

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 858**

51 Int. Cl.:

A61K 38/12 (2006.01)
C07K 7/50 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
A61K 51/04 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2016** **PCT/EP2016/081117**
87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017** **WO17102906**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2016** **E 16822406 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 3389691**

54 Título: **Péptidos cíclicos de localización en NTCP y sus usos como inhibidores de entrada**

30 Prioridad:

16.12.2015 EP 15200494

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**URBAN, STEPHAN;
NI, YI y
MIER, WALTER**

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 2 810 858 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 cíclicos de localización en NTCP y sus usos como inhibidores de entrada

La presente invención se refiere a péptidos cíclicos de localización en NTCP que son péptidos derivados de preS del virus de la hepatitis B (HBV). La presente invención además se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un péptido cíclico. La presente invención además se refiere a usos médicos de dichos péptidos cíclicos y composiciones farmacéuticas, tal como en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección hepática, y/o en la inhibición de la infección por HBV y/o HDV.

Antecedentes de la invención

Actualmente, aproximadamente 2 mil millones de personas portan marcadores serológicos de HBV. Aproximadamente 400 millones de estos están infectados crónicamente con el HBV. De acuerdo con el centro de control de enfermedades (CDC), el 15-25% de las personas infectadas crónicamente con HBV son propensas a desarrollar carcinoma hepatocelular (HCC) dentro de una década si no reciben el tratamiento apropiado (Shephard *et al.*, 2006). El HCC relacionado con el HBV tiene un pronóstico malo y, por lo tanto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado el HBV como el carcinógeno humano natural más importante. A pesar de la existencia de una vacuna profiláctica, el número de infecciones aumentará en las próximas décadas debido al aumento de la población mundial y la limitación de la profilaxis en los países pobres.

El HBV se transmite principalmente por vía parenteral. 90-95% de los individuos inmunocompetentes agudamente infectados eliminan el virus, de este modo aumentando la protección inmunológica de por vida. Aproximadamente 5-10% de las personas infectadas desarrollan hepatitis B crónica (300.000-500.000 personas en Alemania). En contraste, en áreas endémicas altas, particularmente en África Central y Asia Oriental, el principal modo de transmisión es perinatal de madre a hijo. Desafortunadamente, la infección de niños no completamente inmunocompetentes produce un curso crónico de la enfermedad de 90-98%. El HCC relacionado con la hepatitis B es, por lo tanto, la neoplasia más común en muchos de estos países.

Los regímenes terapéuticos aprobados actualmente para el tratamiento de las infecciones por el virus de la hepatitis B (HBV) crónica abordan las etapas de replicación del genoma viral después de una infección ya establecida (Lamivudina, Adefovir, Entecavir, Tenofovir) o actúan como moduladores del sistema inmunitario (interferón alfa). Desafortunadamente, solo 10-25% de los pacientes conservan una respuesta virológica sostenida con tales terapias. Por lo tanto, es de suma importancia desarrollar nuevas terapias que se dirijan a etapas de replicación hasta ahora no afectados (por ejemplo, entrada de virus) que puedan ayudar a eliminar el virus y curar la infección.

A pesar de la disponibilidad de una vacuna profiláctica y de inhibidores de la transcriptasa inversa (RT), el número de personas infectadas con HBV y el número de muertes relacionadas con el HBV en todo el mundo (actualmente aproximadamente 500.000 por año) está en aumento. Aproximadamente dos tercios de los cánceres de hígado primarios son atribuibles a la infección persistente por el HBV (Chan & Sung, 2006).

La inhibición específica de la entrada del virus es un concepto terapéutico atractivo para controlar y finalmente eliminar las infecciones agudas y crónicas por diferentes virus. La inhibición de entrada tiene potencial curativo, como se ha demostrado recientemente en un modelo de ratón para la infección por VHC (Mailly *et al.*, 2014)

El virus humano de la hepatitis B (HBV) es miembro de los hepadnaviridae. Los hepadnavirus son los virus de ADN con envoltura más pequeña que son replicados a través de la transcripción inversa de un intermediario ARNpg. Durante el ensamblaje, la nucleocápside adquiere tres proteínas de la envoltura viral denominadas grande (L), media (M) y pequeña (S). Están codificadas en un marco de lectura abierto y comparten el dominio S que se requiere para el anclaje de membrana. Además del dominio S, M contiene una extensión hidrófila N-terminal de 55 aminoácidos (preS2), mientras que L se extiende adicionalmente por 107, 117 o 118 aminoácidos (dependientes del genotipo) denominados preS1 (Urban *et al.*, 2014). El virus de la hepatitis D (HDV) es un virusoide satélite que utiliza las proteínas de la envoltura del HBV para ingresar a los hepatocitos. Es sabido que el dominio preS1 miristoilado de L desempeña un papel clave en la infectividad de HBV y HDV.

Los inventores de la presente han identificado previamente los lipopéptidos derivados de la proteína L del HBV que bloquean la infección por HBV y HDV de las células PHH y HepaRG (Gripon *et al.*, 2005, Schulze *et al.*, 2010, WO 2009/092611 A1). Son derivados de los 47 aminoácidos de extremo N-terminal del dominio preS1 del genotipo D del HBV (HBVpreS/2-48myr) e incluyen la modificación natural con ácido mirístico.

En los documentos WO 2009/092612 y WO 2012/107579, los inventores describen péptidos derivados de preS de HBV modificados hidrófobos y su uso como vehículos para la administración específica de compuestos al hígado.

Además, los inventores han identificado previamente el receptor responsable de la unión de estos lipopéptidos derivados de la proteína L del HBV, a saber, el polipéptido co-transportador de taurocolato de sodio (NTCP/SLC10A1). (Documentos WO 20014/072526, WO 2014/072524 y WO 2015/014830). Véase también Ni *et al.* (2014) y Yan *et al.* (2012)

Brown *et al.* (1984) describen la determinación de la afinidad de los anticuerpos por el antígeno de superficie del HBV en sueros humanos. Guarracino (2015) describe péptidos cíclicos y síntesis, usos y funciones para los miméticos de péptidos cíclicos. Camerino *et al.* (2008) describen el diseño asistido por ordenador de péptidos cíclicos y peptidomiméticos. Smiya *et al.* (2015) describen sobre la identificación de la actividad fusogénica en la región preS1 de la proteína L del antígeno de superficie del HBV. Kim *et al.* (2008) desvelan un péptido antiviral derivado de la proteína de superficie preS1 del HBV. Kennedy *et al.* (1983) describen la inhibición de un idiotipo de antígeno de superficie humano antihepatitis B común por un péptido sintético cíclico.

La presente invención tiene como objeto la mejora de los procedimientos y medios para la inhibición de NTCP como un receptor de HBV y HDV y el transporte mediado por NTCP de sustratos naturales y xenobióticos.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar medios y procedimientos mejorados para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades hepáticas, tal como enfermedades hepáticas relacionadas con el transporte mediado por NTCP.

La presente invención también tiene como objeto la mejora de los procedimientos y medios para la inhibición, prevención y/o tratamiento de la infección por HBV y otras enfermedades relacionadas con el HBV como están presentes en la técnica anterior y por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar procedimientos y medios mejorados que permitan una inhibición, prevención y/o tratamiento dirigido y efectivo de la infección por HBV y enfermedades relacionadas.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar medios y procedimientos mejorados para la inhibición, prevención y/o tratamiento de la infección por HDV y enfermedades relacionadas con HDV.

Sumario de la invención

La presente invención resuelve los objetos según las reivindicaciones.

De acuerdo con la presente invención este objeto es resuelto mediante la provisión de un péptido cíclico de la fórmula general **Ia**



en el que

P es la secuencia de aminoácidos NPLGFXaaP (SEQ. ID NÚM.: 1), siendo Xaa F o L,

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

en la que **m** es 0 o al menos 1;

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

en el que **n** es 0 o al menos 1;

y en el que **m + n** es 0 a 42;

y portando al menos una modificación hidrófoba en la cadena lateral de aminoácidos de X y/o P, en el que dicho péptido cíclico no está ciclizado dentro de la secuencia de aminoácidos de P de la SEQ. ID NÚM.: 1 y no a través de las cadenas laterales de aminoácidos de P,

en el que la modificación hidrófoba es una acilación o adición de restos hidrófobos, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con la presente invención este objeto es resuelto mediante la provisión de una composición farmacéutica que comprende

(i) al menos un péptido cíclico de la presente invención,

(ii) opcionalmente, un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con la presente invención este objeto es resuelto mediante la provisión del péptido cíclico de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso en medicina.

De acuerdo con la presente invención este objeto es resuelto mediante la provisión del péptido cíclico de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso en el tratamiento para la inhibición de la infección por HBV y/o HDV.

De acuerdo con la presente invención este objeto es resuelto mediante la provisión del péptido cíclico de la presente

invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso en la prevención de una infección primaria por HBV y/o HDV.

5 De acuerdo con la presente invención este objeto es resuelto mediante la provisión del péptido cíclico de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso como inhibidores de la entrada *in vitro* de HBV y/o HDV.

De acuerdo con la presente invención este objeto es resuelto mediante la provisión del péptido cíclico de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección hepática.

10 De acuerdo con la presente invención este objeto es resuelto mediante la provisión del péptido cíclico de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cardiovascular (CVD).

Descripción de las realizaciones preferentes de la invención

15 Antes de describir la presente invención con más detalle a continuación, se debe entender que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente memoria, dado que estos pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica.

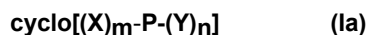
20 Las concentraciones, cantidades y otros datos numéricos pueden ser expresados o presentados en la presente memoria en un formato de intervalo. Se debe entender que dicho formato de intervalo que es usado simplemente por conveniencia y brevedad y, por lo tanto, se debe interpretar de manera flexible para incluir no solo los valores numéricos expresados explícitamente como los límites del intervalo, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o subintervalos abarcados dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y subintervalo se menciona explícitamente. Como ilustración, se debe interpretar que un intervalo numérico de "7 a 49" incluye no solo los valores explícitamente mencionados de 4 a 19, sino que también incluye valores individuales y subintervalos dentro del intervalo indicado. Por lo tanto, en este intervalo numérico son incluidos valores individuales tal como 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16... 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, y subintervalos tal como de 7 a 10, de 10 a 15, de 15 a 25, de 28 a 39, de 35 a 47, de 35 a 49, etc. Este mismo principio se aplica a los intervalos que mencionan solo un valor numérico, tal como "al menos 1 o" al menos un aminoácido". Además, dicha interpretación se debe aplicar independientemente de la amplitud del intervalo o las características que se describen.

Péptidos cíclicos de localización en NTCP

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona péptidos cíclicos.

Dichos péptidos cíclicos son péptidos derivados de preS del virus de la hepatitis B (HBV).

35 Un péptido cíclico de la presente invención tiene la fórmula general la



en el que

P es la secuencia de aminoácidos NPLGFXaaP (SEQ. ID NÚM.: 1), siendo Xaa F o L,

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

40 en el que **m** es 0 o al menos 1;

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

en el que **n** es 0 o al menos 1;

y en el que **m + n** es 0 a 42;

45 y portando al menos una modificación hidrófoba en la cadena lateral de aminoácidos de X y/o P, en el que dicho péptido cíclico no está ciclizado dentro de la secuencia de aminoácidos de P de la SEQ. ID NÚM.: 1 y no a través de cadenas laterales de aminoácidos de P,

en el que la modificación hidrófoba es una acilación o adición de restos hidrófobos, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Preferentemente, $m = 0$ a 8 y/o $n = 0$ a 34, a condición de que $m + n$ sea 0 o al menos 1.

En una realización con

$m + n = 0$, el péptido tiene una longitud de/contiene 7 aminoácidos (a saber P);

$m + n = 1$, el péptido tiene una longitud de/contiene 8 aminoácidos;

5 $m + n = 2$, el péptido tiene una longitud de/contiene 9 aminoácidos; $m + n = 3$, el péptido tiene una longitud de/contiene 10 aminoácidos;

$m + n = 4$, el péptido tiene una longitud de/contiene 11 aminoácidos;

$m + n = 5$, el péptido tiene una longitud de/contiene 12 aminoácidos;

$m + n = 6$, el péptido tiene una longitud de/contiene 13 aminoácidos;

10 $m + n = 7$, el péptido tiene una longitud de/contiene 14 aminoácidos;

$m + n = 8$, el péptido tiene una longitud de/contiene 15 aminoácidos;

$m + n = 15$, el péptido tiene una longitud de/contiene 22 aminoácidos;

$m + n = 40$, el péptido tiene una longitud de/contiene 47 aminoácidos;

$m + n = 42$, el péptido tiene una longitud de/contiene 49 aminoácidos.

15 - **Ciclación**

Los péptidos cíclicos de la presente invención pueden estar ciclados de diferentes maneras, preferentemente

(a) a través de la oxidación de tiol (formación de puentes disulfuro) de dos cisteínas (C) comprendidas en el péptido,

20 tal como a través de un C en o cerca del extremo N-terminal y un C en o cerca del extremo C-terminal (de la secuencia de péptidos antes de la ciclación);

(b) condensación de amida de dos cadenas laterales de aminoácidos (lactama),

tal como a través de una cadena lateral de lisina (K) y una cadena lateral de ácido aspártico (D),

tal como

25 a través de una cadena lateral K en o cerca del extremo N-terminal y una cadena lateral D en o cerca del extremo C-terminal (de la secuencia peptídica antes de la ciclación);

(c) a través de la ciclación cabeza-cola, tal como

a través de una lisina (K) en el extremo N-terminal y el extremo C-terminal (de la secuencia de péptidos antes de la ciclación),

30 a través del extremo N-terminal, es decir, el grupo amino del aminoácido N-terminal y el extremo C-terminal, es decir, el grupo carboxilo del aminoácido de extremo C-terminal (de la secuencia de péptidos antes de la ciclación),

(d) a través de la ciclación de la estructura, y/o

(e) a través de la formación de tioéter.

De acuerdo con la invención, los péptidos cíclicos de la presente invención no comprenden péptidos que están ciclados dentro de la secuencia de aminoácidos de P (es decir, dentro del farmacóforo de 7 aminoácidos, de la SEQ. ID NÚM.: 1 (NPLGFX-aaP con Xaa = F o L)), es decir, a través de cadenas laterales de aminoácidos de P.

35

Sin embargo, la secuencia P puede estar ciclada a través de ciclación cabeza-cola.

Por ejemplo, en una realización, el péptido cíclico comprende P NPLGFXaaP con Xaa = F, es decir, NPLGFFP (SEQ. ID NÚM.: 2), y m y n son cada uno 0. El péptido está ciclado a través de ciclación cabeza-cola a través del extremo N-terminal, es decir, el grupo amino de la asparagina N-terminal (N) y el extremo C-terminal, es decir, grupo carboxilo de la prolina del aminoácido de extremo C-terminal (P).

40

En una realización el péptido cíclico comprende P NPLGFXaaP con Xaa = F, es decir, NPLGFFP (SEQ. ID NÚM.: 2), y X = Cys e Y = Cys, m y n son cada uno 1. El péptido puede estar ciclado a través de oxidación de tiol (formación de

puente disulfuro) de las dos cisteínas (C).

En una realización el péptido cíclico comprende P NPLGFXaaP con Xaa = F, es decir, NPLGFFP (SEQ. ID NÚM.: 2), y X = Cys e Y = Asp-Cys, m = 1 y n = 2. El péptido puede estar ciclado a través de oxidación de tiol (formación de puente disulfuro) de las dos cisteínas (C).

- 5 En una realización el péptido cíclico comprende P NPLGFXaaP con Xaa = F, es decir, NPLGFFP (SEQ. ID NÚM.: 2), y X = Cys e Y = His-Asp-Cys, m = 1 y n = 3. El péptido puede estar ciclado a través de oxidación de tiol (formación de puente disulfuro) de las dos cisteínas (C).

- 10 En una realización el péptido cíclico comprende P NPLGFXaaP con Xaa = F, es decir, NPLGFFP (SEQ. ID NÚM.: 2), y X = Cys-Pro e Y = Asp-Cys, m = 2 y n = 2. El péptido puede estar ciclado a través de oxidación de tiol (formación de puente disulfuro) de las dos cisteínas (C).

En una realización el péptido cíclico comprende P NPLGFXaaP con Xaa = F, es decir, NPLGFFP (SEQ. ID NÚM.: 2), y X = Cys-Pro e Y = His-Asp-Cys, m = 2 y n = 3. El péptido puede estar ciclado a través de oxidación de tiol (formación de puente disulfuro) de las dos cisteínas (C).

- 15 En una realización el péptido cíclico comprende la secuencia de Myrcludex B con P NPLGFXaaP con Xaa = F, es decir, NPLGFFP (SEQ. ID NÚM.: 2), y m = 7 y n = 33. El péptido puede estar ciclado a través de ciclación cabeza-cola a través del extremo N-terminal, es decir, el grupo amino de la glicina N-terminal (G) y el extremo C-terminal, es decir, grupo carboxilo de la glicina del aminoácido de extremo C-terminal (G).

- 20 En una realización el péptido cíclico comprende la secuencia de Myrcludex B con P NPLGFXaaP con Xaa = F, es decir, NPLGFFP (SEQ. ID NÚM.: 2), y dos cisteínas adicionales, de modo que m = 8 y n = 34. El péptido puede estar ciclado a través de oxidación de tiol (formación de puente disulfuro) of las dos cisteínas (C).

En otras realizaciones, los péptidos cíclicos comprenden P NPLGFXaaP con Xaa = L, es decir, NPLGFLP (SEQ. ID NÚM.: 3), respectivamente, así como opcionalmente otros aminoácidos adicionales, como se describió anteriormente.

- Modificación hidrófoba

- 25 De acuerdo con la invención, el péptido cíclico de la presente invención está modificado hidrófobamente, es decir, que porta al menos una *modificación hidrófoba* unida covalentemente.

La posición de la modificación hidrófoba puede variar dentro de la secuencia peptídica. Preferentemente, la modificación hidrófoba está en la cadena lateral de aminoácidos de X y/o Y.

En una realización, la modificación hidrófoba está en la cadena lateral de aminoácidos de P.

- 30 De acuerdo con la invención, la modificación hidrófoba es una acilación o adición de restos hidrófobos, preferentemente una acilación con ácidos grasos C8 a C22,

tal como miristoílo (C14), palmitoílo (C16) o estearoílo (C18),

más preferentemente miristoílo (C14),

o el resto o restos hidrófobos son seleccionados de colesterol, fosfolípidos, glicolípidos, ésteres de glicerol, esteroides, ceramidas.

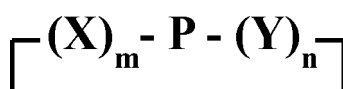
- 35 Los péptidos cíclicos de la invención pueden portar más de una modificación hidrófoba, tal como dos, tres, cuatro o más, que pueden ser iguales o diferentes.

Por ejemplo, un péptido cíclico de la invención porta un grupo miristoílo (C14) y un grupo estearoílo (C18).

Preferentemente, los péptidos cíclicos de la invención portan una o dos modificaciones hidrófobas.

La fórmula general formula la también se puede mostrar como

40



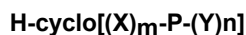
El péptido cíclico con general formula la puede ser obtenido a través de la ciclación cabeza-cola, tal como

- 45 - a través de oxidación de tiol (formación de puente disulfuro) de dos cisteínas (C) comprendidas en el péptido,

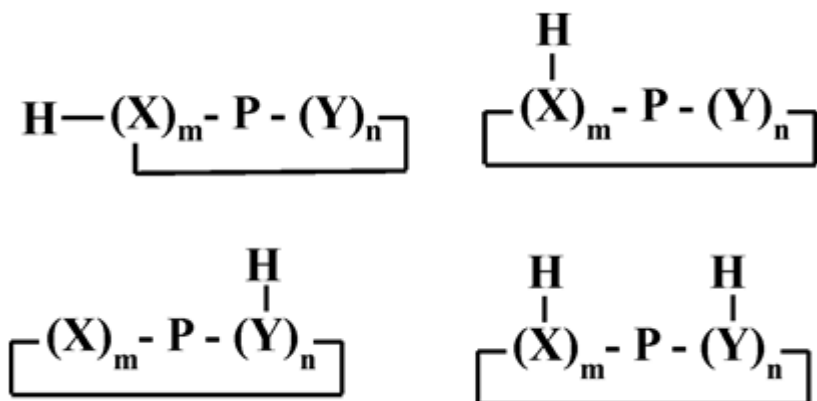
a saber una cisteína en el extremo N-terminal y una cisteína en o cerca del extremo C-terminal (de la secuencia peptídica antes de la ciclación)

- a través de una lisina (K) en el extremo N-terminal o el extremo N-terminal mismo y el extremo C-terminal (de la secuencia peptídica antes de la ciclación).

5 Por ejemplo, un péptido cíclico con fórmula general la puede ser:



tal como



en el que H es la modificación hidrófoba, preferentemente miristoilo (C14).

10 Por ejemplo



- Localización en NTCP

Los péptidos cíclicos de la presente invención son preferentemente adecuados para localización en NTCP (nombre del gen SLC10A1), el polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio.

15 El polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio humano NTCP/SLC10A1 es un receptor específico de HBV preS1 que desempeña un papel clave en la infección por el virus de la hepatitis B (HBV) y/o el virus de la hepatitis D (HDV), según lo identificado recientemente por los inventores (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2014/072526, WO 2014/072524 y WO 2015/014830). La expresión de este receptor o de ciertas contrapartes no humanas permite transformar células que eran previamente incapaces de unirse específicamente al HBV y/o HDV y/o no susceptibles a la infección por HBV y/o HDV en células de unión competente a HBV y/o HDV y/o susceptible a la infección por HBV y/o HDV. Las células que se volvieron susceptibles a la infección por HBV y/o HDV después de la diferenciación (células HepaRG) muestran una susceptibilidad significativamente mayor tras la expresión de NTCP.

25 NTCP es una proteína transmembrana integral, no expresada en HepG2, HuH7, inducida en células HepaRG después del tratamiento con DMSO (Kotani *et al.*, 2012) y modulada por disminución en hepatocitos primarios durante la desdiferenciación (Doring *et al.*, 2012).

30 Como se usa en la presente memoria, "localización en NTCP" o "NTCP localización" se refiere a la unión específica de los péptidos cíclicos de la presente invención al receptor NTCP en células hepáticas/hepatocitos respectivos, preferentemente dentro de un huésped (individuo o paciente) pero también en algunos animales que expresan un NTCP de unión competente aunque no soportan infección (por ejemplo, ratón, rata, perro).

En una realización, el transporte de ácidos biliares mediado por NTCP es disminuido o bloqueado por los péptidos cíclicos de la presente invención (en caso de que NTCP esté saturado con péptidos cíclicos).

35 Sin embargo, la función del receptor HBV/HDV de NTCP, ya bloqueado, a pesar de que NTCP no está saturado con los péptidos cíclicos, es indicar diferentes dosis farmacológicas necesarias para la inhibición del virus o la inhibición del transporte del sustrato

- Dominios accesorios

La presente divulgación también describe un péptido cíclico de la presente invención que además comprende dominios (accesorios).

Tales dominios accesorios aumentan la funcionalidad de los péptidos cíclicos de la invención. Por ejemplo, dichos dominios accesorios proporcionan epitopos que provocan respuestas de anticuerpos con potencial neutralizante adicional para HBV y HDV.

Por ejemplo, la introducción del motivo bien caracterizado de la secuencia de aminoácidos 19-LDPAFG-24.

Tales dominios accesorios pueden ser parte del péptido cíclico o pueden ser acíclicos.

Por ejemplo, el péptido cíclico contiene residuos de aminoácidos 8 a 16 de la secuencia preS y además, por ejemplo, residuos de aminoácidos 20 a 26 o 20 a 48 de la secuencia preS como dominio accesorio.

El dominio accesorio puede estar unido /ligado a una cadena lateral de aminoácidos de X y/o Y, tal como una cadena lateral de lisina.

Preferentemente, el péptido cíclico de la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de

(en el que P, SEQ. ID NÚM.: 1 está subrayado y el dominio accesorio está en cursiva)

- **residuos de aminoácidos 9 a 15** (SEQ. ID NÚM.: 2)

HBVpreS9-15 NPLGFFP

y, por ejemplo, aminoácidos adicionales, tal como, comprendiendo una cisteína de extremo N-terminal y extremo C-terminal (en la secuencia peptídica antes de la ciclación)

X = Cys, Y = Cys, m = 1 y n = 1

Cys-preS9-15-Cys C-NPLGFFP-C (SEQ. ID NÚM.: 4)

tal como un D-Tyr de extremo C-terminal

Cys-HBVpreS9-15-Cys-D-Tyr C-NPLGFFP-C-y (SEQ. ID NÚM.: 5)

- **residuos de aminoácidos 9 a 16**

HBVpreS9-16 NPLGFFPD (SEQ. ID NÚM.: 6)

y, por ejemplo, aminoácidos adicionales,

tal como comprendiendo una cisteína de extremo N-terminal y una de extremo C-terminal (en la secuencia peptídica antes de la ciclación)

X = Cys, Y = Asp-Cys, m = 1 y n = 2

Cys-HBVpreS9-16-Cys C-NPLGFFPD-C (SEQ. ID NÚM.: 7)

tal como D-Tyr de extremo C-terminal

Cys-HBVpreS9-16-Cys-D-Tyr C-NPLGFFPD-C-y (SEQ. ID NÚM.: 8)

- **residuos de aminoácidos 8 a 16**

HBVpreS8-16 PNPLGFFPD (SEQ. ID NÚM.: 9)

y por ejemplo aminoácidos adicionales,

tal como comprendiendo una cisteína de extremo N-terminal y una de extremo C-terminal (en la secuencia peptídica antes de la ciclación)

X = Cys-Pro, Y = Asp-Cys, m = 2 y n = 2

Cys-HBVpreS8-16-Cys C-PNPLGFFPD-C (SEQ. ID NÚM.: 10)

tal como D-Tyr de extremo C-terminal

Cys-HBVpreS8-16-Cys-D-Tyr C-PNPLGFFPD-C-y (SEQ. ID NÚM.: 11)

- residuos de aminoácidos 9 a 17

HBVpreS9-17 NPLGFFPDH (SEQ. ID NÚM.: 12)

y por ejemplo aminoácidos adicionales,

- 5 tal como comprendiendo una cisteína de extremo N-terminal y una de extremo C-terminal (en la secuencia peptídica antes de la ciclación)

X = Cys, Y = Asp-His-Cys, m = 1 y n = 3

Cys-HBVpreS9-17-Cys C-NPLGFFPDH-C (SEQ. ID NÚM.: 13)

tal como D-Tyr de extremo C-terminal

- 10 Cys-HBVpreS9-17-Cys-D-Tyr C-NPLGFFPDH-C-y (SEQ. ID NÚM.: 14)

- residuos de aminoácidos 8 a 17

HBVpreS8-17 PNPLGFFPDH (SEQ. ID NÚM.: 15)

y, por ejemplo, aminoácidos adicionales,

- 15 tal como comprendiendo una cisteína de extremo N-terminal y una de extremo C-terminal (en la secuencia peptídica antes de la ciclación)

X = Cys-Pro, Y = Asp-His-Cys, m = 2 y n = 3

Cys-HBVpreS8-17-Cys C-PNPLGFFPDH-C (SEQ. ID NÚM.: 16)

tal como D-Tyr de extremo C-terminal

Cys-HBVpreS8-17-Cys-D-Tyr C-PNPLGFFPDH-C-y (SEQ. ID NÚM.: 17)

- 20 **- residuos de aminoácidos 2 a 21**

HBVpreS2-21 GTNLSVPPNPLGFFPDHQLDP (SEQ. ID NÚM.: 18)

y, por ejemplo, aminoácidos adicionales,

tal como comprendiendo una cisteína de extremo N-terminal y una de extremo C-terminal (en la secuencia peptídica antes de la ciclación)

- 25 X = CGTNLSVP, Y = DHQLDPC, m = 8 y n = 7

Cys-HBVpreS2-21-Cys C-GTNLSVPPNPLGFFPDHQLDP-C (SEQ. ID NÚM.: 19)

tal como D-Tyr de extremo C-terminal

Cys-HBVpreS2-21-Cys-D-Tyr C-GTNLSVPPNPLGFFPDHQLDP-C-y (SEQ. ID NÚM.: 20)

- residuos de aminoácidos 2 a 48 del genotipo C

- 30 HBVpreS2-48 GTNLSVPPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPKNKDHWP (SEQ. ID NÚM.: 21)

y, por ejemplo, aminoácidos adicionales,

tal como comprendiendo una cisteína de extremo N-terminal y una de extremo C-terminal (en la secuencia peptídica antes de la ciclación)

X = CGTNLSVP, Y = DHQLDPAFGANSNNPDWDFNPKNKDHWP

- 35 m = 8 y n = 34

Cys-C-GTNLSVPPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPKNKDHWP (SEQ. ID NÚM.: 22)

HBVpreS2-48-

Cys

tal como D-Tyr de extremo C-terminal

Cys-HBVpreS2-48-Cys-D-Tyr C-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG-C-y
(SEQ. ID NÚM.: 23)

- Residuos de aminoácidos de Myrcludex B

5 GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG (SEQ. ID NÚM.: 24)

y, por ejemplo, aminoácidos adicionales, tal como comprendiendo una cisteína de extremo N-terminal y una de extremo C-terminal (en la secuencia peptídica antes de la ciclación)

X = CGTNLSVP, Y = DHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVGC,

m = 8 y n = 34

10 Cys-Myrcludex C-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG-C (SEQ. ID NÚM.: 25)

B-Cys

tal como D-Tyr de extremo C-terminal

Cys- Myrcludex B-Cys-D-Tyr C-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG-C-y
(SEQ. ID NÚM.: 26)

15 Los ejemplos de los péptidos cíclicos preferentes de la presente invención son:

cyclo[NPLGFFP] (SEQ. ID NÚM.: 2)

cyclo[NPLGFFPD] (SEQ. ID NÚM.: 6)

cyclo[PNPLGFFPD] (SEQ. ID NÚM.: 9)

cyclo[NPLGFFPDH] (SEQ. ID NÚM.: 12)

cyclo[PNPLGFFPDH] (SEQ. ID NÚM.: 15)

cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDP] (SEQ. ID NÚM.: 18)

cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG] (SEQ. ID NÚM.: 21)

cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG] (SEQ. ID NÚM.: 24)

o

C-NPLGFFP-C , C-NPLGFFPD-C , C-PNPLGFFPD-C ,

20 C-NPLGFFPDH-C , C-PNPLGFFPDH-C

C-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDP-C ,

C-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG-C-y

25 C-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG-C

Preferentemente lo anterior comprende un D-aminoácido de extremo C-terminal, tal como D-tirosina, por ejemplo

30 C-NPLGFFP-C-y , C-NPLGFFPD-C-y , C-PNPLGFFPD-C-y

C-NPLGFFPDH-C-y , C-PNPLGFFPDH-C-y ,

5

C-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDP-C-y ,

C-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG-C-y

C-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENKVG-C-y

- 10 Los ejemplos de péptidos cíclicos preferentes de la presente invención, con una modificación hidrófoba de extremo N-terminal (por ejemplo miristoilación) son:

Myr-cyclo[HBVpreS9-15] (SEQ. ID NÚM.: 2)

myr-cyclo[NPLGFFP]

Myr-cyclo[HBVpreS9-16] (SEQ. ID NÚM.: 6)

myr-cyclo[NPLGFFPD]

Myr-cyclo[HBVpreS8-16] (SEQ. ID NÚM.: 9)

myr-cyclo[PNPLGFFPD]

Myr-cyclo[HBVpreS9-17] (SEQ. ID NÚM.: 12)

myr-cyclo[NPLGFFPDH]

Myr-cyclo[HBVpreS8-17] (SEQ. ID NÚM.: 15)

myr-cyclo[PNPLGFFPDH]

Myr-cyclo-[HBVpreS2-21] (SEQ. ID NÚM.: 18)

myr-cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDP]

Myr-cyclo-[HBVpreS2-48] (SEQ. ID NÚM.: 21)

myr-cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG]

Myr-cyclo-[HBVpreS2-48] = Myrcludex B cíclico (SEQ. ID NÚM.: 24)

myr-cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENKVG]

En otras realizaciones, los péptidos cíclicos comprenden P NPLGXaaP con Xaa = L, es decir, NPLGFLP (SEQ. ID NÚM.: 3).

Los ejemplos respectivos de péptidos cíclicos preferentes de la presente invención son:

cyclo[NPLGFLP]	(SEQ. ID NÚM.: 3)
cyclo[NPLGFLPD]	(SEQ. ID NÚM.: 27)
cyclo[PNPLGFLPD]	(SEQ. ID NÚM.: 28)
cyclo[NPLGFLPDH]	(SEQ. ID NÚM.: 29)
cyclo[PNPLGFLPDH]	(SEQ. ID NÚM.: 30)
cyclo[GTNLSVPNPLGFLPDHQLDP]	(SEQ. ID NÚM.: 31)
cyclo[GTNLSVPNPLGFLPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG]	(SEQ. ID NÚM.: 32)
cyclo[GTNLSVPNPLGFLPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENKVG]	(SEQ. ID NÚM.: 33)

5

En una realización, un péptido cíclico de la presente invención comprende *un resto o restos adicionales*.

Tal resto o restos adicionales pueden ser

- fármacos o sus respectivos profármacos;
- etiquetas,
- 10 - marcadores,
- tal como colorantes fluorescentes, radioisótopos y agentes de contraste;
- virus recombinantes;
- portador o depósito para fármacos, profármacos o marcadores,
- epítopos inmunogénicos;
- 15 - hormonas;
- inhibidores;
- toxinas.

15

Tal resto o restos adicionales están unidos preferentemente de forma covalente, tal como a través de un conector, espaciador y/o grupo de anclaje,

20

por ejemplo, un conector escindible.

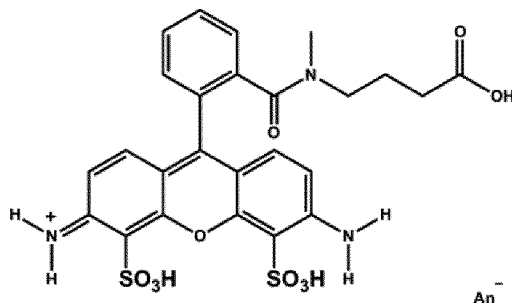
Los radioisótopos preferentes son ¹³¹I, ¹²⁵I, ^{99m}Tc, ¹⁸F, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu.

En una realización, el residuo de aminoácido lisina puede estar unido/acoplado a DOTA [⁶⁸Ga] (es decir, K (DOTA [⁶⁸Ga])).

Los colorantes fluorescentes preferentes son colorantes Alexa, derivados de rodamina y fluoresceína, colorantes Cy.

25

En una realización, el residuo de aminoácido lisina puede estar unido/acoplado al colorante fluorescente Atto 488 (es decir, K (Atto₄₈₈)).



Los agentes de contraste preferentes son complejos de gadolinio (Gd), complejos y partículas de hierro supramagnético (Fe), compuestos que contienen átomos de alto número atómico, es decir, yodo para tomografía computarizada (CT), microburbujas y portadores tales como liposomas que contienen estos agentes de contraste.

En una realización, el péptido cíclico comprende un inhibidor, tal como un inhibidor de la cápside, preferentemente unido covalentemente.

Ha sido demostrado que dichos inhibidores interfieren en la infección por el HBV a través de la desestabilización del genoma del HBV que contiene nucleocápsides y, por lo tanto, interfieren en una etapa posterior a la entrada, por ejemplo, alteran el tráfico intracelular de nucleocápsides y la maduración de nucleocápsides (Wang *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2013; Stray *et al.*, 2006)

El péptido cíclico y el inhibidor de la cápside pueden actuar como un inhibidor de combinación que

(i) se dirige a, e inhibe, NTCP, así como

(ii) interfiere en la replicación del virus a través de la localización al hígado mediante la interacción con NTCP y posteriormente afecta a la nucleocápside con su segundo dominio activo.

La envoltura del HBV encierra tres proteínas denominadas L (grande), M (media) y S (pequeña). Comparten el dominio S de extremo C-terminal con cuatro regiones transmembrana. Las proteínas M y L portan extensiones de extremo N-terminal adicionales de 55 aminoácidos y 107 o 118 aminoácidos (preS2 y preS1), dependientes del genotipo.

Por lo tanto, la expresión péptido "derivado de preS" del HBV de acuerdo con la presente invención se refiere a un péptido con una secuencia de aminoácidos que corresponde a las extensiones de extremo N-terminal de la proteína L del HBV, preS1, preferentemente 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 (WMHBV), chimpancé y gorila, pero también se refiere a variantes de los mismos, como las variantes truncadas de extremo N-terminal y/o extremo C-terminal y las variantes de sustitución de aminoácidos.

Una secuencia de péptidos o aminoácidos (a) se refiere preferentemente a un péptido con una secuencia de aminoácidos que corresponde o se basa en las extensiones de extremo N-terminal de la proteína L del HBV, preS1, preferentemente de los genotipos A a H como así como del virus de la hepatitis B de mono lanudo (WMHBV), orangután, chimpancé y gorila y el virus de la hepatitis B de murciélago recientemente descrito, pero también se refiere a sus variantes, preferentemente variantes truncadas en el extremo C-terminal, variantes de sustitución de aminoácidos.

Como una secuencia indispensable o esencial, los residuos de aminoácidos que son importantes para la unión de los péptidos cíclicos de la presente invención, como se expone en P = SEQ ID NÚM.: 1 (NPLGFXaaP) están presentes en la secuencia de péptidos/aminoácidos de los péptidos cíclicos de la invención.

En particular, los péptidos se basan en las siguientes secuencias (aminoácidos en código de letra única; dominio esencial o farmacóforo subrayado).

Dominio esencial/farmacóforo (SEQ ID NÚM.: 1):

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

preS HBV-A (ID: M57663; SEQ ID NÚM.: 34)

MGGWSSKPRKMGMTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPQANQVGGAFGPGFTPPHGVL
GWSPQAQGILATVPAMPPPASTNRQSGRQPTPISPLRDSHPQA

preS HBV-B (ID: D00329, SEQ ID NÚM.: 35)

MGGWSSKPRKMGMTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFKANSENPDWDLNPHKDNWPDHAKVGVGAFGPGFTPPHGGLL
GWSPQAQGILTSVPAAPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDTHPQA

preS HBV-C (ID: AB048704, SEQ ID NÚM.: 36)

MGGWSSKPRKMGMTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFKANSENPDWDLNPHKDNWPDHAKVGVGAFGPGFTPPHGGLL
GWSPQAQGILTSVPAAPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDTHPQA

preS HBV-*Chimpancé* (ID: AB032432, SEQ ID NÚM.: 37)

MGQNLSTSNPLGFFPEHQLDPAFKANTNNPDWDFNPKKDYWPEANKVGAGAFPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILT
TLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDTHPQA

preS HBV-D (ID: AB048702, SEQ ID NÚM.: 38)

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTNNPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWSPQAQGFQT
LPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRTHPQA

preS HBV-E (ID: X65657, SEQ ID NÚM.: 39)

MGLSWTVPLEWGKNISTTNPLGFFPDHQLDPAFRANTNRPDWDHNPKNKDHTEANKVGVGAFGPGFTPPHGGLLG
WSPQAQGMKLTLPADPPPASTNRQSGRQPTPITPPLRDTHPQA

preS HBV-F (ID: X69798@8, SEQ ID NÚM.: 40)

MGAPLSTTRRGMGQNLSPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWDFNTNKDSWPMANKVGVGGYGPFTPPHGGLL
GWSPQAQGVLTTLPADPPPASTNRRSGRKPTPVSPPLRDTHPQA

preS HBV-G (ID: AF160501, SEQ ID NÚM.: 41)

MGLSWTVPLEWGKNLSASNPLGFLPDHQLDPAFRANTNNPDWDFNPKKDPWPEANKVGVGAYGPFTPPHGGLLG
WSPQSQGTTLTLPADPPPASTNRQSGRQPTPISPLRDSHPQA

HBV Gibbon (ID: AJ131572, SEQ ID NÚM.: 42)

MGQNHSTNPLGFFPDHQLDPLFRANSNNPDWDFNPNKDTWPEATKVGVGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILT
TLPAAPPPASTNRQSGRKATPISPLRDTHPQA

HBV-H (ID: Q8JMY6, SEQ ID NÚM.: 43)

MGAPLSTARRGMGQNLSPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWFNTNKDNWPMANKVGVGGFGPGFTPPHGGLL
GWSPQAQGILTTSPDPPPPASTNRRSGRKPTVSPPLRDTHPQA

HBV Orangután (ID: AF 193864, SEQ ID NÚM.: 44)

MGQNLSPNPLGFFPEHQLDPLFRANTNNPDWDFNPNKDTWPEATKVGVGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGVTT
ILPAVPPASTNRQSGRQPTPISPPPLRDTHPQA

HBV Mono lanudo (ID: NC 001896, SEQ ID NUM.: 45)

MGLNQSTFPLGFFPSHQLDPLFKANAGSADWDKPKDPWQAHD TAVGAFGPGLVPPHGGLLGWSSQAQGLSVTVF
DTPPPPSTNRDKGRKPTPATPPLRDTHPQA

También existe una secuencia de consenso preS HBV (para las posiciones de aminoácidos (-11) a 48)

(SEQ ID NÚM.: 46)

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

Además, las secuencias peptídicas o de aminoácidos son preferentemente secuencias de L-aminoácidos, pero también pueden comprender D-aminoácidos o son secuencias de D-aminoácidos.

Además, las secuencias peptídicas o de aminoácidos también pueden comprender aminoácidos no naturales, que se usar preferentemente para la ciclación.

- Síntesis de los péptidos cíclicos

Los péptidos de esta invención pueden ser preparados mediante una variedad de procedimientos fácilmente conocidos por los expertos en la técnica, en general mediante procedimientos químicos sintéticos.

Los procedimientos químicos sintéticos incluyen más particularmente la síntesis secuencial en fase sólida y en bloque (Erickson and Merrifield, 1976). El procedimiento secuencial en fase sólida se puede realizar usando procedimientos automatizados establecidos, tal como mediante el uso de un sintetizador de péptidos automatizado. En este procedimiento, un aminoácido protegido con α -amino se une a un soporte de resina. El soporte de resina empleado puede ser cualquier resina adecuada empleada convencionalmente en la técnica para la preparación en fase sólida de (poli) péptidos, preferentemente poliestireno que se ha copolimerizado con polioxietileno para proporcionar sitios para la formación de éster con el aminoácido protegido con α -amino introducido inicialmente. Este procedimiento optimizado, aplicado por los inventores, se ha descrito explícitamente (véase, por ejemplo, Gausepohl *et al.*, 1989). Los aminoácidos son introducidos uno por uno (por etapas). Cada ciclo de síntesis correspondiente a la introducción de un aminoácido incluye una etapa de desprotección, etapas de lavado sucesivos, una etapa de acoplamiento con activación del aminoácido y etapas de lavado posteriores. Cada uno de estas etapas es seguido por una filtración. Los agentes reactivos para el acoplamiento son los agentes reactivos clásicos para la síntesis de (poli)péptidos tales como dicitohexilcarbodiimida, hidroxibenzotriazol, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris(dimetilamino)fosfonio 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, etanoditiol o 2-metilindol. El compuesto se purifica después por las técnicas clásicas de purificación, en particular a través de HPLC.

Los péptidos de la presente invención también pueden ser obtenidos mediante el acoplamiento de fragmentos de (poli)péptidos que están protegidos selectivamente, este acoplamiento se efectúa, por ejemplo, en una solución.

Para la síntesis de Myrcludex B, véase también Schieck *et al.*, 2010.

30 Estrategias de ciclación de péptidos

En general, la ciclación de péptidos covalentes puede ser lograda mediante la formación de cualquier enlace químico. Las principales estrategias seguidas son la ciclación por la formación de enlaces disulfuro o enlaces amida. Los aspectos generales de la ciclación del péptido han sido exhaustivamente revisados por White and Yudin (2011).

Para la ciclación de péptidos, primero se sintetiza el péptido lineal (en la mayoría de los casos mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)).

Como se describe en la formación de enlaces amida de White and Yudin (2011): la ciclación cabeza-cola requiere la disponibilidad de un resto de ácido carboxílico con un grupo protector convergente apropiado, es decir, un carbamato unido a un éster alílico (un grupo Alloc). La ciclación se logra en el soporte sólido o en solución usando agentes de activación tales como HBTU. En el caso de péptidos unidos por enlaces disulfuro, la ciclación requiere la disponibilidad de dos grupos tiol con grupos protectores convergentes apropiados tales como grupos protectores de tritilo. La ciclación es lograda por oxidación usando agentes tal como peróxido de hidrógeno o condiciones más suaves disponibles por oxidación al aire.

Composiciones farmacéuticas

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica.

10 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden

- (i) al menos un péptido cíclico de la presente invención,
- (ii) opcionalmente, un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

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

15 Como se describe anteriormente, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende al menos un péptido cíclico de la presente invención y opcionalmente un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable que contiene/comprende el epitopo inmunogénico.

Las composiciones de vacuna de acuerdo con la presente invención son muy adecuadas para los usos y procedimientos descritos en la presente memoria.

20 Un "portador 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 como solución salina tamponada con fosfato. En general, es seleccionado un diluyente o portador sobre la base del modo y la vía de administración, y la práctica farmacéutica estándar.

25 En una realización preferente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención son formuladas para administración oral y, por lo tanto, comprenden portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para administración oral.

Los ejemplos de vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables son también liposomas.

Aplicaciones médicas

30 Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona el péptido cíclico de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso en medicina.

En consecuencia, el péptido cíclico de la presente invención de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es adecuado y, en consecuencia, proporciona el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades.

35 Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona el péptido cíclico de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso en el tratamiento para la inhibición de la infección por HBV y/o HDV.

Como se analizó anteriormente, la presente invención proporciona el péptido cíclico de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso en la prevención de una infección primaria por HBV y/o HDV.

40 Como se analizó anteriormente, la presente invención proporciona el péptido cíclico de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso como inhibidores de la entrada *in vitro* de HBV y/o HDV.

Preferentemente, se inhibe o evita la infección por HBV de cualquier genotipo de HBV.

Preferentemente, la inhibición de la entrada es a través del localización del polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP/SLC10A1), "localización en NTCP".

45 Como se analizó anteriormente, en una realización, el péptido cíclico y el inhibidor de la cápside puede actuar como un inhibidor combinado que

- (i) se dirige a, e inhibe, NTCP, así como
- (ii) interfiere en la replicación del virus a través del localización en el hígado mediante la interacción con NTCP y posteriormente afectar la nucleocápside con su segundo dominio activo.

Como se analizó anteriormente, la presente invención proporciona el péptido cíclico de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección hepática.

- 5 En una realización, la enfermedad o afección hepática es seleccionado de hepatitis, cirrosis, hemocromatosis, preferentemente hepatitis causado por hepatitis A, B, C, D, E, F, G y H virus o hepatitis concomitante causada por virus.

En una realización, la enfermedad o trastorno hepático es una enfermedad que involucra una etapa del hígado de un virus o un patógeno no viral, tal como una enfermedad tropical, malaria, esquistosomiasis, leishmaniasis, Morbus Wilson.

- 10 En una realización, la enfermedad o trastorno hepático es un tumor hepático, preferentemente carcinoma hepatocelular (HCC).

En una realización, la enfermedad o trastorno hepático es una complicación postrasplante después del trasplante de hígado relacionado con la acumulación de sal biliar dentro de las vía biliar/una disfunción hepática relacionada con el postrasplante.

- 15 En una realización, la enfermedad o afección hepática se relaciona con el transporte mediado por polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP) de compuestos en hepatocitos, o necesita una administración de un compuesto, tal como un fármaco o marcador, al sitio o lugar de la enfermedad o afección.

Preferentemente, dicha enfermedad o afección hepática es una enfermedad metabólica relacionada con el hígado seleccionada de colestasis intrahepática,

- 20 envenenamiento del hígado (por toxinas hepáticas)/hepatotoxicidad,

enfermedad hepática colestática inducida por fármacos,

hiperlipidemia

colestasis posthepática,

síndrome metabólico,

- 25 enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA),

enfermedades de almacenamiento de glucógeno,

Preferentemente, los compuestos que son transportados a los hepatocitos a través de NTCP son preferentemente ácidos biliares, esteroides, hormonas tiroideas conjugadas y no conjugadas, toxinas hepáticas, compuestos que están unidos de manera covalente a taurocolato, bromosulfotaleína, fármacos.

- 30 Los inventores han identificado y descrito el polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP) como diana y para uso en la prevención y/o tratamiento de ciertas enfermedades o afecciones hepáticas, tal como enfermedades o afecciones hepáticas relacionadas con el transporte mediado por NTCP de compuestos (tal como ácidos biliares, etc.) en hepatocitos, preferentemente enfermedades metabólicas relacionadas con el hígado (por ejemplo, colestasis intrahepática, envenenamiento del hígado (por toxinas hepáticas)/hepatotoxicidad, enfermedad hepática colestática
35 inducida por fármacos, hiperlipidemia, etc.) y enfermedades cardiovasculares. Véanse los documentos WO 2014/072524 y PCT/EP2014/066262, que se adjuntan en su totalidad en la presente memoria.

Una "enfermedad metabólica relacionada con el hígado" cuando se usa en la presente memoria se refiere a trastornos metabólicos que incluyen obesidad visceral, diabetes mellitus y dislipidemia que están influenciados por el metabolismo hepático de lípidos y ácidos biliares.

- 40 En general, la "colestasis" es una afección en la que los constituyentes biliares no pueden ser secretados por los hepatocitos hacia el árbol biliar o donde la bilis no puede fluir desde el hígado al duodeno, lo que produce la acumulación de ácido biliar de hepatocitos en los hepatocitos.

La "colestasis" o "colestasis intrahepática" cuando se usa en la presente memoria se refiere a los efectos tóxicos intrahepáticos de la acumulación de hepatocitos en el ácido biliar relacionados con una expresión y/o actividad
45 insuficientes de las bombas de sal biliar (como BSEP o MRP) en la membrana canalicular.

"Colestasis poshepática" cuando se usa en la presente memoria se refiere a una enfermedad hepática colestática debido a la obstrucción de los conductos biliares grandes.

"Envenenamiento del hígado" o "hepatotoxicidad" o "enfermedad hepática tóxica" cuando se usa en la presente memoria se refieren a efectos tóxicos de fármacos independientes de la acumulación de ácidos biliares. Estos

fármacos penetran en los hepatocitos a través del transporte mediado por NTCP y causan varios efectos tóxicos directos, mediante el daño de las mitocondrias o mediante la activación de enzimas en el sistema del citocromo P-450 que provocan estrés oxidativo.

- 5 "Enfermedad hepática colestática inducida por fármacos" cuando se usa en la presente memoria se refiere a la inhibición de la exportación de ácidos biliares de los hepatocitos debido a los efectos del fármaco en la bomba de exportación de sal biliar (BSEP).

La colestasis inducida por fármacos puede ser causada por varios fármacos que inhiben la BSEP, tal como rifampicina, ciclosporina A, rifamicina SV, bosentán, troglitazona, estolato de eritromicina y glibenclamida (Fattinger *et al.*, 2001; Funk *et al.*, 2001; Funk *et al.*, 2001; Stieger *et al.*, 2000; Dawson *et al.*, 2012; Morgan *et al.*, 2010; Ogimura *et al.*, 10 2011). BSEP es miembro de la familia (ABC) de casete de unión a ADN de transportadores (BSEP también se identifica como ABCB11) y está involucrado en el proceso de exportación de ácidos biliares de los hepatocitos, de este modo se reduce su toxicidad para estas células. Los fármacos mencionados anteriormente causan los efectos tóxicos del exceso de acumulación de ácido biliar porque se desactiva la excreción de ácido biliar a través de BSEP. La inhibición de la captación de ácidos biliares mediada por NTCP a través del compuesto a base de lipopéptidos (tal como MyrB) y NTCP contrarresta la inhibición de BSEP, y por lo tanto evita la hepatotoxicidad o es adecuada para el tratamiento y/o diagnóstico.

La "hiperlipidemia" (o hiperlipoproteinemia o hiperlipidemia) implica niveles anormalmente elevados de cualquiera o todos los lípidos y/o lipoproteínas en la sangre. Las hiperlipidemias están divididas en subtipos primario y secundario. La hiperlipidemia primaria generalmente se debe a causas genéticas (tal como una mutación en una proteína receptora), mientras que la hiperlipidemia secundaria surge debido a otras causas subyacentes tal como diabetes. Las 20 anomalías de lípidos y lipoproteínas son comunes en la población general y se consideran un factor de riesgo modificable para la enfermedad cardiovascular debido a su influencia en la aterosclerosis.

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

- 25 "Hiperlipidemia" cuando se usa en la presente memoria preferentemente se refiere a hipercolesterolemia que incluye colesterol LDL elevado, colesterol HDL reducido, triglicéridos elevados, arterias obstruidas que llevan a hipertensión arterial, enfermedad cardiovascular (CVD), ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares.

El "síndrome metabólico" se refiere a un trastorno de la utilización y almacenamiento de energía, diagnosticado por una co-ocurrencia de tres de las siguientes cinco afecciones médicas: obesidad abdominal (central), presión arterial elevada, glucosa plasmática en ayunas elevada, niveles altos de triglicéridos séricos altos y bajos de colesterol de alta 30 densidad (HDL). El síndrome metabólico aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, particularmente insuficiencia cardíaca y diabetes. El síndrome metabólico también se conoce como síndrome metabólico X, síndrome cardiometabólico, síndrome X, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome de Reaven, y CHAOS.

- 35 La "enfermedad del hígado graso no alcohólico" (NAFLD) se refiere a una causa de un hígado graso, que ocurre cuando se deposita grasa (esteatosis) en el hígado, no debido al consumo excesivo de alcohol. Está relacionado con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es la forma más extrema de NAFLD, y se considera una de las principales causas de cirrosis hepática de causa desconocida.

40 Preferentemente, el transporte mediado por NTCP está disminuido o bloqueado por los péptidos cíclicos de la presente invención.

Como se analizó anteriormente, en una realización, el péptido cíclico y el inhibidor de la cápside pueden actuar como un inhibidor de combinación que

(i) se dirige a, e inhibe, NTCP, así como

- 45 (ii) interfiere en la replicación del virus mediante la localización al hígado por la interacción con NTCP y posteriormente afecta a la nucleocápside con su segundo dominio activo.

Como se analizó anteriormente, la presente invención proporciona el péptido cíclico de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para uso en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cardiovascular (CVD).

- 50 Preferentemente, la enfermedad cardiovascular comprende el control o la modificación del nivel de colesterol o la absorción de colesterol, en el que el nivel o la absorción de colesterol se controlan o modifican preferentemente mediante la disminución o bloqueo del transporte de sal biliar mediada por NCTP (por el péptido cíclico).

El nivel o la absorción de colesterol se controlan o modifica mediante la disminución o bloqueo del transporte de sal biliar mediada por NCTP por el péptido cíclico de la presente invención.

Dichos usos comprenden el control o modificación del nivel de colesterol o la absorción de colesterol, en el que el nivel o la absorción de colesterol se controlan o modifican mediante la disminución o bloqueo del transporte de sal biliar mediada por NCTP por el péptido cíclico de la presente invención.

Las enfermedades cardiovasculares (CVD) son la principal causa de morbilidad y muerte en el mundo occidental. Los altos niveles de colesterol se han asociado con la CVD como uno de los factores de riesgo. De particular importancia clínica es la deposición anormal de colesterol y lipoproteínas ricas en colesterol en las arterias coronarias. Tal deposición, que finalmente lleva a la aterosclerosis, es el principal factor contribuyente en las enfermedades de las arterias coronarias. En este caso, el manejo de la CVD es crítico de acuerdo con las terapias hipolipemiantes. Existen diferentes clases de fármacos disponibles para este propósito, tales como estatinas, inhibidores de la absorción de colesterol, resinas de ácidos biliares, fibratos y ácido nicotínico que actúan mediante la reducción de los niveles de colesterol por distintas vías (Schmitz and Langmann, 2006). Estos fármacos tienen varios efectos secundarios y dependen de los niveles relativos de las enzimas metabolizadoras y los transportadores que actúan sobre los fármacos cardiovasculares.

El control principal del metabolismo del colesterol es causado por el ácido biliar como un regulador importante de la homeostasis del colesterol. Los niveles de ácido biliar y colesterol están unidos por la regulación del metabolismo y absorción del colesterol. La síntesis de los ácidos biliares es la vía principal del catabolismo del colesterol en los mamíferos, porque los productos finales de la utilización del colesterol son los ácidos biliares. La vía principal para la síntesis de los ácidos biliares se inicia a través de la hidroxilación del colesterol en la posición 7 a través de la acción del colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1). Eso significa que la síntesis de ácidos biliares es uno de los mecanismos predominantes para la excreción del exceso de colesterol. En condiciones fisiológicas, esta regulación es insuficiente para compensar la ingesta excesiva de colesterol. Sin embargo, si se bloquea la absorción de ácido biliar en los hepatocitos, la excreción de colesterol en forma de ácidos biliares será suficiente para compensar la ingesta excesiva de colesterol en la dieta. El bloqueo de la absorción de ácidos biliares a través del compuesto a base de lipopéptidos de acuerdo con la invención y NTCP lleva a una deficiencia intracelular de ácido biliar que se compensa con un aumento del metabolismo y absorción del colesterol.

En consecuencia, de acuerdo con la invención, los péptidos cíclicos de la presente invención son adecuados para las terapias hipolipemiantes para evitar la CVD.

Vía de administración

Preferentemente, la vía de administración de péptidos cíclicos o composiciones farmacéuticas de la presente invención es seleccionada de oral, subcutánea, intravenosa, nasal, intramuscular, transdérmica, inhalatoria, por supositorio.

Una vía preferente de administración o aplicación es por vía oral.

Una realización preferente para administración o aplicación nasal es una pulverización nasal.

Cantidad terapéuticamente efectiva

Los péptidos cíclicos o las composiciones farmacéuticas de la invención son proporcionados de manera que comprendan una cantidad terapéuticamente efectiva de dichos péptidos cíclicos o dichas composiciones farmacéuticas.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un péptido cíclico o una composición farmacéutica de esta invención se refiere a la cantidad que es suficiente para inhibir la función del receptor NTCP. Además, dicha "cantidad terapéuticamente efectiva" depende de la aplicación respectiva y del resultado deseado de inhibición, tratamiento o vacunación.

Son requeridas diferentes cantidades terapéuticamente efectivas para

(i) uso antiviral o inhibición de entrada (tal como 0,01 a 0,5 mg por paciente, preferentemente 0,1 a 1 mg/paciente) en comparación con

(ii) usos que requieren una saturación de NTCP, tal como la inhibición del transporte mediado por NTCP de, por ejemplo, ácidos biliares, fármacos, etc. (tal como 1 mg por paciente o 1-2 mg/paciente).

En una realización, dicha "cantidad terapéuticamente efectiva" de un péptido cíclico o una composición farmacéutica de esta invención se refiere a la cantidad que es suficiente para inhibir una infección por HBV y/o VHD; prevenir una infección primaria por HBV y/o HDV; tratar la hepatitis B y/o D y/o vacunar y/o inhibir la entrada de HBV y/o HDV in vivo.

Una cantidad terapéuticamente efectiva preferente está en el intervalo de 10 μ g a 1 mg por kg de peso corporal, preferentemente de 10 μ g a 100 μ g.

Preferentemente, la cantidad terapéuticamente efectiva está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 50 mg por paciente y por día, preferentemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20

mg por paciente por día o se aplica a un paciente en una dosis que oscila de 100 nmol por kg a 2 µmol por kg por día/o se aplica a un paciente en una dosis que oscila de 10 pmol por kg a 20 µmol por kg de peso corporal.

En el caso de un valor IC_{50} del péptido cíclico usado de aproximadamente 10 nM, una cantidad terapéuticamente efectiva preferente es aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal o en el intervalo de 1 a 5 mg por paciente. La cantidad terapéuticamente efectiva preferente en el intervalo de 1 a 5 mg por paciente se puede administrar una vez al día o en otras realizaciones solo una vez cada 2-3 días.

El experto en la técnica podrá determinar cantidades terapéuticamente efectivas adecuadas.

Los siguientes ejemplos y dibujos ilustran la presente invención sin limitarla, sin embargo, a estos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 *Myrcludex B y derivados*

Figura 2 *Un derivado cíclico con puente covalente de Myrcludex B muestra potencial inhibidor*

A, La secuencia y estructura del derivado cíclico con puente covalente de Myrcludex B (Myr-2-48 Cyc).

B, La actividad inhibidora de Myr-2-48 Cyc es comparable con otros derivados de Myrcludex B, tal como un derivado de Myrcludex B lineal con grupo miristoilo dentro de la secuencia peptídica (2-Myr-48) y un péptido pres lineal 2-21 con un grupo miristoilo C-terminal (2-21-Myr).

Figura 3 *Derivados de Myrcludex B cíclicos adicionales*

Figura 4 *Derivados de Myrcludex B cíclicos adicionales*

A, Descripción general de péptidos ciclados cisteína sintetizados y péptidos de control

B, Configuración experimental para la prueba de péptidos:

Fueron sembradas células HepG2 NTCP en placas de 24 pocillos. Cuando las células alcanzaron 60-70% de confluencia, fueron sometidas a infección por HBV o ensayo de absorción de TC. El sobrenadante celular se recogió del día 5 al 7 para la medición de HBeAg y las células se fijaron con PFA 4% en el día 7 para la inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-HBc.

Figura 5 *Imágenes PET coronarias 40-60 minutos después de la inyección de péptidos marcados con ^{68}Ga .*

A, myr-CNPLGFFPDCK(DOTA[^{68}Ga])

B, Hígado bloqueado con Myrcludex B frío 1 µg/g de peso corporal 30 minutos antes de la inyección con myr-CNPLGFFPDCK (DOTA [^{68}Ga])

C, Myr-K(DOTA[^{68}Ga])HBVpres3-48y (péptido WT)

D, Myr-K(DOTA[^{68}Ga])HBVpres3-48y Ala11-15 (Péptido control incompetente para la unión) Véase también Slijepcevic *et al.*, 2015.

Figura 6 *Comparación de la captación de ^3H -taurocolato en células HepG3 NTCP de diferentes péptidos cíclicos con Myrcludex B*

Figura 7 *Captación de ^3H -taurocolato en células HepG3 NTCP: Valores de IC_{50} y curvas de diferentes péptidos cíclicos con Myrcludex B*

Figura 8 *Ensayo de inhibición de la infección por HBV sobre las células HepG2.*

con Myrcludex B (grado GMP), Myrcludex B-y (fabricación propia) y (+H) péptido cíclico.

A, Curvas y valores de IC_{50} .

B, Valores absolutos de medición de HBeAg de sobrenadantes diluidos 1:2

Ejemplos**Ejemplo 1 Materiales y Procedimientos*****Abreviaturas:***

	COMU	(1-Ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxidimetilamino-morfolino-carbenio-hexafluorofosfato)
5	DCM	Diclorometano
	DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
	DMF	Dimetilformamida
	DOTA	ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
	Fmoc	Cloruro de Fluorenilmetiloxycarbonilo
10	Ga	Galio
	HATU	3-óxido hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio
	HBeAg	Antígeno temprano del virus de Hepatitis B
	HBcAg	Antígeno del núcleo de Hepatitis B
	HBTU	hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
15	HBV	Virus de la Hepatitis B
	HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
	LC/MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
	NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
	NMP	<i>N</i> -Metil-2-pirrolidona
20	NTCP	Polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio
	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
	PET	Tomografía de emisión de positrones
	PFA	Paraformaldehído
	TC	Taurocolato
25	TFA	Ácido trifluoroacético
	TIS	Triisopropilsilano

1. Síntesis de péptido

1.1 Péptido de puente disulfuro

Síntesis de péptidos en fase sólida

5 Los péptidos fueron sintetizados en fase sólida (resina Tentagel R RAM, capacidad 0,22 mmol/g, Rapp Polymere, Tübingen, Alemania) usando química Fmoc/tBu en sintetizador de péptidos (Applied Biosystems 443A, Foster City, CA, USA). Antes de comenzar la síntesis de péptidos, la resina (0,05 mmol) se hinchó previamente en DCM. Los aminoácidos protegidos con Fmoc se usaron en un exceso de 10 veces (0,5 mmol) y se activaron con HBTU/DIPEA en NMP.

Véase también Schieck *et al.*, 2010.

10 *Miristoilación*

El péptido sobre el soporte sólido se hinchó en DCM y fue lavado con NMP. El ácido mirístico (4 eq.) y HATU o COMU (4 eq.) fueron disueltos en NMP y fueron añadidos 10 eq. de DIPEA. La mezcla fue añadida a la resina e incubada durante 30 minutos. Posteriormente, la resina fue lavada tres veces con NMP, tres veces con DCM y fue secada.

Desprotección y escisión de la resina

15 El péptido fue escindido y desprotegido con TFA/TIS/H₂O (95: 2,5:2,5). El péptido desprotegido fue precipitado con éter dietílico, sedimentado por centrifugación (3000 rpm, 5 min) y lavado dos veces con éter dietílico nuevo. El péptido fue secado.

MyrB:

Myr- GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPANKVG-amida [SEQ. ID NÚM.: 24]

20 *Formación de puente disulfuro*

Fueron disueltos 5 mg de péptido bruto en 5 ml de ácido acético 80%. Se dejó caer lentamente 1 mg de yodo en ácido acético glacial en la solución peptídica. Fueron añadidos 10 µl de solución saturada de ácido ascórbico. El disolvente fue evaporado y el péptido fue disuelto nuevamente en acetonitrilo: H₂O 1:1 y purificado por HPLC preparativa. El éxito de la reacción fue confirmado por LC/MS.

25 *Acoplamiento de tintel/compuestos fluorescentes*

Los péptidos fueron disueltos en DMF y reaccionados con compuestos activados con éster de NHS (2 eq.) y DIPEA (10 eq.). La reacción fue controlada por HPLC.

1.2 Aminoprolina-Péptido

30 Fueron cargados 200 mg (0,32 mmol) de resina de cloruro de 2-clorotritilo con 41 mg (0,1 mmol) de Fmoc-Glu(OAll)-OH y 52 mg (68 µL; 0,4 mmol) de DIPEA en 2 ml de diclorometano. Después de recubrimiento con metanol, la resina fue sometida a síntesis de péptidos automatizada (ABI 433A). 109 mg (0,25 mmol) de Fmoc-L-Pro (4-NH-Alloc)-OH (2S, 4S) son acoplados en la posición de aminoácidos deseada mediante la activación de COMU. La ciclación en fase sólida es lograda mediante 110 mg (86 µl; 0,4 mmol) de DPPA y 77 mg (102 µL; 0,6 mmol) en 2 ml de NMP después del ensamblaje lineal, así como la desprotección catalítica de alilo con 5 mg de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 30 mg de complejo de borano dimetilamina. El péptido cíclico fue escindido y desprotegido por 95:2,5:2,5 de TFA/agua/TIS y purificado por HPLC; ocasionalmente, una porción del péptido bruto fue modificada con DOTA o ésteres activos de colorante fluorescente antes de la purificación.

2. Marcación con ⁶⁸Ga e imágenes PET

40 Fue añadido aproximadamente 1 ml de eluato [⁶⁸Ga] Ga³⁺ (aproximadamente 600-800 MBq) a una mezcla de 20 µL de una solución 1 mM del compuesto xy en DMSO y 10 µL de solución saturada de ácido ascórbico en agua. El pH de la mezcla resultante se ajustó a 3,5-4,0 mediante la adición cuidadosa de una solución de acetato de sodio 2,5 M en agua. La complejación se obtuvo mediante el calentamiento por encima de 95 °C durante 5-10 minutos bajo agitación constante. El producto se aisló por extracción en fase sólida con etanol seguido de evaporación. El residuo se tomó en una solución de albúmina sérica bovina 1% y se usó una cantidad apropiada (aproximadamente 20-50 MBq) para el experimento individual en un volumen que no excede 100 µl. Los ratones se anestesiaron con sevofluranol 1% (Abbott, Wiesbaden, Germany) y las imágenes se registraron usando un escáner tomográfico de emisión de positrones (PET) de animales pequeños Inveon (Siemens, Knoxville, TN) hasta 60 minutos después de la inyección.

3. Ensayo de captación de ^3H -taurocolato

- 5 Las células HepG2 NTCP sembradas en un formato de 24 pocillos fueron preincubadas con el péptido indicado durante 30 minutos a 37 °C en medio de cultivo. Fueron añadidos 150 μM de taurocolato (que contiene 450 cpm/fmol de ^3H -taurocolato) a cada pocillo y las células fueron incubadas durante 15 minutos adicionales a 37 °C. La captación fue detenida mediante la eliminación del medio de cultivo celular y la adición de PBS helado. Las células fueron lavadas tres veces con PBS frío y se lisaron (NaOH 0,2 M, SDSI 0,05%). Los lisados celulares fueron mezclados con solución de centelleo líquido Ultima Gold (Perkin Elmer, Rodgau, Germany) y se midió la radiactividad en un contador de centelleo líquido (Packard Instruments, Frankfurt, Germany).

4. Ensayo de inhibición de la infección por HBV

- 10 Las células HepG2 NTCP sembradas en un formato de 24 pocillos fueron preincubadas con el péptido indicado a las concentraciones indicadas durante 30 minutos a 37 °C en medio de cultivo. Posteriormente, las células fueron infectadas con HBV (GE $1,8 \times 10^8$) durante la noche en medio de cultivo celular que contiene PEG 4% durante 16 h a 37 °C en presencia de los péptidos seguido de una etapa de lavado con PBS. El medio fue modificado cada dos días y fue recogido el sobrenadante del día 5 al 7 después de la infección para la medición de HBeAg.
- 15 Las características desveladas en la descripción anterior, en las reivindicaciones y/o en los dibujos adjuntos, por separado y en cualquier combinación de las mismas, pueden ser material para realizar la invención en sus diversas formas.

Referencias

- 20 Brown SE, Howard CR, Zuckerman AJ, Steward MW. Determination of the affinity of antibodies to hepatitis B surface antigen in human sera. *J Immunol Methods*. 1984;72(1):41-8.
- Camerino MA, Chalmers DK, Thompson PE. Computer-assisted design of cyclic peptides and peptidomimetics. *50 Peptides* 26(5): 46-51 (2008).
- Chan, HL. & Sung, JJ. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 26, 153-161 (2006).
- 25 Cho MH, Song JS, Kim HJ, Park SG, Jung G. Structure-based design and biochemical evaluation of sulfanilamide derivatives as hepatitis B virus capsid assembly inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2013;28:916-925.
- Dawson S, *et al.* (2012) In vitro inhibition of the bile salt export pump correlates with risk of cholestatic drug-induced liver injury in humans. *Drug Metab Dispos* 40: 130-138.
- Doring B, Lutteke T, Geyer J, Petzinger E. The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr Top Membr* 2012;70:105-168.
- 30 Fattinger K, Funk C, Pantze M, *et al.* The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther*. 2001; 69:223-31.
- Funk C, Pantze M, Jehle L, *et al.* Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt export pump (Bsep) by troglitazone and troglitazone sulfate. *35 Toxicology*. 2001; 167:83-98.
- Funk C, Ponelle C, Scheuermann G, *et al.* Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: in vivo and in vitro interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in the rat. *Mol Pharmacol*. 2001; 59:627-35.
- Gausepohl, H. *et al.* *Int. J. Prot. Pept. Res.* 34, 287-294 (1989).
- 40 Gripon P, Canine I, Urban S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* 2005;79:1613-1622.
- Guarracino DA. Wheel of fortune - cyclic peptides hit the mimetic jackpot: current syntheses, uses and roles of cyclic peptide mimetics. *Curr. Chem. Biol.*, 2015, 9: 36-52.
- 45 Kennedy RC, Dreesman GR, Sparrow JT, Culwell AR, Sanchez Y, Ionescu-Matiu I, Hollinger FB, Melnick JL. Inhibition of a common human anti-hepatitis B surface antigen idiotype by a cyclic synthetic peptide. *J Virol*. 1983;46(2):653-5.
- Kim DH, Ni Y, Lee SH, Urban S, Han KH. An anti-viral peptide derived from the preS1 surface protein of hepatitis B virus. *BMB Rep*. 2008;41(9):640-4.
- Kotani N, Maeda K, Debori Y, Camus S, Li R, Chesne C, Sugiyama Y. Expression and Transport Function of

Drug Uptake Transporters in Differentiated HepaRG Cells. *Mol Pharm* 2012;9(12):3434-41.

Lempp FA, Urban S. Inhibitors of hepatitis B virus attachment and entry. *Intervirol* 2014;57:151-157.

Levengood MR, van der Donk WA. Use of lantibiotic synthetases for the preparation of bioactive constrained peptides. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18(10):3025-8.

5 Maily L, Xiao F, Lupberger J, Wilson GK, Aubert P, Duong FH, Calabrese D, Leboeuf C, Fofana I, Thumann C, Bandiera S, Lütgehetmann M, Volz T, Davis C, Harris HJ, Mee CJ, Girardi E, Chane-Woon-Ming B, Ericsson M, Fletcher N, Bartenschlager R, Pessaux P, Vercauteren K, Meuleman P, Villa P, Kaderali L, Pfeffer S, Heim MH, Neunlist M, Zeisel MB, Dandri M, McKeating JA, Robinet E, Baumert TF. Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat Biotechnol*. 2015;33(5):549-54. doi: 10. 1 038/nbt.3179. Epub 2015 Mar 23.

10 Meier A, Mehrle S, Weiss TS, Mier W, Urban S. The myristoylated preS1-domain of the Hepatitis B Virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology* 2012; 58:31-42.

15 Mitchell AR, Erickson BW, Ryabtsev MN, Hodges RS, and Merrifield RB, Tert-butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxyme50 thyl)-phenylacetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis. *J Am Chem Soc*. 1976;98 (23):7357-62.

Morgan RE, *et al.* (2010) Interference with bile salt export pump function is a susceptibility factor for human liver injury in drug development. *Toxicol Sci* 118: 485-500.

Müller T, Mehrle S, Schieck A, Haberkorn U, Urban S, Mier W. Liver imaging with a novel hepatitis B surface protein derived SPECT-tracer. *Mol Pharm*. 2013;10(6):2230-6.

20 Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Falth M, Stindt J, *et al.* Hepatitis B and D Viruses Exploit Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide for Species-Specific Entry into Hepatocytes. *Gastroenterology* 2014;146:1070-1083.

Ogimura E, *et al.* (2011) Bile salt export pump inhibitors are associated with bile acid-dependent drug-induced toxicity in sandwich-cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 416: 313-317.

25 Schieck A, Müller T, Schulze A, Haberkorn U, Urban S and Mier W. Solid-Phase Synthesis of the Lipopeptide MyrHBVpreS/2-78, a Hepatitis B Virus Entry Inhibitor. *Molecules* 2010, 15(7), 4773-4783.

Schieck A, Schulze A, Gahler C, Muller T, Haberkorn U, Alexandrov A, Urban S, Mier W. Hepatitis B virus hepatotropism is mediated by specific receptor recognition in the liver and not restricted to susceptible hosts. *Hepatology* 2013; 58(1): 43-53. [Epub ahead of print: 2013. Jan 4.]

30 Schulze A, Schieck A, Ni Y, Mier W, Urban S. Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction. *J Virol* 2010;84:1989-2000.

Shepard, C.W., Simard, E.P., Finelli, L., Fiore, A.E. & Bell, B.P. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev* 28, 112-125 (2006).

35 Slijepcevic, D., Kaufman, C., Wichers, C.G.K., Gilgioni, E.H., Lempp, F.A., Duijst, S., de Waart, D.R., Oude Elferink, R.P.J., Mier, W., Stieger, B., Beuers, U., Urban, S., van de Graaf, S.F.J., 2015. Impaired uptake of conjugated bile acids and hepatitis b virus pres1-binding in na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide knockout mice. *Hepatology* 62, 207-219.

40 Somiya M, Sasaki Y, Matsuzaki T, Liu Q, Iijima M, Yoshimoto N, Niimi T, Maturana AD, Kuroda S. Intracellular trafficking of bio-nanocapsule-liposome complex: Identification of fusogenic activity in the pre-S1 region of hepatitis B virus surface antigen L protein. *J Control Release*. 2015;212:10-8.

Stieger B, Fattinger K, Madon J, *et al.* Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology*. 2000; 118:422- 30.

Stray SJ, Zlotnick A. BAY 41-4109 has multiple effects on Hepatitis B virus capsid assembly. *J Mol Recognit* 2006;19:542-548.

45 Urban S, *Future Virol*. 2008, 3(3), 253-264.

Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to Inhibit Entry of HBV and HDV into Hepatocytes. *Gastroenterology* 2014;147(1):48-64.

Wang YJ, Lu D, Xu YB, Xing WQ, Tong XK, Wang GF, *et al.* A Novel Pyridazinone Derivative Inhibits Hepatitis B Virus Replication by Inducing Genome-Free Capsid Formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*

2015;59:7061-7072.

White CJ and Yudin AK. Contemporary strategies for peptide macrocyclization, *Nature Chemistry* 2011; 3, 509-524.

5 Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *elife*. 2012;1:e00049.

Zoulim, F. Antiviral therapy of chronic hepatitis B. *Antiviral Res* 71, 206-215 (2006).

Listado de secuencias

<110> Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

<120> Péptidos cíclicos de localización en NTCP y sus usos como inhibidores de entrada

5 <130> U30632WO

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio esencial o farmacóforo, secuencia de aminoácidos P, con Xaa = F o L

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 1

	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Xaa	Pro
20	1				5		

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Virus de hepatitis B

25

<400> 2

Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro
1				5		

<210> 3

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio esencial o farmacóforo, secuencia de aminoácidos P con Xaa = L

35

<400> 3

Asn Pro Leu Gly Phe Leu Pro
1 5

5 <210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cys-preS9-15-Cys

<400> 4

Cys Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Cys
1 5

<210> 5

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cys-HBVpreS9-15-Cys-D-Tyr

<400> 5

Cys Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Cys Tyr
1 5 10

25 <210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Virus de hepatitis B

30 <400> 6

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp
1 5

<210> 7

<211> 10

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cys-HBVpreS9-16-Cys

5 <400> 7

Cys	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	Cys
1				5					10

<210> 8

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cys-HBVpreS9-16-Cys-D-Tyr

15

<400> 8

Cys	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	Cys	Tyr
1				5					10	

20

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 9

Cys	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Cys
1				5				

<210> 10

<211> 11

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cys-HBVpreS8-16-Cys

35 <400> 10

ES 2 810 858 T3

Cys Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp Cys
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cys-HBVpreS8-16-Cys-D-Tyr

10 <400> 11

Cys Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp Cys Tyr
1 5 10

<210> 12

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 12

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5

20

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cys-HBVpreS9-17-Cys

<400> 13

30

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

ES 2 810 858 T3

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cys-HBVpreS9-17-Cys-D-Tyr

<400> 14

10		Cys	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Cys	Tyr
		1				5					10		

<210> 15

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 15

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

<210> 16

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cys-HBVpreS8-17-Cys

30

<400> 16

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

<210> 17

<211> 13

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cys-HBVpreS8-17-Cys-D-Tyr

5 <400> 17

Cys Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Cys Tyr
1 5 10

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 18

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

15

Gln Leu Asp Pro
20

<210> 19

<211> 22

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cys-HBVpreS2-21-Cys

25

<400> 19

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

30

His Gln Leu Asp Pro Cys
20

ES 2 810 858 T3

<210> 20

<211> 23

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cys-HBVpreS2-21-Cys-D-Tyr

10

<400> 20

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

15

His Gln Leu Asp Pro Cys Tyr
20

20

<210> 21

<211> 47

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

25

<400> 21

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

30

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
35 40 45

35

ES 2 810 858 T3

<210> 22

<211> 49

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cys-HBVpreS2-48-Cys

<400> 22

10

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

15

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

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

Cys

20

<210> 23

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cys-HBVpreS2-48-Cys-D-Tyr

<400> 23

30

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

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

35

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

Cys Tyr
50

<210> 24

5 <211> 47

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> residuos de aminoácidos de Myrcludex B

10 <400> 24

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
15

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

<210> 25

20 <211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cys-Myrcludex B-Cys

25

<400> 25

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

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

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

35 Cys

5 <210> 26
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Cys- Myrcludex B-Cys-D-Tyr
 <400> 26

	Cys	Gly	Thr	Asn	Leu	Ser	Val	Pro	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp
	1				5					10					15	
15	His	Gln	Leu	Asp	Pro	Ala	Phe	Gly	Ala	Asn	Ser	Asn	Asn	Pro	Asp	Trp
				20					25					30		
	Asp	Phe	Asn	Pro	Asn	Lys	Asp	His	Trp	Pro	Glu	Ala	Asn	Lys	Val	Gly
			35					40					45			
20	Cys	Tyr														
		50														

<210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HBVpreS9-16 con Xaa = L

30 <400> 27

	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Leu	Pro	Asp
	1				5			
	<210> 28							
	<211> 9							
35	<212> PRT							
	<213> Secuencia artificial							

<220>

<223> HBVpreS8-16 con Xaa = L

<400> 28

5

Pro Asn Pro Leu Gly Phe Leu Pro Asp
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HBVpreS9-17 con Xaa = L

15 <400> 29

Asn Pro Leu Gly Phe Leu Pro Asp His
1 5

20 <210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> HBVpreS8-17 con Xaa = L

<400> 30

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

30

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> HBVpreS2-21 con Xaa = L

<400> 31

5 Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Leu Pro Asp His
1 5 10 15
Gln Leu Asp Pro
20

10 <210> 32

<211> 47

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> HBVpreS2-48 con Xaa = L

<400> 32

20 Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Leu 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

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

<210> 33

<211> 47

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> residuos de aminoácidos of Myrcludex B con Xaa = L

<400> 33

35

ES 2.810.858.T3

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

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

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

- 5 <210> 34
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B
- <400> 34

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

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Ser His Pro Gln Ala
115

- 10 <210> 35
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B
- 15 <400> 35

ES 2 810 858 T3

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

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

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

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

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

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

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

20 Arg Asp Thr His Pro Gln Ala
115

<210> 36

<211> 119

<212> PRT

25 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 36

ES 2 810 858 T3

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

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

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

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

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

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

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

20 Arg Asp Thr His Pro Gln Ala
115

<210> 37

<211> 108

<212> PRT

25 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 37

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

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

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

35

ES 2 810 858 T3

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

5

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

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

10

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

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

15 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 38

20

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

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

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

25

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

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

30

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

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

35

ES 2 810 858 T3

<210> 39

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 39

```

10      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

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

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

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

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

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

        Asp Thr His Pro Gln Ala
        115

```

30

35

<210> 40

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 40

10

```

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

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Thr His Pro Gln Ala

```

115

ES 2 810 858 T3

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 41

	Met	Gly	Leu	Ser	Trp	Thr	Val	Pro	Leu	Glu	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Ser	
	1				5					10					15		
10	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				
15	Asp	Pro	Trp	Pro	Glu	Ala	Asn	Lys	Val	Gly	Val	Gly	Ala	Tyr	Gly	Pro	
		50					55					60					
	Gly	Phe	Thr	Pro	Pro	His	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Trp	Ser	Pro	Gln	Ser	
	65					70					75					80	
20	Gln	Gly	Thr	Leu	Thr	Thr	Leu	Pro	Ala	Asp	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Thr	
					85					90					95		
	Asn	Arg	Gln	Ser	Gly	Arg	Gln	Pro	Thr	Pro	Ile	Ser	Pro	Pro	Leu	Arg	
				100					105					110			
25	Asp	Ser	His	Pro	Gln	Ala											
				115													

25

30

35

ES 2 810 858 T3

<210> 42

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 42

10	Met Gly Gln Asn His Ser Val Thr Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp
	1 5 10 15
	His Gln Leu Asp Pro Leu Phe Arg Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp
	20 25 30
15	Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Glu Ala Thr Lys Val Gly
	35 40 45
	Val Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu
	50 55 60
20	Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Leu Pro Ala Ala
	65 70 75 80
	Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Lys Ala Thr Pro
	85 90 95
25	Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Thr His Pro Gln Ala
	100 105

ES 2 810 858 T3

210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

5 <400> 43

```

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
10          20          25          30

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

Lys Asp Asn Trp Pro Met Ala Asn Lys Val Gly Val Gly Gly Phe Gly
15          50          55          60

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

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

Thr Asn Arg Arg Ser Gly Arg Lys Pro Thr Pro Val Ser Pro Pro Leu
20          100          105          110

Arg Asp Thr His Pro Gln Ala
          115

```

25

<210> 44

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 44

	Met	Gly	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ser	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Glu	
	1				5					10					15		
	His	Gln	Leu	Asp	Pro	Leu	Phe	Arg	Ala	Asn	Thr	Asn	Asn	Pro	Asp	Trp	
				20					25					30			
10	Asp	Phe	Asn	Pro	Asn	Lys	Asp	Thr	Trp	Pro	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Gly	
			35					40					45				
	Val	Gly	Ala	Phe	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Pro	Pro	His	Gly	Gly	Leu	Leu	
		50					55					60					
15	Gly	Trp	Ser	Pro	Gln	Ala	Gln	Gly	Val	Thr	Thr	Ile	Leu	Pro	Ala	Val	
	65					70					75					80	
	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Thr	Asn	Arg	Gln	Ser	Gly	Arg	Gln	Pro	Thr	Pro	
					85					90					95		
20	Ile	Ser	Pro	Pro	Leu	Arg	Asp	Thr	His	Pro	Gln	Ala					
				100					105								

ES 2 810 858 T3

<210> 45

<211> 105

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 45

	Met	Gly	Leu	Asn	Gln	Ser	Thr	Phe	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Ser	His	
	1				5					10					15		
10	Gln	Leu	Asp	Pro	Leu	Phe	Lys	Ala	Asn	Ala	Gly	Ser	Ala	Asp	Trp	Asp	
				20					25					30			
	Lys	Pro	Lys	Asp	Pro	Trp	Pro	Gln	Ala	His	Asp	Thr	Ala	Val	Gly	Ala	
			35					40					45				
15	Phe	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Pro	Pro	His	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Trp	Ser	
		50					55					60					
	Ser	Gln	Ala	Gln	Gly	Leu	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	
	65					70					75					80	
20	Pro	Ser	Thr	Asn	Arg	Asp	Lys	Gly	Arg	Lys	Pro	Thr	Pro	Ala	Thr	Pro	
				85						90					95		
	Pro	Leu	Arg	Asp	Thr	His	Pro	Gln	Ala								
				100					105								

ES 2 810 858 T3

<210> 46

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

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

<400> 46

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

20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido cíclico de la fórmula general la



en el que

5 **P** es la secuencia de aminoácidos NPLGFXaaP (SEQ. ID NÚM.: 1), siendo Xaa F o L,

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

en el que *m* es 0 o al menos 1;

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

en el que *n* es 0 o al menos 1;

10 y en el que *m* + *n* es 0 a 42;

y portando al menos una modificación hidrófoba en las cadenas laterales de aminoácidos de X y/o P, en el que dicho péptido cíclico no está ciclado dentro de la secuencia de aminoácidos de P de la SEQ. ID NÚM.: 1 y no a través de cadenas laterales de aminoácidos **de P**,

en el que la modificación hidrófoba es una acilación o adición de restos hidrófobos,

15 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. El péptido cíclico de la reivindicación 1, en el que la modificación hidrófoba es una acilación con ácidos grasos C8 a C22, tal como miristoílo (C14), palmitoílo (C16) o estearoílo (C18), preferentemente miristoílo (C14),

o el resto o restos hidrófobos es seleccionado de colesterol, fosfolípidos, glicolípidos, ésteres de glicerol, esteroides, ceramidas.

- 20 3. El péptido cíclico de la reivindicación 1 o 2, en el que el péptido está ciclado

(a) a través de oxidación de tiol (formación de puente disulfuro) de dos cisteínas (C) comprendidas en el péptido,

(b) condensación de amida de dos cadenas laterales de aminoácidos (lactama),

(c) a través de ciclación cabeza-cola,

25 (d) a través de ciclación de la estructura, y/o

(e) a través de formación de tioéter.

4. El péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que *m* = 0 a 8 y/o *n* = 0 a 34, a condición de que *m* + *n* sea al menos 1.

5. El péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene la fórmula



en el que **H** es la modificación hidrófoba.

6. El péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de

HBVpreS9-15 NPLGFFP (SEQ. ID NÚM.: 2)

Cys- C-NPLGFFP-C (SEQ ID NÚM. 4)

HBVpreS9-15-Cys

HBVpreS9-16 NPLGFFPD (SEQ. ID NÚM.: 6)

Cys- C-NPLGFFPD-C (SEQ. ID NÚM.: 7)

HBVpreS9-16-Cys

HBVpreS8-16	PNPLGFFPD	(SEQ. ID NÚM. 9)
Cys-	C-PNPLGFFPD-C	(SEQ. ID NÚM.: 10)
HBVpreS8-16-Cys		
HBVpreS9-17	NPLGFFPDH	(SEQ. ID NÚM.: 12)
Cys-	C-NPLGFFPDH-C	(SEQ. ID NÚM.: 13)
HBVpreS9-17-Cys		
HBVpreS8-17	PNPLGFFPDH	(SEQ. ID NÚM.: 15)
Cys-	C-PNPLGFFPDH-C	(SEQ. ID NÚM.: 16)
HBVpreS8-17-Cys		
HBVpreS2-21	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDP	(SEQ. ID NÚM.: 18)
Cys-	C-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDP-C	(SEQ. ID NÚM.: 19)
HBVpreS2-21-Cys		
HBVpreS2-48	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP EANQVG	(SEQ. ID NÚM.: 21)
Cys-	C-	(SEQ. ID NÚM.: 22)
HBVpreS2-48-Cys	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP EANQVG-C	
Myrcludex B	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP EANKVG	(SEQ. ID NÚM.: 24)
Cys-Myrcludex B- Cys	C- GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP EANKVG-C	(SEQ. ID NÚM.: 25)

tal como

cyclo[NPLGFFP]	(SEQ. ID NÚM.: 2)
cyclo[NPLGFFPD]	(SEQ. ID NÚM.: 6)
cyclo[PNPLGFFPD]	(SEQ. ID NÚM.: 9)
cyclo[NPLGFFPDH]	(SEQ. ID NÚM.: 12)
cyclo[PNPLGFFPDH]	(SEQ. ID NÚM.: 15)
cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDP]	(SEQ. ID NÚM.: 18)
cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP EANQVG]	(SEQ. ID NÚM.: 21)
cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP EANKVG]	(SEQ. ID NÚM.: 24)
cyclo[NPLGFLP]	(SEQ. ID NÚM.: 3)
cyclo[NPLGFLPD]	(SEQ. ID NÚM.: 27)
cyclo[PNPLGFLPD]	(SEQ. ID NÚM.: 28)
cyclo[NPLGFLPDH]	(SEQ. ID NÚM.: 29)
cyclo[PNPLGFLPDH]	(SEQ. ID NÚM.: 30)
cyclo[GTNLSVPNPLGFLPDHQLDP]	(SEQ. ID NÚM.: 31)

cyclo[GTNLSVPNPLGFLPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG] (SEQ. ID NÚM.: 32)

cyclo[GTNLSVPNPLGFLPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENKVG] (SEQ. ID NÚM.: 33).

7. El péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de

Myr-cyclo[HBVpreS9-15] (SEQ. ID NÚM.: 2)

myr-cyclo[NPLGFFP]

Myr-cyclo[HBVpreS9-16] (SEQ. ID NÚM.: 6)

myr-cyclo[NPLGFFPD]

Myr-cyclo[HBVpreS8-16] (SEQ. ID NÚM.: 9)

myr-cyclo[PNPLGFFPD]

Myr-cyclo[HBVpreS9-17] (SEQ. ID NÚM.: 12)

myr-cyclo[NPLGFFPDH]

Myr-cyclo[HBVpreS8-17] (SEQ. ID NÚM.: 15)

myr-cyclo[PNPLGFFPDH]

Myr-cyclo-[HBVpreS2-21] (SEQ. ID NÚM.: 18)

myr-cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDP]

Myr-cyclo-[HBVpreS2-48] (SEQ. ID NÚM.: 21)

myr-cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG]

Myr-cyclo-[HBVpreS2-48] = Myrcludex B cíclico (SEQ. ID NÚM.: 24)

myr-cyclo[GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENKVG]

por ejemplo

myr-cyclo[NPLGFLP]

5 myr-cyclo[NPLGFLPD]

myr-cyclo[PNPLGFLPD]

myr-cyclo[NPLGFLPDH]

myr-cyclo[PNPLGFLPDH]

10 myr-cyclo[GTNLSVPNPLGFLPDHQLDP] myr-cyclo[GTNLSVPNPLGFLPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENQVG] myr-cyclo[GTNLSVPNPLGFLPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPENKVG].

8. El péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo un resto o restos adicionales,

tal como

fármacos o sus profármacos respectivos;

15 etiquetas;

marcadores, tal como colorantes fluorescentes, radioisótopos y agentes de contraste;

virus recombinantes;

portador o depósito para fármacos, profármacos o marcadores;

epitopos inmunogénicos;

hormonas;

inhibidores;

toxinas;

5 preferentemente unidos de manera covalente, tal como a través de un conector, espaciador y/o grupos de anclaje, por ejemplo, un conector escindible,

y/o comprendiendo un inhibidor, tal como un inhibidor de cápside.

9. Composición farmacéutica comprendiendo

(i) al menos un péptido cíclico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,

10 (ii) opcionalmente, un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. El péptido cíclico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 para uso como inhibidores de la entrada *in vitro* de HBV y/o HDV.

11. El péptido cíclico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 para uso en medicina.

15 **12.** El péptido cíclico o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho uso comprende

- tratamiento para la inhibición de la infección por HBV y/o HDV,

- la prevención de una infección primaria por HBV y/o HDV,

preferentemente a través de localización en NTCP,

20 en el que, preferentemente, la infección por HBV de cualquier genotipo de HBV es inhibida o evitada.

13. El péptido cíclico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 para uso en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección hepática, en el que preferentemente la enfermedad o afección hepática es seleccionada de hepatitis, cirrosis, hemocromatosis, preferentemente hepatitis causada por hepatitis por virus A, B, C, D, E, F, G y H o hepatitis concomitante causada por virus,

y/o en el que preferentemente la enfermedad o trastorno hepático es una enfermedad que involucra un etapa del hígado de un virus o un patógeno no viral, tal como una enfermedad tropical, malaria, esquistosomiasis, leishmaniasis, Morbus Wilson,

30 y/o en el que preferentemente la enfermedad o trastorno hepático es un tumor hepático, preferentemente carcinoma hepatocelular (HCC),

y/o en el que preferentemente la enfermedad o trastorno hepático es una complicación postrasplante después del trasplante de hígado relacionada con la acumulación de sal biliar dentro de la vía biliar,

y/o en el que preferentemente la enfermedad o afección hepática está relacionada con el transporte mediado por el polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP) de compuestos en hepatocitos,

35 o requiere una administración de un compuesto, tal como un fármaco o marcador, al sitio o ubicación de la enfermedad o afección, y preferentemente es una enfermedad metabólica relacionada con el hígado seleccionada de

colestasis intrahepática,

envenenamiento del hígado por toxinas hepáticas/hepatotoxicidad,

40 enfermedad hepática colestática inducida por fármacos,

hiperlipidemia

colestasis posthepática,

síndrome metabólico,

enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA),

enfermedades de almacenamiento de glucógeno,

y en el que los compuestos que son transportados en hepatocitos a través de NTCP son preferentemente ácidos biliares, esteroides, hormonas tiroideas conjugadas y no conjugadas, toxinas hepáticas, compuestos que están unidos de manera covalente a taurocolato, bromosulfoftaleína, fármacos.

- 14.** El péptido cíclico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 para uso en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cardiovascular (CVD), preferentemente comprendiendo el control o modificación del nivel de colesterol o la captación de colesterol,

en el que el nivel o captación de colesterol preferentemente es controlado o modificado mediante la disminución o bloqueo del transporte de sal biliar mediada por NCTP por el péptido cíclico.

- 15.** El péptido cíclico o composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el péptido cíclico es administrado en una cantidad terapéuticamente efectiva, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 50 mg por paciente, preferentemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg por paciente,

o es aplicado a un paciente en una dosis que oscila de 10 pmol por kg a 20 μ mol por kg de peso corporal.

- 16.** El péptido cíclico o composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la vía de administración es seleccionada de oral, subcutánea, intravenosa, nasal, intramuscular, transdérmica, inhalatoria, por supositorio.

Figura 1

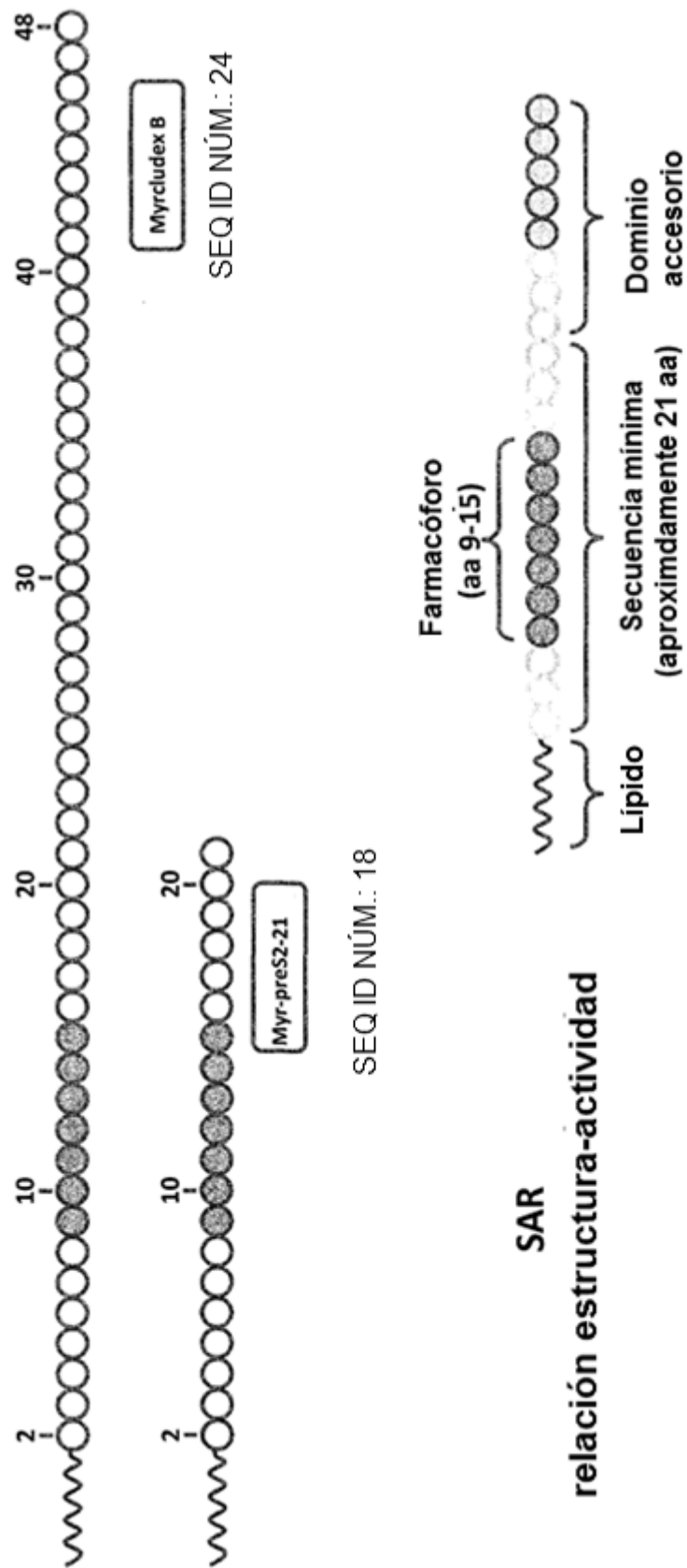
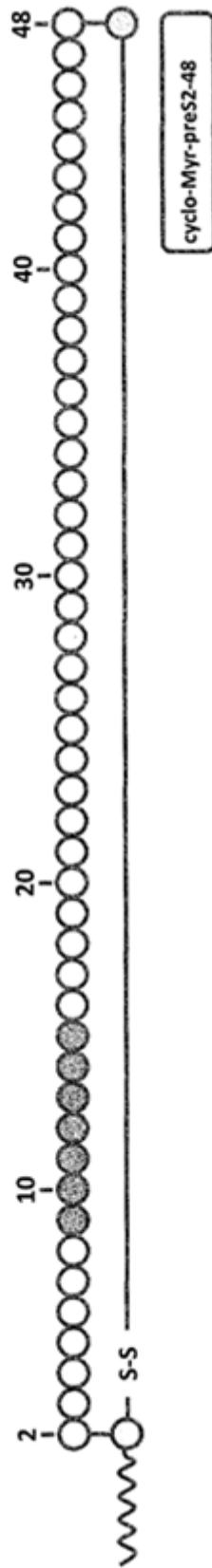


Figura 2 A



Un derivado cíclico con puente covalente de Myrcludex B muestra potencial inhibidor

SEQ ID NÚM.: 25

Figura 2 B

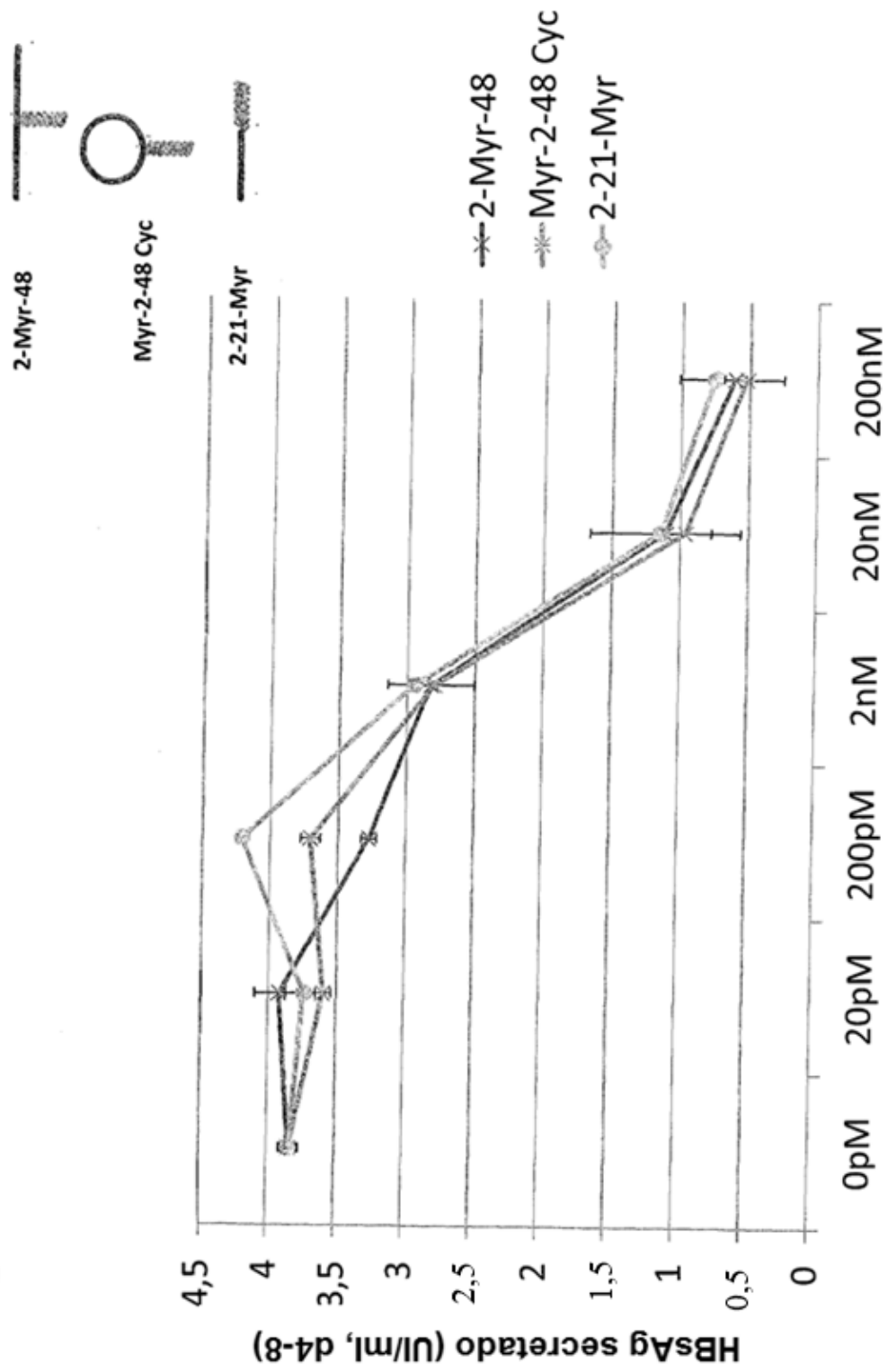


Figura 3

Derivados de Myrcludex cíclico

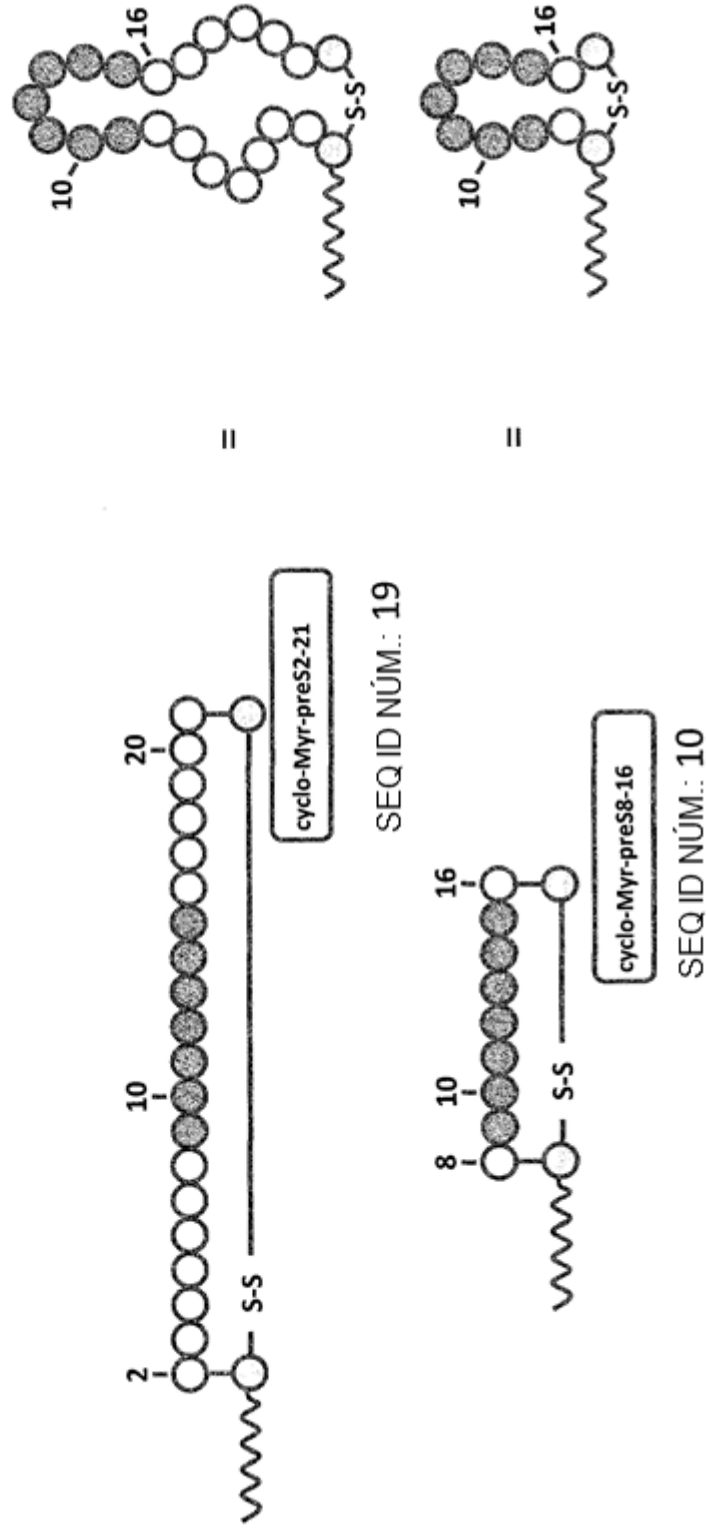
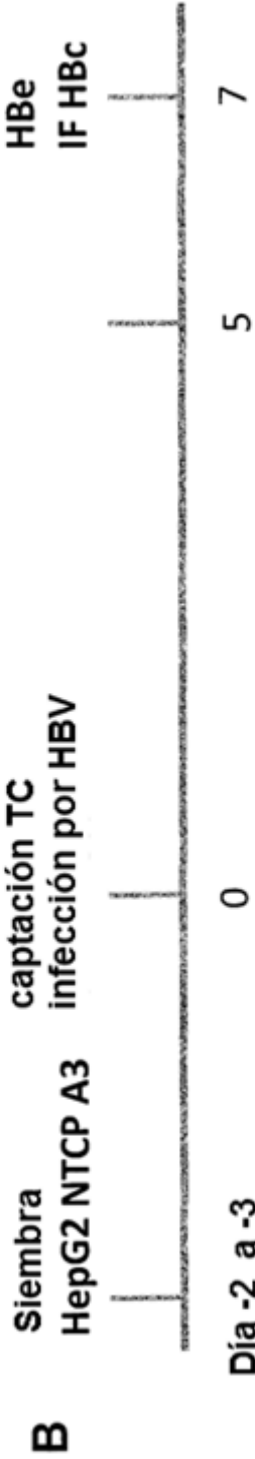


Figura 4 [SEQ ID NÚM.]

	Péptidos cíclicos	Péptidos lineales
	~~~~~C HBVpreS Cy	~~~~~HBVpreS Y
HBVpreS9-16	NPLGFFFPD [8]	NPLGFFFPD
HBVpreS9-16 D16A	NPLGFFFPD	
HBVpreS9-16 D16G	NPLGFFFPD	
HBVpreS9-16 Daa 11/13	NPLGFFFPD	
HBVpreS9-15	NPLGFFFP [5]	
HBVpreS9-17 (+H)	NPLGFFFPDH [14]	
HBVpreS8-16 (+P)	NPLGFFFPD [11]	
HBVpreS8-17 (+P)(+H)	NPLGFFFPDH [17]	PNPLGFFFPDH
Ac-HBVpreS9-16	Ac-CNPLGFFFPD Cy [8]	



**Figura 5**

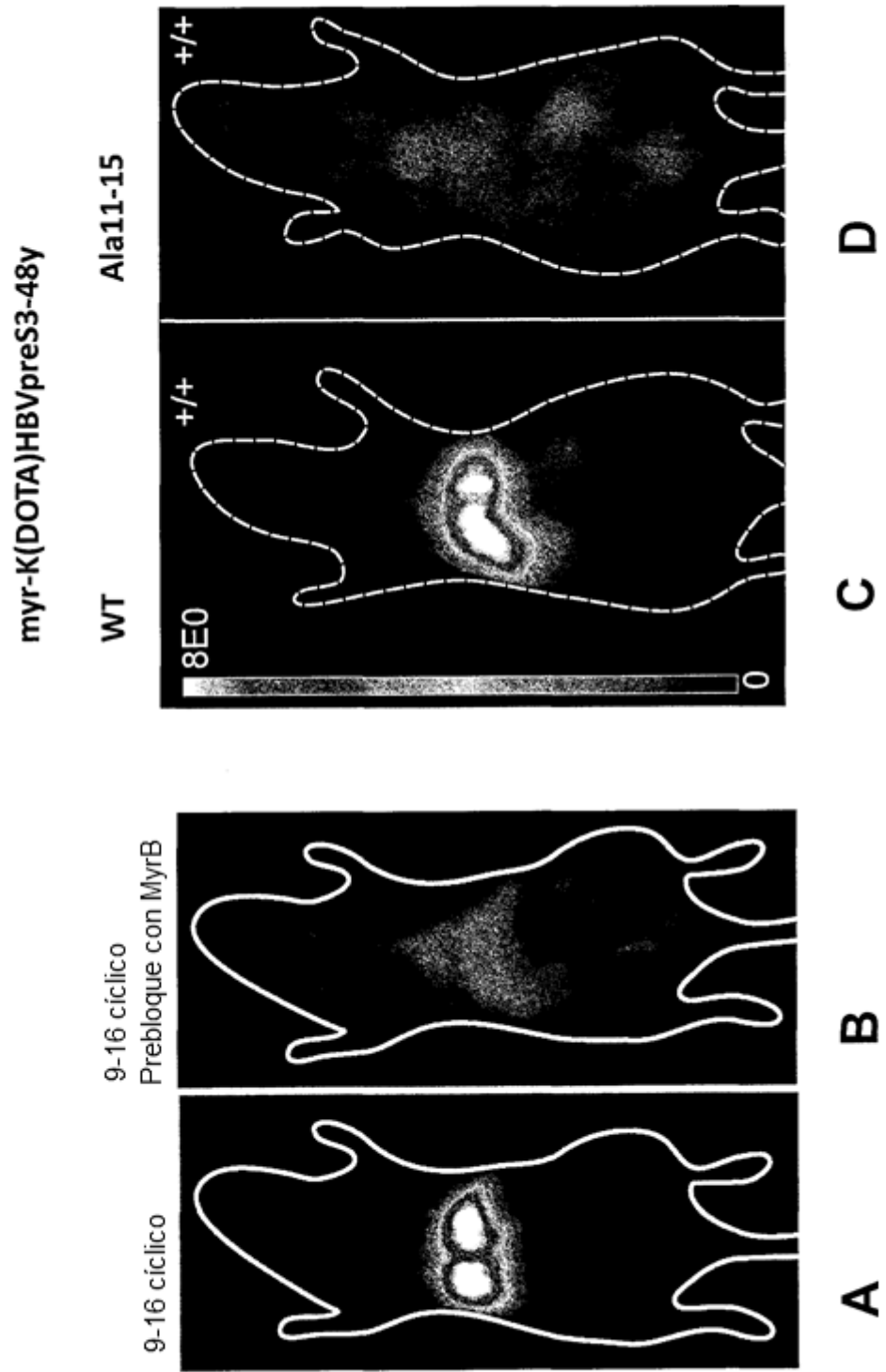


Figura 6

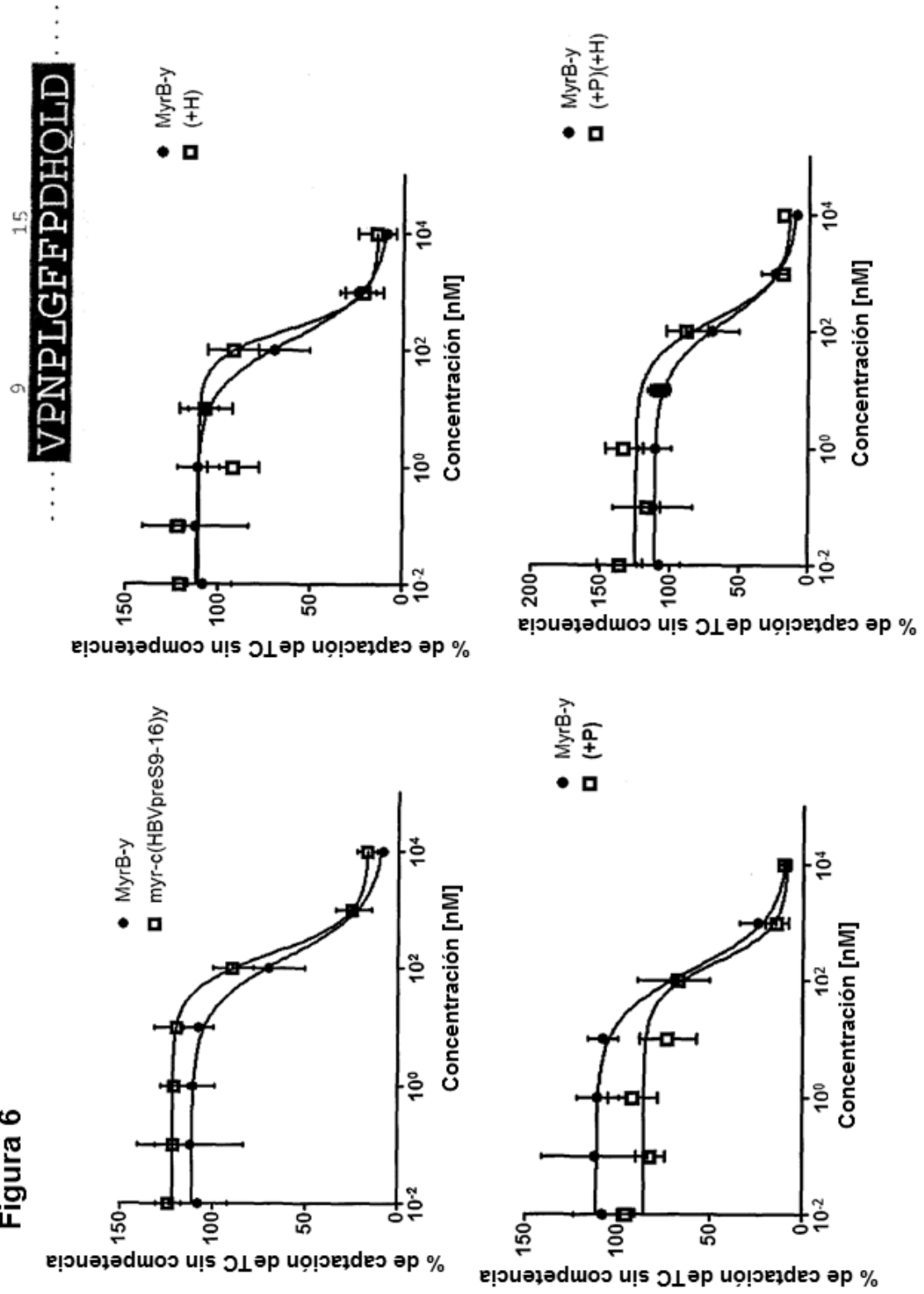


Figura 7

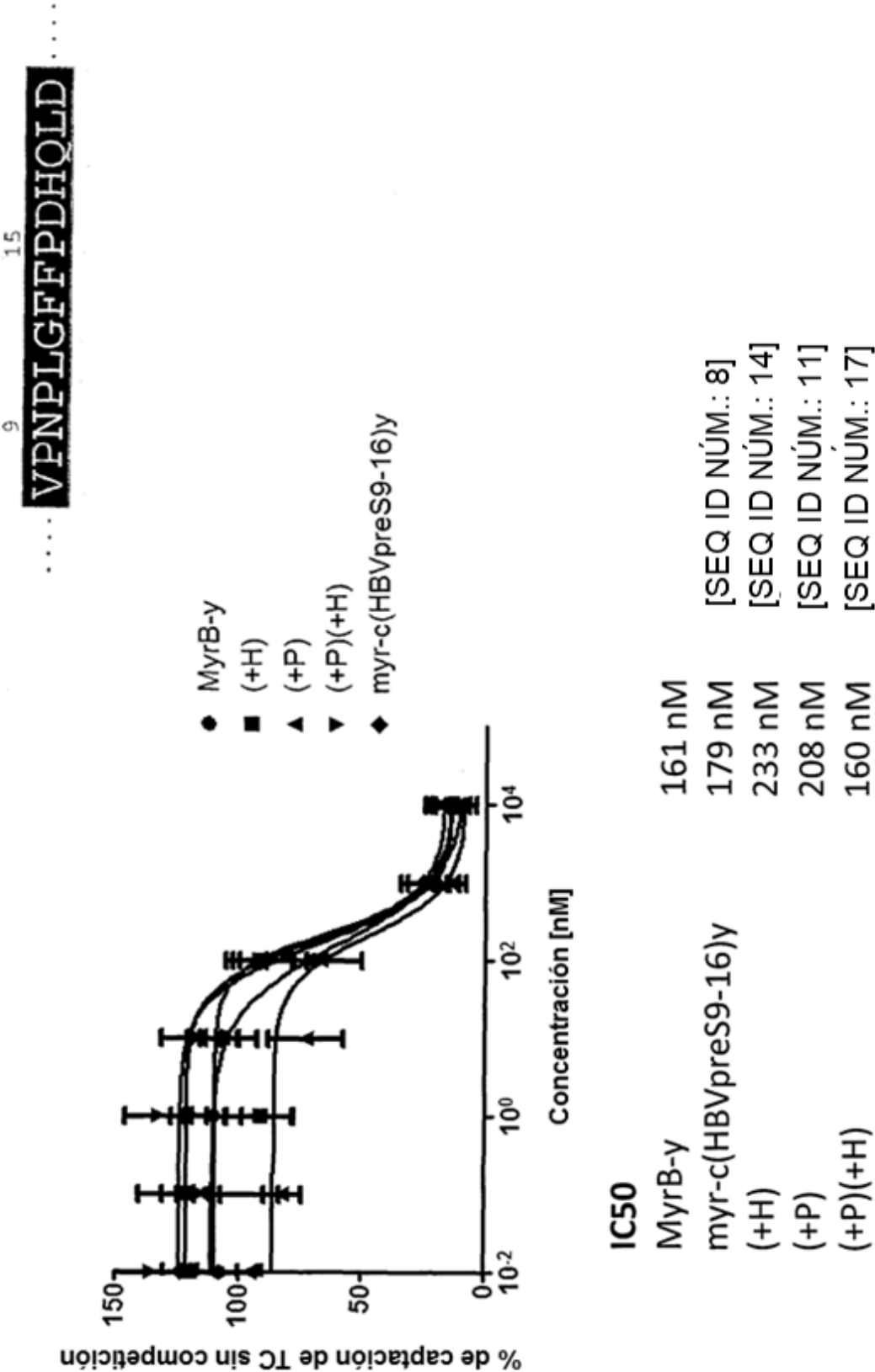


Figura 8

