

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 238**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2015 PCT/CN2015/092132**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16145840**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2015 E 15885210 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3269727**

54 Título: **Agente farmacéutico polipeptídico de proteína X contra el virus de la hepatitis B**

30 Prioridad:

13.03.2015 CN 201510111013

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

15.04.2021

73 Titular/es:

**TIANJIN TOPTECH BIO-SCIENCE &
TECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)
Lab Building S1021, Tianjin International Joint
Academy of, Biomedicine, 220 Dongting Road
Tianjin 300457, CN**

72 Inventor/es:

**ZHANG, XIAODONG y
YE, LIHONG**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 819 238 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

Agente farmacéutico polipeptídico de proteína X contra el virus de la hepatitis B

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al campo de la medicina polipeptídica y específicamente, se refiere a polipéptidos contra la proteína X del virus de la hepatitis B que comprende D-aminoácidos y sus usos.

Antecedentes

10 El cáncer de hígado es uno de los tumores malignos que pueden provocar la muerte. Su grado de malignidad es alto, en China, la tasa de mortalidad por cáncer de hígado es la segunda más alta, solo por debajo de la tasa de mortalidad por cáncer gástrico. De acuerdo con las estadísticas, hay alrededor de 300.000 personas con cáncer de hígado de reciente aparición cada año en China, y aproximadamente 110.000 personas mueren cada año a causa de esta enfermedad. La infección por el virus de la hepatitis B (HBV) puede provocar hepatitis, cirrosis hepática y cáncer primario de hígado. En China, más del 80 % de los pacientes con cáncer de hígado desarrollaron su cáncer de hígado después de la infección por HBV, que también se conoce como cáncer de hígado post hepatitis B.

15 El HBV es un virus de ADN que tiene una longitud de aproximadamente 3,2 Kb y contiene marcos de lectura abiertos (ORF) superpuestos que son responsables de la transcripción y expresión del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), el antígeno nuclear del virus de la hepatitis B (HBcAg), la polimerasa del virus de la hepatitis B y el antígeno X del virus de la hepatitis B (HBxAg) (también conocido como proteína X del virus de la hepatitis B, HBx), en la que HBx es un factor indispensable en la replicación del ADN del HBV. Dado que HBx es un factor indispensable en la replicación del ADN del HBV, inhibir la función de HBx puede conducir a la supresión de la infección por HBV, así como a la posterior hepatitis y cirrosis hepática.

20 Además, como factor trans-activador, HBx puede promover el crecimiento y la proliferación del cáncer de hígado, por lo que también se conoce como oncoproteína. Los estudios a nivel molecular, nivel celular y nivel animal han demostrado que HBx tiene un fuerte efecto en la promoción de la proliferación y migración de las células de cáncer de hígado. Los experimentos con ratones transgénicos también mostraron que HBx puede causar cánceres de hígado. Los resultados de numerosos estudios indicaron además que la persistencia de la infección por HBV podría conducir a enfermedades hepáticas crónicas, incluida la hepatitis crónica, hepatitis crónica repetida, que posteriormente causa hiperplasia del tejido conectivo fibroso en los tejidos hepáticos y cirrosis hepática, y la mayoría de los cánceres hepáticos en base a cirrosis hepática. Está bien establecido que HBx desempeña un papel fundamental en el desarrollo y progreso de las enfermedades hepáticas crónicas (incluidas la hepatitis, cirrosis hepática y cáncer de hígado). En consecuencia, HBx se convierte en un objetivo importante para prevenir y tratar enfermedades del hígado.

25 Actualmente, el tratamiento del cáncer de hígado es principalmente mediante cirugía, complementado con terapias intervencionistas, mientras que la quimioterapia no suele ser muy eficaz. Los datos clínicos muestran que la tasa de detección de HBsAg y HBxAg que se expresa positivamente en tejidos de cáncer de hígado es más del 80 % o incluso del 90 %. Dado que HBx es un factor patogénico importante en la aparición y desarrollo del cáncer de hígado, la identificación de sus inhibidores específicos tendría una gran importancia teórica y clínica. Sin embargo, debido a lo incompleto del análisis de conformación tridimensional de HBx, es bastante difícil diseñar sus inhibidores químicos a través de la información de conformación tridimensional de HBx.

30 Los polipéptidos fragmentarios se pueden utilizar como medicina y ya se han utilizado ampliamente en la práctica clínica. Por ejemplo, timopéptido es una timopentina extraída del timo de ternera con la función de promover la transformación de linfocitos, potenciando la actividad fagocítica de enfermedades. Las características de los fármacos polipeptídicos incluyen efectos farmacocinéticos bien definidos, seguridad y facilidad de fabricación. Sin embargo, debido a que los fármacos polipeptídicos tienden a verse afectados por la proteasa *in vivo* y tienen una baja estabilidad y una semivida corta, la eficacia de estos no suele ser ideal.

35 Los aminoácidos pueden existir en la configuración de levorrotación (L-aminoácidos) y dextrorrotación (D-aminoácidos). Todos los aminoácidos naturales en el cuerpo humano o animal son de tipo L sin ningún D-aminoácido. Las enzimas proteolíticas para D-aminoácidos no existen en los organismos. Por lo tanto, si los aminoácidos naturales de tipo L se reemplazan con los tipos D correspondientes sin afectar la secuencia de aminoácidos cuando se preparan fármacos polipeptídicos, también se puede mejorar la estabilidad de los fármacos polipeptídicos en sangre. Sin embargo, sigue siendo una cuestión importante en el desarrollo de fármacos polipeptídicos cómo mejorar la resistencia a la degradación de los fármacos polipeptídicos sin reducir sus características de enlace para mantener la eficacia farmacéutica.

40 Los inventores de la presente invención han descubierto un polipéptido con una función de inhibición de la proteína X del virus de la hepatitis B y compuesto únicamente por L-aminoácidos naturales (consulte la patente de invención china No. ZL201110061840.5 para obtener detalles). El polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1. El polipéptido tiene la función de inhibir las actividades de HBx a nivel molecular, nivel celular y nivel animal y se puede usar en el tratamiento o prevención de hepatitis, cirrosis hepática y cáncer de

hígado causado por la infección por el virus de la hepatitis B. Los documentos CN 102675422 A y EP 2 687 537 A1 describen polipéptidos que inhiben la proteína x del virus de la hepatitis B (HBx).

Sumario de la invención

5 La presente invención se refiere a polipéptidos contra la proteína X del virus de la hepatitis B y sus usos, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Dichos polipéptidos son polipéptidos que comprenden D-aminoácidos, que tienen la función de inhibir la proteína X del virus de la hepatitis B e inhiben las actividades de HBx, inhiben la replicación del ADN del virus de la hepatitis B y la expresión de antígenos relacionados (por ejemplo, HBeAg) a nivel molecular, nivel celular y nivel animal, e inhiben adicionalmente la hepatitis y cirrosis hepática causadas por la infección por el virus de la hepatitis B y el cáncer de hígado que se produce en base a la cirrosis hepática.

10 En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado, que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NO: 1-11, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, preferiblemente al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más de identidad con la SEQ ID NO: 1, y en la que uno o más L-aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos, está sustituido por D-aminoácido; en el que dicho polipéptido tiene la función de inhibir la proteína X del virus de la hepatitis B y es capaz de inhibir la aparición y el desarrollo de enfermedades de hígado crónicas resultantes de la infección por el virus de la hepatitis B.

En la presente invención, las enfermedades hepáticas crónicas resultantes de la infección por el virus de la hepatitis B comprenden hepatitis, cirrosis hepática y cáncer de hígado.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de acuerdo con la presente invención, como se definió anteriormente, en un procedimiento para tratar y prevenir enfermedades hepáticas crónicas que resultan de la infección por el virus de la hepatitis B. Específicamente, el polipéptido se puede usar como una vacuna terapéutica contra el virus de la hepatitis B. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los polipéptidos de la presente invención, que puede contener un portador farmacéutico opcional.

25 En comparación con los polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos idénticas pero que solo comprenden L-aminoácidos, los polipéptidos de la presente invención no solo exhiben una buena estabilidad, sino que también ejercen efectos farmacéuticos sorprendentemente notables, especialmente en la función de inhibir la replicación del ADN del virus de la hepatitis B y expresión de antígenos relacionados (por ejemplo, HBeAg). Por consiguiente, los polipéptidos se pueden utilizar ampliamente en la prevención y tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas resultantes de la infección por el virus de la hepatitis B, que incluyen hepatitis, cirrosis hepática y cáncer de hígado.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Resultado del análisis de HPLC del polipéptido D-TTK001 purificado sintetizado artificialmente.

Figura 2. Resultados experimentales del enlace *in vitro* de polipéptidos de la invención a la proteína diana HBx usando Biacore 3000.

35 Figura 3. Análisis de los efectos de los polipéptidos de la invención sobre los niveles de secreción de HBeAg de células HepAD38 de cáncer de hígado integradas con ADN de HVB a nivel celular. Los resultados mostraron que los niveles de secreción de HBeAg de células HepAD38 de cáncer de hígado integradas con ADN de HVB se inhibieron después de 48 horas de tratamiento con 0,1, 1, 10 y 100 μM de polipéptido D-TTK001 o L-TTK001 sintetizado artificialmente (es decir, anti-HBxPI#) con una dependencia de la dosis. La dosis mínima eficaz de D-TTK001 es 0,1 μM ; la dosis mínima eficaz de L-TTK001 es de 10 μM . Por lo tanto, el efecto de D-TTK001 sobre HBeAg es mejor que el de L-TTK001 sobre HBeAg. Se emplea la prueba t de Student para el análisis estadístico, * P < 0,05, ** P < 0,01.

40 Figura 4. Análisis de los efectos de polipéptidos de la invención sobre los niveles de secreción de HBeAg de las células HepG2.2.15 a nivel celular. Los resultados mostraron que los niveles de secreción de HBeAg de las células HepG2.2.15 se inhibieron después de 48 horas de tratamiento con 0,1, 1, 10 y 100 μM de polipéptido D-TTK001 o L-TTK001 sintetizado artificialmente (es decir, anti-HBxPI#) con una dependencia de la dosis. La dosis mínima eficaz de D-TTK001 es 0,1 μM ; la dosis mínima eficaz de L-TTK001 es de 10 μM . Por lo tanto, el efecto de D-TTK001 sobre HBeAg es mejor que el de L-TTK001 sobre HBeAg. Se emplea la prueba t de Student para el análisis estadístico, * P < 0,05, ** P < 0,01.

50 Figura 5. Análisis de los efectos de polipéptidos de la invención sobre la proliferación de células HepAD38 de cáncer de hígado integradas con ADN de HVB a nivel celular mediante ensayo MTT. Los resultados mostraron que la proliferación de células HepAD38 de cáncer de hígado integradas con ADN de HVB se inhibió después de 48 horas de tratamiento con 0,1, 1, 10 y 100 μM de polipéptido D-TTK001 o L-TTK001 sintetizado artificialmente (es decir, anti-HBxPI#) con una dependencia de la dosis. Se emplea la prueba t de Student para el análisis estadístico, * P < 0,05, ** P < 0,01.

55

Figura 6. Análisis de los efectos del polipéptido D-TKK001 de la invención en ratones transgénicos de HBV. Se trataron ratones transgénicos de HBV con polipéptido D-TKK001 sintetizado artificialmente en dos grupos con dosis de 2,5 mg/kg y 5,0 mg/kg respectivamente mediante inyección intravenosa en la cola; el grupo de control negativo se trató con PBS mediante inyección intravenosa en la cola. Posteriormente, se midió el número de copias de ADN de HBV en suero de ratones transgénicos de HBV con PCR en tiempo real. Los resultados mostraron que el número de copias de ADN de HBV en el suero de ratones transgénicos de HBV está claramente reducido por D-TTK001 con una dependencia del tiempo y de la dosis, lo que sugiere que D-TTK001 tiene la función de inhibir la replicación del ADN de HBV. Se emplea la prueba t de Student para el análisis estadístico, * P <0,05, ** P <0,01.

Figura 7. Análisis de los efectos del tratamiento del polipéptido D-TKK001 sintetizado artificialmente en hepatitis en ratones transgénicos de HBV. El panel de la izquierda muestra tejido patológico hepático de ratones transgénicos de HBV; 6 de cada 10 ratones transgénicos de HBV en el grupo de control no tratado mostraron características patológicas típicas de la hepatitis viral, como la degeneración hidrópica de hepatocitos. El panel derecho muestra tejido hepático después de 3 semanas de tratamiento con D-TTK001 (5 mg/kg) mediante inyección intravenosa en la cola; ninguno de los 6 ratones del grupo experimental mostró una degeneración hidrópica de hepatocitos, lo que sugiere que D-TTK001 tiene un efecto de tratamiento claro sobre lesiones patológicas de hepatitis en tejido hepático.

Figura 8. Análisis de efectos del polipéptido D-TKK001 sintetizado artificialmente sobre la tasa de supervivencia de ratones inmunodeprimidos portadores de cáncer de hígado. Los resultados de experimentos con animales mostraron que las tasas de supervivencia de ratones inmunodeprimidos portadores de tumores, inoculados con células HepG2-X se prolongaron claramente en grupos tratados con polipéptido D-TTK001 sintetizado artificialmente a 0,1 mg/kg o 5,0 mg/kg, lo que sugiere que D-TTK001 tiene una función de inhibir el fenotipo maligno del tumor inoculado con células HepG2-X en ratones inmunodeprimidos. Para el análisis estadístico se emplea Log-Rank, * P <0,5.

Figura 9. Análisis de los efectos de polipéptidos de la invención sobre los niveles de secreción de HBeAg de células HepAD38 de cáncer de hígado integradas con ADN de HVB a nivel celular. Los resultados mostraron que los niveles de secreción de HBeAg de las células HepAD38 de cáncer de hígado integradas con ADN de HVB se inhibieron después de 48 horas de tratamiento con 10 µM de cada polipéptido D-TTK001 o polipéptido sintetizado artificialmente como se muestra en las SEQ ID NO: 2-11 (por ejemplo, D-TTK001-1, D-TTK001-2, D-TTK001-3, D-TTK001-4, D-TTK001-5, D-TTK001-6, D-TTK001-7, D-TTK001-8, D-TTK001-9, D-TTK001-10) con una dependencia de la dosis. Se emplea la prueba t de Student para el análisis estadístico, * P <0,05, ** P <0,01.

Descripción detallada

En la presente invención, incluidas la descripción y reivindicaciones, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos se utilizan con los siguientes significados:

En la invención, se utilizan abreviaturas para describir aminoácidos, incluidos L-aminoácidos y D-aminoácidos. Las abreviaturas se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Listado de abreviaturas

Aminoácidos	Símbolos de tres letras de L-aminoácidos	Símbolos de una letra de L-aminoácidos	Símbolos de tres letras de D-aminoácidos	Símbolos de una letra de L-aminoácidos
Alanina	Ala	A	D-Ala	D/A
Arginina	Arg	R	D-Arg	D/R
Asparagina	Asn	N	D-Asn	D/N
Ácido aspártico	Asp	D	D-Asp	D/D
Cisteína	Cys	C	D-cys	D/C
Glutamina	Gln	Q	D-Gln	D/Q
Ácido glutámico	Glu	E	D-Glu	D/E
Glicina	Gly	G	D-Gly	D/G
Histidina	His	H	D-His	D/H
Isoleucina	Ile	I	D-Ile	D/I

(continuación)

Aminoácidos	Símbolos de tres letras de L-aminoácidos	Símbolos de una letra de L-aminoácidos	Símbolos de tres letras de D-aminoácidos	Símbolos de una letra de L-aminoácidos
Leucina	Leu	L	D-Leu	D/L
Lisina	Lys	K	D-Lys	D/K
Metionina	Met	M	D-Met	D/M
Fenilalanina	Phe	F	D-Phe	D/F
Prolina	Pro	P	D-Pro	D/P
Serina	Ser	s	D-Ser	D/S
Treonina	Thr	T	D-Thr	D/T
Triptófano	Trp	W	D-Trp	D/W
Tirosina	Tyr	Y	D-Tyr	D/Y
Valina	Val	V	D-Val	D/V

En la invención, en la secuencia de aminoácidos de polipéptidos, el símbolo "D-*" se usa para indicar cualquier D-aminoácido que sustituya al L-aminoácido original en la posición específica del polipéptido.

- 5 Como una referencia, los aminoácidos pueden existir en la configuración de levorrotación (L-aminoácidos) y dextrorrotación (D-aminoácidos). Los L-aminoácidos son los aminoácidos que existen de manera natural en la naturaleza y en la mayoría de los sistemas biológicos. Además, los polipéptidos que existen de manera natural están compuestos de L-aminoácidos, por lo que pueden denominarse L-polipéptidos. Los D-aminoácidos son "imágenes" de los correspondientes L-aminoácidos. Aunque los D-polipéptidos (polipéptidos compuestos completamente por D-aminoácidos) no existen de manera natural, estos polipéptidos pueden sintetizarse artificialmente para formar estructuras proteicas tridimensionales.

10 "Aislado" se refiere a separar una sustancia de su entorno original (por ejemplo, su entorno natural si se genera de manera natural). Por ejemplo, un polipéptido generado de manera natural que existe en un animal vivo significa que no ha sido aislado, mientras que el mismo polipéptido separado parcial o completamente de los sistemas naturales con los que coexiste habitualmente significa que está aislado. Dicho polipéptido puede existir como parte de un vector o como parte de una composición; dado que el vector y la composición no son un componente de su entorno natural, todavía están aislados.

15 El término "purificado", como se usa en la presente memoria, significa un estado aumentado de pureza, en el que "pureza" es un término relativo, y no debe interpretarse estrictamente como pureza absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente el 50 %, o superior al 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, o incluso alcanzar al 100 %.

20 Como se usa en la presente invención, la sustancia aislada se separa de su entorno original. Los polipéptidos que existen de manera natural dentro de las células vivas no están aislados; sin embargo, los mismos polipéptidos que se separan de las sustancias con las que coexisten en el estado natural deben considerarse aislados y, aunque se mejora la pureza, así se purifican.

25 La denominada "secuencia de aminoácidos" o "polipéptido" se refiere a un péptido, oligopéptido, polipéptido o proteína y su fragmento parcial, que consta de aminoácidos que están conectados entre sí por enlaces peptídicos. Cuando la secuencia de aminoácidos en la presente invención está relacionada con la secuencia de aminoácidos de una molécula de proteína de origen natural o un polipéptido descrito conocido, sintetizado artificialmente, tal molécula de proteína de origen natural o polipéptido conocido no pretende limitar la secuencia de aminoácidos de la totalidad de la secuencia de aminoácidos de dicha molécula de proteína o dicho polipéptido conocido. La secuencia de aminoácidos de la invención puede comprender péptidos adicionales, tales como etiqueta de histidina múltiple (His-tag) o etiqueta de epítipo como Myc, FLAG o similares. La secuencia de aminoácidos de la invención también puede comprender D-aminoácidos sintetizados artificialmente, que sustituyen a uno o más L-aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha molécula de proteína o dicho polipéptido conocido.

30 El "fragmento funcional" de un polipéptido como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier parte o porción del polipéptido de la invención, que retiene una actividad o función biológica sustancialmente similar o idéntica del polipéptido original del cual es parte (el polipéptido original).

La "variante funcional" de un polipéptido como se usa en la presente memoria se refiere a secuencias de aminoácidos que tienen una actividad o función biológica sustancialmente similar o idéntica del polipéptido o secuencia de aminoácidos, incluyendo, por ejemplo, 1) la secuencia de aminoácidos original con una o más eliminaciones de aminoácidos y/o adición de uno o más aminoácidos; o 2) uno o más de los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos original sustituidos por uno o más aminoácidos conservadores o no conservadores; o 3) un grupo en uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos sustituidos por otro grupo; o 4) la secuencia de aminoácidos original fusionada con otra molécula o compuesto (como azúcar, lípidos, polietilenglicol, etc.); o 5) secuencia de aminoácidos original fusionada con secuencia de polipéptido adicional (por ejemplo, una secuencia líder o una secuencia de señal de secreción o una secuencia de polipéptido usada con fines de purificación); o 6) un análogo retroinverso de la secuencia de aminoácidos original; o 7) combinación de los anteriores.

En el que "eliminación" se refiere a la eliminación de una o una pluralidad de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos.

"Insertar" o "agregar" se refiere al aumento de una o una pluralidad de aminoácidos causado por el cambio de secuencia de aminoácidos en comparación con las moléculas de la presencia natural o antes del cambio.

"Sustitución" se refiere a uno o una pluralidad de aminoácidos reemplazados por diferentes aminoácidos.

"Eliminación, sustitución o adición de una o una pluralidad de aminoácidos" se refiere al uso de procedimientos conocidos de mutación de ácidos nucleicos, como el procedimiento de mutagénesis dirigida para eliminar, sustituir o agregar varios aminoácidos en el grado en que la eliminación, sustitución o adición sean posibles. La mutación anterior no se limita a mutaciones inducidas artificialmente por procedimientos conocidos, sino que también incluye una mutación que se produce de manera natural en ácido nucleico o proteína que puede separarse y purificarse.

El porcentaje de "homología" o "identidad" de la secuencia de aminoácidos se refiere a un porcentaje de identidad o similitud de secuencia en la comparación con dos o más secuencias de aminoácidos. Existen muchos procedimientos para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para la persona experimentada, como el programa MEGALIGN (Lasergene Software Packages, DNASTA Inc., Madison, WI). El programa MEGALIGN puede comparar dos o más secuencias en base a los diferentes tipos de procedimientos, tales como el procedimiento de racimo (véase Higgins & Sharp, Gene 73:237-244 (1988)). Cada conjunto de secuencia se alinea por racimos al verificar la distancia entre los pares, y luego el racmo se asigna por pares o grupos. El porcentaje de similitud de dos secuencias de aminoácidos, Secuencia A y Secuencia B, se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{\text{(el número de residuos acoplados entre la Secuencia A y Secuencia B)}}{\text{(el número de residuos de la secuencia A - el número de residuos de la secuencia A en los intervalos - el número de residuos de la secuencia B en los intervalos)}} \right] \times 100 \%$$

En la invención, "enfermedades hepáticas crónicas resultantes de la infección por el virus de la hepatitis B" se refiere a enfermedades hepáticas causadas por la infección por el virus de la hepatitis B, que incluyen hepatitis crónica, cirrosis hepática después de hiperplasia del tejido conectivo fibroso en tejido hepático causada por hepatitis repetida y cánceres de hígado en base a cirrosis hepática.

En la invención, "tratamiento" y "prevención" y palabras derivadas de los mismos no significan tratamiento o prevención al 100% o completamente, pero pueden identificarse como el grado de tratamiento o prevención aprobado por las personas experimentadas. En la invención, podría entenderse por "prevención" el retraso de la aparición de la enfermedad, o de sus síntomas o trastornos.

Polipéptido

La presente invención proporciona polipéptidos aislados o purificados. Dichos polipéptidos son polipéptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos Gly-Ser-Ala-Val-Met-Phe-Ser-Ser-Lys-Glu-Arg-Gly (es decir, la SEQ ID NO: 1, en la presente memoria denominado L-TTK001) en el que uno o más L-aminoácidos naturales están sustituidos con los correspondientes D-aminoácidos sintetizados artificialmente. La presente invención demostró que tales polipéptidos pueden inhibir significativamente la actividad de HBx, por lo tanto, exhiben la función de inhibir la replicación del ADN del virus de la hepatitis B y la expresión de antígenos relacionados (por ejemplo, HBeAg), e inhiben aún más la aparición y el desarrollo de enfermedades hepáticas crónicas después de la infección por virus de la hepatitis B, especialmente hepatitis, cirrosis hepática y cáncer de hígado.

En la invención, cualquier número de L-aminoácidos en el polipéptido L-TTK001 puede sustituirse con los correspondientes D-aminoácidos, se pueden reemplazar tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 L-aminoácidos.

De acuerdo con una realización de la invención, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención es la secuencia de L-TTK001 en la que 10 L-aminoácidos, excepto la glicina, se reemplazan con los correspondientes D-aminoácidos (es decir, Gly-D-Ser-D-Ala-D-Val-D-Met-D-Phe-D-Ser-D-Ser-D-Lys-D-Glu-D-Arg-Gly, SEQ ID NO: 2, en la presente memoria denominado L-TTK001).

5 Dado que la peptidasa natural no puede usar D-aminoácidos como sustratos, utilizando los D-aminoácidos correspondientes para sustituir uno o más L-aminoácidos del polipéptido, es posible obtener polipéptidos con mayor estabilidad *in vivo*. Los estudios han demostrado que, por ejemplo, la presencia de D-aminoácidos en N-terminal o C-terminal puede aumentar la estabilidad *in vivo* de los polipéptidos (Powell et al., Pharm.Res.10: 1268-1273 (1993)). Pero dado que los D-aminoácidos y los L-aminoácidos tienen una quiralidad diferente, es decir, una configuración estereoquímica diferente, se forman estructuras de "imagen especular", los polipéptidos que comprenden D-aminoácidos no siempre tienen la misma capacidad de enlace o función biológica que los L-polipéptidos originales. Por lo tanto, es difícil predecir si dos moléculas polipeptídicas que tienen las mismas secuencias de aminoácidos pero que tienen diferentes configuraciones de aminoácidos tienen las mismas funciones. Por consiguiente, excepto en la realización de experimentos reales sobre los polipéptidos modificados que comprenden D-aminoácidos, no se puede determinar si los polipéptidos que comprenden D-aminoácidos tienen la misma eficacia que los polipéptidos originales. En la práctica, si es necesario modificar un polipéptido farmacéutico que comprende L-aminoácidos en un polipéptido farmacéutico que comprende D-aminoácidos, con el fin de mantener o potenciar su función farmacodinámica, es necesario que el personal técnico realice numerosos experimentos y una optimización continua, sobre cómo modificar específicamente el polipéptido, tal como, cual de uno o más aminoácidos se sustituirán o qué posición se sustituirá.

En general, para un polipéptido que contiene residuos de D-aminoácidos, cuanto menor sea el número de residuos de L-aminoácidos sustituidos por residuos de D-aminoácidos, menor será el cambio en la capacidad de enlace del polipéptido. Cuando se sustituye un gran número de L-aminoácidos, el cambio en la capacidad de enlace de polipéptidos y la eficacia biológica aumentará en consecuencia, incluso dará como resultado su pérdida total.

25 Sin embargo, los inventores de la presente invención descubrieron a través de la experimentación que cuando uno o más L-aminoácidos del polipéptido L-TTK001 son sustituidos por D-aminoácidos, dicho polipéptido sustituido mantiene sustancialmente la misma función biológica que el polipéptido L-TTK001, incluyendo: inhibir la replicación y expresión del virus de la hepatitis B a nivel celular y animal, tratar la hepatitis viral causada por el virus de la hepatitis a nivel animal e inhibir posteriormente el crecimiento de células de cáncer de hígado.

30 Los inventores de la presente invención también descubrieron sorprendentemente que incluso cuando todos los L-aminoácidos de L-TTK001 se sustituyeron por D-aminoácidos sintetizados artificialmente (es decir, el polipéptido obtenido es D-TTK001), el enlace *in vitro* de dicho polipéptido sustituido a la proteína HBx no se ha modificado significativamente. Por ejemplo, de acuerdo con los resultados del análisis de enlace *in vitro*, el enlace *in vitro* del L-polipéptido L-TTK001 a HBx (8 nM) no mostró diferencias significativas en comparación con el enlace *in vitro* de D-TTK001 a HBx (35 nM).

40 Dado que los aminoácidos contenidos en D-TTK001 son todos D-aminoácidos, el polipéptido D-TTK001 también tiene buenos resultados farmacocinéticos. Por lo tanto, los inventores descubrieron que los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo, D-TTK001, pueden lograr una eficacia farmacéutica eficaz con dosis mucho más bajas que L-TTK001 y con procedimientos de administración diferentes a los de L-TTK001, como por inyección intravenosa en la cola del animal.

45 De manera relevante, los inventores descubrieron que los polipéptidos de la invención exhiben efectos más notables que los L-polipéptidos (por ejemplo, L-TTK001) sobre la inhibición de la replicación del ADN de HBV y la expresión de antígenos relacionados (por ejemplo, HBeAg), e inhibiendo adicionalmente la aparición y desarrollo de enfermedades hepáticas crónicas después de la infección por el virus de la hepatitis B (que incluyen hepatitis, cirrosis hepática y cáncer de hígado) especialmente para la hepatitis, debido a la propiedad farmacocinética y estabilidad de los polipéptidos. Por ejemplo, la dosis eficaz de D-polipéptido sobre la inhibición del nivel de secreción de HBeAg son órdenes de magnitud más baja que la del L-polipéptido; mientras que con base en la mejora de la estabilidad, los polipéptidos de la invención también son ventajosos con respecto a los L-polipéptidos compuestos por L-aminoácidos en la selección de las vías de administración.

50 También se divulgan diversos fragmentos funcionales de polipéptidos de la invención. Dichos fragmentos funcionales pueden ser cualquier fragmento de la secuencia de aminoácidos continua del polipéptido de la presente invención con la condición de que los fragmentos funcionales puedan retener la actividad biológica del polipéptido original en un alcance similar, en el mismo alcance o en un mayor alcance en comparación con el polipéptido original, por ejemplo, inhibición de la actividad de HBx. Con referencia al polipéptido original, los fragmentos funcionales pueden tener, por ejemplo, aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, 105 %, 110 %, 120 %, 150 %, 200 % o incluso mayor actividad de la proporcionada por el polipéptido original. Dichos fragmentos funcionales también pueden contener aminoácidos adicionales en uno o ambos del terminal amino y del terminal carboxilo de diversos fragmentos de la secuencia continua de aminoácidos, por ejemplo, aminoácidos diferentes de los de la secuencia en el aminoácido del polipéptido original. Dichos aminoácidos adicionales no obstaculizan la función biológica de dicho fragmento funcional, por ejemplo, inhibición de

la actividad de HBx, inhibición de la replicación y expresión del virus HBV e inhibición eficaz de la aparición y desarrollo de hepatitis y desarrollo de cáncer de hígado. Más deseablemente, dichos aminoácidos adicionales pueden conducir a una actividad biológica potenciada en comparación con la actividad biológica del polipéptido original. En una realización de acuerdo con la presente invención, las secuencias de aminoácidos de los péptidos de la presente invención tienen al menos un 70 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de la presente invención; más preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de los péptidos de la presente invención tienen al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de la presente invención.

Además, también se divulgan variantes funcionales del polipéptido y los fragmentos funcionales del mismo. Las variantes funcionales del polipéptido y los fragmentos funcionales del mismo deben retener una actividad biológica sustancialmente similar o idéntica con el polipéptido original o los fragmentos funcionales del mismo, por ejemplo, inhibición de la actividad HBx, inhibición de la replicación y expresión del virus HBV, tratamiento de la hepatitis viral causada por el virus del HBV a nivel animal de ratones transgénicos del HBV, y la inhibición del fenotipo maligno de células de cáncer de hígado. Los polipéptidos de la invención pueden tener, por ejemplo, aproximadamente 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos originales. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de acuerdo con la invención tienen al menos un 70 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de la invención; más preferiblemente, las realizaciones del polipéptido de la invención difieren del polipéptido original en solo 1-3 aminoácidos; lo más preferiblemente, las realizaciones del polipéptido de la invención difieren del polipéptido original en solo 1 aminoácido.

También se divulgan secuencias de aminoácidos de los polipéptidos sometidos a al menos una sustitución conservadora de aminoácidos. Específicamente, los polipéptidos pueden someterse a 1, 2, 3, 4, 5 o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. Alternativamente, también se divulgan secuencias de aminoácidos de polipéptidos sometidos a al menos una sustitución de aminoácidos no conservadora del polipéptido original o fragmentos funcionales del mismo. Específicamente, se divulga la secuencia de aminoácidos que tiene 2, 3, 4, 5 o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras del polipéptido original o fragmentos funcionales del mismo. En estos casos, las sustituciones de aminoácidos no interfieren con, ni inhiben las actividades biológicas de los polipéptidos de la invención o fragmentos funcionales de los mismos. Más preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos aumentan adicionalmente las actividades biológicas de los polipéptidos de la invención o fragmentos funcionales de los mismos.

Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son bien conocidas en la técnica, lo que significa sustituciones de aminoácidos en las que un aminoácido que tiene ciertas propiedades físicas y/o químicas se sustituye por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades químicas o físicas. Las personas experimentadas en la técnica comprenderán que las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden no provocar cambios significativos en la estructura o función de la proteína. Por ejemplo, las sustituciones conservadoras típicas de aminoácidos incluyen un aminoácido ácido sustituido con otro aminoácido ácido (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituida con otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val, etc.), un aminoácido básico sustituido con otro aminoácido básico (Lys, Arg, etc.), un aminoácido con una cadena lateral polar sustituida con otro aminoácido de cadena lateral polar (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr, etc.), un aminoácido aromático (Trp, Phe, Tyr, etc.) sustituido por otro aminoácido aromático, etc.

Los polipéptidos de la invención son como se describen en las reivindicaciones adjuntas y retienen las actividades biológicas esenciales del polipéptido original, por ejemplo, inhibición de la actividad HBx, inhibición de replicación y expresión del virus de HBV a nivel celular y a nivel del animal, y tratamiento de hepatitis viral causada por el virus de HBV, incluida la inhibición del crecimiento de células cancerosas de hígado en estadios avanzados.

En una realización, los polipéptidos de la invención y variantes funcionales de los fragmentos funcionales de los mismos tienen solo un aminoácido diferente del polipéptido original de la SEQ ID NO: 1, y tienen una actividad y función biológica similar al polipéptido original de la SEQ. ID NO: 1, por ejemplo, inhibición de la actividad de HBx e inhibición eficaz de células cancerosas, preferiblemente células de cáncer de hígado, especialmente células de cáncer de hígado que expresan HBx.

Los polipéptidos de la invención (incluidos los fragmentos funcionales) y las variantes funcionales de los mismos descritos en la presente memoria también pueden comprender un péptido que penetra en las células (CPP). Tal CPP facilita la entrada del polipéptido de la invención a través de la membrana celular y dentro de la célula. Los CPP son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Deshayes et al., Cell. Mol. Life Sci. 62: 1839-1849 (2005); El-Andaloussi et al., Curr. Pharm. Design. 11: 3597-3611(2005). El CPP descrito en la presente memoria puede ser cualquiera de los conocidos en la técnica.

Los polipéptidos de la invención (incluidos los fragmentos funcionales) y variantes funcionales de los mismos, por ejemplo, se pueden lipídizar (por ejemplo, con ácidos grasos), glicosilar, amidar, carboxilar, fosforilar, esterificar, N-acilado, ciclar mediante un enlace disulfuro, convertir en una sal de adición de ácido, dimerizar o polimerizar y/o conjugar.

Los polipéptidos de la invención (incluyendo fragmentos funcionales) y variantes funcionales de los mismos, incluyendo derivados de estos tales como derivados de ácidos grasos, pueden ser un péptido monomérico, un péptido dimérico o un péptido multimérico.

5 Los polipéptidos de la invención (incluidos los fragmentos funcionales) y las variantes funcionales de los mismos pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2005; Reid, R., Peptide and Protein Drug Analysis, Marcel Dekker Company, 2000; y Patente de Estados Unidos No. 5,449,752). Además, los polipéptidos se pueden producir de forma recombinante usando procedimientos recombinantes estándar (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001). Además, algunos de los polipéptidos de la invención (incluidos fragmentos funcionales y variantes funcionales de los mismos) pueden aislarse y/o purificarse a partir de una fuente, como una planta, una bacteria, un insecto, un mamífero, por ejemplo, una rata, un humano, etc. Los procedimientos de aislamiento y purificación son bien conocidos en la técnica. Alternativamente, los polipéptidos descritos en la presente memoria (que incluyen fragmentos funcionales y variantes funcionales de los mismos) pueden sintetizarse u obtenerse de empresas comerciales.

Conjugado

La presente invención también divulga conjugados, por ejemplo, bioconjugados, que comprenden los polipéptidos de la invención (que incluyen fragmentos funcionales o variantes funcionales) o peptidomiméticos. Los conjugados, así como los procedimientos para sintetizar conjugados en general, se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Hudecz, F., Methods Mol Biol. 298: 209-223 (2005) y Kirin et al., Inorg Chem. 44(15): 5405-5415 (2005)).

Composición farmacéutica

Los materiales mencionados anteriormente de la presente invención, incluidos polipéptidos (incluidos fragmentos funcionales) y variantes funcionales de los mismos, etc. (en lo sucesivo denominados colectivamente "los materiales de la invención") pueden aislarse, purificarse, sintetizarse y/o recombinarse.

25 Los materiales de la invención también se pueden formular en una composición, tal como una composición farmacéutica. En este respecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los polipéptidos (incluidos fragmentos funcionales y variantes funcionales) y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la invención que contiene cualquiera de los materiales de la invención puede comprender más de un material de la invención, por ejemplo, dos o más polipéptidos diferentes. 30 Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender un material en combinación con otro fármaco o agente farmacéutico activo. Preferiblemente, dicho otro agente farmacéutico o fármaco activo puede incluir, tal como un agente quimioterapéutico, por ejemplo, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, damiorrabicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiaurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica comprende el material de la invención en combinación con un lípido. Dicho lípido puede ser cualquier lípido, incluyendo un ácido graso, un fosfolípido, un esteroide, un esfingolípido, un terpeno, un glicerolípido, un glicerofosfolípido, un lípido prenol, un sacarolípido, un policétido y similares. Tales lípidos son conocidos en la técnica.

Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser cualquiera de los usados convencionalmente y está limitado solo por consideraciones químico-físicas, tales como solubilidad y falta de reactividad con el compuesto o compuestos activos, y por la ruta de administración. Los portadores farmacéuticamente aceptables descritos en la presente memoria, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes y diluyentes, son bien conocidos por las personas experimentadas en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. Preferiblemente, el portador farmacéuticamente aceptable es químicamente inerte para el agente o agentes activos y no tiene efectos secundarios perjudiciales o toxicidad bajo las condiciones de uso.

45 La elección del portador estará determinada en parte por el material particular de la invención, así como por el procedimiento particular utilizado para administrar el material de la invención. Por consiguiente, existe una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Las siguientes formulaciones para administración oral, en aerosol, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, interperitoneal, rectal y vaginal son ejemplares y de ninguna manera son limitantes. Puede usarse más de una ruta 50 para administrar los materiales de la invención y, en ciertas situaciones, una ruta particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra ruta.

En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica es una formulación tópica, una formulación intravenosa o una formulación subcutánea. En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica es una formulación tópica. Las formulaciones tópicas son bien conocidas por las personas experimentadas en la técnica. Tales formulaciones son particularmente adecuadas en el contexto donde la invención se aplica a la piel. La formulación tópica de la invención puede ser, por ejemplo, una crema, una loción, un ungüento, un parche, un aceite, una pasta, un aspersion, por ejemplo, un aspersion en aerosol, un gel, un líquido en

forma de bola rodante, una barra sólida, etc. Preferiblemente, la formulación tópica de la invención es una crema, una loción, un ungüento o un parche.

5 Formulaciones adecuadas para administración oral pueden estar compuestas por (a) soluciones líquidas, como una cantidad eficaz del material de la invención disuelto en diluyentes, como agua, solución salina o zumo de naranja; (b) cápsulas, comprimidos y grageas, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y polietilenglicoles, con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsulas pueden ser del tipo ordinario de gelatina de cáscara dura o blanda, que contienen, por ejemplo, 10 tensioactivos, lubricantes y agentes de carga inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir una o más de, lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, acacia, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes desintegrantes, agentes humectantes, conservantes, agentes 15 saborizantes y otros excipientes farmacológicamente compatibles. Las formas de gragea pueden comprender el material de la invención en un agente saborizante, generalmente sacarosa o acacia, así como pastillas que comprenden el material de la invención en una matriz inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia, además, emulsiones, geles y similares que contienen excipientes conocidos en la técnica.

20 Los materiales de la invención, solos o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden convertir en formulaciones en aerosol para su administración por inhalación. Estas formulaciones en aerosol se pueden colocar en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. También se pueden formular como preparaciones sin presión, como en un nebulizador o atomizador. Estas formulaciones por aspersión también se pueden utilizar para aplicar por aspersión a mucosas.

25 Formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. El material de la invención se puede administrar en un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, como un líquido estéril o una mezcla de líquidos, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y 30 soluciones azucaradas relacionadas, un alcohol, como etanol o alcohol hexadecílico, un glicol, como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, aceites, ácidos grasos, ésteres o glicéridos de ácidos grasos o glicéridos acetilados de ácidos grasos con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, como un jabón o un detergente, un agente de suspensión, como pectina, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes 35 farmacéuticos.

Los aceites, que se pueden usar en formulaciones parenterales, incluyen aceites de petróleo, animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de oliva, aceite de petróleo y aceite mineral. Los ácidos grasos adecuados para uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico.

40 Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales de ácidos grasos de metales alcalinos y sales de trietanolamina, y contienen detergentes adecuados que incluyen (a) detergentes catiónicos tales como haluros de dimetil dialquil amonio y haluros de alquil piridinio, (b) detergentes aniónicos tales como alquilo, arilo y sulfonatos de olefina, alquilo, olefina éter y sulfatos de monoglicérido, y sulfosucinato, etc., (c) detergentes no iónicos como, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de polioxi-etilenopolipropileno, etc., (d) detergentes anfóteros tales como alquil-β-aminopropionatos y sales de amonio 45 cuaternario de 2-alquil-imidazolina, y (e) mezclas de los mismos.

Las formulaciones parenterales contendrán típicamente de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 25 % (porcentaje en peso en volumen) del material de la invención en solución. Se pueden usar conservantes y tampones. Para minimizar o eliminar la irritación en el lugar de la inyección, tales composiciones pueden contener uno o más 50 tensioactivos no iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB). La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones variará típicamente de aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 % (peso en porcentaje en volumen). Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol y sorbitán y aductos de óxido de etileno de alto peso molecular con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales pueden presentarse en envases sellados de dosis individual o 55 multidosis, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) requiriendo solo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de usar. Pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

60 Los materiales de la invención o composiciones que comprenden el material de la invención se pueden convertir en formulaciones inyectables. Los requisitos de portadores farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables son

bien conocidos por las personas de experiencia ordinaria en la técnica. Preferiblemente, cuando se administra a células, por ejemplo, células dendríticas, las células se administran mediante inyección.

Además, los materiales de la invención, o composiciones que comprenden dichos materiales, pueden convertirse en supositorios mezclándolos con una variedad de bases, tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua.

5 Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones por aspersión que contienen, además del ingrediente activo, tales portadores que se sabe que son apropiados en la técnica.

10 Las personas experimentadas en la técnica apreciarán que, además de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, los materiales de la invención se pueden formular como complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina o liposomas.

15 Para los propósitos de la invención, la cantidad o dosis del material de la invención administrada debería ser suficiente para producir, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica, en el sujeto o animal durante un período de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material de la invención debería ser suficiente para inhibir la proliferación de una célula enferma, o tratar o prevenir una enfermedad (por ejemplo, tumor o cáncer) en un período de aproximadamente 2 horas o más, por ejemplo, 12 a 24 horas o más, desde el momento de la administración. En ciertas realizaciones, el período de tiempo podría ser incluso mayor. La dosis estará determinada por la eficacia del material particular de la invención y la condición del animal (por ejemplo, humano), así como el peso corporal del animal (por ejemplo, humano) que se va a tratar. Se conocen en la técnica muchos ensayos para determinar una dosis administrada. La dosis del material de la invención también estará determinada por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un material particular.

20 Una persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciará fácilmente que los materiales de la invención pueden modificarse de diversas formas, de modo que la eficacia terapéutica o profiláctica de los materiales se incrementa mediante la modificación. Por ejemplo, los materiales se pueden conjugar directa o indirectamente a través de un enlazador a una fracción de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos, por ejemplo, los materiales de la invención, a fracciones direccionadas es conocida en la técnica. Véanse, por ejemplo, Wadwa et al., J. Drug Targeting 3:111 (1995) y la patente de Estados Unidos No. 5,087,616. En una realización adicional, los materiales de la invención se pueden modificar en una forma de depósito, de modo que la manera en que los materiales se liberan en el cuerpo al que se administra se controla con respecto al tiempo y ubicación dentro del cuerpo (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 4,450,150). Las formas de depósito de los materiales de la invención pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende los materiales de la invención y un material poroso o no poroso, como un polímero, en el que los materiales de la invención están encapsulados por o difundidos por todo el material y/o degradación del material no poroso. A continuación, el depósito se implanta en la ubicación deseada dentro del cuerpo y los materiales de la invención se liberan del implante a una tasa predeterminada.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención, que incluyen polipéptidos (incluidos fragmentos funcionales) y variantes funcionales de los mismos, pueden usarse en procedimientos para prevenir e inhibir enfermedades hepáticas crónicas inducidas por infección por el virus de la hepatitis B, incluida la hepatitis viral y la cirrosis hepática y cánceres de hígado resultantes. Las personas de experiencia ordinaria en la técnica deben comprender fácilmente que las enfermedades hepáticas crónicas inducidas por el virus de la hepatitis B descritas en la presente invención pueden estar presentes en cualquier huésped. Preferiblemente, el huésped es un mamífero. Especialmente
30
35
40 preferible, el huésped es un humano.

La presente invención se ilustrará adicionalmente a continuación con referencia a los ejemplos específicos. Debe entenderse que estos ejemplos solo se utilizan para describir la invención, pero no para limitar el alcance de la invención. Los procedimientos experimentales sin condiciones específicas descritos en los siguientes ejemplos se realizan generalmente bajo condiciones convencionales, y los materiales usados sin una descripción específica se compran de la corporación de reactivos químicos comunes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diseño y preparación de polipéptidos

Síntesis artificial del fragmento de polipéptido D-TTK001:

50 Polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos Gly-D-Ser-D-Ala-D-Val-D-Met-D-Phe-D-Ser-D-Ser-D-Lys-D-Glu-D-Arg-Gly (SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo, D-TTK001) se sintetizan mediante procedimientos sintéticos artificiales. El polipéptido se preparó mediante el procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida, tal como se llevó a cabo en el sintetizador de péptidos AAPTEC Apex396 (adquirido de Hong Kong Universal Analytical & Testing Instruments Ltd.); la síntesis se realizó de acuerdo con la secuencia SEQ ID NO: 1, desde el terminal carboxilo terminal C al terminal amino terminal N, para sintetizar el aminoácido en el reactor de vidrio sellado a prueba de explosión. Esto se refiere a que el primer monómero de aminoácido agregado a la secuencia de aminoácidos de Gly-D-Ser-D-Ala-D-Val-D-Met-D-Phe-D-Ser-D-Ser-D-Lys-D-Glu-D-Arg-Gly fue Gly en el terminal C, seguido de D-Arg y luego D-Glu, hasta que se agregaron los últimos D-Ser y Gly en el terminal N. El péptido
55 resultante se obtuvo añadiendo, reaccionando y sintetizando repetidamente. La síntesis de péptidos en fase sólida

redujo en gran medida las dificultades de purificación de los péptidos resultantes en cada una de las etapas. Las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la reacción se protegieron para evitar reacciones secundarias. Los grupos carboxilo terminales no estaban enlazados, por lo que deben activarse antes de la reacción.

5 El polipéptido D-TTK001 sintetizado artificialmente se analizó mediante HPLC (con columna PLC Agela C18). La figura 1 mostró que la pureza es del 97,2 %.

Ejemplo 2:

A. Medición de la capacidad de enlace *in vitro*

10 El plásmido recombinante (pET-30a-HBx) que expresa el gen HBx se autoconstruyó y se conservó (Zhang H, et al. J Biomed Biotechnol, doi:10.1155/2009/289068), y luego se llevó a cabo la expresión y purificación de HBx de acuerdo con la referencia anterior para la medición de la capacidad de enlace *in vitro*. Se utilizó la unidad de análisis de interacción biomolecular Biacore 3000 (fabricada por GE Healthcare) para medir la capacidad de enlace *in vitro* del polipéptido D-TTK001 a la proteína HBx expresada de forma recombinante. Se inyectaron polipéptidos a diferentes concentraciones durante 180 segundos a una tasa de 30 μ l/min. En la etapa de disociación, se inyectó tampón HBS-EP durante 900 segundos a una tasa de 30 μ l/min, luego a una tasa de 30 μ l/min, se inyectaron 2 inyecciones de NaOH 1mM durante 20 segundos para regenerar el chip. Todas las señales se calibraron utilizando el canal 1 como el canal de referencia. La medición de enlaces se realizó dos veces, respectivamente, en la que, en la primera medición, se inyectó HBX en el canal del polipéptido acoplado y el canal en blanco a concentraciones de 0 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM y 600 nM, respectivamente. El tiempo de enlace fue de 180 segundos y el tiempo de disociación fue de 400 segundos. Sobre la superficie del chip, se inyectó NaOH 1 mM durante 20 segundos a una tasa de 30 μ l/min para la regeneración. Los resultados se analizaron cinéticamente mediante software, como se muestra en la Figura 2. En la segunda medición, se inyectó HBX en el canal del polipéptido acoplado y el canal en blanco a concentraciones de 0 nM, 10 nM, 50 nM, 588 nM, 1 μ M y 2 μ M, respectivamente. El tiempo de enlace fue de 180 segundos y el tiempo de disociación fue de 400 segundos. Sobre la superficie del chip, se inyectó NaOH 1 mM durante 20 segundos a una tasa de 30 μ l/min para la regeneración. Los resultados se analizaron cinéticamente mediante BIA Evaluation Software.

Los resultados de dos mediciones de enlace se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados del análisis de afinidad de enlace

Muestra	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
D-TTK001~HBx Primera medición	2,72e4	8,11e-4	2,99e-8
D-TTK001~HBx Segunda medición	6,76e4	2,72e-3	4,03e-8

30 Los datos muestran que aunque el enlace *in vitro* de D-TTK001 a HBx fue menor que el del anti-HBxPI# L-polipéptido, no hay diferencia en el orden de magnitud.

B. Experimentos de eficacia *in vitro*

1. Líneas celulares:

Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en los experimentos

Línea celular	Características, uso y notas	Origen
HepG2-X	HepG2 transfectada de manera estable con el gen HBx Wang Q, et al. Neoplasia. 2010; 12(2):103-15.	auto construido y conservado
HepG2.2.15	HepG2 transfectado de manera estable con el genoma completo del HBV	Adquirido de Shanghai Jinma Biotech Co., Ltd.
HepAD38	Célula de cáncer de hígado integrada de manera estable con el ADN del HBV, su expresión regulada por tetraciclina	Adquirido de Shanghai Sixin Biotech Co., Ltd.

35 2. Principales reactivos:

Reactivo	Origen
medio RPMI1640	Gibco
medio DMEM	Gibco

(continuación)	
Reactivo	Origen
Lipofectamina 2000	Invitrogen
Milicina	Solarbio
Tripsina	BBI
Suero bovino fetal	Hyclone
Kit de ensayo de HBeAg	Shanghai Kehua Bio-engineering Co., Ltd

3. Análisis de la función de D-TTK001 en la secreción de HBeAg en células de cáncer de hígado utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

5 (1) Cultivo celular

(i) La cabina de bioseguridad se esterilizó con ultravioleta durante 30 min y se purgó durante 30 minutos; medio de cultivo DMEM/F12 (1:1) que contenía suero bovino fetal al 15 %, se sacaron células HepAD38 (o células HepG2.2.15), se esterilizaron con alcohol al 75 % y se colocaron en la cabina de bioseguridad.

10 (ii) Bajo condiciones asépticas, desechar el medio de cultivo viejo, agregar 3 ml cada vez de 1×PBS, lavar dos veces, agregar 1 ml de tripsina al 0,25 %, las células se digirieron hasta el redondeo celular como se observa en el microscopio. Agregar 5 ml de medio de cultivo, dispensar células, contar con un hemocitómetro y diluir con medio de cultivo hasta un número de células de $1\sim 2\times 10^4$ células/ml.

15 (iii) sembrar en placas de 96 pocillos. Bajo condiciones asépticas, desechar el medio de cultivo viejo, agregar cada vez 3 ml de 1×PBS, lavar dos veces, agregar 1 ml de tripsina al 0,05 %, las células se digirieron hasta el redondeo celular como se observa en el microscopio. Agregar 10 ml de medio de cultivo, dispensar las células, contar con hemocitómetro y diluir con medio de cultivo DMEM/F12 (1:1), agregar 100 µl de suspensión celular en cada pocillo hasta un número de células de $1\sim 2\times 10^3$ células/ml. A los pocillos más externos no se le agregan células. Cultivar hasta la unión y extensión celular (generalmente 12 horas). Se pueden realizar pruebas posteriores cuando las células estén en buenas condiciones.

20 (2) Aplicar D-TTK001 (o L-TTK001, es decir, anti-HBxPI#) a células HepAD38 de cáncer de hígado (o células HepG2.2.15)

La solución madre de D-TTK001 10 mM (o L-TTK001) se diluyó en serie, de alta concentración a baja concentración, se añadió a la solución de cultivo de células HepAD38 (o células HepG2.2.15) de cáncer de hígado para obtener concentraciones finales de D-TTK001 (o L-TTK001) de 0,1 µM, 1 µM, 10 µM y 100 µM en los grupos respectivos. Para el grupo de control negativo, agregar 10 µl de ddH₂O esterilizado e incubar durante 72 horas en una incubadora de CO₂ al 5 % a 37 ° C.

25 (3) Usar ELISA para medir el contenido de HBeAg en medio de cultivo celular HepAD38 (o células HepG2.2.15)

(i) Equilibrado: colocar el kit de ensayo HBeAg a temperatura ambiente durante 30 minutos.

(ii) Preparar la solución: diluir 25 veces con agua purificada el líquido de lavado concentrado.

30 (iii) Sacar la placa: sacar la placa de reacción de acuerdo con los requisitos experimentales (3 pocillos para control negativo, 1 pocillo para control positivo y 1 pocillo para control en blanco).

(iv) Agregar la muestra: agregar 75 µl de muestras de prueba o control negativo/positivo en los pocillos respectivos, agitar y mezclar suavemente.

(v) Incubar: después de sellar con sellador de microplacas, incubar a 37 ° C durante 60 minutos.

35 (vi) Agregar la enzima: agregar 50 µl de conjugados de enzima en cada pocillo excepto en los pocillos en blanco, agitar suavemente y mezclar.

(vii) Incubar: después de sellar con sellador de microplacas, incubar a 37 ° C durante 30 minutos.

(viii) Lavar la placa: retirar el sellador de microplacas con cuidado, lavar manualmente la placa 5 veces y secar sin frotar.

40 (ix) Revelado de color: agregar 50 µl de cada uno de los agentes reveladores de color líquido A y B, agitar suavemente y mezclar, revelar el color en la oscuridad, a 37 ° C durante 30 minutos.

(x) Detener: agregar 50 µl de solución de detención en cada pocillo, agitar suavemente y mezclar, medir el resultado en diez minutos. Configurar la longitud de onda del lector de microplacas en 450 nm, medir el valor de OD para cada pozo después de configurar a cero con los pocillos en blanco.

5 Como se muestra en la Figura 3 y la Figura 4, D-TTK001 (o L-TTK001) exhibió un efecto de inhibición sobre los niveles de secreción de HBeAg de las células HepAD38 (o células HepG2.2.15) con una dependencia de la dosis. La dosis mínima eficaz de D-TTK001 es 0,1 µM; la dosis mínima eficaz de L-TTK001 es de 10 µM. Por lo tanto, el efecto de D-TTK001 sobre HBeAg es mejor que el de L-TTK001 sobre HBeAg. Se emplea la prueba t de Student para el análisis estadístico, * P <0,05, ** P <0,01.

4. Ensayo MTT

10 (1) Sembrar células en placa: suspender las células HepAD38 en fase exponencial en medio RPMI1640 con FBS al 10 % y sembrar en placa 4.000-5.000 células en una placa de 96 pocillos con 100 µl por pocillo.

(2) Cultivar células: dentro de las 12 horas para la adhesión de las células cultivadas, agregar diferentes concentraciones de polipéptidos D-TTK001 (o L-TTK001) sintetizados del Ejemplo 1 (0,1 µM, 1 µM, 10 µM y 100 µM) en 8 pocillos para cada concentración, e incubar durante 48 horas en condiciones comunes.

15 (3) Coloración: agregar 20 µl de solución de MTT (5 mg/ml de MTT en tampón PBS (pH 7,4)) para cada pocillo.

(4) Incubar durante 4 horas y aspirar cuidadosamente el sobrenadante de los pocillos. Agregar 150 µl de DMSO en cada pocillo, agitar durante 10 minutos hasta que los cristales se disuelvan.

(5) Comparación: leer en un lector ELISA a 490 nm para medir la absorbancia para cada pocillo. Los resultados se calcularon utilizando la prueba t de Student.

20 Como se muestra en la Figura 5, D-TTK001 (o L-TTK001) exhibió un claro efecto de inhibición sobre el crecimiento y proliferación de células HepAD38 con una dependencia de la dosis. La dosis mínima efectiva de D-TTK001 y L-TTK001 es de 10 µM. Se emplea la prueba t de Student para el análisis estadístico, * P <0,05, ** P <0,01.

Ejemplo 3: experimentos de eficacia de polipéptidos *in vivo*

25 1. Efecto de D-TTK001 sobre el ADN de HBV en ratones transgénicos de HBV

(1) Origen y características de los ratones transgénicos de HBV (Guangzhou Junketaite Pharmaceutical Technology Co., Ltd.)

30 Los ratones transgénicos de HBV se compraron en Guangzhou Junketaite Pharmaceutical Technology Co., Ltd. El modelo animal es una forma replicativa de alta expresión de 1,3 copias de ratones transgénicos Tg de genoma completo del HBV (genoma de HBV 1,3) Swb establecido mediante el procedimiento de microinyección por Guangzhou Junketaite Pharmaceutical Technology Co., Ltd. Los sueros HBsAg y HBeAg pueden analizarse con un kit ELISA común; el ADN de HBV en suero de 93,93 % ratones transgénicos positivos es $10^4 \sim 10^6$ copias/ml; los tejidos del hígado en inmunohistoquímica tienen expresión de HBsAg (tipo citoplásmico) y HBcAg (cariotipo). Ni el género, ni el mes de edad, ni la hora en un día tienen un efecto significativo, lo que significa una expresión estable; se puede mantener una tasa alta de ADN positivo del HBV en suero durante un período prolongado (probado en ratones transgénicos hasta los 39 meses de edad), el género no muestra ningún efecto significativo. Esto constituye una buena base para el modelo transgénico que se utilizará en la evaluación de fármacos anti HBV.

(2) Procedimiento de administración intravenosa en la cola (D-TTK001) y procedimiento de muestreo de sangre en ratones transgénicos de HBV

40 Preparar D-TTK001 asépticamente. Administrar 2,5 mg/kg (10 ratones) o 5,0 mg/kg (42 ratones) en base al peso de los ratones mediante inyección intravenosa en la cola en un volumen de 50 µl. Administrar 50 µl de PBS estéril al grupo de control en blanco (10 ratones). Los ratones tienen entre 6-8 meses de edad, la mitad machos y la mitad hembras. Inyectar diariamente durante 3 semanas (21 días en total). Tomar sangre arterial de la cola de los ratones antes de la administración para la futura medición del contenido de ADN del HBV en la sangre de los ratones, registrar como grupo T0. Tomar sangre arterial de la cola de los ratones después de una semana (grupo T1+), dos semanas (grupo T2+) y tres semanas (grupo T3+) de administración. Extraer sangre después de una semana de suspender la administración (grupo T4). Las muestras de sangre se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2-4 horas para preparar el suero. Almacenar las muestras en un refrigerador a -80 ° C para futuras mediciones del contenido de ADN del HBV en sangre de ratones.

50 (3) Medición del número de copias de ADN del HBV con ensayo de PCR en tiempo real

(i) Preparación de las muestras de prueba: Sacar las muestras de prueba del refrigerador a -80 ° C. Colocar a temperatura ambiente para equilibrarlo. Tomar la cantidad correspondiente de líquido de reacción, mezcla de enzimas y estándar interno por proporción (líquido de reacción 38 µl por porción + 2 µl por porción de la mezcla de

enzima + 0,2 µl por porción de estándar interno) de acuerdo con el número de muestra de prueba, muestra de control negativo y muestra de referencia, mezclar suficientemente como mezcla de PCR. Tratamiento de la muestra (se tratan de forma sincrónica el control negativo, referencia cuantitativa del control positivo y muestras de prueba):
 5 agregar 5 µl de liberador nucleico celular en cada tubo de reacción de PCR, luego agregar 5 µl de muestra de prueba en cada tubo, absorber de un lado a otro por 3-5 veces y mezclar; después de un intervalo de más de 10 minutos, agregar 40 µl de mezcla de PCR en cada tubo, cerrar los tubos con tapas, centrifugar a 2000 rpm durante 30 segundos.

(ii) amplificación por PCR

10 Utilizando el kit de ensayo de PCR de ADN del HBV en tiempo real fabricado por Sun Yat-sen University Daan Gene Co., Ltd. de acuerdo con las especificaciones del fabricante de la siguiente manera: colocar el tubo de reacción de PCR en la célula de muestra del instrumento de PCR, configurar el control negativo, control positivo, referencias cuantitativas A~D y prueba de muestra en el orden correspondiente, y luego configurar el nombre de la muestra y concentración de referencia cuantitativa. Selección del canal de detección de fluorescencia: por ejemplo, en el instrumento ABI 7300, i) seleccionar el canal FAM (reportero: FAM, extintor: ninguno) para detectar el ADN de HBV;
 15 ii) seleccionar el canal HEX/MIC (reportero: HEX/MIC, extintor: ninguno) para detectar el estándar interno del HBV; iii) configurar la referencia pasiva como ROX.

Los parámetros de ciclo se establecen de la siguiente manera:

Reacción enzimática UNG	50 °C	2 min	1 ciclo
Activación de la enzima taq	94 °C	5 min	1 ciclo
Degradación	94 °C	15 seg	45 ciclos
Apagado, extensión e intensidad fluorescente	57 °C	30 seg	1 ciclo
Enfriado de instrumentos	25 °C	10 seg	1 ciclo

(iii) Análisis de resultados:

20 Configurar condiciones de análisis: ajustar valor de inicio, valor de detención de línea base y el valor del umbral de acuerdo con la imagen analizada (el usuario puede ajustar arbitrariamente de acuerdo con las necesidades reales, el valor de inicio puede ser 1~10, el valor de parada puede ser 5~10, valor puede ser 0,01 ~0,2) para optimizar la curva estándar en la ventana "Curva estándar", es decir, correlación entre -1,0~-0,97. Seleccionar "Analizar" en el menú "Análisis" para el análisis automático de resultados. Registrar el valor (C) de la variable desconocida en la
 25 ventana "Bandeja". "C" indica concentración o contenido de la muestra.

(iv) Control de calidad:

Muestra de QC negativa: sin valor Ct; pero la inspección de la pared interna del HBV es positiva (valor Ct ≤ 40).

Muestra de QC positiva: concentración medida entre $1,26 \times 10^5 \pm 1,26 \times 10^6$ IU/ml.

Cuatro referencias cuantitativas positivas: todas positivas con un coeficiente de correlación lineal de $0,98 \leq |r| \leq 1$.

30 Todos los requisitos anteriores deben cumplirse en un experimento; de lo contrario, el experimento no es válido y debe volver a realizarse.

Se midió el número de copias de ADN de HBV en suero de ratones transgénicos de HBV con PCR en tiempo real. Resultados del grupo de 2,5 mg/kg: la tasa efectiva es del 30 % (3 de cada 10 ratones) a partir de una semana (grupo T1+) con una clara dependencia del tiempo. En el grupo de 5,0 mg/kg, la tasa efectiva es del 54,8 % (23 de
 35 42 ratones). La tasa efectiva es del 46,2 % (18 de 39 ratones) a partir de una semana (grupo T1+), en la que una tasa efectiva decreciente dependiente del tiempo es del 30,4 % (7 de 23 ratones). Como se muestra en la Figura 6, sugerida por una comparación de la eficacia decreciente dependiente del tiempo entre 3 ratones del grupo de 2,5 mg/kg y 7 ratones del grupo de 5,0 mg/kg, fue dependiente de la dosis la función farmacológica de la inhibición de D-TTK001 en la replicación del HBV a nivel de animales transgénicos de HBV.

40 2. Observación patológica del tejido hepático de ratones transgénicos de HBV después del tratamiento con D-TTK001

Una vez finalizados los experimentos anteriores en ratones transgénicos de HBV, se sacrificaron los ratones y se tomó tejido hepático, se fijó con formalina, se incrustó con el procedimiento convencional, para preparar biopsias de tejido, luego se realizó la observación patológica.

45 Los efectos del tratamiento del polipéptido D-TTK001 sintetizado artificialmente sobre la hepatitis en ratones transgénicos de HBV se muestran en la Figura 7. El panel izquierdo muestra tejido patológico hepático de ratones

transgénicos de HBV; 6 de cada 10 ratones transgénicos de HBV en el grupo de control no tratado mostraron características patológicas típicas de hepatitis viral, como degeneración hidrópica de hepatocitos. El panel derecho muestra tejido hepático después de 3 semanas de tratamiento con D-TTK001 (5 mg/kg) mediante inyección intravenosa en la cola; ninguno de los 6 ratones del grupo experimental mostró una degeneración hidrópica de los hepatocitos, lo que sugiere que D-TTK001 tiene un efecto de tratamiento claro sobre las lesiones patológicas de la hepatitis en el tejido hepático.

3. Efecto de D-TTK001 en ratones inmunodeprimidos portadores de tumores inoculados

Suspender las células HepG2-X en fase exponencial tratándolas con tripsina, contar el número de células, diluir a 1×10^7 células/ml con solución salina fisiológica estéril y luego almacenar en agua helada. Tome dos ratones BALB/C hembras de 4~6 semanas de edad: i) un ratón en el grupo de control, inyectar 0,2 ml de las células diluidas anteriores en la axila de la extremidad anterior derecha para cada ratón, luego inyectar solo 0,5 ml de agua destilada esterilizada (sin fármacos polipeptídicos); ii) un ratón del grupo experimental con una dosis de administración de 10 mg/kg de peso. Inyectar 0,2 ml de las células diluidas anteriores en la axila de la extremidad anterior derecha para cada ratón, después de 20 días de la inyección, extirpar el tejido tumoral asépticamente, cortar en pequeños trozos de tejido, volver a inocular a ratones BALB/C hembra de 4~6 semanas de edad para 18 ratones en total. Después de que el volumen del tumor ($V=L \times W^2 \times 0,5$) alcanza 100 mm³, dividir 18 ratones en 3 grupos que tengan cada uno 6 ratones. El primer grupo es el grupo de control, que se inyecta por vía intravenosa en la cola con PBS estéril. El segundo grupo es el grupo experimental, que se inyecta por vía intravenosa en la cola con 0,1 mg/kg de D-TTK001. El tercer grupo es el grupo experimental, que se inyecta por vía intravenosa en la cola con 0,5 mg/kg de D-TTK001 (polipéptido liofilizado disuelto en 0,5 ml de agua destilada esterilizada). Inyectar diariamente durante 30 días, medir el peso de los ratones y el volumen del tumor antes de cada inyección y observar el tiempo de supervivencia de los ratones inmunodeprimidos. Después de que los ratones mueren, realizar el análisis usando el procedimiento de Kaplan-Meier para trazar la curva de supervivencia, se emplea Log-Rank para el análisis estadístico.

Como se muestra en la Figura 8, los resultados experimentales mostraron que el tiempo de supervivencia de los ratones inmunodeprimidos portadores de tumores inoculados con células HepG2-X se prolongó claramente en grupos tratados con polipéptido D-TTK001 sintetizado artificialmente a 0,1 mg/kg o 5,0 mg/kg, sugiriendo que D-TTK001 tiene la función de inhibir el fenotipo maligno del tumor inoculado con células HepG2-X en ratones inmunodeprimidos. Para el análisis estadístico se emplea Log-Rank, * P < 0,5.

Ejemplo 4: Fragmentos funcionales y variantes funcionales de polipéptido

La invención también investiga el papel de las variantes funcionales del polipéptido y sus fragmentos funcionales. Las secuencias que se muestran en la siguiente tabla son secuencias sustituidas con D-aminoácidos sintetizados artificialmente en base a L-TTK001 (es decir, anti-HBxPI#). Los fragmentos de polipéptidos se sintetizaron artificialmente de acuerdo con las secuencias (procedimiento como el anterior), y luego, se adoptó el procedimiento ELISA mencionado anteriormente para observar el cambio en las funciones de los polipéptidos.

Fragmentos de polipéptidos sintetizados	Secuencias de aminoácidos	SEQ ID NO.
D-TTK001	Gly-D-Ser-D-Ala-D-Val-D-Met-D-Phe-D-Ser-D-Ser-D-Lys -D-Glu-D-Arg-Gly o G-D/S-D/A-D/V-D/M-D/F-D/S-D/S-D/K-D/E-D/R-G	1
D-TTK001-1	Gly-D-Ser-Ala-Val-Met-Phe-Ser-Ser-Lys-Glu-Arg-Gly o G-D/S-A-V-M-F-S-S-K-E-R-G	2
D-TTK001-2	Gly-D-Ser-Ala-Val-Met-Phe-Ser-Ser-Lys-Glu-Arg-Gly o G-S-D/A-V-M-F-S-S-K-E-R-G	3
D-TTK001-3	Gly-D-Ser-Ala-Val-Met-Phe-Ser-Ser-Lys-Glu-Arg-Gly o G-S-A-D/V-M-F-S-S-K-E-R-G	4
D-TTK001-4	Gly-D-Ser-Ala-Val-Met-Phe-Ser-Ser-Lys-Glu-Arg-Gly o G-S-A-V-D/M-F-S-S-K-E-R-G	5
D-TTK001-5	Gly-D-Ser-Ala-Val-Met-Phe-Ser-Ser-Lys-Glu-Arg-Gly o G-S-A-V-M-D/F-S-S-K-E-R-G	6

(continuación)

Fragmentos de polipéptidos sintetizados	Secuencias de aminoácidos	SEQ ID NO.
D-TTK001-6	Gly-D-Ser-Ala-Val-Met-Phe-Ser-Ser-Lys-Glu-Arg-Gly o G-S-A-V-M-F-D/S-S-K-E-R-G	7
D-TTK001-7	Gly-D-Ser-Ala-Val-Met-Phe-Ser-Ser-Lys-Glu-Arg-Gly o G-S-A-V-M-F-S-D/S-K-E-R-G	8
D-TTK001-8	Gly-D-Ser-Ala-Val-Met-Phe-Ser-Ser-Lys-Glu-Arg-Gly o G-S-A-V-M-F-S-S-D/K-E-R-G	9
D-TTK001-9	Gly-D-Ser-Ala-Val-Met-Phe-Ser-Ser-Lys-Glu-Arg-Gly o G-S-A-V-M-F-S-S-K-D/E-R-G	10
D-TTK001-10	Gly-D-Ser-Ala-Val-Met-Phe-Ser-Ser-Lys-Glu-Arg-Gly o G-S-A-V-M-F-S-S-K-E-D/R-G	11

5 Como se muestra en la Figura 9, 10 μ M de cada uno de D-TTK001-1, D-TTK001-2, D-TTK001-3, D-TTK001-4, D-TTK001-5, D-TTK001-6, D-TTK001-7, D-TTK001-8, D-TTK001-8, D-TTK001-9, D-TTK001-10 inhibe los niveles de secreción de HBeAg de las células HepAD38 en diversos grados, en el que D-TTK001 tiene el efecto más significativo, lo que sugiere que sustituciones individuales con D-aminoácidos sintetizados artificialmente cambian la conformación del polipéptido L-TTK001 (es decir, anti-HBxPI#), afectando así las actividades biológicas del mismo en diversos grados. Además, la estabilidad del polipéptido se potencia con el aumento del número de sustituciones de D-aminoácidos. Si bien las actividades biológicas de D-TTK001 y L-TTK001 son similares entre sí, lo que sugiere que el isómero simétrico mantiene la capacidad de enlace a la proteína HBx diana. Se emplea la prueba t de Student para el análisis estadístico, * P < 0,05, ** P < 0,01.

Ejemplo 5: Experimentos farmacocinéticos *in vivo* de fármacos polipeptídicos en ratas

15 Se inyectaron por vía intravenosa 6 animales de experimentación con 3,6 mg/kg de solución de D-TTK001 (equivalente a 5 mg/kg en ratones). Se recolectaron muestras de sangre y se colocaron los tubos de ensayo heparinizados de acuerdo con los tiempos de recolección de sangre. La concentración plasmática de D-TTK001 en ratas se midió mediante un espectrómetro de masas Triple-TOF.

Los principales parámetros farmacocinéticos después de la inyección intravenosa de 3,5 mg/kg de D-TTK001 en 6 ratas se muestran en la Tabla 3, en la que la vida media fue de 55,27 minutos.

20 Tabla 3. Principales parámetros farmacocinéticos después de la inyección intravenosa de 3,5 mg/kg de D-TTK001 en 6 ratas

Parámetros farmacocinéticos	01	02	03	04	05	06	Media	SD
C _{max} (μ g/ml)	75,70	32,90	31,60	26,90	28,40	19,60	35,85	20,07
C ₀ (μ g/ml)	80,53	27,93	31,15	28,97	31,91	18,27	36,46	22,14
t _{1/2} (min)	31,28	58,07	99,44	41,40	56,30	45,09	55,27	23,80
AUC _{0-t} (μ g/ml \cdot min)	1165,52	1073,22	2299,13	742,46	1221,15	998,81	1250,05	540,48
AUC _{0-∞} (μ g/ml \cdot min)	1180,24	1177,75	3151,72	770,73	1361,37	1051,30	1448,85	856,85
V(l/kg)	0,134	0,249	0,159	0,271	0,209	0,217	0,207	0,052
CL(l/min/kg)	0,003	0,003	0,001	0,005	0,003	0,003	0,003	0,001

Ejemplo 6: Prueba de toxicidad aguda por fármacos polipeptídicos

El grupo de control y el grupo experimental constan cada uno de 10 ratones blancos Kunming, con 5 hembras y 5 machos en cada grupo, respectivamente. Al grupo experimental se le inyectó polipéptido D-TTK001 con una

concentración de 500 mg/kg (10 mg de polipéptido liofilizado disuelto en 0,8 ml de agua destilada esterilizada) mediante inyección intravenosa en la cola; al grupo de control se les inyectó 0,8 ml de agua destilada esterilizada. Observación consecutiva de los ratones durante 24 horas después de la inyección.

5 La prueba de toxicidad aguda del fármaco polipeptídico mostró que los ratones no tienen comportamientos anormales, y ningún cambio anormal de peso en comparación con el grupo de control.

10 El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en la presente memoria, está destinado simplemente a ilustrar mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención a menos que se especifique lo contrario. Las realizaciones preferidas de esta invención se describen en la presente memoria, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de esas realizaciones preferidas pueden resultar evidentes para las personas de experiencia ordinaria en la técnica al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que las personas experimentadas en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de manera diferente a la descrita específicamente en la presente memoria. La invención incluye todas las modificaciones del objeto mencionado en las reivindicaciones adjuntas, y que caen dentro del alcance definido en dichas reivindicaciones adjuntas, según lo permitido por la ley aplicable a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente.

Listado de secuencias

<110> Tianjin Toptech Bio-Science & Technology Co., Ltd.

<120> Fármaco polipeptídico contra la proteína X del virus de la hepatitis B

20 <130> T31829WOEP

<140> EP 15885210.3

<141> 2015-10-16

<150> CN201510111013.0

<151> 2015-3-13

25 <160> 11

<170> versión PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

30 <213> Polipéptido sintetizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Serina

35 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es D-Alanina

<220>

40 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es D-Valina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es D-Metionina
 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es D-Fenilalanina
 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es D-Serina
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es D-Serina
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (9)..(9)
 20 <223> Xaa es D-Lisina
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es D- Ácido glutámico
 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es D-Arginina
 <400> 1
Gly Xaa Gly
 30 **1 5 10**
 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Polipéptido sintetizado
 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Serina

<400> 2

Gly Xaa Ala Val Met Phe Ser Ser Lys Glu Arg Gly
1 5 10

5 <210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Polipéptido sintetizado

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es D-Alanina

<400> 3

Gly Ser Xaa Val Met Phe Ser Ser Lys Glu Arg Gly
1 5 10

15 <210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Polipéptido sintetizado

<220>

20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es D-Valina

<400> 4

Gly Ser Ala Xaa Met Phe Ser Ser Lys Glu Arg Gly
1 5 10

25 <210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Polipéptido sintetizado

<220>

30 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es D-Metionina

<400> 5

Gly Ser Ala Val Xaa Phe Ser Ser Lys Glu Arg Gly
1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Polipéptido sintetizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es D-Fenilalanina

10 <400> 6

Gly Ser Ala Val Met Xaa Ser Ser Lys Glu Arg Gly
1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

15 <213> Polipéptido sintetizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es D-Serina

20 <400> 7

Gly Ser Ala Val Met Phe Xaa Ser Lys Glu Arg Gly
1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Polipéptido sintetizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es D-Serina

30 <400> 8

Gly Ser Ala Val Met Phe Ser Xaa Lys Glu Arg Gly
1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Polipéptido sintetizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

5 <222> (9)..(9)

<223> Xaa es D-Lisina

<400> 9

Gly Ser Ala Val Met Phe Ser Ser Xaa Glu Arg Gly
1 5 10

<210> 10

10 <211> 12

<212> PRT

<213> Polipéptido sintetizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

15 <222> (10)..(10)

<223> Xaa es D- Ácido glutámico

<400> 10

Gly Ser Ala Val Met Phe Ser Ser Lys Xaa Arg Gly
1 5 10

<210> 11

20 <211> 12

<212> PRT

<213> Polipéptido sintetizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

25 <222> (11)..(11)

<223> Xaa es D-Arginina

<400> 11

Gly Ser Ala Val Met Phe Ser Ser Lys Glu Xaa Gly
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos que es una cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NO: 1-11, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferiblemente al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más de identidad con la SEQ ID No: 1, en la que uno o más L-aminoácidos en dicha secuencia de aminoácidos está sustituido por un D-aminoácido; dicho polipéptido tiene la función de inhibir la proteína X del virus de la hepatitis B y es capaz de inhibir la aparición y el desarrollo de enfermedades hepáticas crónicas que resultan de la infección por el virus de la hepatitis B.
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas enfermedades hepáticas crónicas resultantes de la infección por el virus de la hepatitis B comprenden hepatitis, cirrosis hepática y cáncer de hígado.
- 10 3. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en un procedimiento para tratar y prevenir enfermedades hepáticas crónicas resultantes de la infección por el virus de la hepatitis B.
4. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho péptido se usa como vacuna terapéutica contra el virus de la hepatitis B.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y portadores farmacéuticos opcionales.

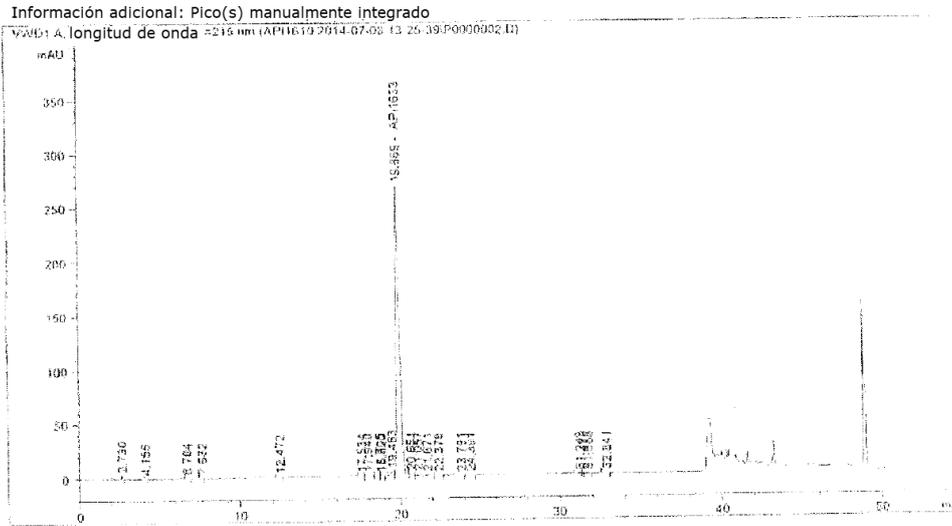


FIG. 1

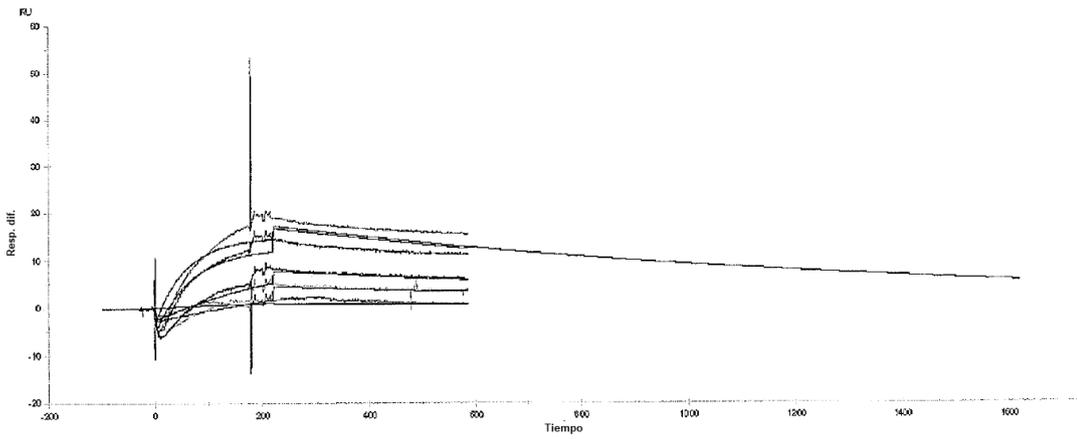


FIG. 2

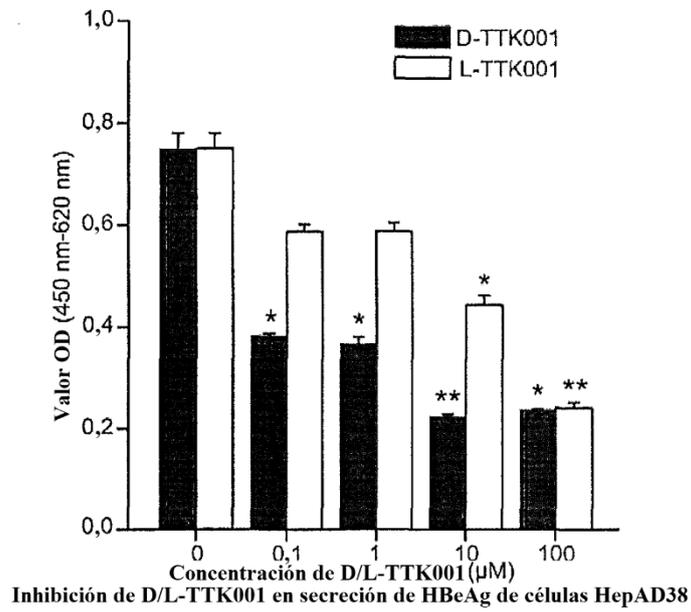


FIG. 3

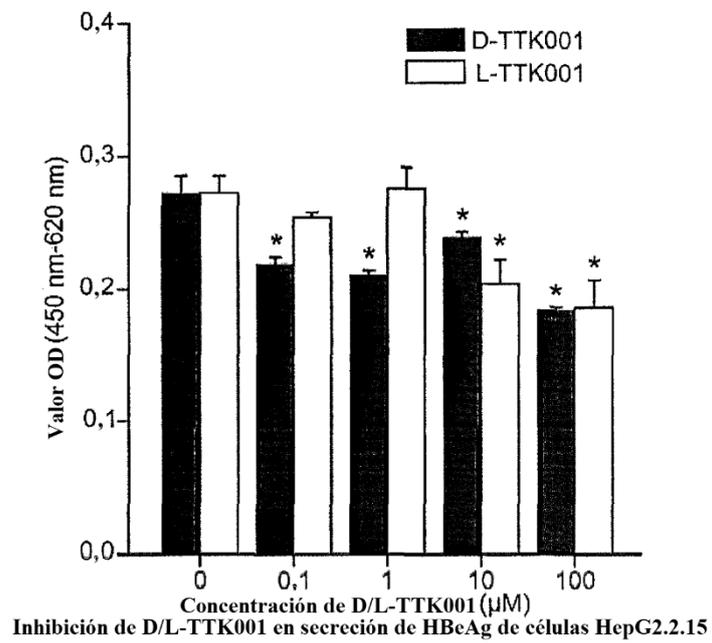


FIG. 4

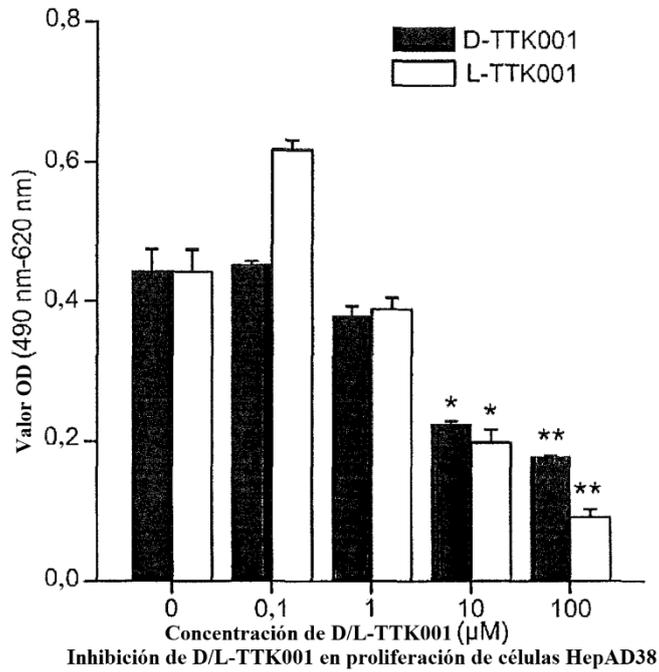


FIG. 5

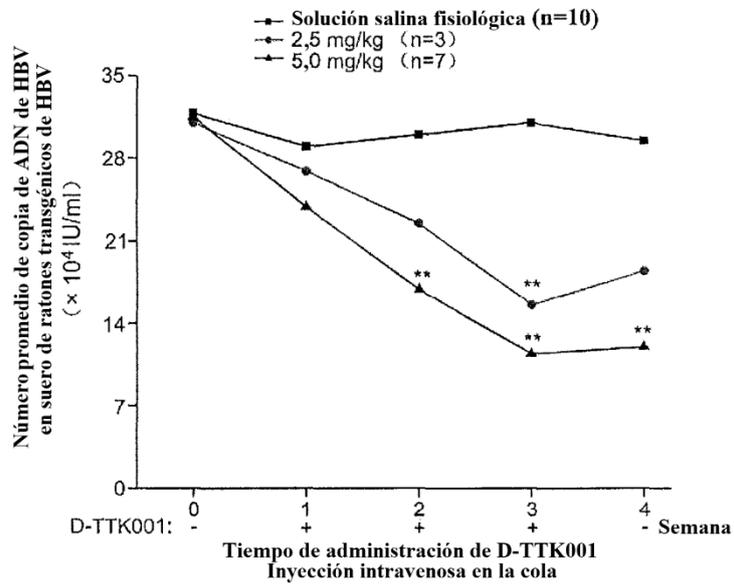


FIG. 6

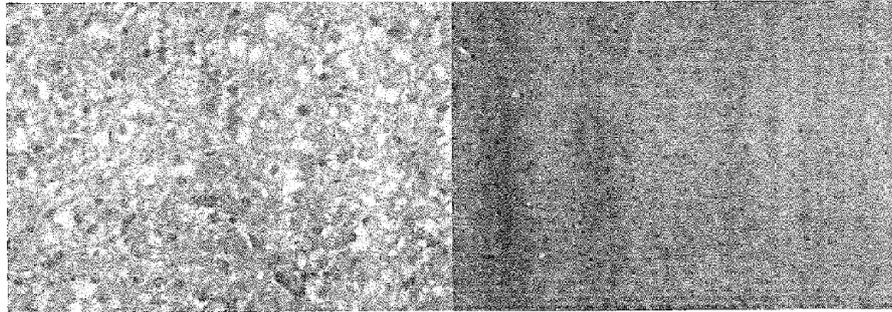


FIG. 7

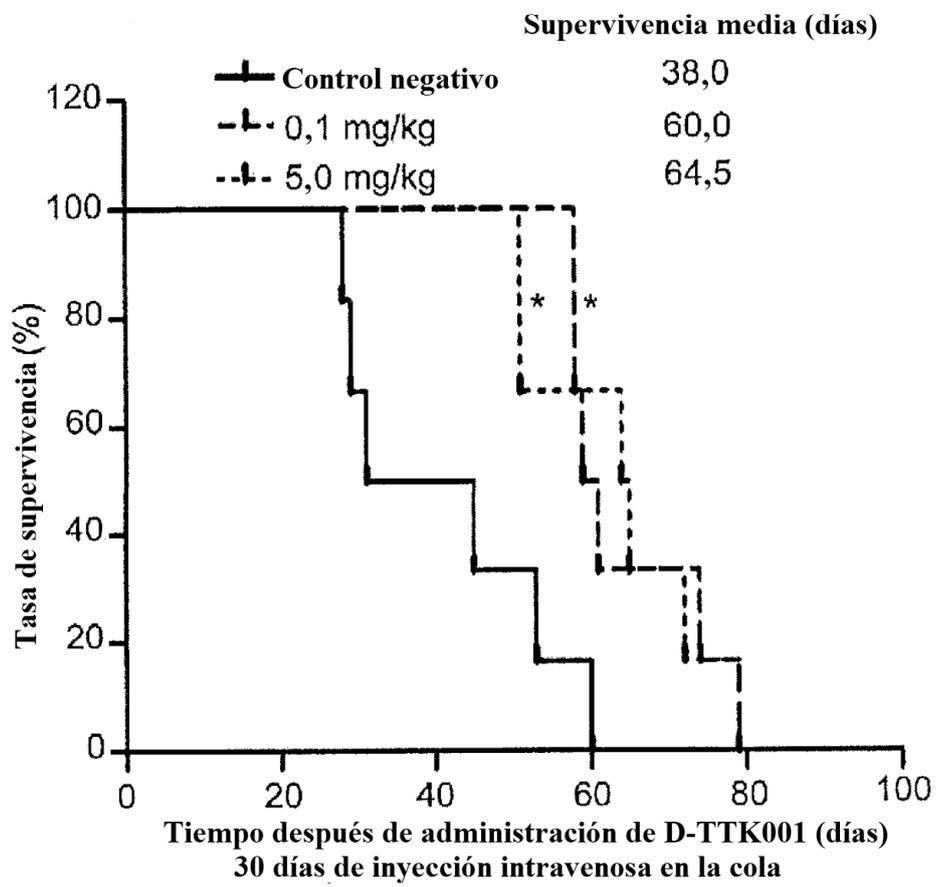


FIG. 8

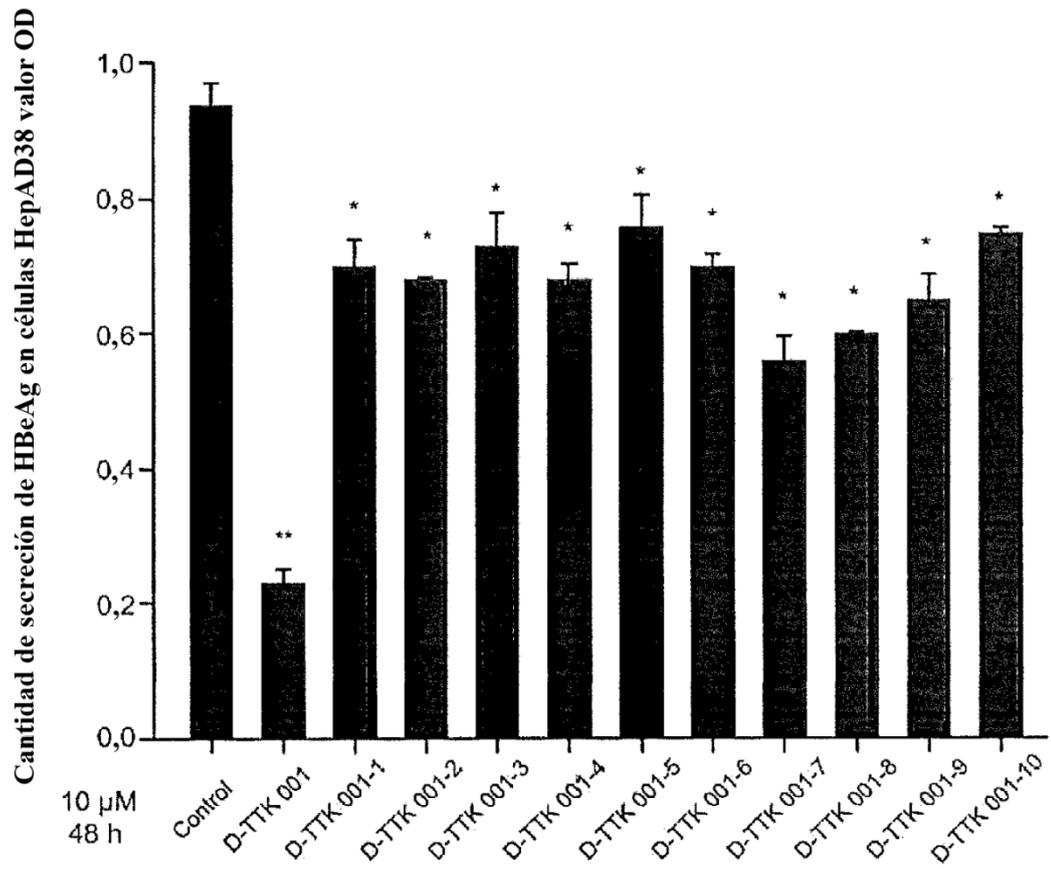


FIG. 9