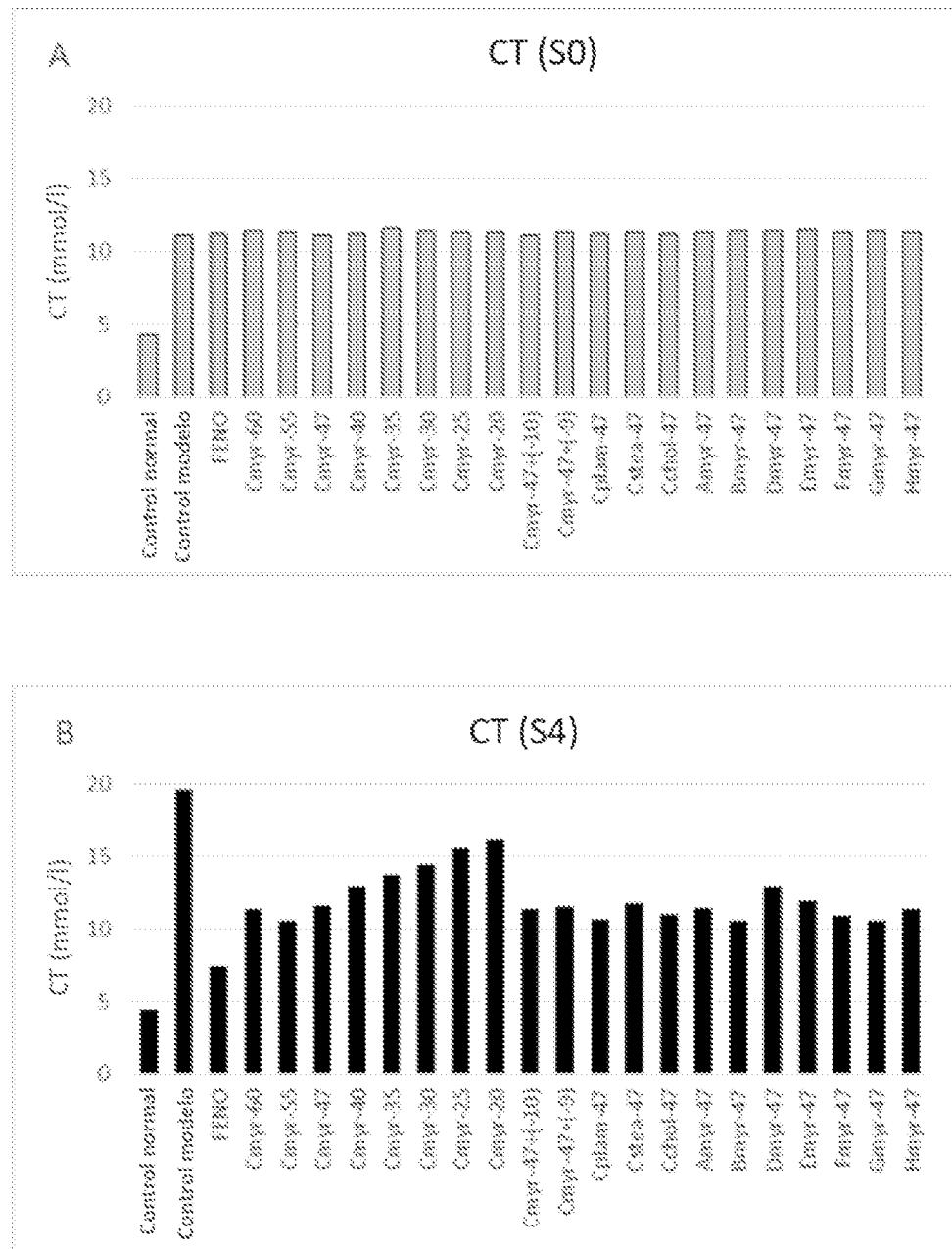
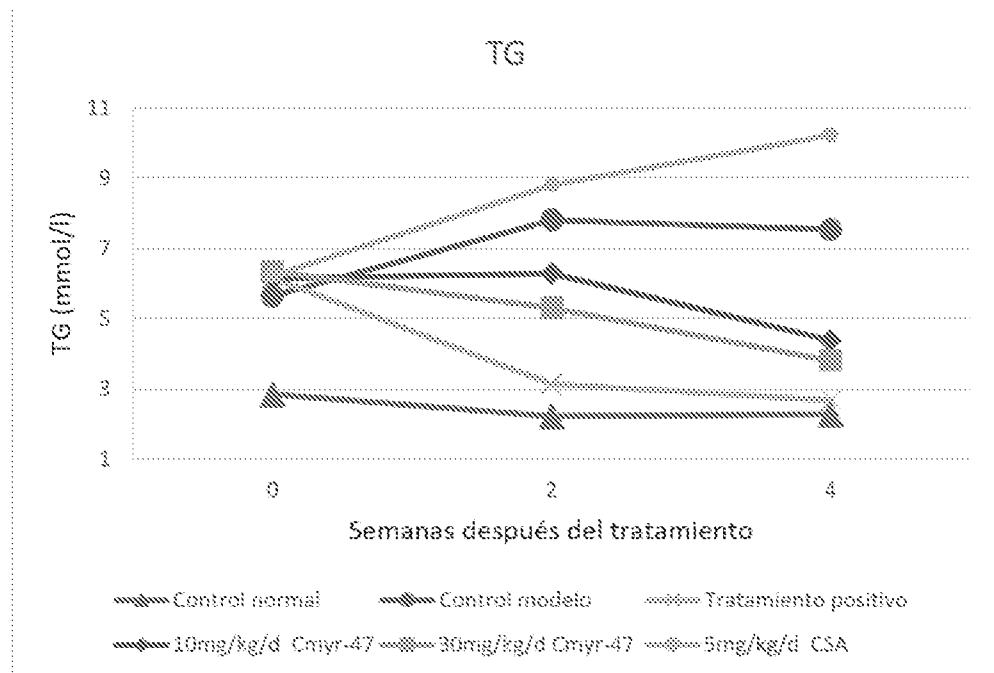
**FIG. 6**

FIG. 7



**FIG. 8**

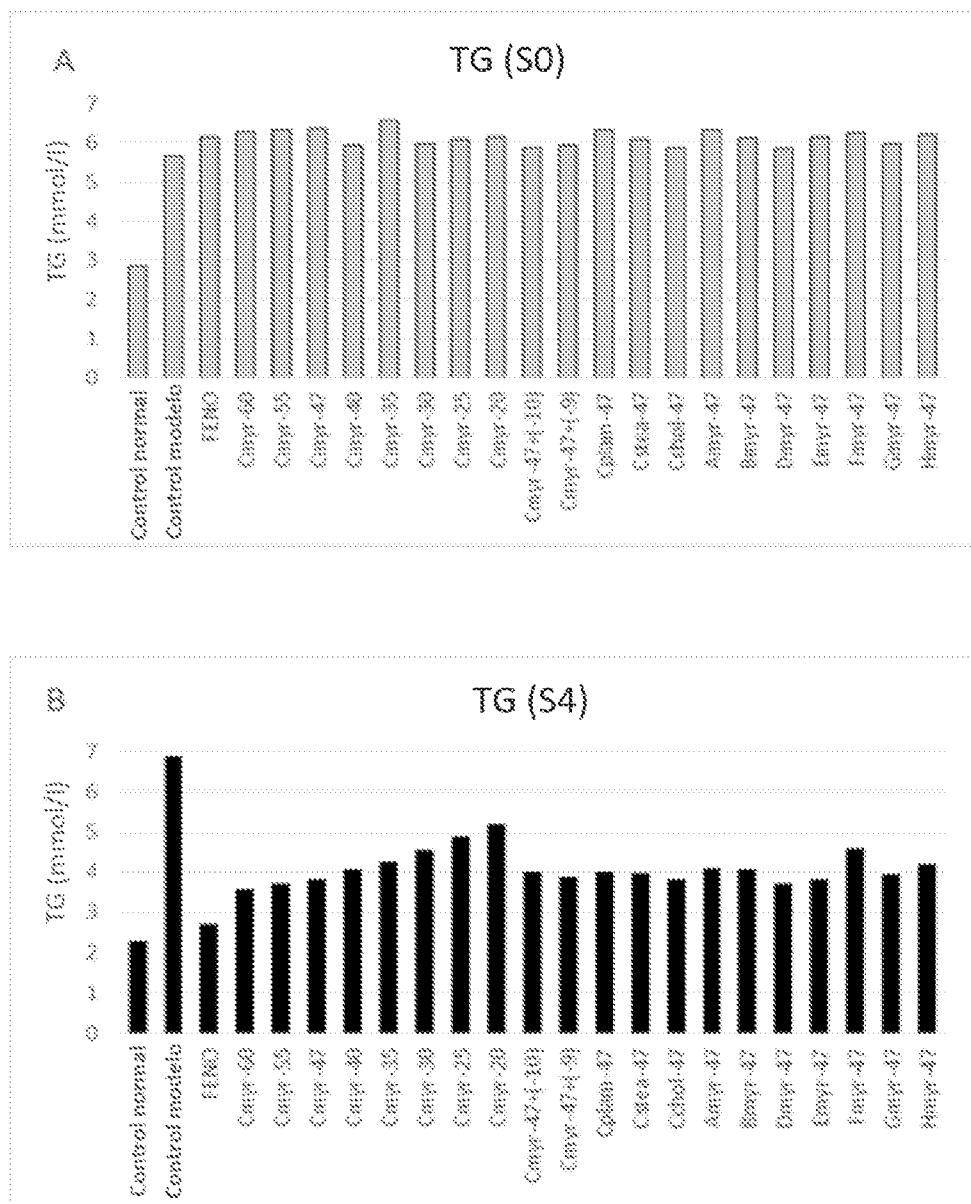
**FIG. 9**

FIG. 10

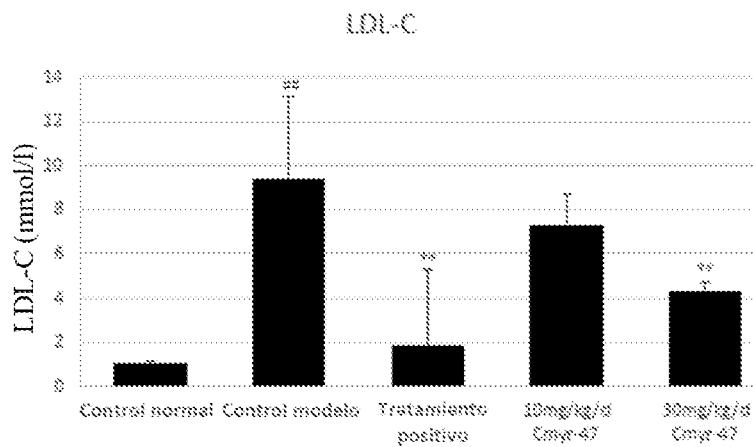
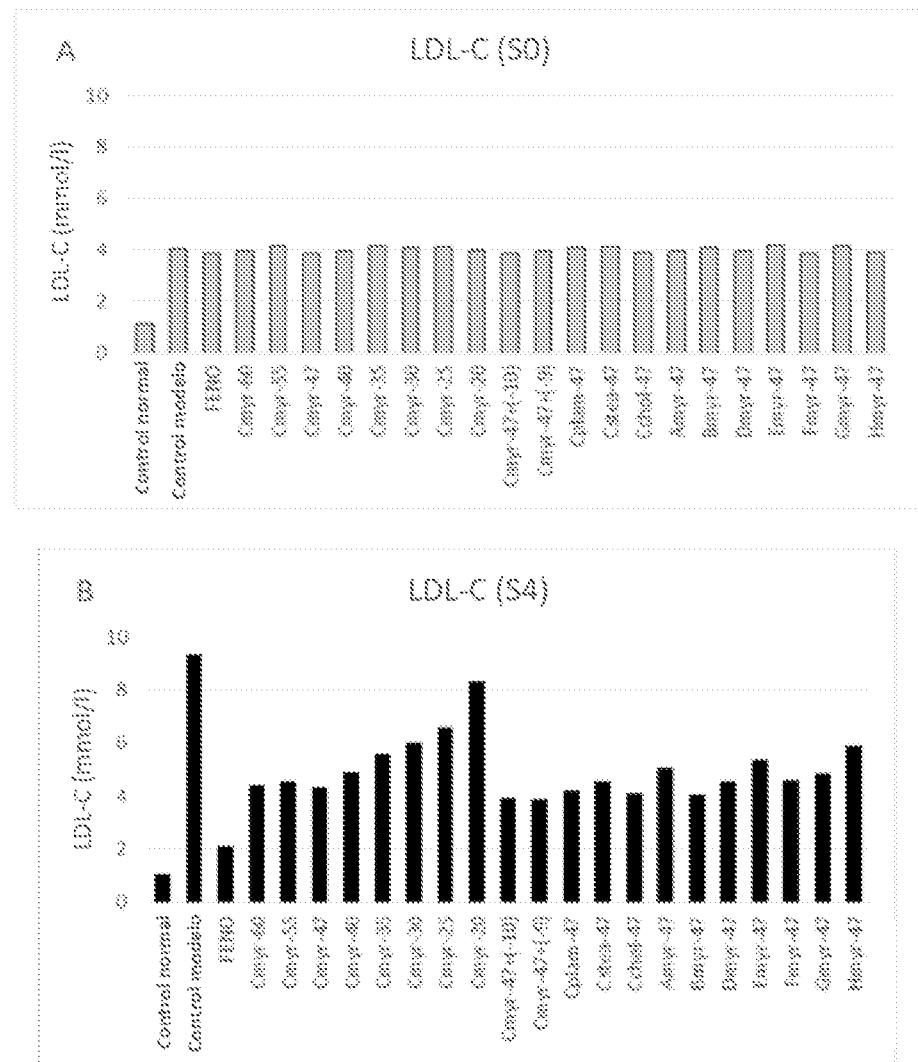
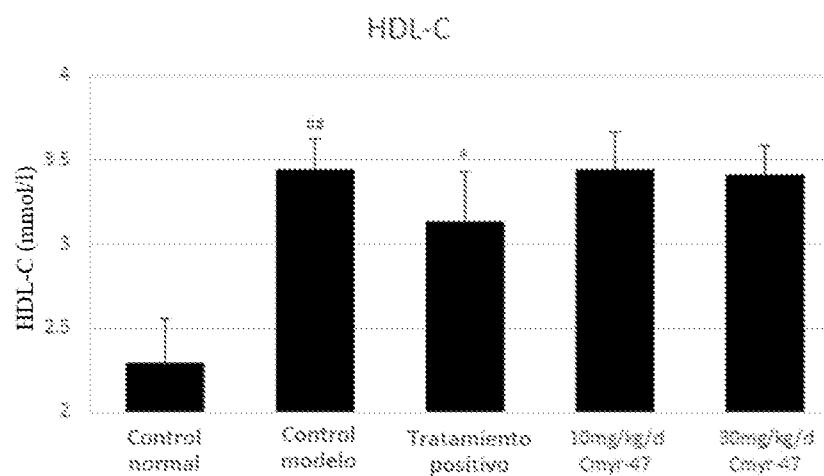


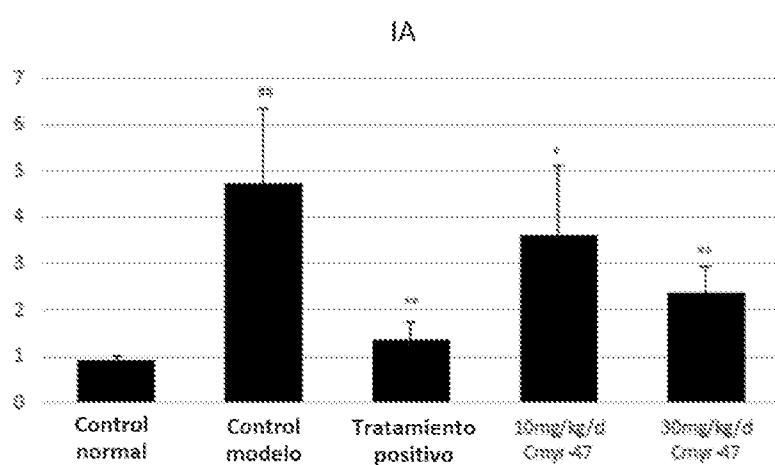
FIG. 11



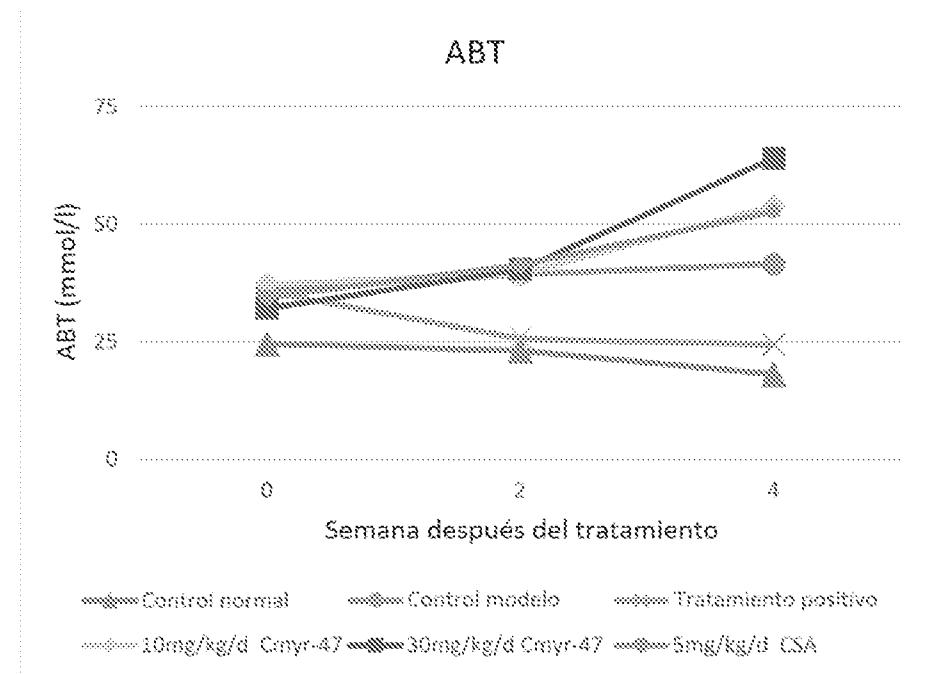
**FIG. 12**



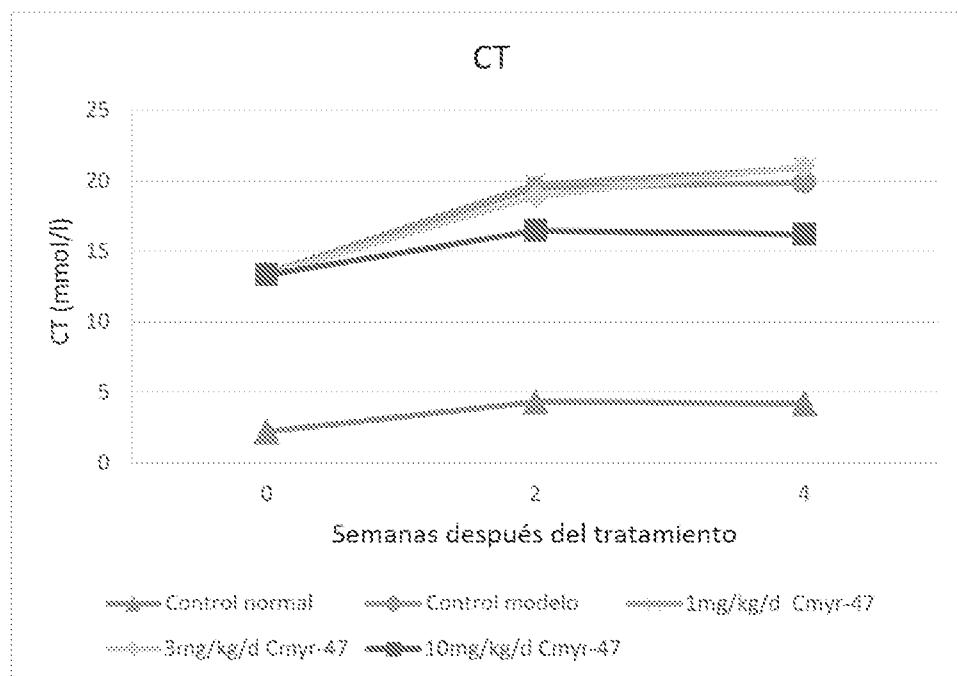
**FIG. 13**



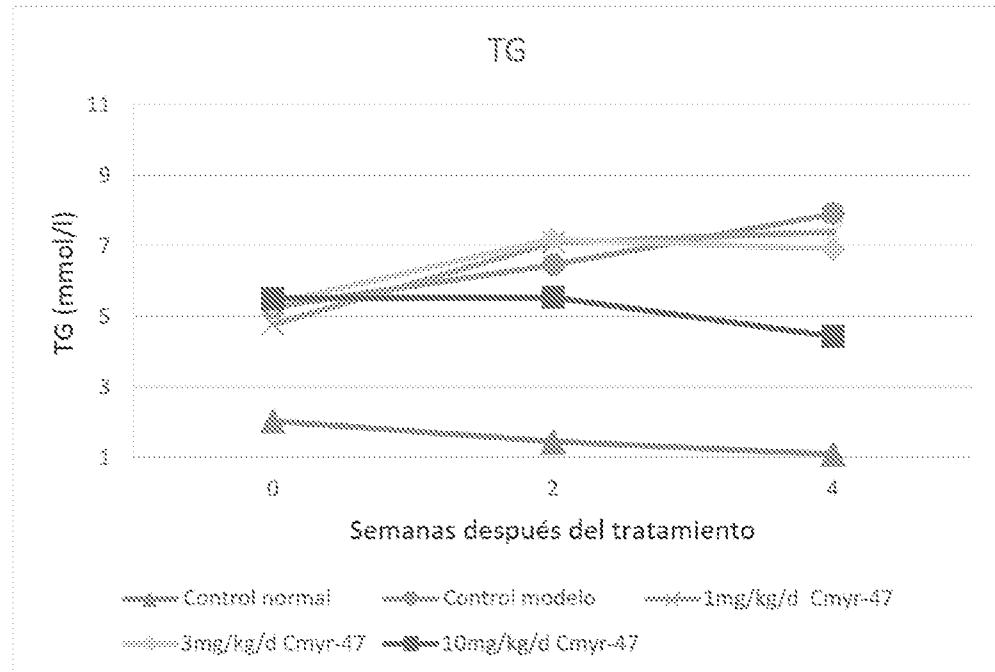
**FIG. 14**



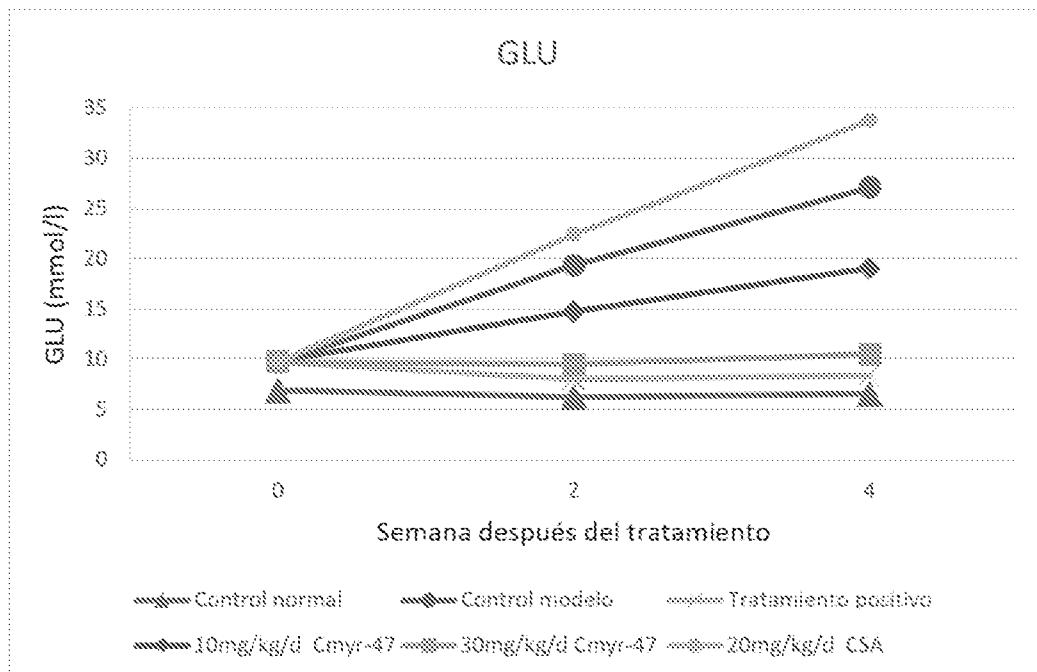
**FIG. 15**

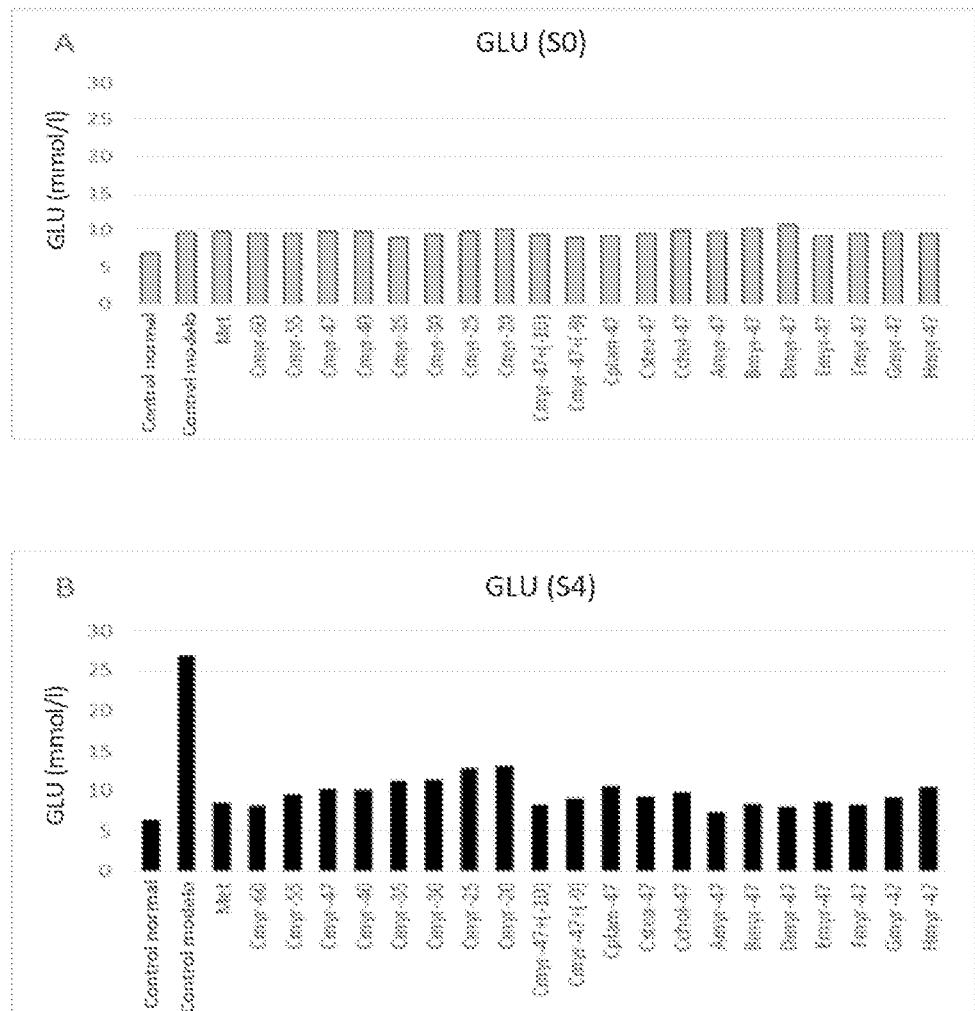


**FIG. 16**

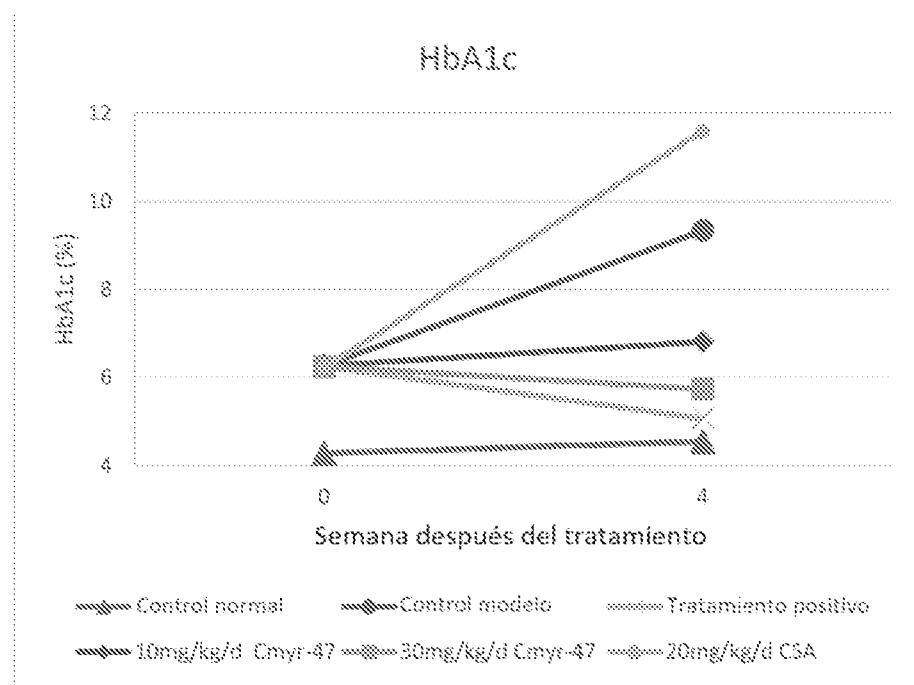


**FIG. 17**



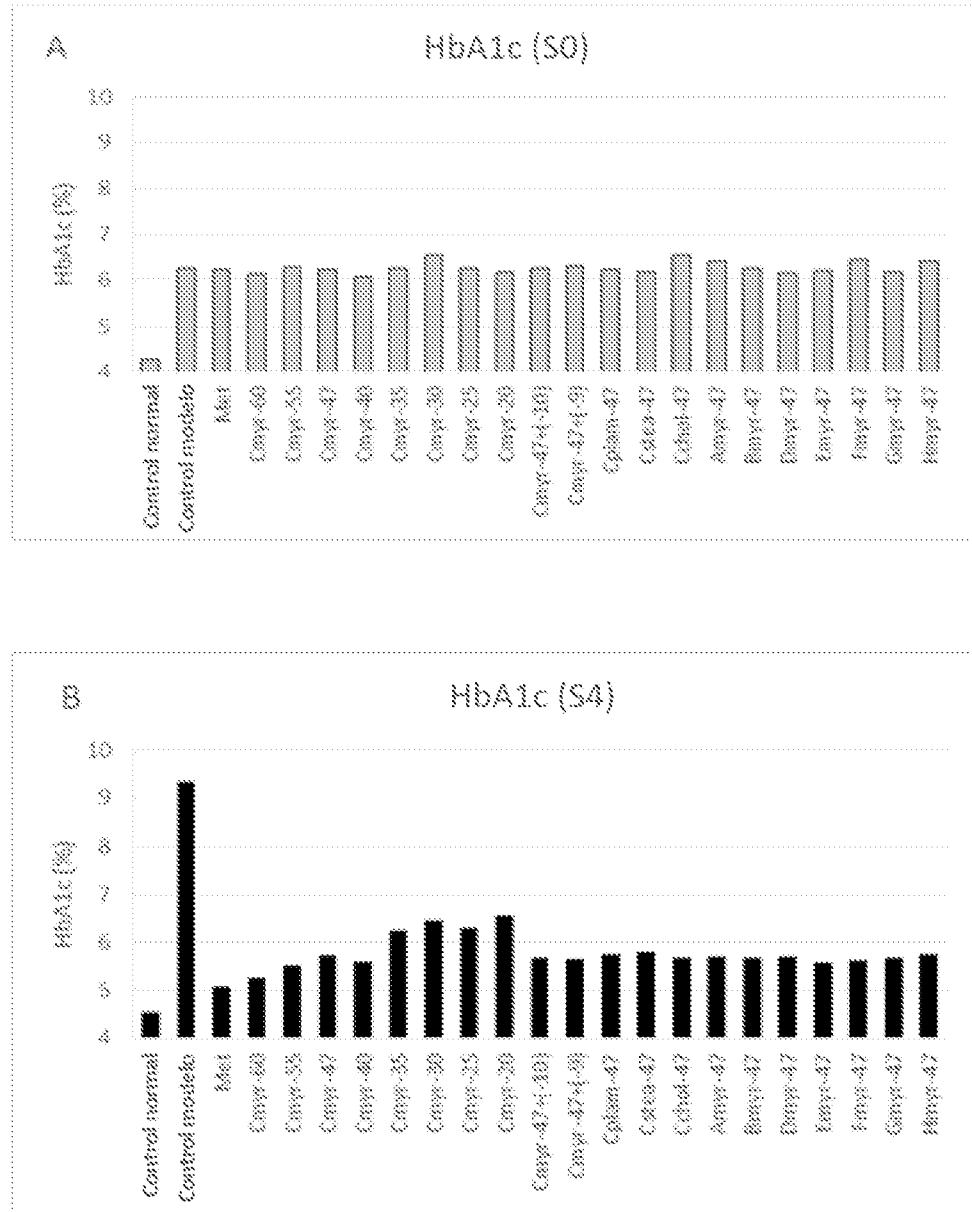
**FIG. 18**

**FIG. 19**

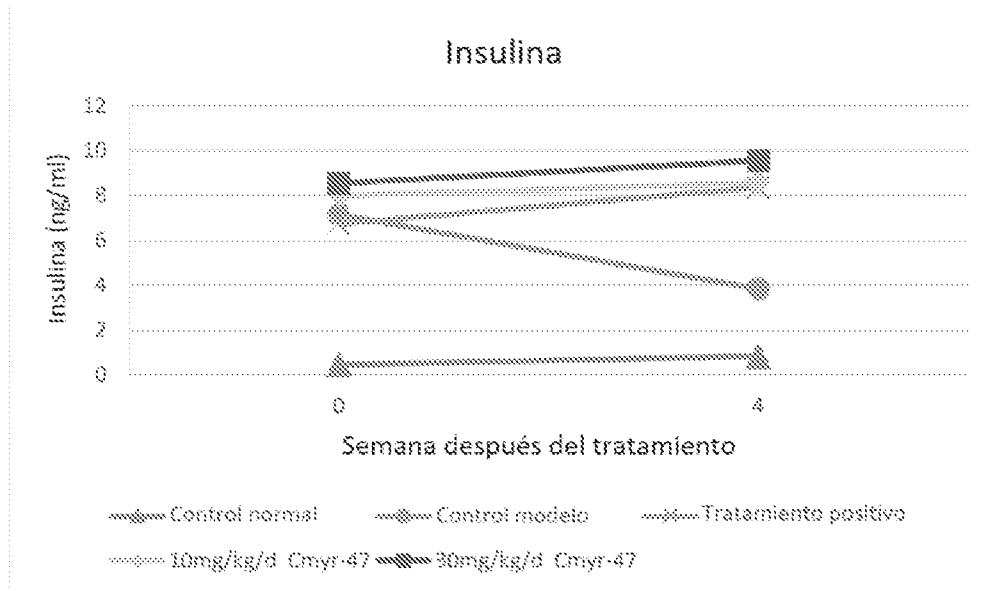


ES 2 979 305 T3

FIG. 20



**FIG. 21**



**FIG. 22**

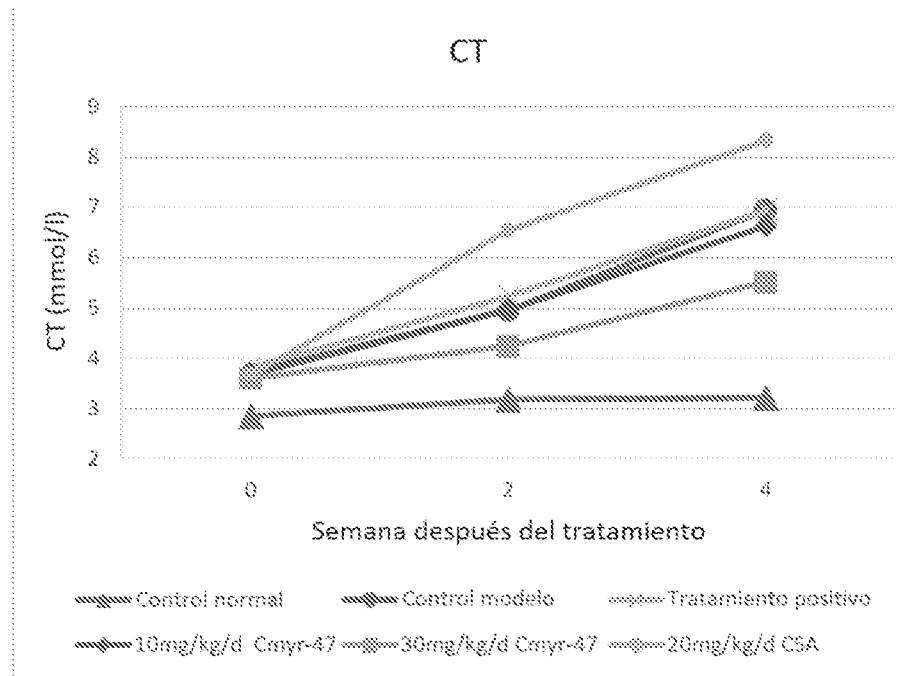
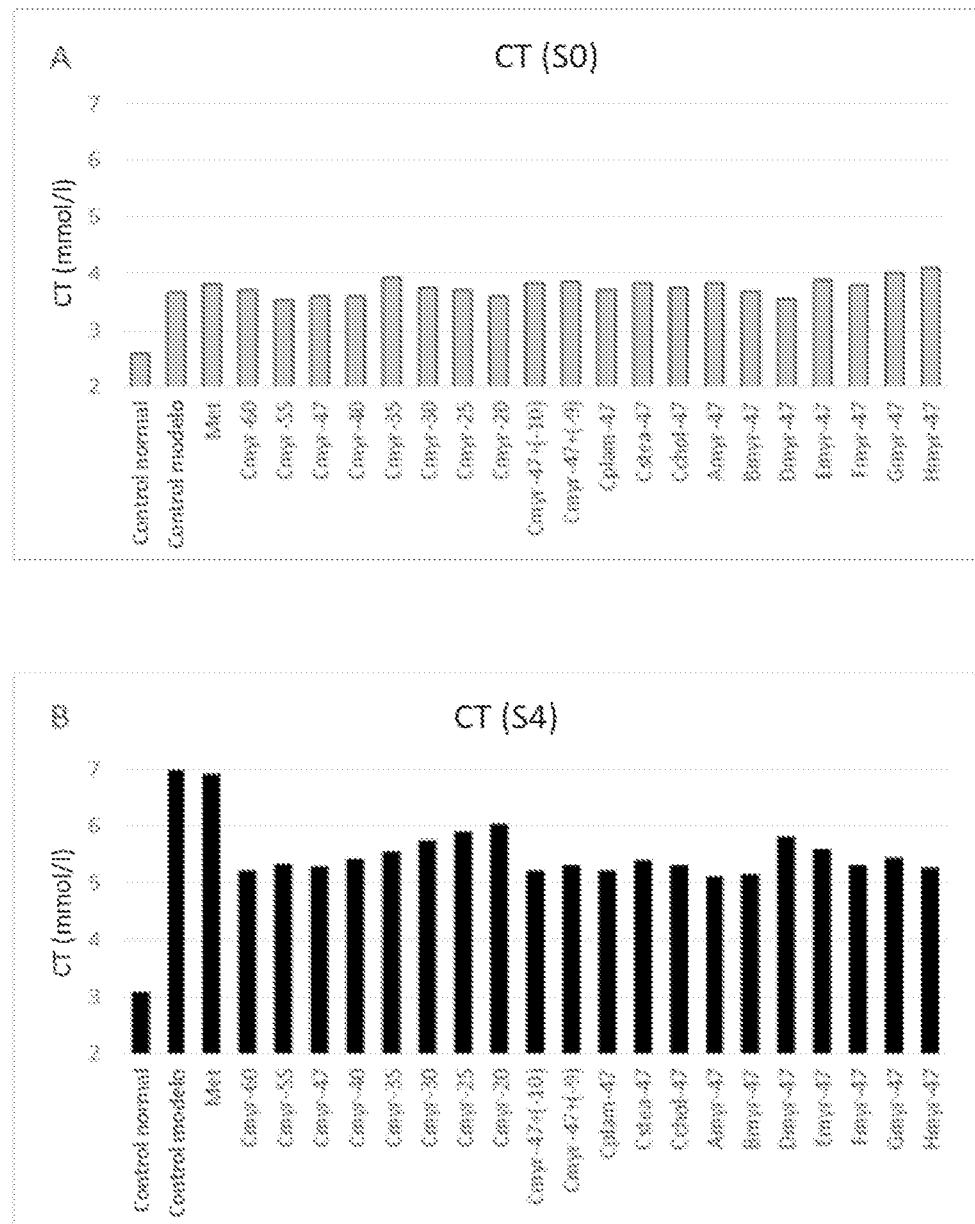


FIG. 23



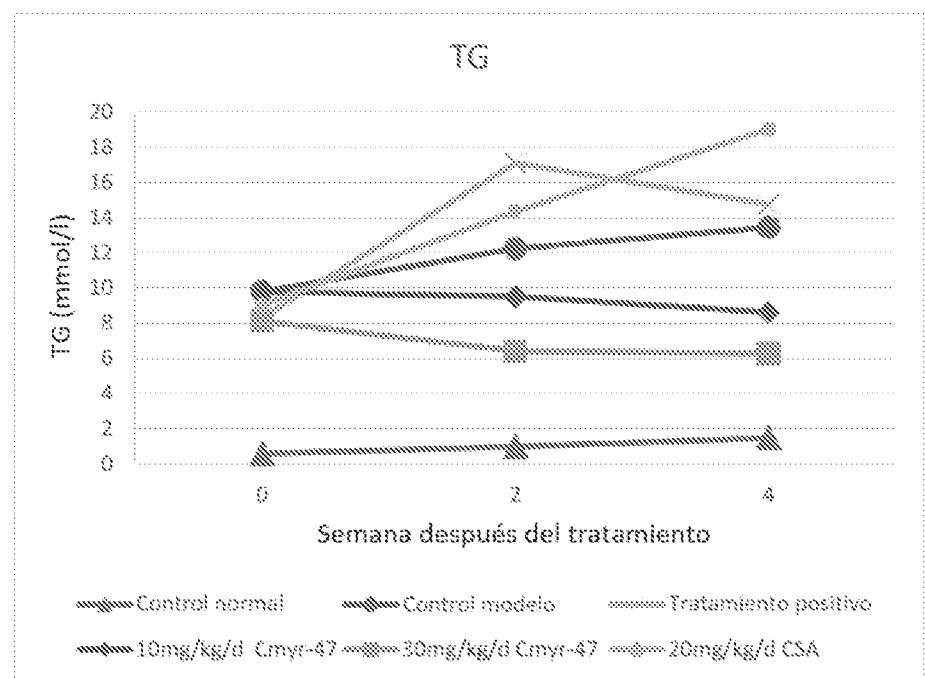
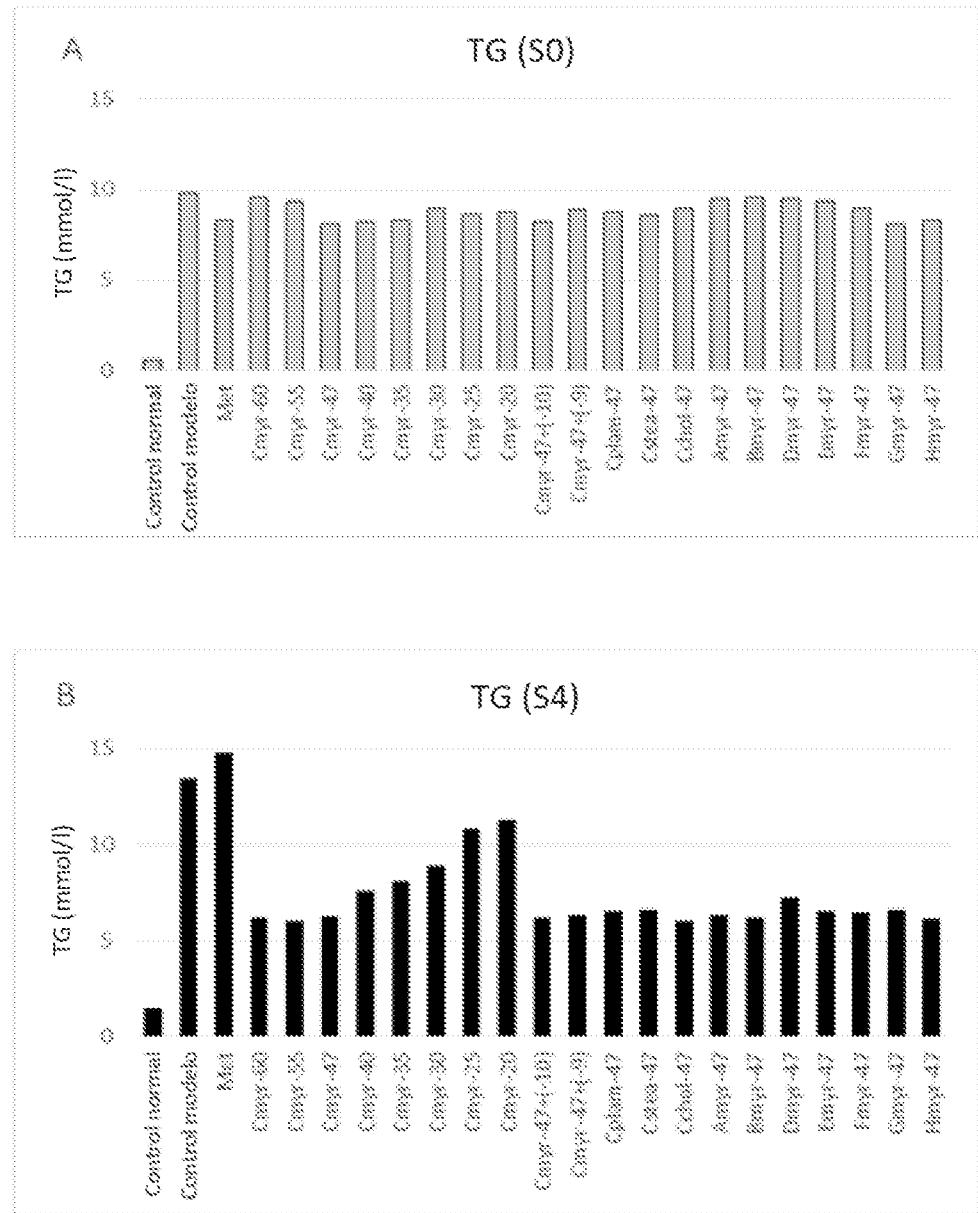
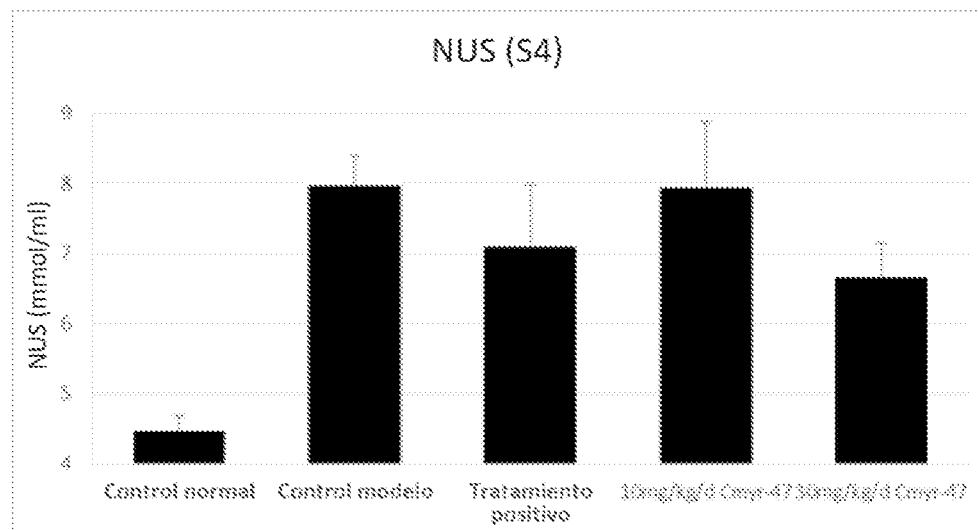
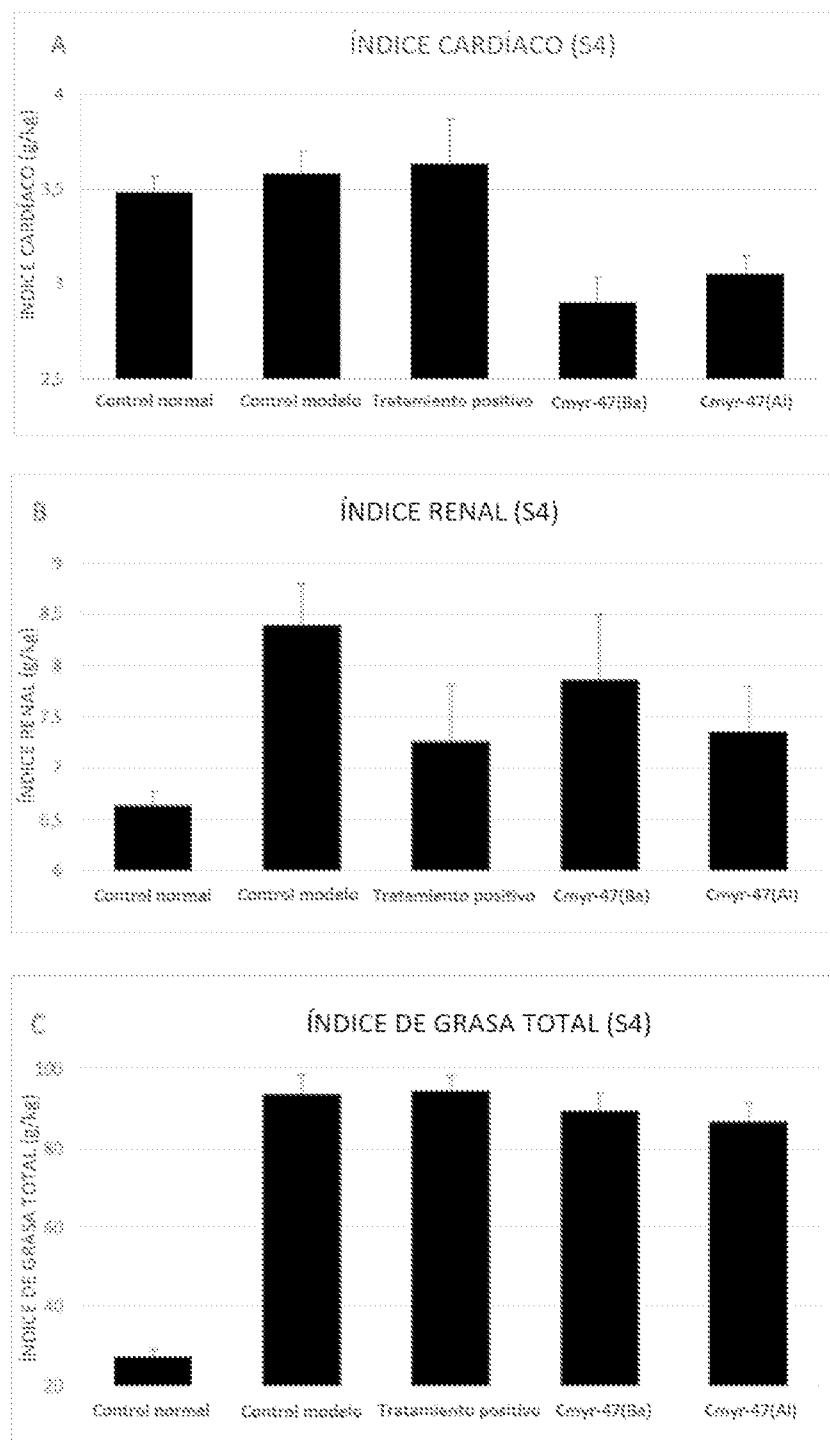
**FIG. 24**

FIG. 25



**FIG. 26**



**FIG. 27**

**FIG. 28**

