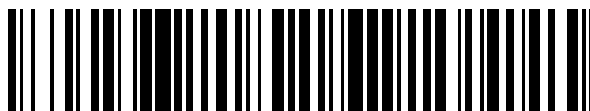


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 847 288**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/02** (2006.01)

**A61P 33/02** (2006.01)

**A61P 31/20** (2006.01)

**A61P 35/04** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2009 PCT/EP2009/000477**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2009 WO09092612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2009 E 09704030 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 2245047**

54 Título: **Péptidos derivados de preS hidrófobos modificados del virus de la hepatitis B (VHB) y su uso como vehículos para el suministro específico de compuestos al hígado**

30 Prioridad:

**25.01.2008 US 62347 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.08.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

### Observaciones:

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

ES 2 847 288 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados de preS hidrófobos modificados del virus de la hepatitis B (VHB) y su uso como vehículos para el suministro específico de compuestos al hígado

La presente invención se refiere a péptidos derivados de preS hidrófobos modificados del virus de la hepatitis B (VHB) que son vehículos versátiles para el suministro específico de compuestos al hígado, preferiblemente a los hepatocitos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Cualquier tipo de compuesto, pero en particular fármacos, tales como interferones, inhibidores de la transcriptasa inversa viral o inhibidores del ensamblaje del núcleo, pueden dirigirse específicamente al hígado y, por lo tanto, enriquecerse en el hígado. Este direccionamiento al hígado se puede utilizar además para el tratamiento dirigido de enfermedades o trastornos hepáticos, tales como hepatitis, malaria, carcinoma hepatocelular (CHC), así como para la prevención de la infección por VHB y/o VHD.

## Antecedentes de la invención

El hígado, un órgano que está presente en los vertebrados y otros animales, juega un papel importante en el metabolismo y tiene una serie de funciones en el cuerpo, incluyendo el almacenamiento de glucógeno, la descomposición de los glóbulos rojos, la síntesis de proteínas plasmáticas y desintoxicación. El hígado también es la glándula más grande del cuerpo humano. Se encuentra debajo del diafragma en la región torácica del abdomen. Produce bilis, un compuesto alcalino que ayuda a la digestión mediante la emulsión de lípidos. También realiza y regula una amplia variedad de reacciones bioquímicas de gran volumen que requieren tejidos especializados.

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

Existe una gran cantidad de enfermedades conocidas del hígado, tales como:

- Hepatitis: inflamación del hígado, causada principalmente por varios virus pero también por ciertos venenos, autoinmunidad o condiciones hereditarias;
- Cirrosis: la formación de tejido fibroso en el hígado que reemplaza las células muertas del hígado. La muerte de las células del hígado puede ser causada, por ejemplo, por hepatitis viral, alcoholismo o contacto con otras sustancias químicas tóxicas para el hígado;
- Hemocromatosis: una enfermedad hereditaria que causa la acumulación de hierro en el cuerpo, que eventualmente conduce a daño hepático;
- Cáncer de hígado: carcinoma hepatocelular (CHC) primario o colangiocarcinoma y cánceres metastásicos, generalmente de otras partes del tracto gastrointestinal;
- Enfermedad de Wilson: una enfermedad hereditaria que hace que el cuerpo retenga cobre;
- Colangitis esclerosante primaria: una enfermedad inflamatoria del conducto biliar, de naturaleza autoinmune;
- Cirrosis biliar primaria: enfermedad autoinmune de los conductos biliares pequeños;
- Síndrome de Budd-Chiari: obstrucción de la vena hepática;
- Síndrome de Gilbert: un trastorno genético del metabolismo de la bilirrubina, que se encuentra en aproximadamente el 5% de la población;
- Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II: la acumulación de glucógeno causa debilidad muscular progresiva (miopatía) en todo el cuerpo y afecta a varios tejidos corporales, particularmente en el corazón, los músculos esqueléticos, el hígado y el sistema nervioso.

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

Además, varios patógenos y parásitos, especialmente de enfermedades tropicales, tienen una etapa hepática durante su ciclo de vida.

Por ejemplo, la malaria, que es una de las enfermedades infecciosas más comunes y un enorme problema de salud pública. La malaria es causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium*. Las formas más graves de la enfermedad son causadas por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, pero otras especies relacionadas (*Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y, a veces, *Plasmodium knowlesi*) también pueden infectar a los seres humanos. Este grupo de especies de *Plasmodium* patógenas para los seres humanos se suele denominar parásitos de la malaria. Los parásitos de la malaria son transmitidos por mosquitos *Anopheles* hembra. La malaria en humanos se desarrolla a través de dos fases: una exoeritrocítica (fase hepática o "etapa hepática") y una fase eritrocítica. Cuando un mosquito infectado perfora la piel de una persona para ingerir sangre, los esporozoitos de la saliva del mosquito ingresan al torrente sanguíneo y migran al hígado. Aproximadamente 30 minutos después de su introducción en el huésped humano, infectan los hepatocitos, multiplicándose asexualmente y asintóticamente durante un

período de 6 a 15 días. Una vez en el hígado, estos organismos se diferencian para producir miles de merozoitos que, tras la ruptura de sus células huésped, escapan a la sangre e infectan los glóbulos rojos, comenzando así la etapa eritrocítica del ciclo de vida. El parásito escapa del hígado sin ser detectado envolviéndose en la membrana celular de la célula hepática infectada del huésped. El parásito está relativamente protegido del ataque del sistema inmunológico del cuerpo porque durante la mayor parte de su ciclo de vida humano reside dentro del hígado y las células sanguíneas y es relativamente invisible para la vigilancia inmunológica. Existe un interés creciente en el desarrollo de medicamentos que se dirijan específicamente a las etapas específicas en el hígado de los parásitos de la malaria (por ejemplo, primaquina) para evitar el desarrollo de etapas sanguíneas.

Otro ejemplo es la esquistosomiasis o bilharziosis, que es una enfermedad parasitaria causada por varias especies de gusanos planos. Aunque tiene una baja tasa de mortalidad, la esquistosomiasis puede ser muy debilitante. Es una enfermedad a menudo crónica que resulta de la infección de la sangre con un gusano plano parásito (esquistosoma). Causa debilitamiento y daño hepático e intestinal. Se encuentra más comúnmente en Asia, África y América del Sur, especialmente en áreas con agua contaminada con caracoles de agua dulce, que contienen el parásito.

El virus de la hepatitis B (VHB), la causa de la hepatitis B, es el prototipo de una familia de virus de ADN pequeños y envueltos de mamíferos y aves (1). La envoltura del VHB encierra tres proteínas denominadas L (grande), M (mediana) y S (pequeño) (Figura 1A). Comparten el dominio S del terminal C con cuatro regiones transmembrana. Las proteínas M y L portan extensiones adicionales del terminal N de 55 aa, y dependiendo del genotipo, 107 o 118 aa (preS2 y preS1) (Figura 1B). En los viriones, la relación estequiométrica de L, M y S es de aproximadamente 1:1: 4, mientras que las partículas subvirales (PSV) no infecciosas secretadas con mayor abundancia contienen casi exclusivamente proteína S y sólo trazas de L (2). Durante la síntesis, el dominio de preS1 de L se miristoila y en algún momento del ciclo de vida del VHB se transloca a través de la membrana derivada del RE. Esta modificación es esencial para la infectividad (3,4). Tanto el VHB como los otros virus hepatotrópicos tienen un tropismo hepático, es decir, el hígado es el tejido que apoya específicamente el crecimiento del VHB.

El direccionamiento específico de fármacos tiene como objetivo mejorar la eficacia de las terapias. En 1906 Paul Ehrlich introdujo la expresión "bala mágica" para la búsqueda de estrategias de tratamiento optimizadas. Desde entonces, la investigación en el sentido del direccionamiento de fármacos se ha centrado en el desarrollo de sistemas portadores que aumentan la concentración terapéutica de un fármaco en el tejido diana, tal como tumores o patógenos y, por lo tanto, reducen los efectos secundarios para el organismo en su conjunto. Idealmente, el direccionamiento del fármaco debería cumplir los siguientes criterios: 1) transferencia exclusiva del fármaco al sitio de acción requerido; 2) un mínimo de efectos para el organismo restante; 3) uso de un vector farmacológicamente inactivo.

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

Se han usado varios portadores de fármacos para mejorar el direccionamiento de fármacos al hígado. Un enfoque sencillo se basa en la fagocitosis activa del sistema reticuloendotelial en el hígado mediante la administración de fármacos en vehículos particulares, tales como liposomas y microesferas. Por ejemplo, se ha demostrado que después de una inyección iv, los portadores de partículas que incorporan un fármaco son capturados principalmente por el sistema reticuloendotelial en el hígado, lo que da como resultado que el fármaco se dirija al hígado (5). Por otro lado, el direccionamiento de fármacos al hígado con polímeros solubles en agua cargados positivamente se basa en la extravasación libre de la mayoría de las sustancias solubles en agua del sistema vascular del hígado, así como en cargas negativas en la superficie de las células hepáticas (6). Por lo tanto, se han utilizado polímeros como vehículo para permitir que los fármacos se dirijan al hígado basándose en tales características anatómicas y bioquímicas del hígado. Se ha intentado el direccionamiento más específico de fármacos al hígado mediante el uso de receptores de asialoglicoproteína de células hepáticas. El receptor de asialoglicoproteína (receptor de galactosa) está presente en los hepatocitos con alta densidad. Además, una vez que un ligando se une al receptor de galactosa, el complejo ligando-receptor se internaliza, lo que permite la captación celular de ligandos galactosilados (7).

El documento US 7.001.760 B2 describe vectores recombinantes derivados del virus de la hepatitis B (VHB), que pueden usarse para terapia génica, tal como la administración de genes terapéuticos a células hepáticas y la expresión de genes heterólogos en células hepáticas. Sin embargo, los vectores del VHB tienen una capacidad limitada para empaquetar genes.

El documento CN 101 045 156 A describe "un medicamento dirigido" con la fórmula general  $XY$ , en la que X es una secuencia de aminoácidos, que contiene (a) una secuencia de aminoácidos derivada de una proteína de un virus infeccioso con especificidad hepática, (b) una secuencia de (a) generada por permutación, agotamiento, inserción o acceso de uno o más residuos de aminoácidos; L es un enlazador opcional entre X e Y; e Y es un medicamento o grupo de radical. X puede contener un polipéptido de proteína pre-S1 del VHB o una variante de la misma.

Sin embargo, hasta ahora no existen enfoques de diagnóstico, terapéuticos y/o preventivos universales que se dirijan específicamente al hígado de un animal o ave, en particular en un ser humano, y, al mismo tiempo, suministren específicamente un compuesto o fármaco deseado al hígado.

- 5 Por lo tanto, existe la necesidad de enfoques universales de diagnóstico, terapéuticos y/o preventivos que en un sujeto se dirijan específicamente al hígado y suministren específicamente un compuesto o fármaco deseado al hígado.

Además, no existen enfoques de diagnóstico, terapéuticos y/o preventivos universales que en un sujeto se dirijan específicamente al hígado y suministren específicamente un compuesto o fármaco deseado al hígado y, al mismo tiempo, eviten la entrada del virus de la hepatitis B y la hepatitis D en hepatocitos.

Además, existe la necesidad de dirigir específicamente al hígado epítomos antigénicos para activar el sistema inmunológico, por ejemplo para la vacunación.

- 15 La presente invención, por lo tanto, tiene como objetivo proporcionar medios y procedimientos para la prevención y/o tratamiento eficaz de enfermedades del hígado y la regulación de la función hepática.

### Sumario de la invención

- 20 La presente invención resuelve este objetivo como se reivindica en las reivindicaciones.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve proporcionando un péptido derivado de preS hidrófobo modificado del VHB como vehículo para el suministro específico del compuesto o compuestos al hígado para su uso como medicamento.

- 25 Dicho péptido derivado de preS hidrófobo modificado tiene la fórmula general:



- 30 P es dicho péptido derivado de preS que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs. 11, 12, 13, 16, 23 y 26.

H es dicha modificación hidrófoba del péptido P derivado de preS, que está en el terminal N de P y se selecciona de acilación con miristoilo (C14) o estearoilo (C18); en el que m es 1.

- 35 R es una modificación opcional del terminal C (es decir, n es 0 o al menos 1) de dicho péptido P derivado de preS.

A es un grupo de anclaje opcional (es decir, o es 0 o al menos 1), que es adecuado para la unión covalente del compuesto o compuestos y está unido a H, P y/o R.

- 40 Dicho péptido derivado de preS hidrófobo modificado comprende además el compuesto o compuestos seleccionados de un fármaco; un profármaco; un portador o depósito para un fármaco o profármaco y en el que el compuesto o compuestos y el péptido hidrófobo forman un conjugado.

- 45 De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve además proporcionando el péptido o péptidos derivados de preS hidrófobos modificados del VHB de la invención para el tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático o para la regulación de la función hepática.

### Descripción de las realizaciones preferidas de la invención

- 50 Antes de que la presente invención se describa con más detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos en este documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica.

#### Péptidos derivados de preS hidrófobos modificados del VHB

- 60 Como se ha señalado anteriormente, la presente invención proporciona péptidos derivados de preS hidrófobos modificados del virus de la hepatitis B (VHB) como vehículo para el suministro específico de compuesto o compuestos al hígado para su uso como medicamento.

- 65 La envoltura del VHB encierra tres proteínas denominadas L (grande), M (mediana) y S (pequeña) (véase Figura 1A). Comparten el dominio S del terminal C con cuatro regiones transmembrana. Las proteínas M y L portan extensiones

adicionales del terminal N de 55 aa, dependiendo del genotipo, 107 o 118 aminoácidos (preS2 y preS1) (véase la Figura 1B).

Por lo tanto, la expresión péptido "derivado de preS" del VHB de acuerdo con la presente invención se refiere a un péptido con una secuencia de aminoácidos que corresponde a las extensiones del terminal N de la proteína L del VHB, preS1, preferiblemente a una secuencia de consenso de las especies y genotipos A a H, así como de los virus de la hepatitis B del mono lanudo (VHBML), chimpancé y gorila, pero también se refiere a variantes de los mismos, preferiblemente variantes truncadas del terminal N y/o el terminal C, variantes de sustitución de aminoácidos.

La SEQ ID NO. 1 muestra la secuencia de aminoácidos consenso de preS del VHB de la especie y genotipos A a H así como del mono lanudo (VHBML).

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

La secuencia de aminoácidos del "genotipo C" del VHB dentro de esta solicitud se refiere a una secuencia artificial, que corresponde o es idéntica al genotipo C del VHB, tal como, por ejemplo, el mostrado en el GenBank ABV02850.1, excepto que la posición 46 (de acuerdo con la numeración que se describe a continuación) es Lys (K) en el genotipo C de la presente invención en lugar de Gln (Q) como en la secuencia del GenBank; la secuencia del genotipo C del VHB de esta solicitud también puede denominarse como "genotipo C Q46K del VHB". Véase también las SEQ ID NOs. 4, 12, 21-27.

La Figura 2 también muestra la numeración de los residuos de aminoácidos de la secuencia consenso de preS del VHB, a la que se hará referencia a lo largo de esta memoria descriptiva:

El residuo de aminoácido número 1 es la metionina (Met1) del genotipo D (anteriormente descrito como el subtipo ayw, véase también la SEQ ID NO.5), mientras que el residuo de aminoácido número (-11) es la metionina (Met(-11)) del genotipo C (SEQ ID NO. 4). Met1 o Met(-11) *in vivo*, respectivamente, se escinde mediante una metionil aminopeptidasa celular y se modifica mediante una transferencia posterior de un residuo miristoilo de miristoil-CoA al residuo aminoácido número 2 glicina (Gly2) o residuo de aminoácido número (-10) glicina (Gly(-10)), respectivamente, por N-miristoil transferasa. El residuo de aminoácido del terminal N del genotipo D es el aminoácido natural Glicina (Gly2) y se numera 2 de acuerdo con la numeración respectiva de los codones del marco de lectura abierto subyacente de L (o, por ejemplo, Gly(-10) para el genotipo C).

La secuencia consenso de preS del VHB también comprende los aminoácidos adicionales del terminal N de los genotipos A, B, C, E, F, G y H (designados en las posiciones "-"). Por lo tanto, en total, la secuencia consenso de preS del VHB abarca las posiciones (-11) a 48. Por lo tanto, existe una diferencia entre la numeración descrita anteriormente y la lista real de aminoácidos en la SEQ ID NO. 1, por ejemplo

Met (-11), número de residuo (-11), se enumera como residuo de aminoácido 1 en la SEQ ID NO. 1;  
Gly (-10), número de residuo (-10), se enumera como residuo de aminoácido 2 en la SEQ ID NO. 1;  
Met 1, residuo número 1, se enumera como residuo de aminoácido 12 en la SEQ ID NO. 1;  
Gly 2, residuo número 2, se enumera como residuo de aminoácido 13 en la SEQ ID NO. 1;  
Gly 48, residuo número 48, se enumera como residuo de aminoácido 58 en la SEQ ID NO. 1.

SEQ ID NO: 1      Secuencia consenso de preS del VHB (posiciones (-11) a 48)

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

SEQ ID NO: 2      Genotipo A del VHB

(-11)-M GGWSS **K**PRKG MGTNL SVPNP LGFFP DHQLD PAF**G**A NSNNP DWDFN **PVKDD** WPA**A**N  
**Q**VG-48

SEQ ID NO: 3      Genotipo B del VHB

(-11)-M GGWSS **K**PRKG MGTNL SVPNP LGFFP DHQLD PAF**K**A NS**E**NP DW**D**L**N** **P**H**K**D**N** W**P**D**A**N  
KVG-48

SEQ ID NO: 4 secuencia artificial de aminoácidos, que corresponde al genotipo C del VHB, excepto que la posición 46 es Lys (K) en lugar de Gln (Q); Q46K

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

SEQ ID NO: 5 Genotipo D del VHB

1-MG**Q**NL **ST**SNP LGFFP DHQLD PAFRA **NTANP** DWDFN PNKDT **WPDAN**  
5 KVG-48

SEQ ID NO: 6 Genotipo E del VHB

(-10)-M**GLSW** **TVPLE** **WGKNI** **ST**TNP LGFFP DHQLD PAFRA **NTRNP** DWD**HN** PNKDH **WTEAN**  
10 KVG-48

SEQ ID NO. 7 Genotipo F del VHB

(-11)-M **GAPLS** **TTRRG** MG**Q**NL SVPNP LGFFP DHQLD **PL**FRA **NSSSP** DWDFN **TNKDS** **WPMAN**  
15 KVG-48

SEQ ID NO: 8 Genotipo G del VHB

(-10)-M**GLSW** **TVPLE** **WGK**NL **SASNP** LG**F**LP DHQLD PAFRA **NTNNP** DWDFN **PKKDP** **WPEAN**  
20 KVG-48

SEQ ID NO: 9 Genotipo H del VHB

(-11)-M **GAPLS** **TARRG** MG**Q**NL SVPNP LGFFP DHQLD **PL**FRA **NSSSP** DWDFN **TNKDN** **WPMAN**  
25 KVG-48

SEQ ID NO: 10 VHBML

1-MG**L**N**Q** **ST**FNP LGFFP **SH**QLD **PLFKA** **NAGSA** DWD**KN** PNKDP **WPQAH**  
**DTA**-48

Para las SEQ ID NOs. 2-10 véase también los números de acceso del GenBank:

30	Genotipo A del VHB	GenBank AAT28684.1
	Genotipo B del VHB	GenBank AAU01950.1
	Genotipo C del VHB	GenBank ABV02850.1 (en el que la posición 46 es Lys (K) (como en la SEQ ID NO. 4) en lugar de Gln (Q) (de ABV02850.1)
	Genotipo D del VHB	GenBank AAR19337.1
35	Genotipo E del VHB	GenBank ABS31101.1
	Genotipo F del VHB	GenBank ABK19774.1
	Genotipo G del VHB	GenBank AAF34735.1/AF160501_3
	Genotipo H del VHB	GenBank AAM09052.1
40	VHBML	GenBank AAC16905.1

Un péptido derivado de preS hidrófobo modificado del VHB proporcionado para el uso de acuerdo con la presente invención tiene la fórmula



en la que

**P** es dicho péptido derivado de preS que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs. 11, 12, 13, 16, 23 y 26;

**H** es dicha modificación hidrófoba de P, que está en el terminal N de P y se selecciona de acilación con estearoilo (C18) o miristoilo (C14);

**R** es una **modificación del terminal C** de P;

**A** es un **grupo ancla**;

**m** es 1;

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

Preferiblemente, ni **n** ni **o** son 0.

**P** no comprende sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos en los residuos 9 a 15 de la SEQ ID NO. 1.

Preferiblemente, el motivo de secuencia NPLGFFP (correspondiente a los residuos 9 a 15 de la SEQ ID NO. 1) no se interrumpe ni se modifica, tal como por el reemplazo de los residuos 11-15 por D-aminoácidos.

Los inventores han identificado que estos residuos de aminoácidos son importantes para el tropismo hepático de los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados del VHB, como se describe a continuación.

De acuerdo con la invención, en los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados proporcionados para el uso de acuerdo con la invención, **P** consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre

los residuos de aminoácidos 2 a 48 de la secuencia consenso	[SEQ ID NO. 11];
los residuos de aminoácidos 2 a 21 de la secuencia consenso	[SEQ ID NO. 12];
los residuos de aminoácidos 2 a 48 del genotipo C	[SEQ ID NO. 13];
los residuos de aminoácidos 2 a 21 del genotipo C	[SEQ ID NO. 16];
los residuos de aminoácidos 2 a 48 del genotipo D	[SEQ ID NO. 23]; y
los residuos de aminoácidos 2 a 21 del genotipo D	[SEQ ID NO. 26].

**P** no comprende sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos en los residuos 9 a 15 de la SEQ ID NO. 1 con el fin de mantener el direccionamiento/tropismo al hígado.

Véanse también las Tablas y las respectivas Figuras y Ejemplos.

En una realización más preferida, **P** comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre

SEQ ID NO. 11	(residuos 2 a 48 de la secuencia consenso),
SEQ ID NO. 12	(residuos 2 a 21 de la secuencia consenso),
SEQ ID NO. 13	(residuos 2 a 48 del genotipo C),
SEQ ID NO. 16	(residuos 2 a 21 del genotipo C),
SEQ ID NO. 23	(residuos 2 a 48 del genotipo D), y
SEQ ID NO. 26	(residuos 2 a 21 del genotipo D).

Las anteriores son las secuencias de aminoácidos preferidas que cumplen la combinación preferida de las características deseadas: secuencia de aminoácidos corta, inmunogenicidad baja o nula y direccionamiento eficiente al hígado.

La **modificación hidrófoba (H)** del péptido **P** derivado de preS esta en el terminal N de **P**.

"Terminal N" se refiere a la modificación hidrófoba en el terminal N, es decir, el primer residuo de aminoácido respectivo (por ejemplo, Gly 2), pero también comprende la modificación hidrófoba en las proximidades del terminal N, como los respectivos residuos de aminoácidos (-4), (-3), (-2), (-1), 1, 2 o 3 o 4. Por lo tanto, la modificación hidrófoba puede obtenerse además mediante la unión de una fracción hidrófoba en un sitio cerca al terminal N de **P**.

La modificación hidrófoba de dicho péptido derivado de preS del VHB de acuerdo con la presente invención añade una fracción hidrófoba al péptido.

Además, **m** es 1, es decir, la modificación con una fracción o grupo hidrófobo.

La modificación hidrófoba de dicho péptido derivado de preS del VHB proporcionada para el uso de acuerdo con la presente invención se selecciona de:

- acilación con miristoilo (C14) o estearoilo (C18).

Se prefiere la modificación por miristoilación en aplicaciones *in vivo* y medicinales debido a su mayor seguridad, por ejemplo, sin mostrar los efectos adversos del grupo estearoilo (respuesta inmune innata, etc.).

La unión de las fracciones hidrófobas se realiza preferiblemente mediante unión covalente, que se puede lograr mediante carbamato, amida, éter, disulfuro o cualquier otro enlace que esté dentro del conocimiento del experto en la técnica.

Por lo tanto, los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados, es decir acilados de esta invención son preferiblemente lipopéptidos debido a su grupo/fracción lipófila o hidrófoba del terminal N.

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

"Terminal C" se refiere a la modificación en el terminal C, es decir, el último residuo de aminoácido respectivo, pero también comprende la modificación en estrecha proximidad al terminal C, tal como el último residuo de aminoácido menos uno, el último menos dos residuos de aminoácidos o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, introducción de un D-aminoácido que protege al portador de la degradación enzimática, por ejemplo, por la acción de carboxipeptidasas).

El experto en la técnica podrá seleccionar el o las fracciones adecuadas respectivas dependiendo de la aplicación respectiva.

Las fracciones preferidos que protegen de la degradación se seleccionan de amidas, D-aminoácidos, aminoácidos modificados, aminoácidos cíclicos, albúmina, polímeros naturales y sintéticos, tales como PEG, glicano.

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

Preferiblemente, *n* es 1.

En realizaciones adicionales de esta invención, *n* es 1, 2, 3, 4 o más. Es decir, el extremo terminal C de P o su proximidad se puede modificar con más de una fracción o grupo, tal como 2. Las fracciones o grupos pueden ser iguales o diferentes entre sí.

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

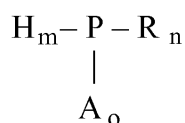
Los expertos en la materia conocen enlazadores o espaciadores, tales como polialanina, poliglicina, carbohidratos, grupos (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>.

El experto en la técnica podrá, por lo tanto, seleccionar el respectivo o respectivos enlazadores o espaciadores adecuados dependiendo de la aplicación respectiva.

El **grupo de anclaje (A)** sirve como punto de unión para un compuesto, una etiqueta, un marcador.

En una realización preferida, el grupo de anclaje es el "terminal C" de P, en el que "terminal C" se refiere a la modificación en el terminal C, es decir, el último residuo de aminoácido respectivo, pero también comprende la proximidad del extremo terminal C, tal como el último residuo de aminoácido menos uno, el último residuo de aminoácido menos dos o más residuos de aminoácido. En este caso, *n* puede ser 0, por lo que no hay otra modificación del terminal C R.

En esta realización, el péptido derivado de preS hidrófobo modificado del VHB puede tener la siguiente fórmula general



El grupo de anclaje A puede estar en una cadena lateral de aminoácidos del péptido P derivado de preS o puede ser la cadena lateral de aminoácidos del mismo péptido P derivado de preS, es decir, A puede ser la misma cadena lateral o una cadena lateral modificada.

El grupo de anclaje también puede ser un residuo de aminoácido modificado que se introdujo en la secuencia de aminoácidos de P para servir como grupo de anclaje.

En otras realizaciones de la invención, el grupo de anclaje A está unido a la modificación hidrófoba H y/o la modificación del terminal C R.

Los grupos de anclaje preferidos se seleccionan entre éster, éter, disulfuro, amida, tiol, tioéster.

El experto en la técnica será capaz de seleccionar el grupo o grupos de anclaje adecuados respectivos dependiendo del compuesto, etiqueta, marcador, respectivo que se va unir.

Además, el grupo de anclaje puede ser adecuado para unir un componente formador de complejo, tal como el complejo biotina/avidina, poliarginina/oligonucleótido (por ejemplo, ARNpi).



Además, **o** es 0 o al menos 1, es decir, el grupo de anclaje (R) es opcional.

Preferiblemente, **o** es 1.

- 5 En realizaciones adicionales de esta invención, **o** es 1, 2, 3, 4 o más. Es decir, hay más de un grupo de anclaje, como por ejemplo 2. Los grupos de anclaje pueden ser iguales o diferentes entre sí, lo que permite la unión de varios compuestos, como un fármaco y un marcador o fármacos diferentes.

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

- 10 Los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados más preferidos proporcionados para el uso de la invención son los siguientes:

- 15 - **P** consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 23 y SEQ ID NO. 26, y
- **H** es una modificación hidrófoba por acilación con estearoilo (C18) o miristoilo (C14).

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

Designación del péptido	Secuencia de aminoácidos	Modificación hidrófoba
VHBpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (consenso)	SEQ ID NO. 11	Estearoilo (C18)
VHBpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (consenso)	SEQ ID NO. 12	Estearoilo (C18)
VHBpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (C)	SEQ ID NO. 13	Estearoilo (C18)
25 VHBpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (C)	SEQ ID NO. 16	Estearoilo (C18)
VHBpreS/2-48 <sup>mir</sup> (C)	SEQ ID NO. 13	Miristoilo (C14)
VHBpreS/2-48 <sup>mir</sup> (D)	SEQ ID NO. 23	Miristoilo (C14)
VHBpreS/2-21 <sup>estearoil</sup> (D)	SEQ ID NO. 26	Estearoilo (C18)

- 30 En los que (C) se refiere al genotipo C Q46K del VHB.

Los péptidos de esta invención pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos fácilmente conocidos por los expertos en la técnica, en general mediante procedimientos químicos de síntesis y/o procedimientos de ingeniería genética.

- 35 Los procedimientos químicos de síntesis incluyen más particularmente la síntesis secuencial y en bloque en fase sólida (Erickson y Merrifield, 1976). El procedimiento secuencial en fase sólida se puede realizar usando procedimientos automatizados establecidos tales como el uso de un sintetizador de péptidos automático. En este procedimiento, un aminoácido protegido con  $\alpha$ -amino se une a un soporte de resina. El soporte de resina empleado puede ser cualquier resina adecuada convencionalmente empleada en la técnica para la preparación en fase sólida de (poli) péptidos, preferiblemente poliestireno que ha sido copolimerizado con polioxietileno para proporcionar sitios para la formación de ésteres con el aminoácido protegido con  $\alpha$ -amino introducido inicialmente. Este procedimiento optimizado, aplicado por los inventores, se ha descrito explícitamente (véase, por ejemplo, 12). Los aminoácidos se introducen uno a uno (paso a paso). Cada ciclo de síntesis correspondiente a la introducción de un aminoácido incluye una etapa de desprotección, etapas de lavado sucesivas, una etapa de acoplamiento con activación del aminoácido y etapas de lavado posteriores. Cada una de estas etapas va seguida de una filtración. Los agentes reactivos para el acoplamiento son los agentes reactivos clásicos para la síntesis de (poli)péptidos tales como diciclohexilcarbodiimida, hidroxibenzotriazol, benzotriazol-1-il-oxitris (dimetilamino) fosfonio hexafluorofosfato y difenilfosforilazida. Después de la síntesis del polipéptido en la resina, el polipéptido se separa de la resina mediante un tratamiento con un ácido fuerte tal como ácido trifluoroacético en presencia de anisol, etanoditioil o 2-metilindol. A continuación, el compuesto se purifica mediante las técnicas clásicas de purificación, en particular mediante HPLC.

- Los péptidos de la presente invención también se pueden obtener acoplando fragmentos de (poli)péptido que están protegidos selectivamente, efectuándose este acoplamiento, por ejemplo, en una solución.

- 55 Los péptidos pueden producirse además mediante técnicas de ingeniería genética como las conoce el experto en la materia. Un sistema de expresión eucariota, como el sistema de baculovirus, es particularmente adecuado. De acuerdo con este procedimiento, las proteínas se expresan en células de insectos infectadas con un baculovirus recombinante que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga y que regula secuencias de ácido nucleico, tal como un promotor. Varias líneas celulares están disponibles para la infección con baculovirus recombinante, tal como la línea celular Sf-9, disponible a través de la American Type Culture Collection (CRL 1711). La expresión en un sistema de expresión procariótico, tal como *E. coli*, también es particularmente adecuada.

- 65 La introducción de la fracción hidrófoba en el péptido puede lograrse mediante una variedad de procedimientos fácilmente conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen enfoques de síntesis y de ingeniería genética.

Alternativamente, los péptidos y/o péptidos de fusión (es decir, péptidos hidrófobos modificados) pueden producirse mediante líneas de células eucariotas transfectadas de forma estable, tal como CHO y otras líneas celulares que se conocen en la técnica y que se utilizan habitualmente para generar vacunas y similares. Debido a la propiedad intrínseca de que los aminoácidos 47-preS1 del terminal N promueven la secreción de una proteína/péptido miristoilado, el péptido hidrófobo modificado biológicamente activo se puede extraer de los sobrenadantes del cultivo celular.

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

Como se ha señalado anteriormente, la presente invención proporciona péptidos derivados de preS hidrófobos modificados del VHB como vehículo o lanzadera para el suministro específico de un compuesto al hígado para su uso como medicamento.

"Vehículo" o "lanzadera" para el suministro específico de un compuesto al hígado de acuerdo con la presente invención se refiere al tropismo o hepatotropismo hepático de los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados del VHB como los encuentran los inventores y se describen en este documento, es decir, a su capacidad para acumularse selectivamente en el hígado, preferiblemente para acumularse selectivamente en la membrana plasmática de los hepatocitos, así como para entrar selectivamente en los hepatocitos.

La invención se basa en el hallazgo de una acumulación hepática muy específica y en la identificación de los determinantes del tropismo hepático del VHB en la secuencia de preS 1 del VHB por los inventores. Por lo tanto, la invención utiliza el conocimiento acerca de los determinantes del tropismo hepático para el diseño de vehículos universales o lanzaderas para la administración o el direccionamiento específico al hígado, respectivamente.

Los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados de la presente invención son vehículos o lanzaderas versátiles para administrar específicamente un compuesto o compuestos al hígado.

Preferiblemente, el suministro específico de un compuesto al hígado es el suministro específico del compuesto a los hepatocitos.

Además, el compuesto se puede administrar específicamente a hepatocitos *in vitro* así como *in vivo*.

Preferiblemente, el compuesto se administra específicamente al hígado de un animal, preferiblemente mamífero o humano, o un ave.

#### Compuestos para ser suministrados

El "compuesto" que se administrará específicamente al hígado de acuerdo con esta invención se selecciona de fármacos; profármacos; un portador o depósito de un fármaco o profármaco.

Los fármacos pueden estar en forma de profármacos o preprofármacos.

En una realización preferida de la invención, el compuesto que se administrará específicamente a los hepatocitos es un **fármaco** (o un fármaco en forma de profármaco) y se selecciona preferiblemente entre

<i>Clase de fármaco</i>	<i>Ejemplos</i>
interferón	IFN $\alpha$
inhibidor de la transcriptasa inversa viral	Lamivudina, Adefovir, Entecavir
inhibidor de la ARN polimerasa viral	inhibidor de la polimerasa NS5B del VHC
inhibidor del ensamblaje del núcleo viral o	para virus hepatrópicos
inhibidor de la nucleocápside viral	Por ejemplo, Inhibidores del ensamblaje de la cápside del VHB derivados de dihidroarilpirimidina
inhibidor de la quinasa	inhibidor de la Raf quinasa Sorafenib (BAY 43-9006)
análogo de nucleósido	
inhibidor de proteasa	Inhibidor de la proteasa NS3 del VHC, BILN-2061, VX950
- inhibidor de proteasa viral o general	
inhibidor del proteasoma	MG132, bortezomib
anticuerpo o fragmento del mismo	Anticuerpos anti-E2 del VHC neutralizantes
ARNpi o precursor del mismo	ARNpi específicos de VHB, VHC, HDV y modificaciones de los mismos; ARNpi que se dirigen a otras secuencias, incluidas las secuencias celulares

(continuación)

<i>Clase de fármaco</i>	<i>Ejemplos</i>
inhibidor de farnesilación; tal como inhibidor de farnesil transferasa (IFT)	
alcohol deshidrogenasa (ADH) o activador del mismo	
inhibidor de la biosíntesis de colesterol, tal como los inhibidores de la HMD-CoA-reductasa	Mevinacor/Lovastatina
inhibidor de la etapa hepática de un virus o un patógeno no viral, tal como malaria, esquistosomiasis (bilharziosis), leishmaniasis	Primaquina
inhibidores de otros virus que ocasionalmente infectan el hígado	por ejemplo, Zovirax para el tratamiento de la infección por el virus del herpes
antibióticos para actuar específicamente en el hígado	

El compuesto se selecciona preferiblemente de un fármaco clínicamente aprobado.

- 5 En una realización, el compuesto a administrar es IFN-alfa.  
P preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 23 y/o H es una modificación hidrófoba con miristoilo (C14).  
El péptido o péptidos derivados de preS1 hidrófobos modificados usados en tal realización pueden ser VHBpreS/2-20<sup>mir</sup> (D), VHBpreS/2-48<sup>mir</sup> (D), VHBpreS/2-20<sup>estearoil</sup> (D), VHBpreS/2-48<sup>estearoil</sup> (D)
- 10 (vease también la Figura 14). Se obtuvo una proteína de fusión o constructo con interferón alfa de ratón mediante expresión recombinante en células de insecto utilizando el sistema de expresión de baculovirus.  
Consulte también las Figuras 14 y 15, así como los Ejemplos.
- 15 En los que el compuesto es interferón, tal como IFN $\alpha$ , y P preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 23 y/o H es una modificación hidrófoba con miristoilo (C14).
- En una realización preferida adicional de la presente invención también el compuesto está marcado, es decir, porta un marcador como se define en el presente documento.
- 20 En las realizaciones preferidas, los compuestos están en forma de depósitos o vehículos, que por ejemplo, portan un fármaco, profármaco. Dichos depósitos o vehículos son conocidos en la técnica, tales como nanopartículas, liposomas, microburbujas, emulsiones gaseosas.
- 25 De acuerdo con la invención, el compuesto y el péptido derivado de preS hidrófobo modificado del VHB forman un **conjugado**.  
Preferiblemente, el conjugado del compuesto y el péptido derivado de preS hidrófobo modificado se forma por unión covalente o por formación de complejo.
- 30 Preferiblemente, en un conjugado el compuesto se une covalentemente al péptido derivado de preS hidrófobo modificado, preferiblemente uniendo el compuesto a un grupo de anclaje **A**. La forma de unión depende del tipo de compuesto. El experto en la técnica podrá determinar los grupos de anclaje adecuados para formar conjugados adecuados.
- 35 Preferiblemente, **A** comprende además un espaciador o enlazador.  
El espaciador o enlazador comprende preferiblemente un sitio de reconocimiento para la activación específica de hepatocitos, que preferiblemente es reconocido por una proteína del hígado.
- 40 El sitio de reconocimiento es preferiblemente un sitio de escisión proteolítica. La proteína del hígado es, por lo tanto, preferiblemente una proteína hepatocelular, más preferiblemente una enzima proteolítica hepatocelular. Por lo tanto, el conjugado puede administrarse a un sujeto y será transportado a través del cuerpo, tal como en los fluidos corporales, sin escindir. Sin embargo, tan pronto como el conjugado alcanza su objetivo, el hígado o los hepatocitos, respectivamente, la proteína del hígado, tal como una enzima proteolítica hepatocelular, escindirá el sitio de escisión
- 45 proteolítica y liberará el compuesto de su lanzadera, es decir, el péptido derivado de preS hidrófobo modificado.
- Otras proteínas del hígado preferidas son los citocromos, tales como el citocromo P450. La tecnología HepDirect® (de Metabasis Technologies, Inc.) como se usa en Adefovir o Pradevofir, también es adecuada para la presente invención.
- 50 En una realización, el conjugado del compuesto y péptido derivado de preS hidrófobo modificado se forma mediante formación de complejos. Los complejos preferidos útiles en la invención son biotina/avidina, poliarginina/oligonucleótido (por ejemplo, ARNpi). El experto en la materia podrá determinar los componentes complejos adecuados y diseñar el compuesto y el péptido derivado de preS hidrófobo modificado en consecuencia.

El péptido derivado de preS hidrófobo modificado, en particular los conjugados de la presente invención, se usan preferiblemente para enriquecer un compuesto, que se transporta al hígado, en el hígado. Preferiblemente, el compuesto se escinde del conjugado con el péptido derivado de preS hidrófobo modificado del VHB por una proteína del hígado, preferiblemente una enzima proteolítica hepatocelular, en particular *in vivo* en el hígado.

#### Tratamiento de enfermedades del hígado

En una realización preferida de la invención, los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados anteriores, en particular sus conjugados con compuestos, se proporcionan para el tratamiento de una enfermedad o trastorno del hígado.

Dependiendo de la enfermedad o trastorno del hígado que debe ser tratado, el compuesto respectivo se selecciona y se administra selectivamente y específicamente al hígado.

Una "enfermedad hepática" o un "trastorno hepático" de acuerdo con la presente invención se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que tenga un efecto sobre el hígado, tejido hepático o hepatocitos o los involucre.

Ejemplos de enfermedades del hígado son:

- Hepatitis: inflamación del hígado, causada principalmente por varios virus pero también por ciertos venenos, autoinmunidad o condiciones hereditarias;
- Cirrosis: formación de tejido fibroso en el hígado que reemplaza las células muertas del hígado. La muerte de las células del hígado puede ser causada, por ejemplo, por hepatitis viral, alcoholismo o contacto con otras sustancias químicas tóxicas para el hígado;
- Hemocromatosis: una enfermedad hereditaria que causa la acumulación de hierro en el cuerpo, que eventualmente conduce a daño hepático;
- Cáncer de hígado: carcinoma hepatocelular primario (CHC) o colangiocarcinoma y cánceres metastásicos, generalmente de otras partes del tracto gastrointestinal;
- Enfermedad de Wilson: una enfermedad hereditaria que hace que el cuerpo retenga cobre;
- Colangitis esclerosante primaria: una enfermedad inflamatoria del conducto biliar, de naturaleza autoinmune;
- Cirrosis biliar primaria: enfermedad autoinmune de los conductos biliares pequeños;
- Síndrome de Budd-Chiari: obstrucción de la vena hepática;
- Síndrome de Gilbert: un trastorno genético del metabolismo de la bilirrubina, que se encuentra en aproximadamente el 5% de la población;
- Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II: la acumulación de glucógeno causa debilidad muscular progresiva (miopatía) en todo el cuerpo y afecta a varios tejidos corporales, particularmente en el corazón, músculos esqueléticos, hígado y sistema nervioso;
- Enfermedad hepática pediátrica, tal como atresia biliar, deficiencia de alfa-1-antitripsina, síndrome de Alagille y colestasis intrahepática familiar progresiva;
- Enfermedades metabólicas.

Además, también se incluyen enfermedades del hígado de animales, tales como mascotas o ganado, en particular enfermedades que pueden transmitirse a los seres humanos, tales como la toxoplasmosis.

La enfermedad o trastorno hepático a tratar se selecciona preferiblemente de hepatitis, cirrosis, hemocromatosis, preferiblemente hepatitis causada por virus de la hepatitis A, B, C, D, E, F, G y H.

La enfermedad o trastorno hepático a tratar también puede ser hepatitis concomitante causada por virus, tales como virus de la familia Herpesviridae, por ejemplo, virus del herpes, virus de la citomegalia (VCM) pero también virus de la varicela zoster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB), virus Cocksackie, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue.

La enfermedad o trastorno hepático a tratar también puede ser una enfermedad que involucre un estadio hepático de un virus o un patógeno no viral, tal como en muchas enfermedades tropicales. Dado que el estadio hepático de algunos patógenos es un estadio temprano, la infección respectiva puede tratarse de forma selectiva y específica en un estadio temprano.

Dichos virus son virus de la hepatitis A, B, C, D, E, F, G y H, virus del herpes.

Dichos patógenos no virales son bacterias, parásitos y/o gusanos.

Los parásitos son, por ejemplo, parásitos protozoarios del género *Plasmodium* que causan malaria, tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* y especies relacionadas (por ejemplo, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*).

Tales gusanos son, por ejemplo, gusanos planos del género *Schistosoma* que causan esquistosomiasis o bilharziosis, tales como *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* y *Schistosoma mekongi*.

- 5 Dichos parásitos también son, por ejemplo, protozoos tripanosómicos de *Leishmania* del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* que son responsables de la enfermedad leishmaniasis.

Por lo tanto, la malaria, la esquistosomiasis (bilharziosis) y/o la leishmaniasis pueden tratarse por medio de esta invención.

10

Por lo tanto, determinadas enfermedades tropicales pueden tratarse mediante esta invención.

La enfermedad o trastorno hepático a tratar son preferiblemente tumores hepáticos, preferiblemente carcinoma hepatocelular (CHC).

15

La enfermedad o trastorno hepático a tratar también puede ser una enfermedad metabólica, tal como diabetes, hiperlipidemia, síndrome metabólico y obesidad, hiperglucemia crónica, síndrome metabólico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) (véase también (9)).

20

En una realización preferida de la invención, los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados anteriores, en particular sus conjugados con compuestos, se proporcionan para la regulación de la función hepática.

Se prefiere su uso para la presentación de antígenos mediada por hepatocitos y la activación de respuestas inmunológicas dirigidas al hígado. En este caso, el compuesto a administrar al hígado es preferiblemente un epítipo inmunogénico.

25

En una realización preferida de la invención, los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados descritos anteriormente, en particular sus conjugados con compuestos, también son adecuados para la prevención de la infección por hepatitis B y/o D. Esto es posible debido a la propiedad de los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados descritos anteriormente para dirigirse no solo al hígado (tropismo hepático) sino que además actúan como inhibidores de la entrada viral del VHB y/o VHD, que pueden verse por ejemplo en la Figura 9. Por lo tanto, los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados descritos anteriormente son vacunas adecuadas contra el VHB y/o el VHD. (Véase también la correspondiente solicitud de patente PCT de los inventores con el título: "Hydrophobic modified preS-derived peptides of hepatitis B virus (HBV) and their use as HBV and HDV entry inhibitors", que se presentó el mismo día). Los péptidos derivados de preS acilados descritos anteriormente, en particular sus conjugados con compuestos, pueden proporcionarse para el tratamiento combinado de una enfermedad o trastorno hepático y la prevención de la infección por hepatitis B y/o D.

30

35

#### Composiciones farmacéuticas

40

En una realización preferida, el uso de acuerdo con la invención comprende el uso de una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido derivado de preS hidrófobo modificado del VHB como se define en el presente documento y al menos un compuesto para ser administrado específicamente al hígado como se define en este documento y, opcionalmente, un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

45

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende:

- al menos un péptido derivado de preS hidrófobo modificado del VHB como se definió anteriormente en el presente documento;
- 50 - al menos un compuesto para ser administrado específicamente al hígado, preferiblemente a los hepatocitos, como se definió anteriormente en el presente documento;
- o
- un conjugado como se define en el presente documento;
- y
- 55 - opcionalmente, un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

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

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

60

#### Método de tratamiento

65

La presente divulgación describe procedimientos para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático mediante la utilización del péptido o péptidos derivados de preS hidrófobos modificados del VHB o la composición o composiciones farmacéuticas de la invención.

5 La presente divulgación también describe un procedimiento para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento combinados de una enfermedad o trastorno hepático y la prevención de la infección por VHB y/o VHD administrando a un sujeto un conjugado como se define en el presente documento, que comprende un péptido derivado de preS hidrófobo modificado del VHB y un compuesto, o una composición farmacéutica como se define en el presente documento.

10 El procedimiento para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento combinados de una enfermedad o trastorno hepático y la prevención de la infección por hepatitis B y/o D puede comprender administrar a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz

15 (a) un conjugado que comprende un péptido derivado de preS hidrófobo modificado como se define en el presente documento y al menos un compuesto como se define en el presente documento, en el que el conjugado es como se define en el presente documento; o  
(b) una composición farmacéutica como se define en el presente documento.

## 20 Ruta de administración

Preferiblemente, la vía de administración de los conjugados o composiciones farmacéuticas de la presente invención, en particular en el procedimiento de tratamiento, se selecciona de subcutánea, intravenosa, oral, nasal, intramuscular, transdérmica, por inhalación, mediante supositorio.

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

## Cantidad terapéuticamente eficaz

30 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un conjugado o una composición farmacéutica de esta invención se refiere a la cantidad que es suficiente para tratar la enfermedad o trastorno hepático respectivo y/o para prevenir la infección por hepatitis B y/o D.

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

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

40 En el caso de un valor de  $CI_{50}$  del péptido derivado de preS hidrófobo modificado usado de aproximadamente 10 nM, una cantidad terapéuticamente eficaz preferida es aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal o en el intervalo de 1 a 5 mg por paciente.

La cantidad terapéuticamente eficaz preferida depende del compuesto respectivo que se va a administrar y su respectiva cantidad terapéuticamente eficaz.

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

## Aplicación de terapia génica

50 La divulgación también describe los péptidos derivados de preS, es decir, los ácidos nucleicos que los codifican, en enfoques de terapia génica.

Se describe un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido P derivado de preS como se define en el presente documento para la terapia génica de una enfermedad o trastorno hepático. El ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos del péptido P derivado de preS, que es necesario y suficiente para lograr el direccionamiento al hígado.

Por ejemplo, el vector viral es de replicación defectuosa, preferiblemente un vector viral adenoasociado.

60 El vector viral puede comprender además una secuencia heteróloga que se va a expresar en el hígado.

El vector viral puede ser un vector génico terapéuticamente adecuado, que es conocido por los expertos.

## Identificación del receptor del VHB

65

La divulgación describe además un procedimiento para la identificación *in vitro* y/o *in vivo* de un receptor de hepatocitos implicado en la unión y/o penetración del VHB y/o cuantificación de la expresión de dicho receptor que comprende el uso de un péptido derivado de preS hidrófobo modificado como se describió anteriormente.

- 5 Dicho receptor de hepatocitos se puede identificar en mamíferos o modelos animales respectivos, tales como ratón o humano.

En particular, dicho procedimiento comprende las etapas que comprenden:

- 10 - poner en contacto una biopsia de hígado o un hepatocito con un péptido derivado de preS hidrófobo modificado de la invención en condiciones y durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión específica de dicho péptido a un receptor expresado en la superficie de un hepatocito;
- detectar la unión de dicho péptido a un receptor; y
- 15 - identificar dicho receptor.

El procedimiento para la identificación de un receptor del VHB comprende el uso de

- (a) un conjugado que comprende un péptido derivado de preS hidrófobo modificado como se define en el presente documento y al menos un compuesto como se define en el presente documento, en el que el conjugado es como se define en el presente documento; o
- 20 (b) una composición farmacéutica como se define en este documento.

Esto se puede lograr de acuerdo con procedimientos clásicos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, esto podría implicar el marcaje radiactivo, enzimático o fluorescente de los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados de la invención, y la detección posterior con un procedimiento apropiado. Se conocen varios materiales fluorescentes y se pueden utilizar como marcadores. Estos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, rojo Texas. Los marcadores enzimáticos comprenden la conjugación de una enzima con una molécula de interés, por ejemplo, un polipéptido, y puede detectarse mediante cualquiera de las técnicas colorimétrica, espectrofotométrica o fluoroespectrofotométrica.

30 El virus de la hepatitis B humana (VHB) es el factor etiológico más importante del carcinoma hepatocelular. Las características distintivas de la infección por VHB son de una notable eficacia *in vivo* y un tropismo hepático pronunciado. Este último es probablemente el resultado de una interacción específica de una de las tres proteínas de superficie del VHB con receptores asociados al hígado o factores que se dirigen al hígado en el sistema circulatorio.

35 Con base en conocimientos recientes sobre los detalles moleculares de la vía de entrada del VHB y la identificación de los dominios de la proteína de la superficie del VHB que son responsables de la unión de los hepatocitos y el tropismo hepático, la presente invención condujo al desarrollo de una nueva clase de conjugados péptido-fármaco para atacar enfermedades del hígado, tales como el CHC, y opcionalmente para interferir con la infección por VHB y VHD.

Los inventores identificaron lipopéptidos derivados de proteínas de superficie de preS1 del VHB que bloquean eficazmente la entrada del VHB *in vitro* e *in vivo*. Los estudios de biodistribución de la presente invención en estos péptidos inhibidores revelaron que se acumulan selectivamente en el hígado donde se unen y presumiblemente entran en los hepatocitos. Este hepatotropismo requiere acilación del terminal N del péptido y depende de un determinado motivo de secuencia de preS del VHB dentro de los 47 aminoácidos de preS1 del terminal N, es decir, dentro de los residuos de aminoácidos 2 a 21 o los residuos de aminoácidos 2 a 20 (o preferiblemente la secuencia mínima de los residuos 9 a 15). La observación de los inventores de que esta secuencia de péptidos lleva además una señal de translocación de membrana que facilita el transporte de proteínas de fusión incluso completas a través de las membranas plasmáticas (resultados no publicados) abre la posibilidad de administrar específicamente cualquier tipo de fármaco a la membrana plasmática de los hepatocitos o incluso selectivamente en esta célula.

Los inventores han demostrado que los lipopéptidos derivados de preS1 del VHB son capaces de prevenir completamente la infección por VHB en un modelo de ratón uPA-RAG-1 trasplantado con dosis muy bajas. Los estudios farmacocinéticos sobre estos inhibidores de entrada derivados de preS del VHB indicaron un hepatotropismo notable combinado con una estabilidad en suero extraordinariamente alta ( $t_{1/2}$  aproximadamente de 60 h) y una semivida prolongada en el órgano diana ( $t_{1/2}$  aproximadamente de 24 h). Tanto la acilación del terminal N como la integridad de cierta secuencia de aminoácidos de los péptidos son obligatorias (es decir, dentro de los residuos de aminoácidos 2 a 21 (o preferiblemente la secuencia mínima de residuos 9 a 15)). Los péptidos se pueden usar como vectores versátiles para el direccionamiento de fármacos específicos al hígado para vencer las infecciones de los hepatocitos o para tratar el carcinoma hepatocelular.

Los inventores han probado además el principio de que la infección por VHBML puede bloquearse eficazmente mediante la aplicación subcutánea de péptidos derivados de la proteína de la envoltura del VHB *in vivo*. Esto abre nuevas perspectivas para la prevención de la infección aguda por VHB y opciones terapéuticas para la hepatitis B crónica. Dado que los ratones uPA/RAG-2/Pfp utilizados carecen de células B, células T y células NK, se asume un

efecto inhibidor directo de los péptidos sobre hepatocitos susceptibles. Esto está respaldado por la acumulación eficiente de péptidos derivados de preS acilados en el hígado, seguido de una eliminación lenta, posiblemente a través de la vía biliar. Ambas propiedades permiten la aplicación subcutánea con dosis muy bajas y bajas frecuencias. Dado que 5 inyecciones de 0,2 mg/kg del VHB/preS2-48<sup>mir</sup> en 5 días dieron como resultado la prevención del establecimiento de la infección por VHBML, la administración continua del péptido VHB/preS2-4S<sup>estearoil</sup> aproximadamente 30 veces más activo podría ser eficaz en dosis inferiores a 7 µg/kg  $\approx$  13 nmol/kg cuando se administra diariamente o cada 2 días. Teniendo en cuenta que la dosis farmacológica eficaz por peso corporal obtenida en ratones tiene que corregirse para humanos (8) por un factor de aproximadamente 10, se espera que la dosis eficaz por persona sea inferior a 100 µg/día.

Los inventores también han demostrado que

- Los lipopéptidos derivados de preS1 del VHB de la invención se unen a hepatocitos humanos primarios (HHP) y que esta unión es dependiente de miristoilo y específica de la secuencia (véase también la Figura 10),
  - La unión de los lipopéptidos derivados de preS1 del VHB de la invención no está restringida a los hepatocitos susceptibles al VHB (véase también la Figura 11),
  - La unión de los lipopéptidos derivados de preS1 del VHB de la invención depende del estado de diferenciación de las células y de que solo se unen a los hipocitos diferenciados (véase la Figura 12),
  - Los lipopéptidos derivados de preS1 del VHB de la invención no se unen a otras líneas celulares de hepatoma y no hepatoma
- no se observó unión a células Hep G2, células Hep G2.215, células HuH y células CHO K1 (datos no mostrados).

Por lo tanto, los factores celulares tratados por los péptidos dependen del estado de diferenciación. Pero estos no son críticos para el intervalo restringido de hospedadores del virus.

**Tabla 1.** Péptidos derivados de preS hidrófobos modificados (\*) de la presente invención y péptidos adicionales descritos en esta divulgación

Designación de péptidos		Secuencia de aminoácidos		
VHBpreS/(-11)-48(consenso)	consenso		SEQ ID NO. 1	
VHBpreS/2-48 <sup>mir</sup> (consenso)			SEQ ID NO. 11*	
VHBpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (consenso)				
VHBpreS/2-21 <sup>mir</sup> (consenso)			SEQ ID NO. 12*	
VHBpreS/2-21 <sup>estearoil</sup> (consenso)				
Péptidos del genotipo C				
* VHBpreS/(-11)-48 <sup>mir</sup> (C)	natural		SEQ ID NO. 4	
* VHBpreS/2-48 <sup>mir</sup> (C)				
* VHBpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (C)			SEQ ID NO. 13*	
* VHBpreS/(-11)-48 <sup>estearoil</sup> (C)				
VHBpreS/5-48 <sup>mir</sup> (C)	truncada	Terminal N	SEQ ID NO. 13	
VHBpreS/5-48 <sup>estearoil</sup> (C)				
VHBpreS/9-48 <sup>mir</sup> (C)				SEQ ID NO. 15
VHBpreS/9-48 <sup>estearoil</sup> (C)				
VHBpreS/2-21 <sup>mir</sup> (C)	truncada	Terminal N y/o C	SEQ ID NO. 16*	
VHBpreS/2-21 <sup>estearoil</sup> (C)				
VHBpreS/5-21 <sup>mir</sup> (C)				SEQ ID NO. 17
VHBpreS/5-21 <sup>estearoil</sup> (C)				
VHBpreS/9-21 <sup>mir</sup> (C)				SEQ ID NO. 18
VHBpreS/9-21 <sup>estearoil</sup> (C)				
VHBpreS/2-15 <sup>mir</sup> (C)				SEQ ID NO. 19
VHBpreS/2-15 <sup>estearoil</sup> (C)				
VHBpreS/5-15 <sup>mir</sup> (C)				SEQ ID NO. 20
VHBpreS/5-15 <sup>estearoil</sup> (C)				
VHBpreS/9-15 <sup>mir</sup> (C)**				SEQ ID NO. 21
VHBpreS/9-15 <sup>estearoil</sup> (C)**				
VHBpreS/(-2)-20 <sup>palma</sup> (C)				



(continuación)

Continuación

Péptidos del genotipo D			
VHBpreS/1-48 <sup>mir</sup> (D)	natural		SEQ ID NO. 5
VHBpreS/2-48 <sup>mir</sup> (D)			SEQ ID NO. 23*
VHBpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> (D)			
VHBpreS/5-48 <sup>mir</sup> (D)	Truncada	Terminal N	SEQ ID NO. 24
VHBpreS/5-48 <sup>estearoil</sup> (D)			
VHBpreS/9-48 <sup>mir</sup> (D)			SEQ ID NO. 25
VHBpreS/9-48 <sup>estearoil</sup> (D)		Terminal N y/o C	
VHBpreS/2-21 <sup>mir</sup> (D)			SEQ ID NO. 26*
VHBpreS/2-21 <sup>estearoil</sup> (D)			
VHBpreS/5-21 <sup>mir</sup> (D)			SEQ ID NO. 27
VHBpreS/5-21 <sup>estearoil</sup> (D)			
VHBpreS/9-21 <sup>mir</sup> (D)			SEQ ID NO. 28
VHBpreS/9-21 <sup>estearoil</sup> (D)			
VHBpreS/2-20 <sup>mir</sup> (D)			SEQ ID NO. 38
VHBpreS/2-20 <sup>estearoil</sup> (D)			
VHBpreS/2-15 <sup>mir</sup> (D)			SEQ ID NO. 29
VHBpreS/2-15 <sup>estearoil</sup> (D)			
VHBpreS/5-15 <sup>mir</sup> (D)			SEQ ID NO. 30
VHBpreS/5-15 <sup>estearoil</sup> (D)			
VHBpreS/9-15 <sup>mir</sup> (D) **			SEQ ID NO. 21
VHBpreS/9-15 <sup>estearoil</sup> (D) **			
mir se refiere a miristoilación del terminal N; palm se refiere a palmitoilación del terminal N; estearoil se refiere a la estearoilación del terminal N; (C) se refiere al genotipo C (con Q46K, como en la SEQ ID NO. 4); (D) se refiere al genotipo D; ** secuencia mínima.			

**Tabla 2.** Péptidos derivados de preS hidrófobos modificados con cambios en los epítomos inmunogénicos descritos en esta divulgación

Designación del péptido	Secuencia de aminoácidos
VHBpreS/2-48 <sup>mir</sup> -Ala <sup>21,23,29,30</sup> (C)	SEQ ID NO. 31
VHBpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> -Ala <sup>21,23,29,30</sup> (C)	
VHBpreS/(-11)-48 <sup>mir</sup> -D20(C)	SEQ ID NO. 32
VHBpreS/(-11)-48 <sup>estearoil</sup> -D20(C)	
VHBpreS/2-48 <sup>mir</sup> -D20(C)	SEQ ID NO. 33
VHBpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> -D20A(C)	
VHBpreS/(-11)-48 <sup>mir</sup> -SNN(27-29)ANA(C)	SEQ ID NO. 34
VHBpreS/(-11)-48 <sup>estearoil</sup> -SNN(27-29)ANA(C)	
VHBpreS/2-48 <sup>mir</sup> -SNN(27-29)ANA(C)	SEQ ID NO. 35
VHBpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> -SNN(27-29)ANA(C)	
VHBpreS/(-11)-48 <sup>mir</sup> -D20A + SNN (27-29)ANA(C)	SEQ ID NO. 36
VHBpreS/(-11)-48 <sup>estearoil</sup> -D20A + SNN(27-29)ANA(C)	
VHBpreS/2-48 <sup>mir</sup> -D20A + SNN(27-29)ANA(C)	SEQ ID NO. 37
VHBpreS/2-48 <sup>estearoil</sup> -D20A + SNN(27-29)ANA(C)	
<p>mir se refiere a miristoilación del terminal N;  estearoil se refiere a la estearoilación del terminal N;  (C) se refiere al genotipo C (con Q46K, como en la SEQ ID NO. 4).</p>	

5

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

#### Breve descripción de los dibujos

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

15 **(A)** El ADN parcialmente bicatenario está asociado covalentemente con el complejo de polimerasa viral, que consta de la proteína terminal, (PT), la transcriptasa inversa (TR) y la RNasaH. El genoma está encapsulado por una capa icosaédrica, construida con 120 dímeros de proteínas nucleares. Las 3 proteínas de superficie del VHB L, M y S están incrustadas en una bicapa lipídica derivada del RE. Las proteínas L y M contienen el dominio S completo que actúa como ancla de la membrana.

**(B)** Estructura del dominio de las 3 proteínas de superficie del VHB L, M y S.

La proteína L contiene el dominio de preS1 de 107 aminoácidos miristoilados en el terminal N, el dominio de preS2 de 55 aminoácidos y el dominio S que contiene los 4 segmentos transmembrana (I-IV).

**Figura 2.** Secuencia consenso de preS1 del VHP.

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

La siguiente alineación muestra: la secuencia consenso (Consenso) y los ocho genotipos del VHB (A-H) así como la secuencia de preS del VHB del mono lanudo (VHBM) que comprende los aminoácidos 2-48. Téngase en cuenta que los genotipos A, B, C, E, G y H tienen once aminoácidos adicionales en sus terminales N, el genotipo F tiene 10 residuos de aminoácidos adicionales. En la parte inferior, se muestran los subdominios funcionales conocidos.

Por favor téngase en cuenta que el genotipo C del VHB se refiere al genotipo C Q46K del VHB.

**Figura 3.** Biodistribución y estabilidad hepática de lipopéptidos derivados del preS del VHB después de la aplicación subcutánea.

**(A)** Acumulación específica en el hígado de péptidos preS/2-48(D) del VHB miristoilados ( $C_{14}$ ) frente estearoilados ( $C_{18}$ ) VHB después de la inyección subcutánea en ratones NMRI macho en comparación con el Fuzeon® (T-20) de control. Por animal, se inyectaron subcutáneamente aproximadamente 2,25 µg de los péptidos marcados con  $^{131}I$ . En los puntos de tiempo indicados, se sacrificaron los animales y se determinó la acumulación de péptidos específicos en el hígado (% de DI/g).

**(B)** HPLC de fase inversa del VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(D) puro marcado con  $^{131}I$  (curva marrón) en comparación con extractos de hígado (curva naranja) obtenidos 24 h después de la inyección subcutánea en ratones uPA+/-/RAG-2-/-Pfp-/- del mismo péptido. Nótese que el 50% de la actividad detectable se eluye en la fracción 13. Dado que el residuo miristoilo hidrófobo está situado en el terminal N y el residuo de Tyr yodado en la fracción 13 del terminal C, representa el péptido de longitud completa inalterado.

**Figura 4:** Biodistribución del VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(D) después de la aplicación subcutánea en ratones NMRI.

Por unidad de tiempo, se inyectaron por vía subcutánea 2,25 µg del VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(D) marcado con  $^{131}I$  en ratones NMRI (N = 3). Se sacrificaron los animales 10 min, 1 h, 4 h y 24 h después de la inyección, y se determinaron las acumulaciones de péptidos específicas de órganos (% de DI/g) (sangre, pulmón, corazón, bazo, hígado, riñón y músculo). Téngase en cuenta que la mayor parte del péptido se acumula en el hígado y que el eje Y se sacude para una mejor resolución de la distribución en los otros órganos.

**Figura 5:** Biodistribución del VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(D) después de la aplicación subcutánea en ratones uPA+/-/RAG-2-/-Pfp-/-.

Por unidad de tiempo, se inyectaron por vía subcutánea 2,25 µg del VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(D) marcado con  $^{131}I$  (N = 3). Se sacrificaron los animales 10 min, 1 h, 4 h y 24 h después de la inyección y se determinaron las acumulaciones de péptidos (% de DI/g) específicas de órganos (hígado, bazo, riñón, sangre, pulmón, intestino, corazón, músculo y cerebro). Téngase en cuenta que, al igual que en los ratones NMRI, la mayor parte del péptido se acumula en el hígado.

**Figura 6:** *Scintigram*a del VHBpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(D) marcado con  $^{125}I$  después de la inyección subcutánea en un ratón. Acumulación específica del VHBpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(D) marcado con  $^{125}I$  en el hígado de ratones después de una inyección subcutánea cerca de la pata derecha; aparece el hígado en el lado izquierdo en el medio. Téngase en cuenta que la próxima señal cerca de la cabeza es la tiroides y podría representar yodo libre después de la desyodación del péptido.

**Figura 7:** El tropismo hepático es específico de secuencia y requiere una modificación hidrófoba del terminal N.

**A y B.** Biodistribución de un péptido preS, en el que el terminal N no está modificado en forma hidrófoba, en comparación con una secuencia aleatorizada ("mezclada"). Téngase en cuenta que tanto VHBpreS/1-48 Tyr así como su forma aleatorizada se encuentran en el riñón.

**A:** Biodistribución del VHBpreS/1-48 Tyr(D) en ratones.

**B:** Biodistribución del VHBpreS/mezclada 1-48 Tyr(D) en ratones.

**C y D.** Biodistribución de un péptido preS hidrófobo modificado comparado con una secuencia aleatorizada ("mezclada"). Sólo VHBpreS/2-48 Tyr<sup>estearoil</sup>(D) se transporta al hígado, en el que su forma aleatorizada se distribuye uniformemente.

**C:** Biodistribución del VHBpreS/2-48 Tyr<sup>estearoil</sup>(D) en ratones.

**D:** Biodistribución del VHBpreS/2-48 Tyr (mezclado)<sup>estearoil</sup>(D) en ratones.

**Figura 8:** Biodistribución de variantes de péptidos preS hidrófobos modificados, en la que las variantes son los terminales N y/o C truncados y mutados puntualmente.

Las variantes truncadas, VHBpreS/5-48 D-Tyr<sup>estearoil</sup>(D), VHBpreS/2-33-D Tyr<sup>estearoil</sup>(D) así como VHBpreS/2-21 D-Tyr<sup>estearoil</sup>(D), muestran tropismo hepático, mientras que la variante con una mutación puntual en la posición 12 (G12E) no.

- A:** Biodistribución de VHBpreS/5-48 D-Tyr<sup>estearoil</sup>(D) en ratones.  
**B:** Biodistribución de VHBpreS/2-33-D-Tyr<sup>estearoil</sup>(D) en ratones.  
**C:** Biodistribución de VHBpreS/2-48(G12E) D-Tyr<sup>estearoil</sup>(D) en ratones.  
**D:** Biodistribución de VHBpreS/2-21 D-Tyr<sup>estearoil</sup>(D) en ratones.

**Figura 9.** Inhibición de la infección por VHB mediante péptidos derivados de preS del VHB hidrófobos modificados de la invención.

- A:** inhibición de la infección por VHB mediante VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(D), VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(C), VHBpreS/(-11)-48<sup>mir</sup>(C), VHBpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(C) y VHBpreS/(-11)-48<sup>estearoil</sup>(C).  
**B:** inhibición de la infección por VHB mediante VHBpreS/2-48<sup>estearoil</sup>(D), VHBpreS/2-15<sup>estearoil</sup>(D), VHBpreS/2-21<sup>estearoil</sup>(D), VHBpreS/2-26<sup>estearoil</sup>(D) y VHBpreS/2-33<sup>estearoil</sup>(D).

Las células HepaRG se infectaron en ausencia (0 nM) o en presencia de 1, 5, 25, 100 y 1000 nM de los respectivos péptidos derivados de preS del VHB hidrófobos modificados de la invención. El inóculo infeccioso (VHB del genotipo D) y los péptidos se incubaron durante la noche. Después del lavado, las células se mantuvieron durante otros 12 días para permitir la expresión del gen viral. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular del día 8-12 y se analizaron para detectar HBSAg secretado usando un ELISA cuantitativo disponible comercialmente. Los valores de HBsAg de la respectiva infección incompleta se establecieron en 100% y el grado de inhibición de la infección se da en % de la infección incompleta.

En la que (C) o genotipo C se refiere al genotipo C Q46K del VHB.

**Figura 10.** La unión de los péptidos derivados del preS del VHB hidrófobos modificados de la invención a hepatocitos humanos primarios (HHP) es inmunofluorescencia específica de secuencia y dependiente de miristoilo, que muestra imágenes confocales Azul: DAPI; Verde: FITC.

Se incubaron hepatocitos humanos primarios (HHP) con o sin péptido 400 nM durante 4 horas:

- A** sin péptido  
**B** con mir-FITC silvestre  
**C** con mir-FITC mutado  
**D** con mir(-)-FITC silvestre. Los puntos brillantes (verdes) muestran autofluorescencia de las células (A, C y D), mientras que sólo en B se puede ver la unión del péptido a las células.  
 mir-FITC silvestre se refiere a VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(C)-FITC con lisina (K) en el terminal C [SEQ ID NO. 39], marcado con un fluoróforo (FITC)  
 mir-FITC mutado VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(C)-FITC con dos sustituciones de aminoácidos en las posiciones L11 y F13, en las que los aminoácidos se sustituyeron con los respectivos residuos de aminoácidos D (D-Leu y D-Phe) [SEQ ID NO. 40], marcado con un fluoróforo (FITC)  
 mir(-)-FITC silvestre se refiere a VHBpreS/2-48(C)-FITC sin miristoilación [SEQ ID NO. 39], marcado con un fluoróforo (FITC)  
 El fluoróforo FITC se unió a la cadena lateral (grupo NH<sub>2</sub>) de la Lys adicional.

**Figura 11.** La unión de los péptidos derivados de preS del VHB hidrófobos modificados de la invención no está restringida a hepatocitos susceptibles al VHB.

Inmunofluorescencia, mostrando imágenes confocales Azul: DAPI; Verde: FITC.

Las células se incubaron con o sin péptido 400 nM durante 4 horas a 37 °C:

- A** (panel superior) Células HepaRG diferenciadas  
**B** (panel inferior) Hepatocitos primarios de ratón (HPR)

Sólo mir-FITC silvestre se une a las células. Los puntos brillantes (verdes) muestran la autofluorescencia de las células

mir-FITC silvestre se refiere a VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(C)-FITC con lisina (K) en el terminal C [SEQ ID NO. 39], marcado con un fluoróforo (FITC) unido a la cadena lateral (grupo NH<sub>2</sub>) de la Lys adicional

mir-FITC mutado VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(C)-FITC con dos sustituciones de aminoácidos en las posiciones L11 y F13, en las que los aminoácidos se sustituyeron con los respectivos residuos de aminoácidos D (D-Leu y D-Phe) [SEQ ID NO. 40], marcados con un fluoróforo (FITC)

mir(-)-FITC silvestre se refiere a VHBpreS/2-48(C)-FITC sin miristoilación [SEQ ID NO. 39], marcado con un fluoróforo (FITC)

El fluoróforo FITC se unió a la cadena lateral (grupo NH<sub>2</sub>) de la Lys adicional.

**Figura 12.** La unión de los péptidos derivados de preS del VHB hidrófobos modificados de la presente invención depende del estado de diferenciación de las células. Los péptidos solo se unen a hepatocitos diferenciados.

Inmunofluorescencia, mostrando imágenes confocales Azul: DAPI; Verde: FITC.

Las células se incubaron con o sin péptido 400 nM durante 4 horas a 37 °C:

**A** (panel superior) Comparación de células HepaRG diferenciadas e indiferenciadas

**B** (panel inferior) Comparación de hepatocitos primarios de ratón (HPR) diferenciados y desdiferenciados

mir-FITC silvestre se une sólo a células diferenciadas. Los puntos brillantes (verdes) muestran la autofluorescencia de las células

mir-FITC silvestre se refiere a VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(C)-FITC con lisina (K) en el terminal C [SEQ ID NO. 39], marcado con un fluoróforo (FITC)

El fluoróforo FITC se unió a la cadena lateral (grupo NH<sub>2</sub>) de la Lys adicional.

**Figura 13.** Análisis FACS de la unión de un péptido derivado de preS del VHB hidrófobo modificado de la presente invención a hepatocitos primarios de ratón (HPR).

**A** que muestra el protocolo del análisis FACS

**B** que muestra los resultados del análisis FACS (en comparación con los resultados de inmunofluorescencia). Sólo mir-FITC silvestre se une a las células.

mir-FITC silvestre se refiere a VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(C)-FITC con lisina (K) en el terminal C [SEQ ID NO. 41], marcado con un fluoróforo (FITC)

mir-FITC mutado VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(C)-FITC con dos sustituciones de aminoácidos en las posiciones L11 y F13, en las que los aminoácidos se sustituyeron con los respectivos residuos de aminoácidos D (D-Leu y D-Phe) [SEQ ID NO. 42], marcados con un fluoróforo (FITC)

El fluoróforo FITC se unió a la cadena lateral (grupo NH<sub>2</sub>) de la Lys adicional.

**Figura 14.** Constructos de fusión de péptidos derivados de preS del VHB con interferón alfa de ratón.

**Figura 15.** Prueba de purificación y actividad del VHBpreS/2-20<sup>mir</sup>(D)-IFN-alfa

Purificación de la proteína de fusión VHBpreS/2-20<sup>mir</sup>(D)-Interferón alfa 2 de ratón del sobrenadante de células de insecto, que se infectaron con un baculovirus recombinante.

**A** Primera etapa de cromatografía: purificación cromatográfica mediante la etiqueta His, usando Ni-agarosa, porque el constructo VHBpreS/2-20<sup>mir</sup>(D)-IFN-alfa porta una etiqueta His en el terminal C.

**B** Segunda etapa de cromatografía: cromatografía de filtración en gel (S75)

**C** Las fracciones de elución de la primera etapa de cromatografía se ensayaron para IFN.

Véase también los Ejemplos.

Para la secuencia de aminoácidos del VHBpreS/2-20(D), véase la SEQ ID NO. 38.

## Ejemplos

### Síntesis de péptidos derivados de preS hidrófobos modificados

La síntesis se llevó a cabo como se describe por ejemplo en (10).

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

Se estudió la biodistribución de los péptidos derivados de preS hidrófobos modificados en ratones NMRI macho. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las leyes alemanas. Los péptidos, que contienen un residuo de Tyr adicional en el extremo terminal C, se marcaron con <sup>131</sup>I (Amersham Biosciences, Friburgo, Alemania) mediante el procedimiento de cloramina-T y se purificaron mediante HPLC. Los péptidos marcados se administraron subcutáneamente mediante inyección de una solución en DMSO al 50%. En momentos seleccionados se sacrificaron los ratones y se midió la radiactividad contenida en la sangre, corazón, pulmón, bazo, hígado, riñón, músculo y cerebro en un contador  $\gamma$  (Canberra Packard, Rüsselsheim, Alemania) y se expresó como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% de DI/g).

### Evaluación de la estabilidad de los péptidos derivados de preS modificados hidrofóbicos después de la extracción del hígado

Para determinar la estabilidad del péptido en el hígado, se extrajo VHBpreS/2-48<sup>mir</sup>(D) marcado con <sup>131</sup>I de un lóbulo del hígado 24 h después de la inyección subcutánea. Para ello, se añadió a la muestra 1 ml de agua por gramo de tejido hepático congelado. Después de la homogeneización se añadió un volumen igual de acetonitrilo y se repitió la homogeneización. Después de centrifugación (2 x 10 min a 4000 x g), esta solución se separó en una columna de HPLC de fase inversa y la radiactividad de cada fracción se cuantificó en un contador gamma.

### Líneas celulares y cultivos de células primarias

Se cultivaron células HepaRG en medio E de William complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 5 µg/ml de insulina y  $5 \times 10^{-5}$  M de hemisuccinato de hidrocortisona (10). Las células se pasaron 1/5 cada dos semanas mediante tripsinación. Dos a tres semanas antes de la infección, se indujo la diferenciación de las células añadiendo DMSO al 2% en el medio de mantenimiento. El medio se cambió cada 2-3 días.

#### Ensayos de competición de infecciones

Como inóculo infeccioso, se usó un sobrenadante de cultivo concentrado 50 veces de células HepG2 clon 2.2.15 (11), debido a un suministro ilimitado y una calidad constante. Se preparó a partir de sobrenadantes recién recogidos precipitando partículas virales en presencia de polietilenglicol (PEG) 8000 al 6%. El sedimento se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía FCS al 25%. Las alícuotas se almacenaron a -80 °C. Se incubaron células HepaRG diferenciadas o HHP con la fuente infecciosa concentrada, diluida 10 veces en medio de cultivo complementado con PEG 8000 al 4% (Sigma), durante 20 h a 37 °C. Al final de la incubación, las células se lavaron tres veces con el medio de cultivo y se mantuvieron en presencia de DMSO al 2% y hemisuccinato de hidrocortisona  $5 \times 10^{-5}$  M y se recogieron en los tiempos indicados.

Los experimentos de competición se realizaron en placas de 12 pocillos. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células se preincubaron en primer lugar durante 30 min con péptidos derivados del VHB sintetizados químicamente, seguido de una incubación conjunta de células con péptido y virus durante 20 h. Todas las series de competición se realizaron al menos dos veces y en cada caso se muestran los resultados de un experimento representativo (véanse las Figuras 3 a 7).

Se infectaron células HepaRG en ausencia (0 nM) o en presencia de 1, 5, 25, 100 y 2000 nM de los péptidos respectivos de la invención. El inóculo infeccioso (VHB de genotipo D) y los péptidos se incubaron durante la noche. Después del lavado, las células se mantuvieron durante otros 12 días para permitir la expresión del gen viral. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular del día 8-12 y se analizaron para detectar HBSAg secretado usando un ELISA cuantitativo disponible comercialmente. Los valores de HBSAg de la respectiva infección incompleta se establecieron en 100% y el grado de inhibición de la infección se da en % de la infección incompleta.

#### Experimentos de inmunofluorescencia/microscopía

Los hepatocitos primarios que crecieron en cubreobjetos se incubaron con el péptido respectivo a 200 nM en medio de cultivo celular sin suero. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, las células se fijaron y los núcleos se tiñeron con DAPI. La microscopía de fluorescencia se realizó en un microscopio confocal de disco giratorio con un aumento de 600x.

#### Análisis FACS

Los hepatocitos primarios crioconservados se descongelaron y lavaron con medio libre de suero. En cada reacción se incubaron  $4 \times 10^5$  células/ml con el péptido respectivo a una concentración de 200 nM en medio de cultivo celular sin suero. La tinción se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente con mezclado frecuente. Posteriormente, las células se lavaron extensamente y se resuspendieron en PBS para continuar con el análisis FACS.

Los resultados se muestran en las Figuras.

#### Constructos de fusión de péptidos VHBpreS1 con interferón alfa de ratón: producción, purificación y prueba de actividad

Las proteínas de fusión VHBpreS1-péptido-interferón alfa de ratón (véase la Figura 14) se expresaron en células de insecto Hi5 usando el sistema de expresión de baculovirus. Las proteínas de fusión secretadas en los sobrenadantes celulares se recolectaron el día 5 después de la infección y se purificaron en una primera etapa mediante una cromatografía de afinidad para la etiqueta His fusionada en el terminal C al preS1-interferón. La actividad de las proteínas preS1-interferón en las fracciones de elución se midió por su capacidad para inhibir la muerte celular mediada por el virus de la enfermedad de Newcastle. Las fracciones de elución que contenían proteínas preS1-interferón funcionales se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel en una columna de sefrosa S75 con un tampón de urea-PBS 1 M (véase la Figura 15).

#### **Referencias**

1. Seeger, C. & Mason, W.S. Hepatitis B virus biology. Microbiol Mol Biol Rev 64, 51-68 (2000 ).
2. Nassal, M. Hepatitis B virus morphogenesis. Curr Top Microbiol Immunol 214, 297-337 (1996 ).
3. Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S. & Guguen-Guillouzo, C. Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. Virology 213, 292-299 (1995 ).

4. Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C. & Gripon, P. Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* 73, 2052-2057 (1999).
5. Juliano RL (1988) Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres, and emulsions. *Adv Drug Deliv Rev* 2: 31-54 .
6. Hashida M and Takakura Y (1994) Pharmacokinetics in design of polymeric drug delivery systems. *J Control Release* 31: 163-171 .
7. Lu, X. M., Fischman, A. J., Jyawook, S. L., Hendricks, K., Tompkins, R.G. y Yarmush, M. L. (1994) Antisense DNA delivery *in vivo*: liver targeting by receptor-mediated uptake. *J. Nucl. Med.* 35, 269-275 .
8. Freireich, E.J., Gehan, E.A., Rall, D.P., Schmidt, L.H. & Skipper, H.E. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep* 50, 219-244 (1966 ).
9. Erion, M.D. Prodrugs for liver-targeted drug delivery. 541-572. *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects. Volumen V, Part II, Prodrugs.* Springer Nueva York, 2007.
10. Gripon, P., Cannie, I. & Urban, S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* 79, 1613-1622 (2005).
11. Glebe D, Urban S, Knoop EV, Cag N, Krass P, Grun S, Bulavaite A, Sasnauskas K, Gerlich WH. Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* 129, 234-245 (2005 ).

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Hospital Universitario de Heidelberg

<120> Péptidos derivados de preS hidrófobos modificados del virus de la hepatitis B (VHB) y su uso como vehículos para la administración específica de compuestos al hígado

<130> U30197PCT

<150> US 61/062.347

<151> 2008-01-25

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 59

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia consenso de preS1 del VHB (posiciones (-11) a 48)

<400> 1

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

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

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

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

# ES 2 847 288 T3

<210> 2

<211> 59

<212> PRT

5 <213> virus de la Hepatitis B

<400> 2

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

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

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

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

<210> 3

<211> 59

15 <212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

<400> 3

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

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

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

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

<210> 4

25 <211> 59

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Posiciones de la secuencia de preS1 del VHB (-11) a 48, correspondientes al genotipo C del VHB, pero Q46K

<400> 4

# ES 2 847 288 T3

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

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

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

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

<210> 5

5 <211> 48

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

<400> 5

10

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

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

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

15 <210> 6

<211> 58

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

20 <400> 6

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

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

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

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

<210> 7

25 <211> 59

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

<400> 7

30



# ES 2 847 288 T3

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

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

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

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

<210> 8

<211> 58

5 <212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

<400> 8

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

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

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

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

15 <210> 9

<211> 59

<212> PRT

<213> virus de la Hepatitis B

20 <400> 9

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

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

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

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

# ES 2 847 288 T3

<210> 10  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B del mono lanudo

5

<400> 10  
 Met Gly Leu Asn Gln Ser Thr Phe Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Ser  
 1 5 10 15  
 His Gln Leu Asp Pro Leu Phe Lys Ala Asn Ala Gly Ser Ala Asp Trp  
 20 25 30  
 Asp Lys Asn Pro Asn Lys Asp Pro Trp Pro Gln Ala His Asp Thr Ala  
 35 40 45

10

<210> 11  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Secuencia consenso de preS1 del VHB (posiciones 2 a 48)  
 <400> 11  
 Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp  
 20 25 30  
 Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly  
 35 40 45

20

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Secuencia consenso de preS1 del VHB (posiciones 2 a 21)  
 <400> 12  
 Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Asp Pro  
 20

30

<210> 13  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35

# ES 2 847 288 T3

<220>

<223> Posiciones 2 a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondientes al genotipo C del VHB, pero Q46K

5 <400> 13

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

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

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

<210> 14

10 <211> 44

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Posiciones 5 a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondientes al genotipo C del VHB, pero Q46K

<400> 14

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

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

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

20

<210> 15

<211> 40

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Posiciones 9 a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondientes al genotipo C del VHB, pero Q46K

30 <400> 15

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

Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp His  
20 25 30

Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly  
35 40

<210> 16

35 <211> 20

<212> PRT

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

<400> 16

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

Gln Leu Asp Pro  
20

<210> 17

<211> 17

10 <212> PRT

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

<400> 17

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

Pro

<210> 18

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B (posiciones 9 a 21, genotipo C)

<400> 18

25 Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro  
1 5 10

<210> 19

<211> 14

30 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B (posiciones 2 a 15, genotipo C)

<400> 19

35 Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro  
1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B (posiciones 5 a 15, genotipo C)

40 <400> 20

Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro  
1 5 10

45 <210> 21

<211> 7

<212> PRT

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

50 <400> 21

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro  
1 5

# ES 2 847 288 T3

<210> 22  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B (posiciones (-2) a 20, genotipo C)

5 <400> 22

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

Pro Asp His Gln Leu Asp

10 20

<210> 23  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B (posiciones 2 a 48, genotipo D)

15 <400> 23

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

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

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

20  
 <210> 24  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B ((posiciones 5 a 48, genotipo D)

25 <400> 24

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

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

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

30 <210> 25  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B (posiciones 9 a 48, genotipo D)

35 <400> 25

# ES 2 847 288 T3

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg  
1 5 10 15

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

Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly  
35 40

<210> 26

<211> 20

5 <212> PRT

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

<400> 26

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

Gln Leu Asp Pro  
20

10

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

15 <213> virus de la hepatitis B (posiciones 5 a 21, genotipo D)

<400> 27

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

Pro

20

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> virus de la hepatitis B (posiciones 9 a 21, genotipo D)

25

<400> 28

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro  
1 5 10

30

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> virus de la hepatitis B (posiciones 2 a 15, genotipo D)

35

<400> 29

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

40

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> virus de la hepatitis B (posiciones 5 a 15, genotipo D)

<400> 30

# ES 2 847 288 T3

Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro  
1 5 10

5 <210> 31  
<211> 47  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Posiciones 2 a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondientes al genotipo C (pero Q46K), con sustitución de Ala en las posiciones 21, 23, 29, 30

<400> 31

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

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

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

20 <210> 32  
<211> 59  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Posiciones (-11) a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondientes al genotipo C (pero Q46K), D20A

25 <400> 32

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

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

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

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

30 <210> 33  
<211> 47  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Posiciones 2 a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondientes al genotipo C (pero Q46K), D20A

35 <400> 33

# ES 2 847 288 T3

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

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

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

5 <210> 34  
<211> 59  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Posiciones (-11) a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondientes al genotipo C (pero Q46K), S27A, N29A

<400> 34

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

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

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

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

20 <210> 35  
<211> 47  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Posiciones 2 a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondiente al genotipo C (pero Q46K), S27A, N29A

<400> 35

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

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

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

30 <210> 36  
<211> 59



# ES 2 847 288 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

5 <223> posiciones (-11) a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondiente al genotipo C (pero Q46K), D20A, S27A, N29A

<400> 36

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

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

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

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

10

<210> 37

<211> 47

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Posiciones 2 a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondiente al genotipo C (pero Q46K), D20A, S27A, N29A

20

<400> 37

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

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

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

25

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> virus de la hepatitis B (posiciones 2 a 20, genotipo D)

30

<400> 38

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

Gln Leu Asp

<210> 39

35

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial

# ES 2 847 288 T3

<220>

<223> Posiciones 2 a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, genotipo C, más K en la posición 49

5 <400> 39

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

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

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

<210> 40

10 <211> 48

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Posiciones 2 a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondientes al genotipo C (pero Q46K), más K en la posición 49, las posiciones L11 y F13 son D-aminoácidos

<400> 40

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

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

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

20

<210> 41

<211> 48

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Posiciones 2 a 48 de la secuencia de preS1 del VHB, correspondiente al genotipo C (pero Q46K), más K en la posición 49

30

<400> 41

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

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

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

35 <210> 42

<211> 48

# ES 2 847 288 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

5 <223> Posiciones 2 a 48 de la secuencia preS1 del VHB, correspondientes al genotipo C (pero Q46K), más K en la posición 49, las posiciones L11 y F13 son D-aminoácidos

<400> 42

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

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

Phe	Asn	Pro	Asn	Lys	Asp	His	Trp	Pro	Glu	Ala	Asn	Lys	Val	Gly	Lys
10		35					40					45			

## REIVINDICACIONES

1. Péptido hidrofobo modificado derivado de preS del virus de la hepatitis B (VHB) de fórmula

5 [H<sub>m</sub>-P-R<sub>n</sub>]A<sub>o</sub>

como vehículo para el suministro específico de compuesto o compuestos al hígado para su uso como medicamento,  
en el que

10 P es dicho péptido derivado de preS que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs. 11, 12, 13, 16, 23 y 26;

H es dicha modificación hidrófoba del péptido P derivado de preS, que está en el terminal N de P y se selecciona de acilación con estearoilo (C18) o miristoilo (C14),

15 m es 1,

R es una modificación del terminal C de dicho péptido P derivado de preS, que es preferiblemente una fracción que protege de la degradación seleccionado entre amida, D-aminoácido, aminoácido modificado, aminoácido cíclico, albúmina, polímero natural y sintético, tal como PEG, glicano,

n es 0 o al menos 1,

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

que comprende además compuesto o compuesto(s)seleccionados de un fármaco; un profármaco; un portador o depósito para un fármaco o profármaco y en el que el compuesto o los compuestos y el péptido hidrófobo forman un conjugado.

2. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que H y/o R están unidos a P mediante un enlazador o espaciador.

3. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona de un fármaco, preferiblemente interferón, tal como IFN $\alpha$ ;

inhibidor de la transcriptasa inversa viral;

inhibidor de la ARN polimerasa viral;

35 inhibidor del ensamblaje del núcleo viral o inhibidor de la nucleocápside viral;

inhibidor de quinasa, tal como un inhibidor de quinasa Raf;

análogo de nucleósido;

inhibidor de proteasa;

inhibidor de proteasoma;

40 anticuerpo o fragmento del mismo;

ARNpi o precursor del mismo;

inhibidor de farnesilación; tal como inhibidor de farnesil transferasa (FTI);

alcohol deshidrogenasa (ADH) o activador de la misma;

inhibidor de la biosíntesis de colesterol;

45 inhibidor de la etapa hepática de un virus o un patógeno no viral;

antibiótico,

en el que, preferiblemente, el fármaco está en forma de un profármaco.

4. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el compuesto es interferón, tal como IFN $\alpha$ , y P comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 23 y/o H es una modificación hidrófoba con miristoilo (C14).

5. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el conjugado se forma por unión covalente o por formación de complejo, más preferiblemente uniendo covalentemente un compuesto a un grupo de anclaje A.

6. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el grupo de anclaje A comprende además un espaciador o enlazador, en el que el espaciador o enlazador comprende preferiblemente un sitio de reconocimiento, que preferiblemente es reconocido por una proteína del hígado, preferiblemente una proteína hepatocelular, más preferiblemente una enzima proteolítica hepatocelular o citocromo.

7. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende el uso de una composición farmacéutica que comprende;

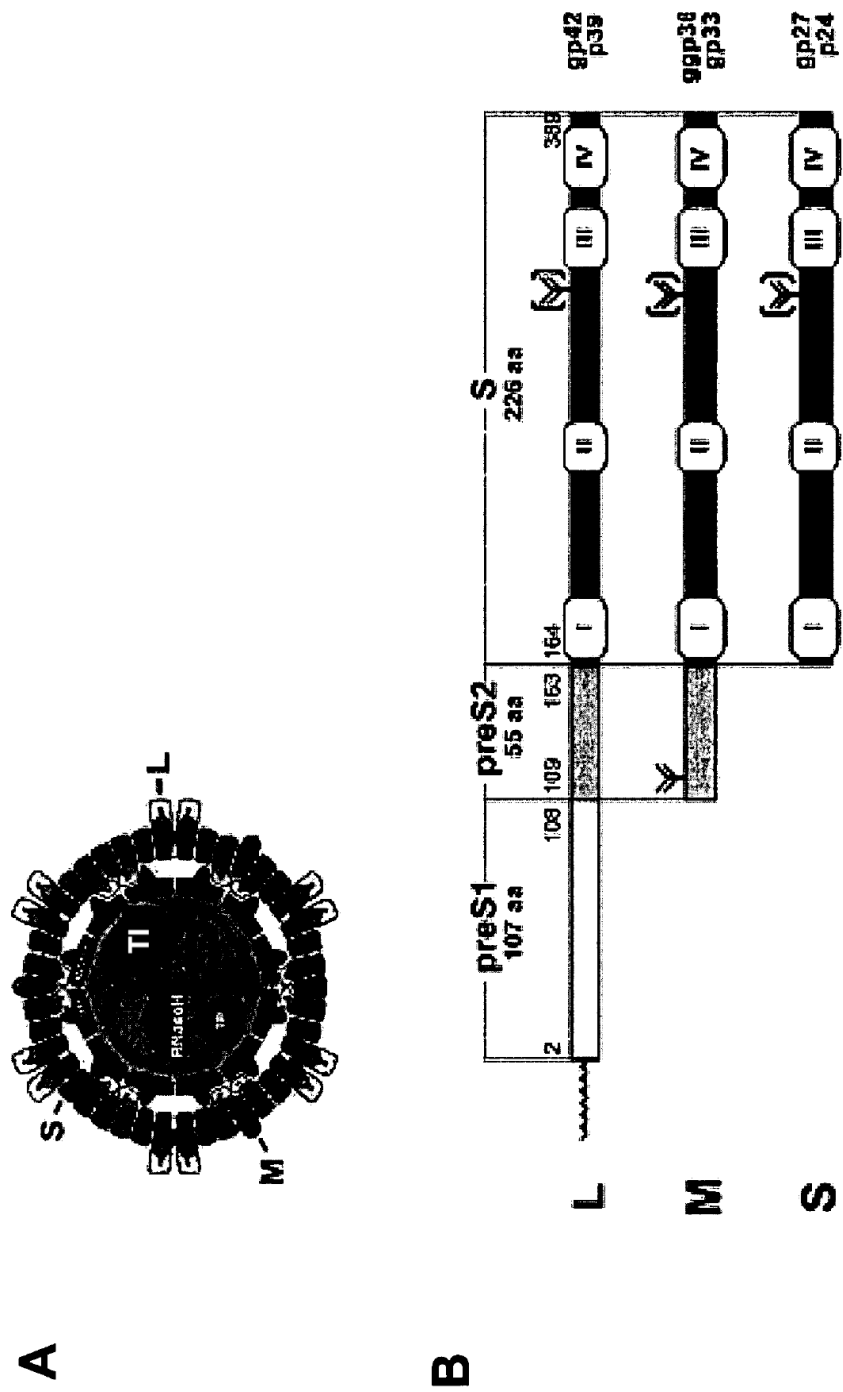
65 al menos un péptido derivado de preS hidrófobo modificado del VHB de acuerdo con la reivindicación 1 o 2;

al menos un compuesto para ser administrado específicamente al hígado, preferiblemente a los hepatocitos,

preferiblemente como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 4;  
o un conjugado como se define en la reivindicación 5; y  
opcionalmente, un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 8. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el suministro específico de un compuesto al hígado es preferiblemente el suministro específico del compuesto a los hepatocitos.
- 10 9. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el compuesto se administra específicamente al hígado de un animal, preferiblemente mamífero o humano, o un ave, y/o en el que el compuesto está preferiblemente enriquecido en el hígado, y/o en el que el compuesto se escinde preferiblemente del conjugado covalente con el péptido derivado de preS hidrófobo modificado del VHB por una proteína del hígado, preferiblemente una proteína hepatocelular, más preferiblemente una enzima proteolítica hepatocelular o citocromo.
- 15 10. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático.
- 20 11. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la enfermedad o trastorno hepático se selecciona de hepatitis, cirrosis, hemocromatosis, preferiblemente hepatitis causada por virus de la hepatitis A, B, C, D, E, F, G y H o hepatitis concomitante causada por virus, y/o en el que la enfermedad o trastorno hepático es una enfermedad que implica un estadio hepático de un virus o un patógeno no viral, preferiblemente una enfermedad tropical, malaria, esquistosomiasis, leishmaniasis.
- 25 12. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la enfermedad o trastorno hepático es un tumor hepático, preferiblemente carcinoma hepatocelular (CHC), o en el que la enfermedad o trastorno hepático es una enfermedad metabólica, preferiblemente obesidad, síndrome metabólico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- 30 13. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en la regulación de la función hepática y/o para uso en la presentación de antígenos mediada por hepatocitos y la activación de respuestas inmunológicas dirigidas al hígado.
- 35 14. El péptido derivado de preS hidrófobo modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en la prevención de la infección por hepatitis B y/o D como vacuna.

Figura 1



## Figura 2

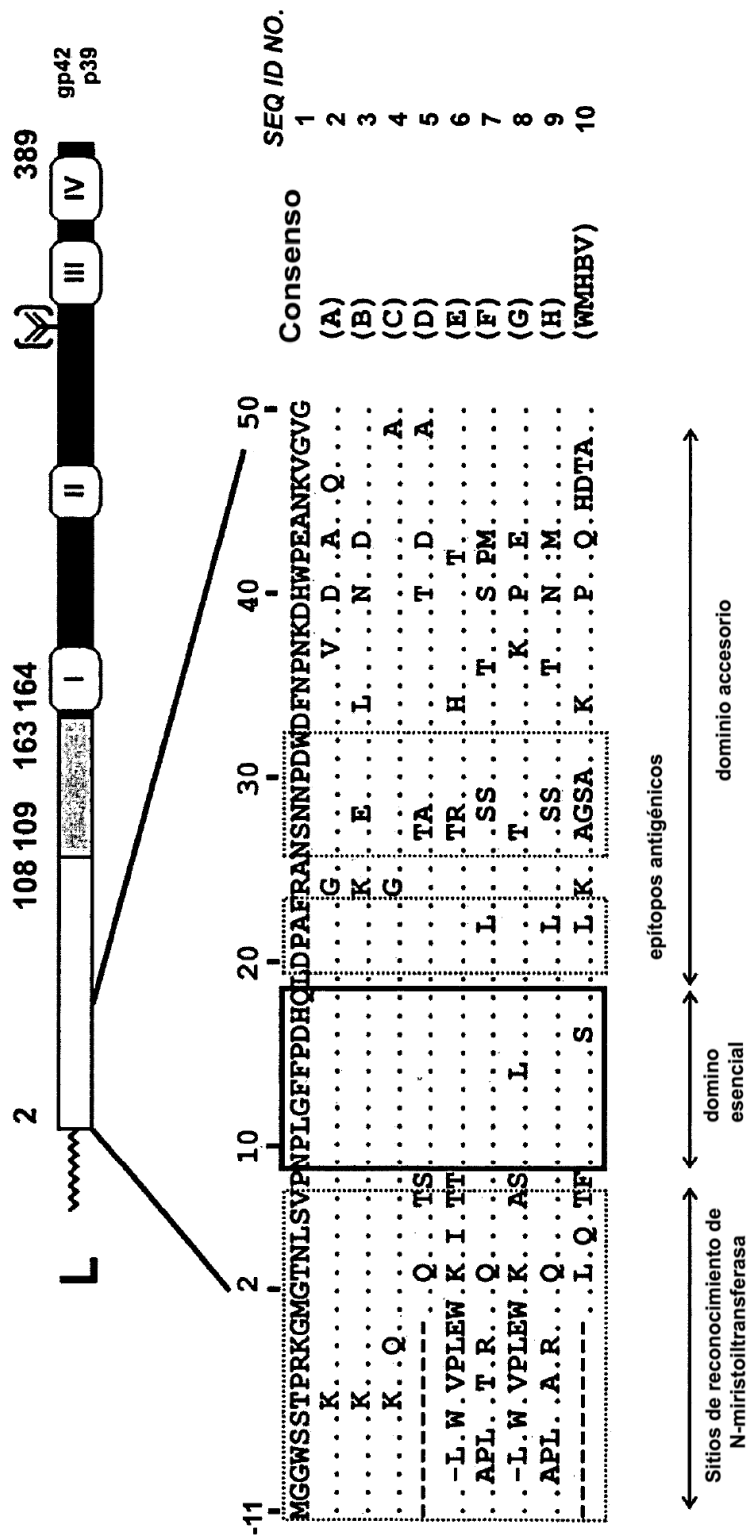


Figura 3

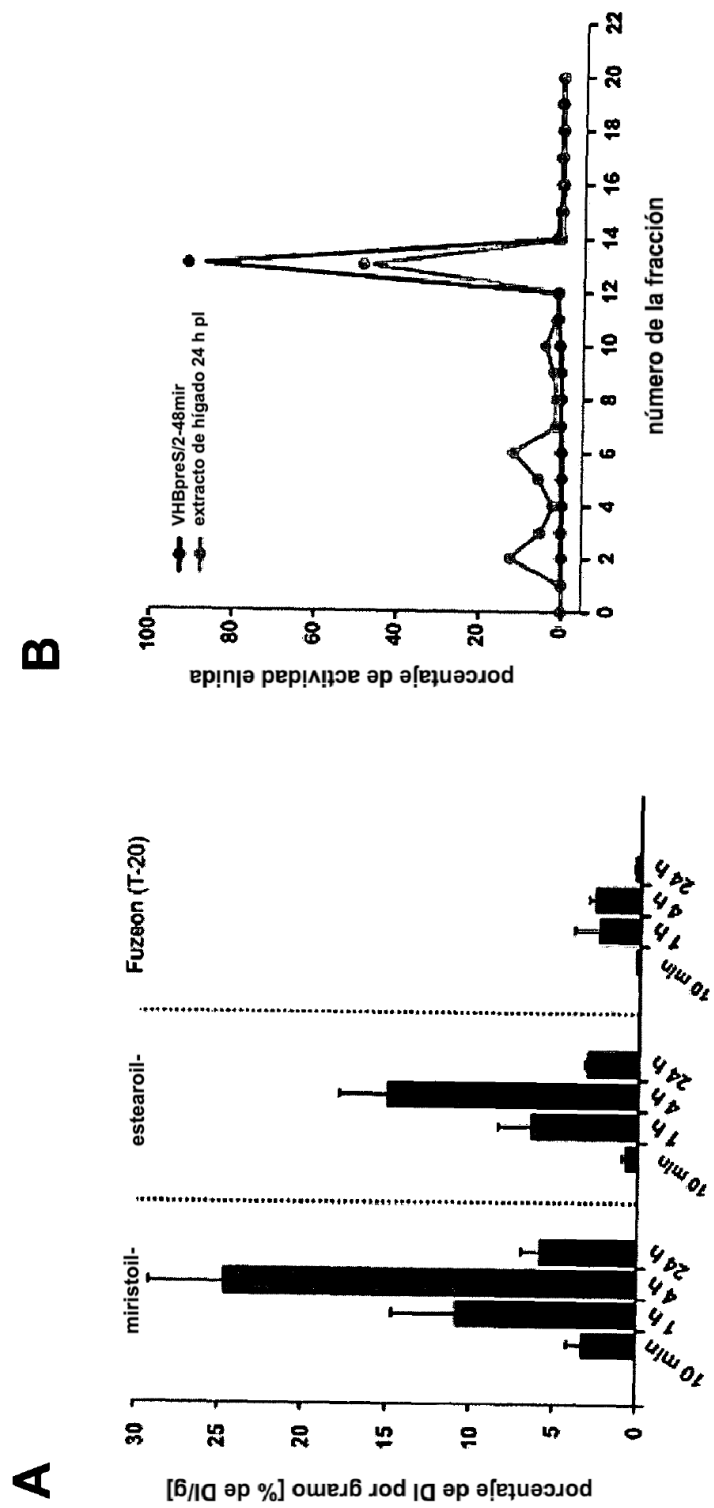
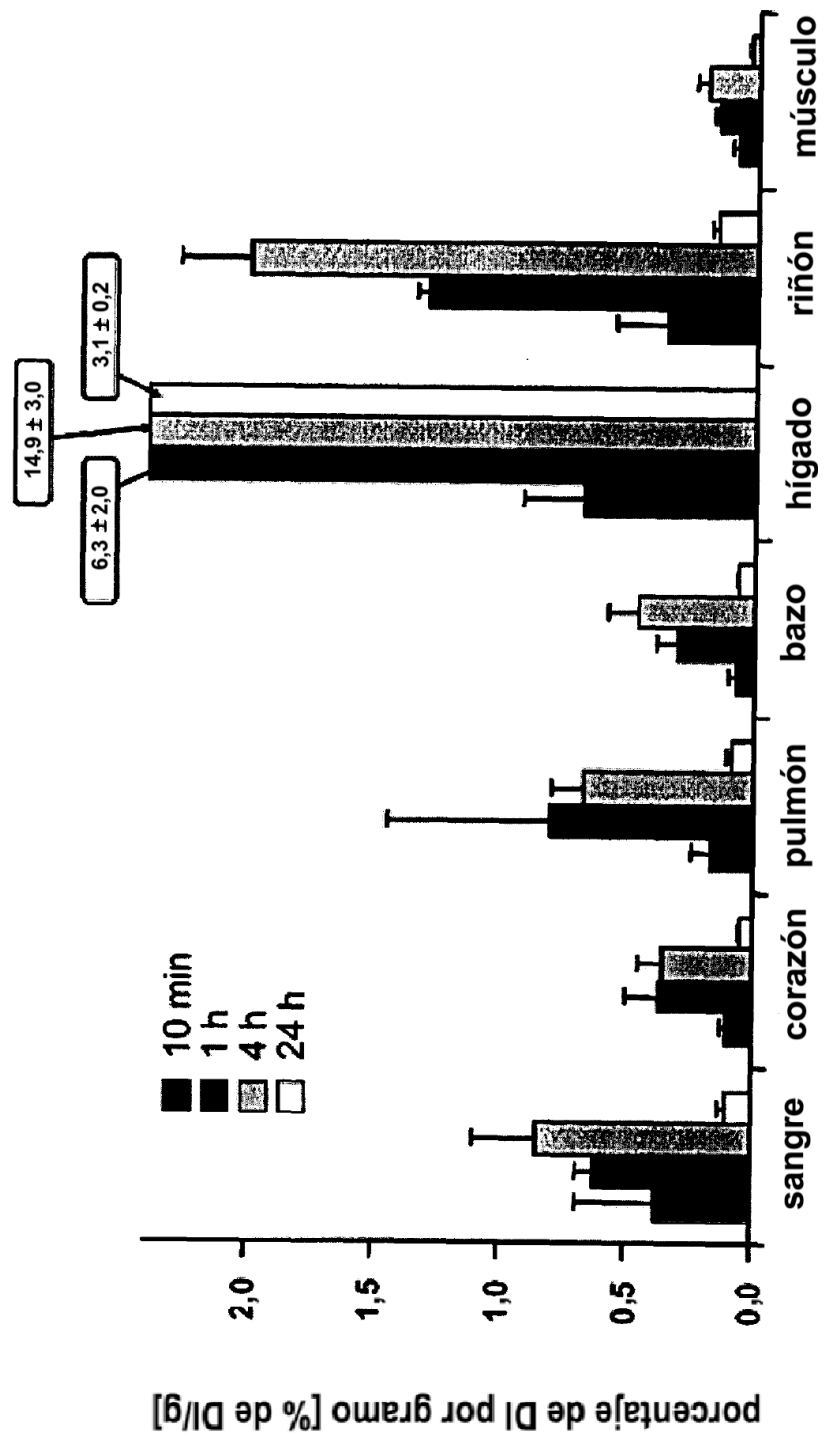
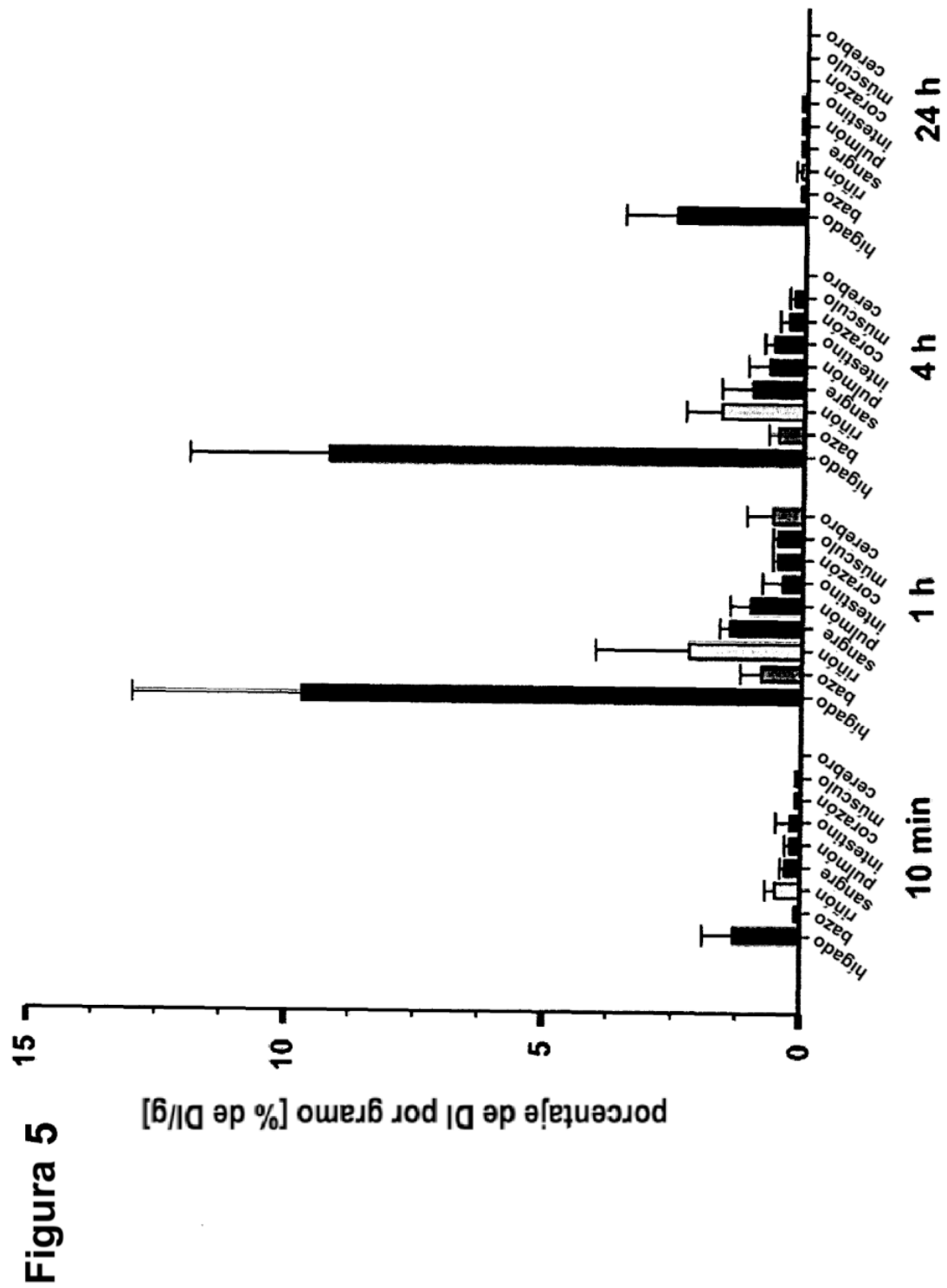




Figura 4





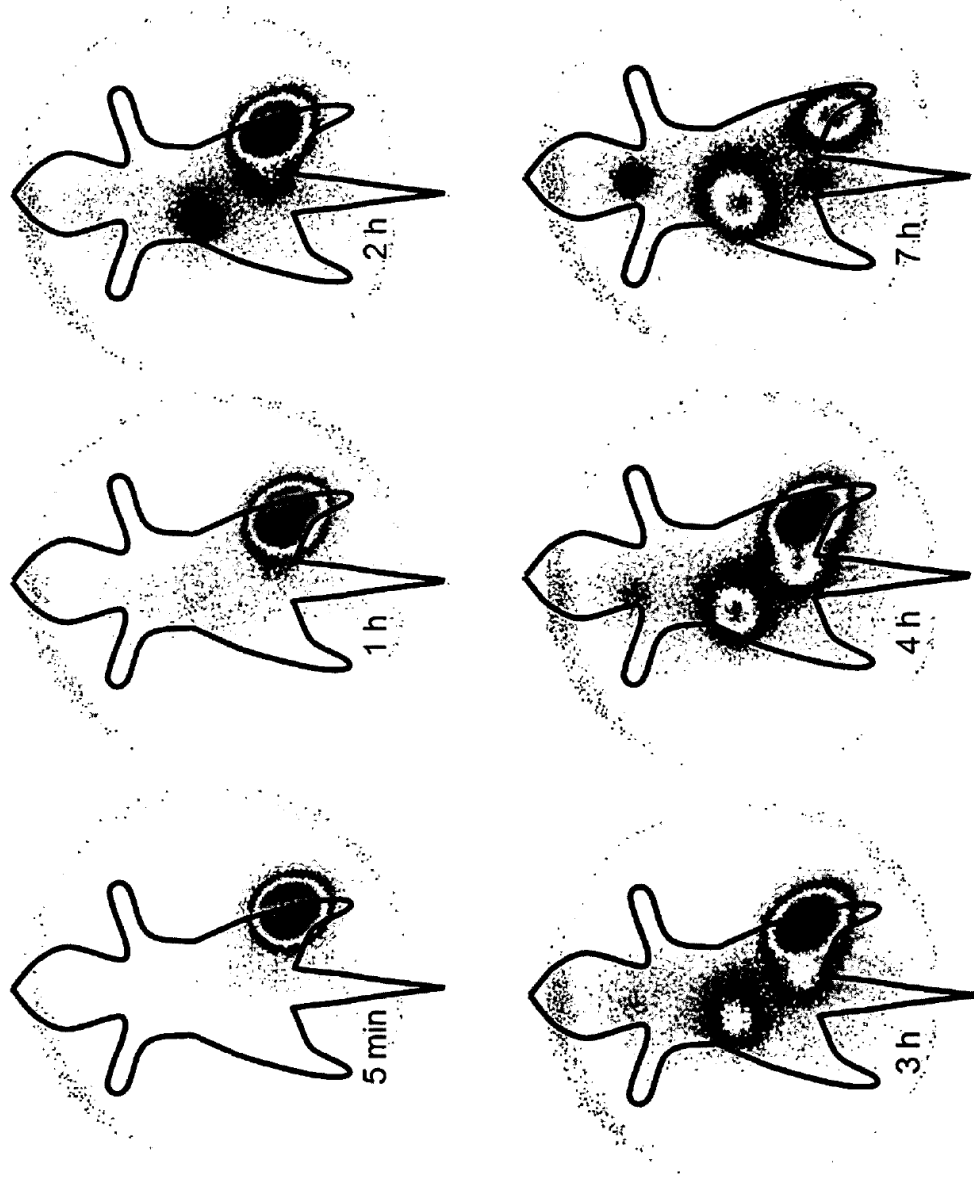


Figure 6

Figura 7

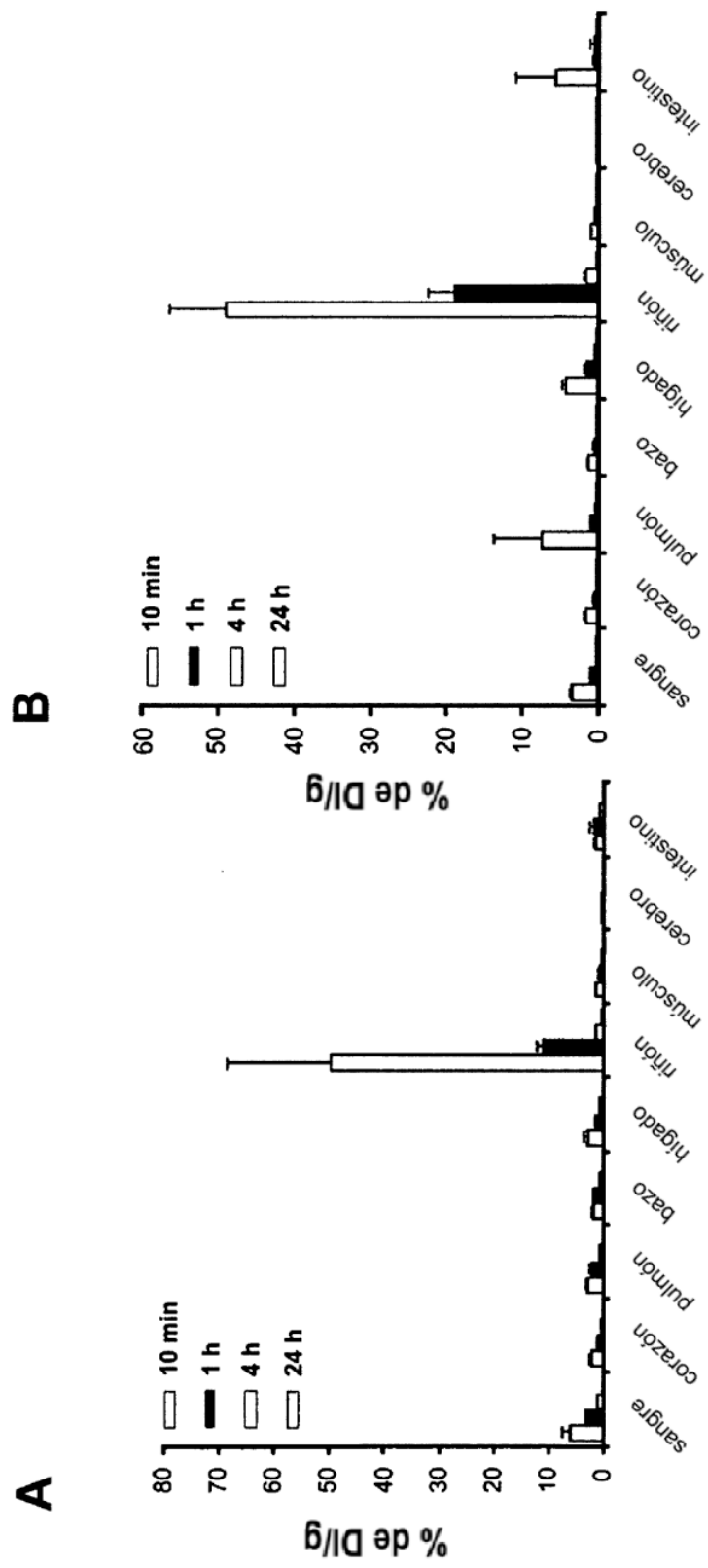


Figura 7

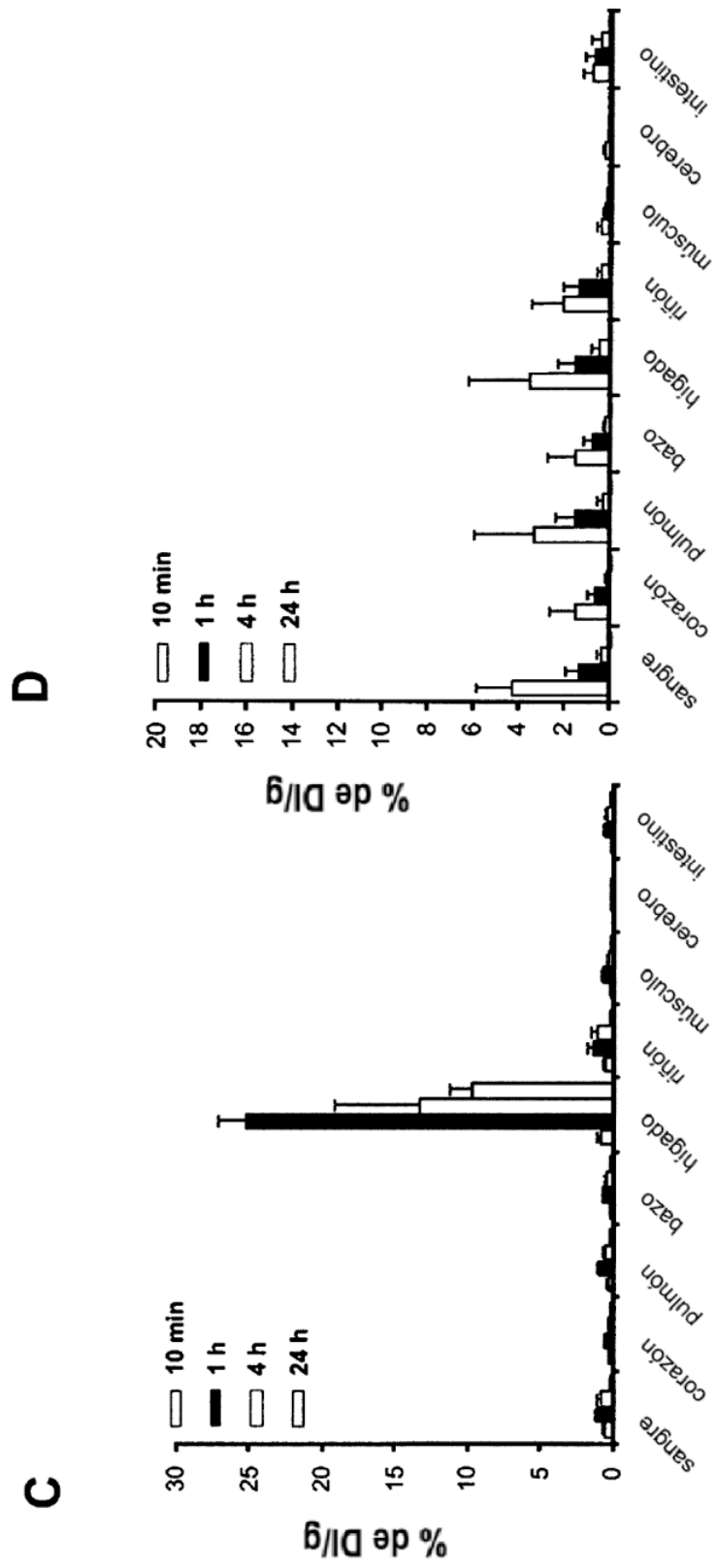
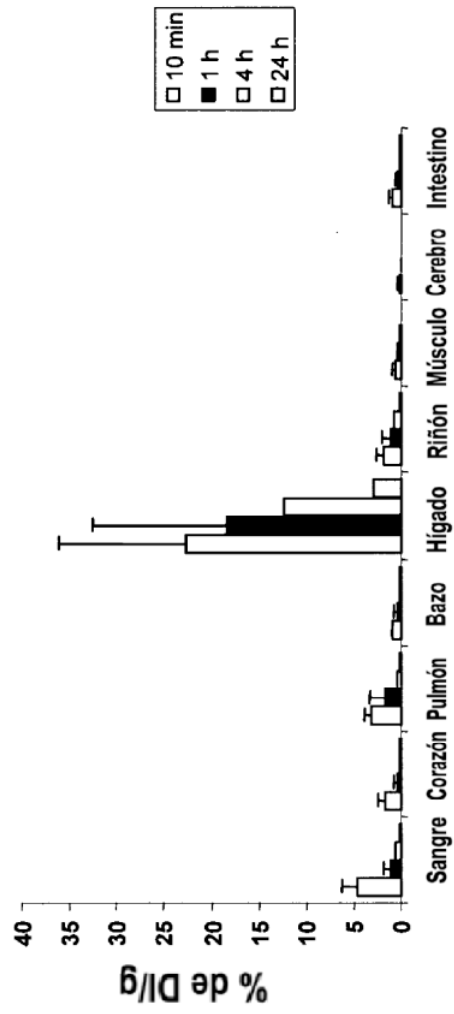


Figura 8

**A**



**B**

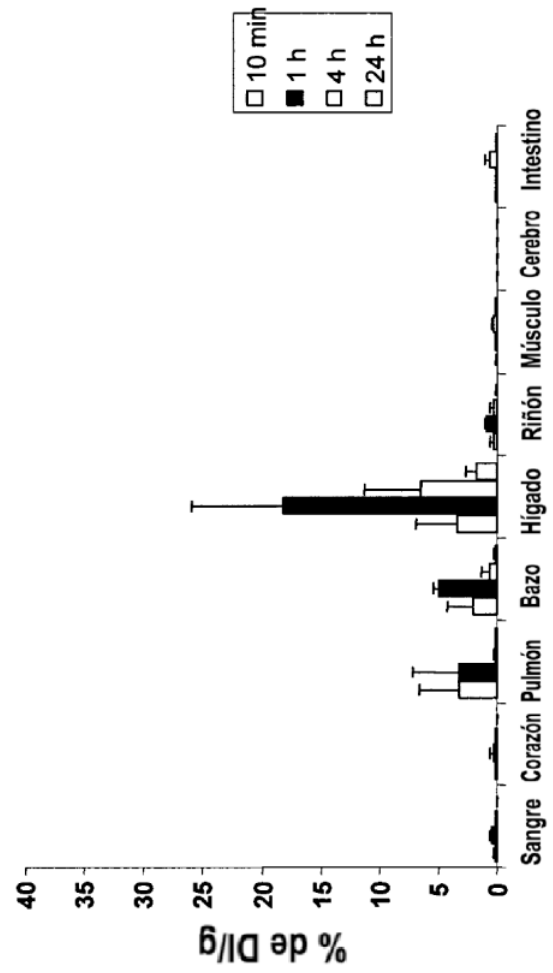
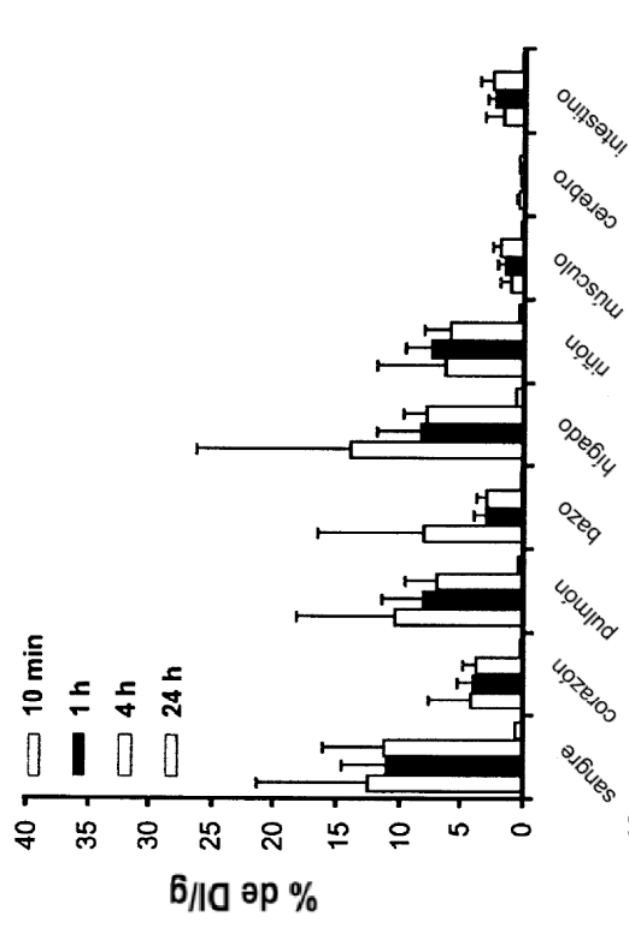


Figura 8

C



D

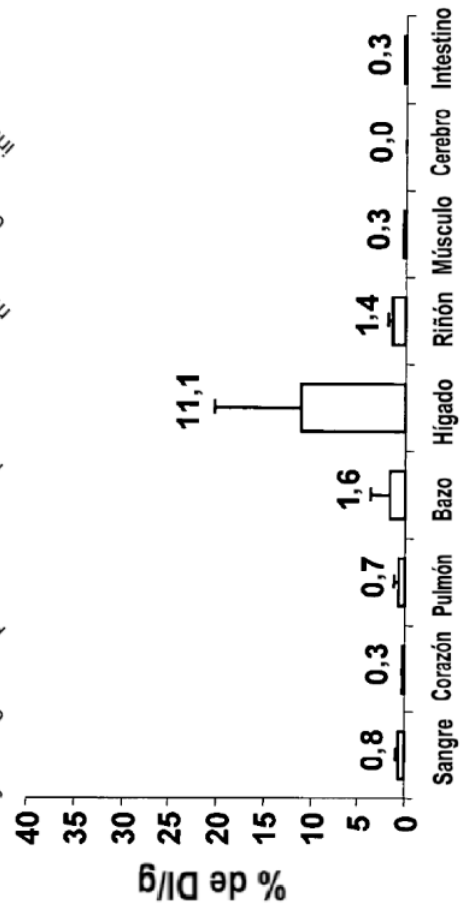


Figura 9 A

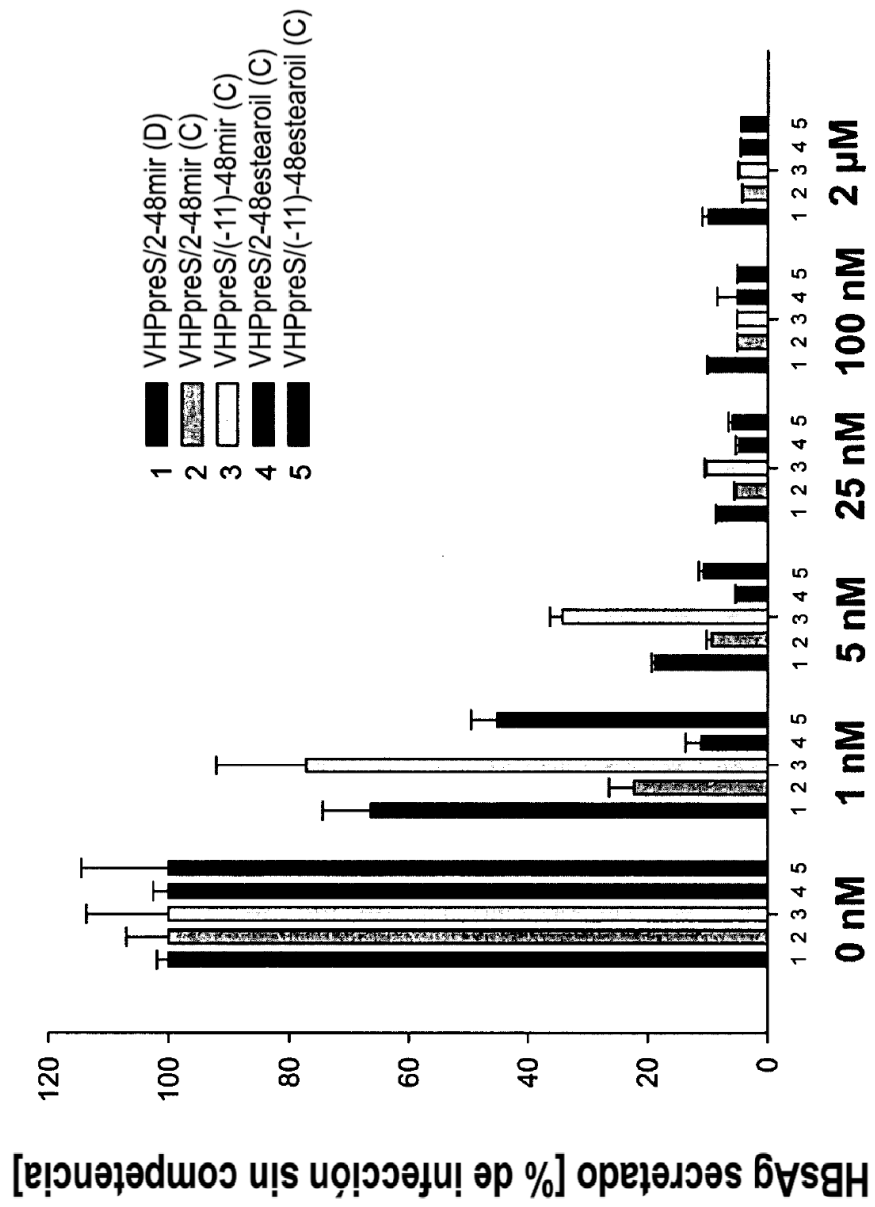
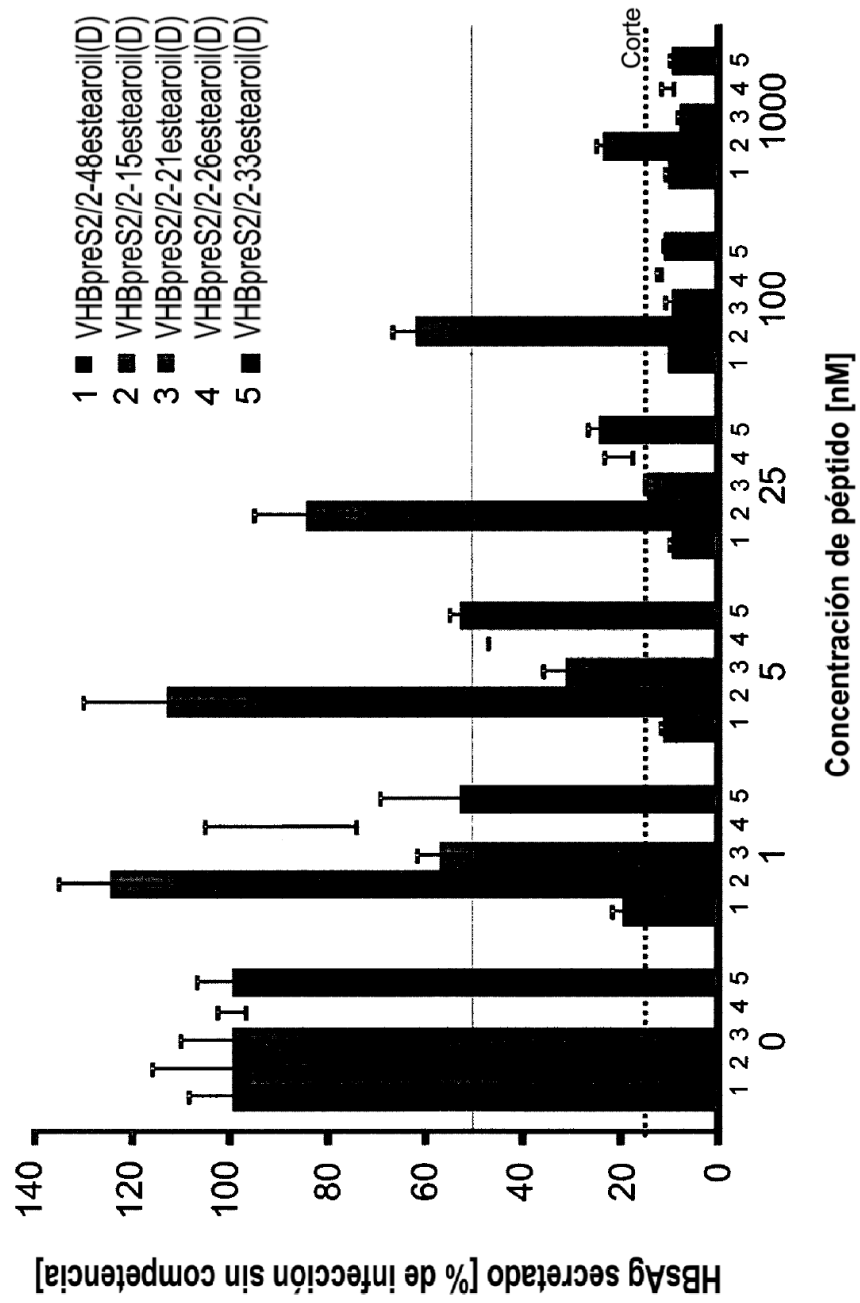




Figura 9 B



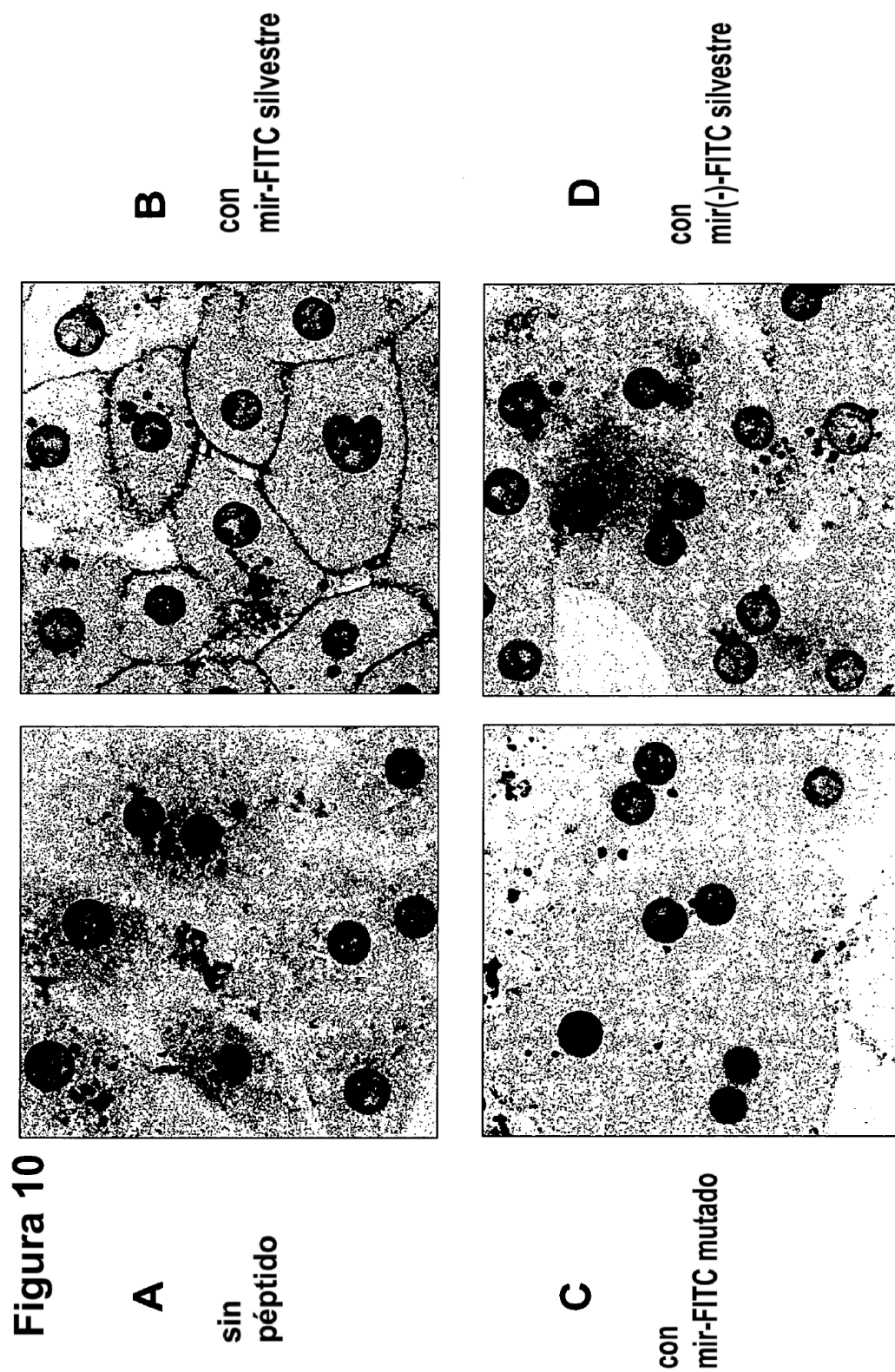
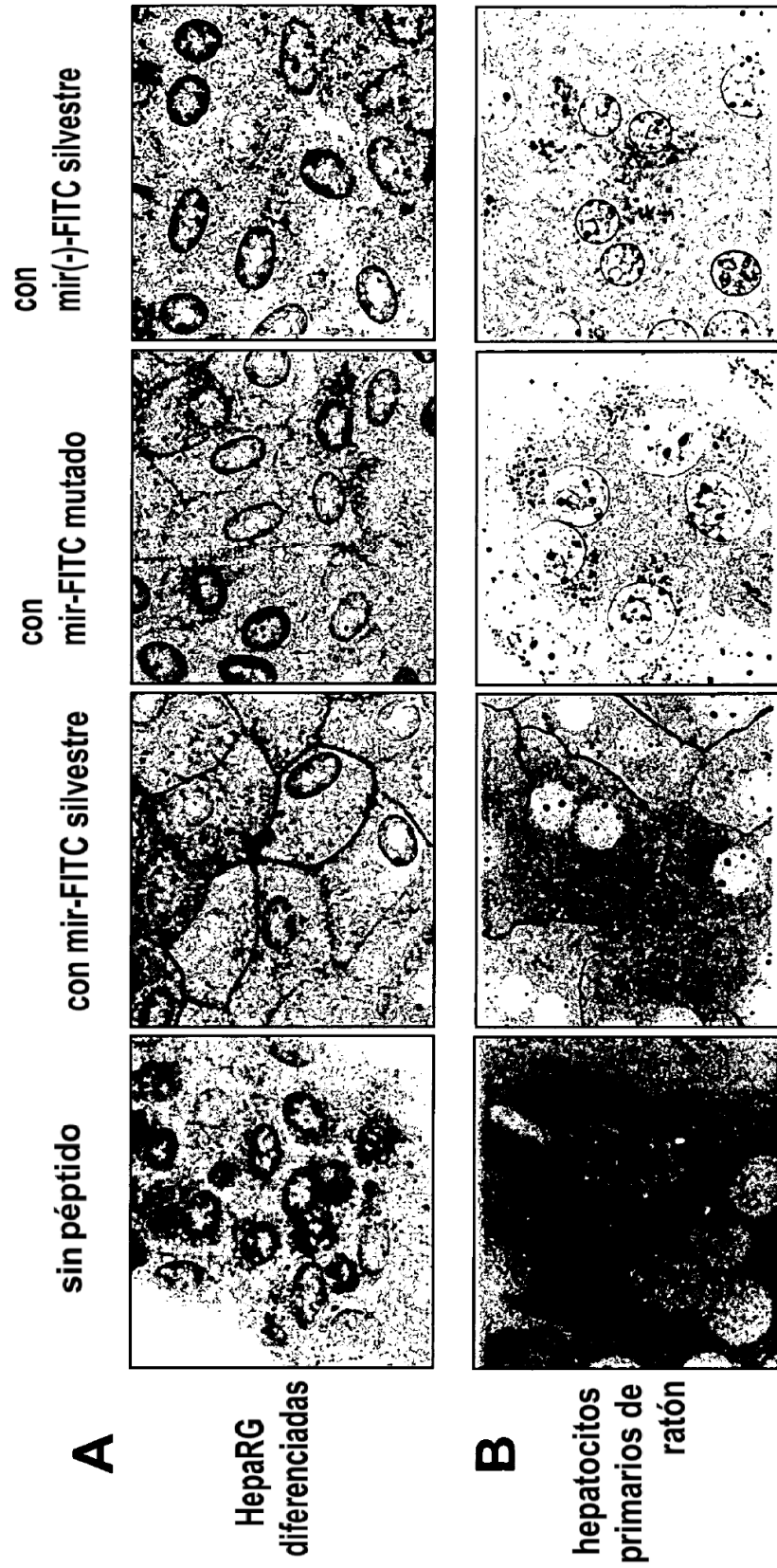
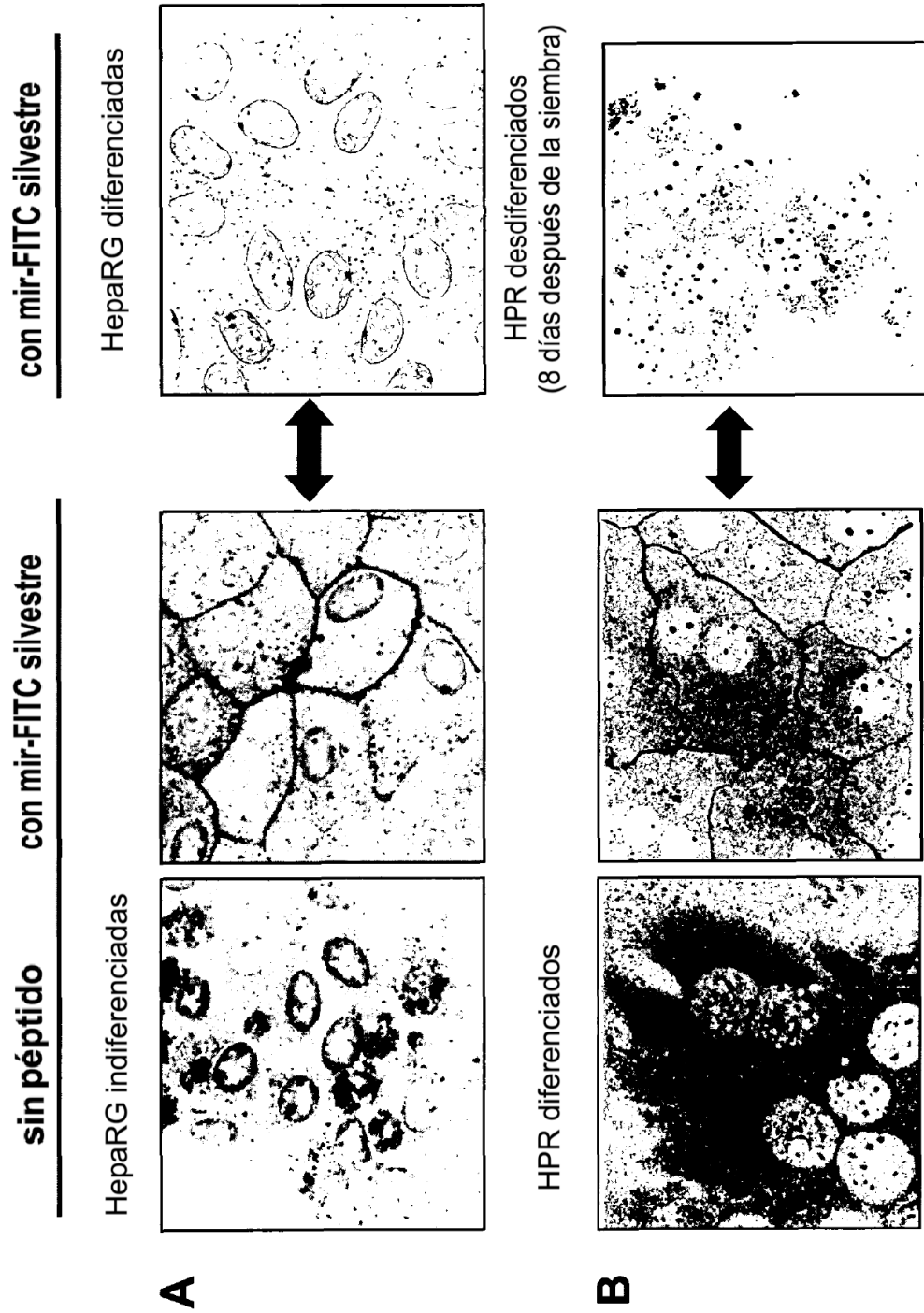


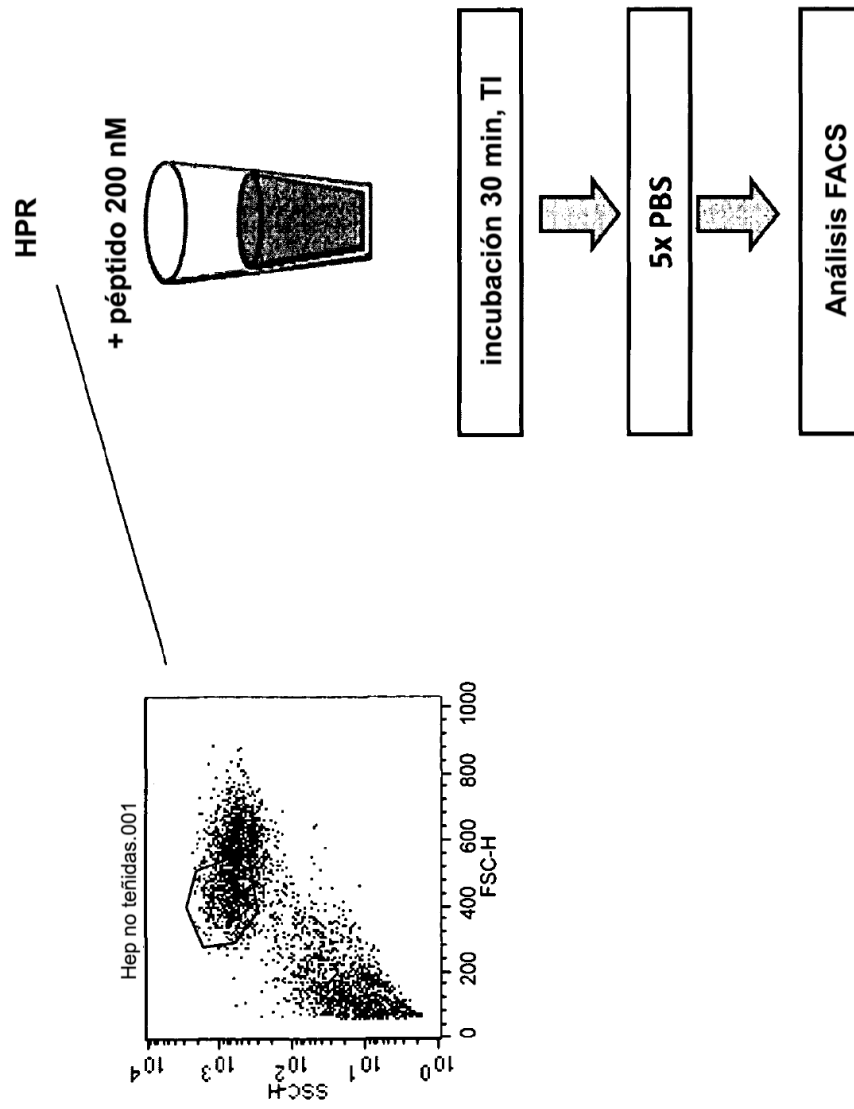
Figura 11



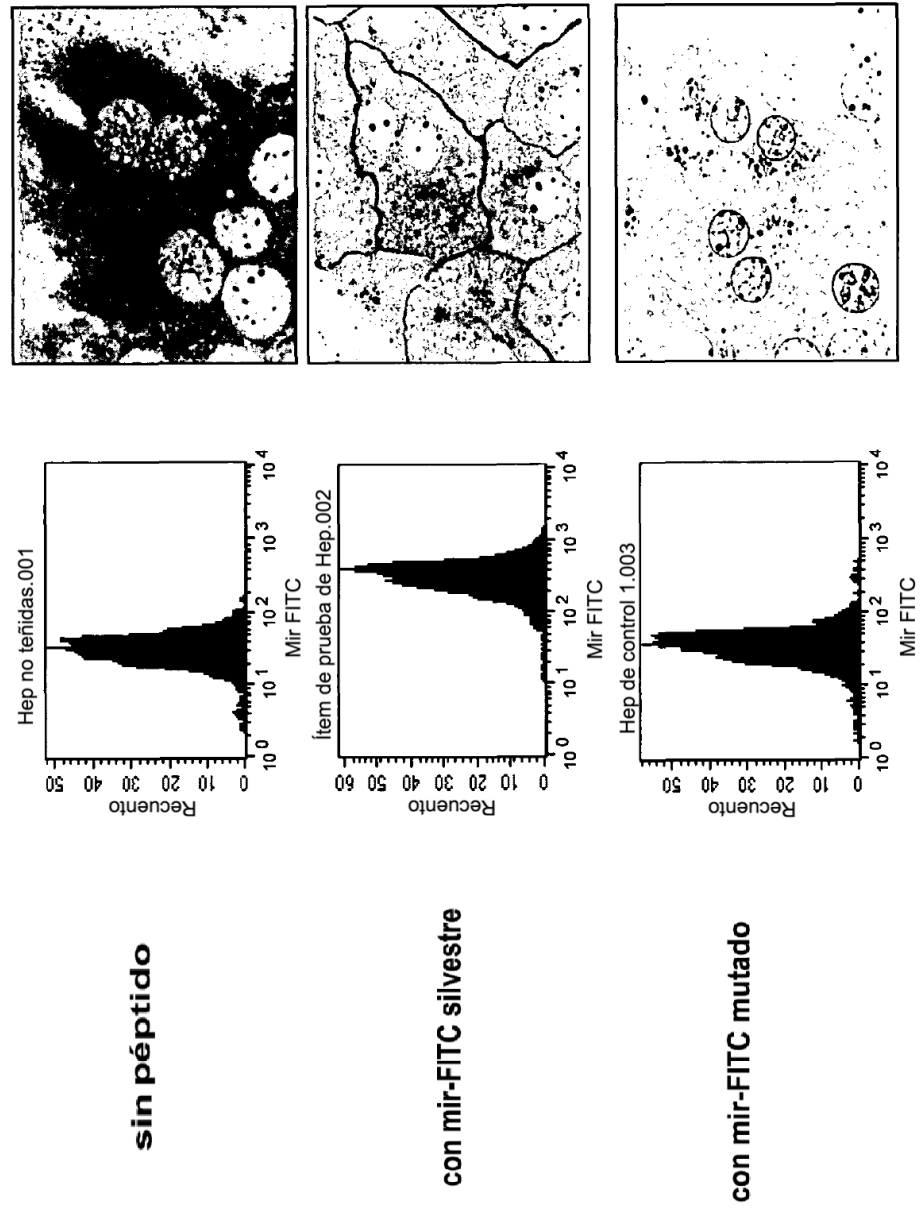
**Figura 12**



**Figura 13 A**



**Figura 13 B**



**Figura 14**

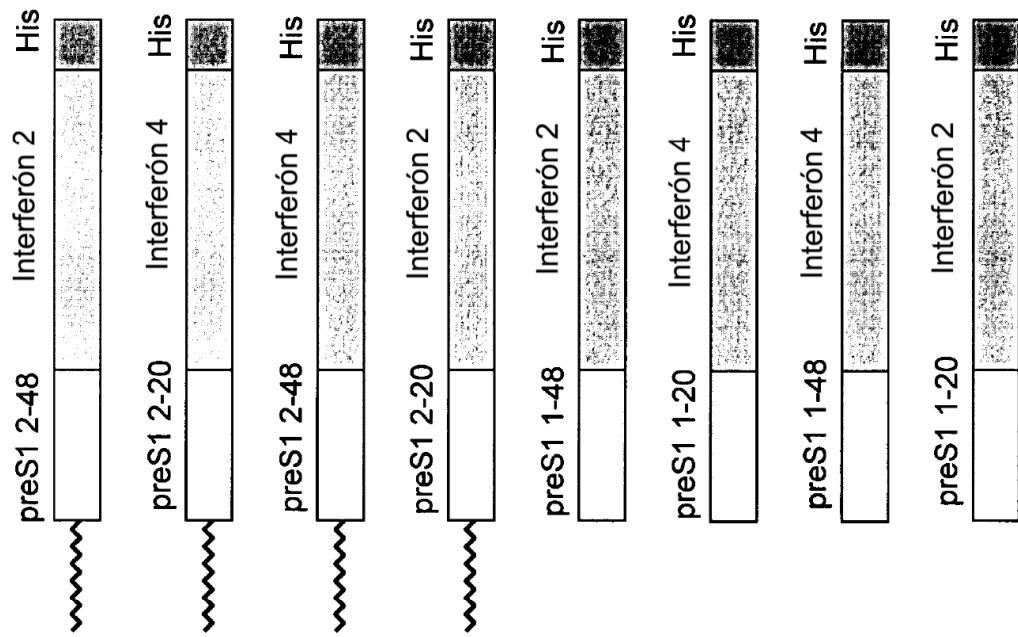


Figura 15

