



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 688**

51 Int. Cl.:

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 38/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05727232 .0**

86 Fecha de presentación : **11.03.2005**

87 Número de publicación de la solicitud: **1722819**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

54 Título: **Procedimiento para solubilizar mezclas de péptidos.**

30 Prioridad: **12.03.2004 EP 04450061**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **Intercell AG.**
Campus Vienna Biocenter 6
1030 Vienna, AT

72 Inventor/es: **Zauner, Wolfgang;**
Kritsch, Constantia;
Heinrich-Cseh, Christa y
Berger, Agnes

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Procedimiento para solubilizar mezclas de péptidos.

La presente invención se refiere a un procedimiento para solubilizar mezclas de péptidos.

La formulación de péptidos y mezclas de péptidos para uso farmacéutico supone, en muchos casos, un gran desafío. Idealmente, una formulación debe ser estable a temperatura ambiente o al menos a 4°C durante un tiempo prolongado (hasta dos años). Esta estabilidad a largo plazo es especialmente difícil de conseguir en disolución puesto que pueden tener lugar muchas reacciones en los grupos funcionales de la cadena lateral de aminoácidos, tales como oxidación (triptófano, metionina, cisteína), desamidación (glutamina, asparragina), y racemización. Además, dependiendo del pH de la formulación final también se puede producir la hidrólisis del esqueleto del péptido. Por tanto, la crio-deseccación es una manera preferida de obtener formulaciones de péptidos estables.

La solubilización de péptidos únicos normalmente representa un problema menor en la práctica de laboratorio. Mientras que normalmente los péptidos hidrófilos se disuelven en agua o disoluciones acuosas tamponadas, los péptidos hidrófobos se disuelven en disoluciones que contienen en muchos casos al menos un componente de un disolvente orgánico. La solubilización de una mezcla de péptidos químicamente diferentes es mucho más complicada debido a la presencia de una variedad de péptidos hidrófilos (solubles en agua) e hidrófobos (insolubles en agua).

Por tanto, se multiplican los desafíos para una formulación farmacéutica que contenga una mezcla de péptidos. En primer lugar se debe encontrar un disolvente que permita la solubilización de todos los péptidos a la concentración requerida. Además, el disolvente debe ser relativamente no tóxico, de manera que trazas del disolvente residual en el producto no impida su uso farmacéutico. Finalmente, para prolongar la vida de almacenamiento de una mezcla de péptidos/proteínas, la composición debe ser liofilizable (las mezclas de, por ejemplo, agua y DMSO no se pueden crio-deseccar).

Los problemas que surgen durante la solubilización de mezclas de péptidos son evidentes teniendo en cuenta el comportamiento de disolución de péptidos únicos. La adición de disoluciones alcalinas suaves que contienen, por ejemplo, NH_4OH incrementa la solubilidad de péptidos ácidos. En contraste, las disoluciones ácidas suaves que contienen, por ejemplo, TFA ayudan a solubilizar péptidos básicos. Los péptidos solubles en agua pueden interactuar entre sí dependiendo de sus respectivos estados de carga (por ejemplo, los oligopéptidos catiónicos interactuarán con oligopéptidos aniónicos para formar una sal insoluble que precipita en disoluciones acuosas). Los péptidos altamente hidrófobos normalmente se disuelven en disolventes orgánicos tales como DMSO, DMF, acetonitrilo, ácido acético o en mezclas de agua con los disolventes anteriormente mencionados. Además, es sabido por la persona experta en la materia que las sales tienden a promover la agregación de moléculas hidrófobas, especialmente péptidos, seguido de una precipitación que depende de la concentración. Por tanto, la solubilización de una mezcla de péptidos que contiene diferentes tipos de péptidos es un problema importante en la fabricación de, por ejemplo, composiciones farmacéuticas.

La patente europea EP 0 611 572 B1 describe un procedimiento para solubilizar un decapeptido (Cetorelix) usando una disolución acuosa que contiene ácido acético al 30%. Antes del crio-deseccado esta disolución se diluye adicionalmente con agua para dar una concentración final de ácido acético del 3%. La solicitud de patente de EE.UU. correspondiente US 2002/0198186 A1 amplía el procedimiento descrito a péptidos que contienen de 3 a 14 aminoácidos. No obstante, tanto la patente europea como la solicitud de patente de EE.UU. describen solamente la solubilización y liofilización de péptidos únicos y no mezclas de dos o más péptidos. Además, se debe enfatizar que la dilución de la disolución a ácido acético al 3% precipitará los péptidos hidrófobos dando como resultado una suspensión turbia.

Otros disolventes usados habitualmente para péptidos son el dimetilsulfóxido (DMSO; véase, por ejemplo, Chen y Wetzel, Protein Science 10:887-891) y dimetilformamida (DMF; véase, por ejemplo, de Groot y col., Molecular Cancer Therapeutics 1:901-911). Los péptidos disueltos por estos disolventes normalmente son hidrófobos y poco solubles en agua. De forma negativa las disoluciones de péptidos que contienen DMSO o DMF no se pueden liofilizar y no se pueden usar directamente para fines médicos.

Es el objetivo de la presente invención proporcionar procedimientos para la solubilización de mezclas de péptidos, que están compuestas de dos o más péptidos que consisten en péptidos hidrófilos así como péptidos hidrófobos. Otro objetivo es hacer disponible un procedimiento para la fabricación de formulaciones farmacéuticas estériles y opcionalmente liofilizadas que contienen mezclas de péptidos.

Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para la fabricación de una preparación farmacéutica que comprende la solubilización de una mezcla de péptidos, caracterizado porque la mezcla de péptidos se solubiliza con una disolución acuosa que contiene al menos un ácido orgánico seleccionado del grupo constituido por ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y sus formas halogenadas o hidroxiladas. La concentración del ácido orgánico en la disolución acuosa es de al menos el 10%. Para prolongar la vida de almacenamiento la mezcla de péptidos solubilizada se puede esterilizar (por filtración, irradiación, tratamiento térmico, esterilización química u otros procedimientos) y liofilizar posteriormente.

En una forma de realización preferida la mezcla de péptidos contiene péptidos hidrófilos así como péptidos hidrófobos. Naturalmente el presente procedimiento también es usable para mezclas de péptidos que contienen solamente un tipo de péptidos (específicamente para mezclas que contienen, por ejemplo, dos o más péptidos hidrófilos).

5 En otra forma de realización preferida los péptidos que se disuelven con una disolución acuosa según la presente invención contienen al menos 6, preferentemente al menos 8, más preferentemente al menos 10, y especialmente al menos 12 aminoácidos. Según la presente invención se pueden disolver los péptidos y polipéptidos que contienen un número máximo de 100 aminoácidos.

10 En el alcance de la presente invención los péptidos están caracterizados por su solubilidad. Los péptidos que son solubles en una disolución acuosa menos de 100 $\mu\text{g/ml}$ se consideran hidrófobos. Por otra parte los péptidos hidrófilos se disuelven en una disolución acuosa tamponada a una concentración por encima de 100 $\mu\text{g/ml}$. Los péptidos hidrófilos además se pueden dividir en péptidos catiónicos (>20% de aminoácidos básicos incluyendo lisina, arginina, histidina), aniónicos (>20% de aminoácidos ácidos incluyendo ácido aspártico, ácido glutámico) y péptidos ricos en
15 hidroxilos (>30% de aminoácidos que contienen -OH como serina, treonina, tirosina).

En otra forma de realización preferida la mezcla de péptidos contiene péptidos y/o polipéptidos obtenidos a partir de antígenos. Preferentemente, se usan péptidos o polipéptidos procedentes de un patógeno vírico o bacteriano o de hongos o parásitos como tales antígenos (incluyendo antígenos derivados o antígenos glicosilados o lipidados o polisacáridos o lípidos). Otra fuente preferida de antígenos son antígenos tumorales. Los patógenos preferidos se seleccionan del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis A y B, virus de la hepatitis C (VHC), virus del sarcoma de Rous (VSR), virus de Epstein-Barr (VEB), virus Influenza, Rotavirus, *Staphylococcus aureus*,
20 *Chlamydia pneumonias*, *Chlamydia trochomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumonias*, *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*, *Plasmodium sp.* (*Pl. falciparum*, *Pl. vivax*, etc.), *Aspergillus sp.* o *Candida albicans*. Los antígenos también pueden ser moléculas expresadas por células cancerígenas (antígenos tumorales). El proceso de derivación puede incluir la purificación de una proteína específica a partir de las células del patógeno/cancerígenas, la inactivación del patógeno así como la derivación proteolítica o química o la estabilización de esa proteína. De la misma forma también se pueden mezclar antígenos tumorales (vacunas contra el cáncer) o antígenos autoinmunitarios para obtener una composición según la presente invención. Con esas composiciones se puede llevar a cabo una vacunación
25 tumoral o un tratamiento para enfermedades autoinmunitarias.

En el caso de antígenos peptídicos el uso de mimítos/agonistas/superagonistas/antagonistas peptídicos o péptidos modificados en ciertas posiciones sin afectar a las propiedades inmunológicas o mimítos/agonistas/superagonistas/antagonistas no peptídicos está incluido en la presente invención. Los antígenos peptídicos también pueden contener
35 elongaciones en cualquiera de los extremos carboxilo o amino del antígeno peptídico que facilitan la interacción con un compuesto(s) policatiónico o un compuesto(s) inmunoestimulador. Para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias se pueden aplicar antagonistas peptídicos.

Los antígenos también se pueden derivar para incluir moléculas que potencien la presentación de antígenos y el
40 envío de antígenos a moléculas presentadoras de antígenos.

Una composición obtenida mediante el procedimiento según la presente invención, especialmente en forma de vacuna, además puede comprender un compuesto policatiónico, preferentemente un polímero policatiónico, más preferentemente un péptido policatiónico, especialmente poliarginina, polilisina o un péptido antimicrobiano.

45 El compuesto(s) policatiónico a usar según la presente invención puede ser cualquier compuesto policatiónico que presente el efecto característico según el documento WO 97/30721. Los compuestos policatiónicos preferidos se seleccionan entre polipéptidos básicos, policationes orgánicos, poliaminoácidos básicos o sus mezclas. Estos poliaminoácidos deben tener una longitud de cadena de al menos 4 residuos aminoácidos. Especialmente preferidas son
50 las sustancias que contienen enlaces peptídicos, como polilisina, poliarginina y polipéptidos que contienen más del 20%, especialmente más del 50% de aminoácidos básicos en un intervalo de más de 8, especialmente más del 20, residuos aminoácidos o sus mezclas. Otros policationes preferidos y sus composiciones farmacéuticas se describen en el documento WO 97/30721 (por ejemplo, polietilenimina) y el documento WO 99/38528. Preferentemente estos polipéptidos contienen entre 20 y 500 residuos aminoácidos, especialmente entre 30 y 200 residuos. Estos compuestos
55 policatiónicos se pueden producir químicamente o por recombinación o se pueden obtener de fuentes naturales.

Los (poli)péptidos catiónicos también pueden ser péptidos microbianos anti-bacterianos policatiónicos. Estos (poli)péptidos pueden ser de origen procariota o de origen animal o de plantas o se pueden producir químicamente o por recombinación. Los péptidos también pueden pertenecer a la clase de defensinas. Estos péptidos de defensa del
60 hospedador o defensinas también son una forma preferida de polímero policatiónico según la presente invención. En general, como polímero policatiónico se usa un compuesto que permita la activación del producto final (o regulación aguas abajo) del sistema inmunitario adaptativo, preferentemente mediado por APCs (incluyendo células dendríticas).

Las sustancias policatiónicas usadas en el procedimiento según la presente invención son péptidos antimicrobianos
65 derivados de catelicidina o sus derivados (documento WO 02/13857), especialmente péptidos antimicrobianos derivados de catelicidinas de mamífero, preferentemente de humano, bóvido o ratón, o compuestos neuroactivos, tales como la hormona del crecimiento (humana) (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/24822).

Los compuestos policatiónicos procedentes de fuentes naturales incluyen VIH-REV o VIH-TAT (péptidos catiónicos derivados, péptidos de Antennapedia, quitosán u otros derivados de quitina) u otros péptidos derivados de estos péptidos o proteínas mediante producción bioquímica o recombinante. Otros compuestos policatiónicos preferidos son la catelina o sustancias relacionadas o derivadas de la catelina, especialmente de ratón, de bóvido o especialmente catelinas y/o catelicidinas humanas. Las sustancias relacionadas o derivadas de la catelina contienen toda o parte de la secuencia de la catelina con al menos 15-20 residuos aminoácidos. Las derivaciones pueden incluir la sustitución o modificación de los aminoácidos naturales por aminoácidos que no están entre los 20 aminoácidos habituales. Además, se pueden introducir residuos catiónicos adicionales en esas moléculas de catelina. Se prefiere que estas moléculas de catelina se combinen con la composición del antígeno/vacuna según la presente invención. No obstante, sorprendentemente estas moléculas de catelina también han resultado ser eficaces como adyuvantes para un antígeno sin la adición de adyuvantes adicionales. Por tanto es posible usar esas moléculas de catelina como adyuvantes eficaces en formulaciones de vacuna con o sin sustancias inmunoactivadoras adicionales.

Otra sustancia policatiónica preferida a usar según la presente invención es un péptido sintético que contiene al menos 2 motivos KLK separados por un enlazador de 3 a 7 aminoácidos hidrófobos, especialmente L (documento WO 02/32451).

Esas mezclas de péptidos son útiles para la formulación de vacunas. Naturalmente, según el procedimiento de la presente invención también se pueden disolver mezclas de péptidos que contienen péptidos que actúan como, por ejemplo, hormonas.

Los péptidos de la mezcla de péptidos se sintetizan mediante procedimientos químicos normales (por ejemplo, síntesis en fase sólida según Merrifield). Naturalmente los péptidos también se pueden obtener mediante fragmentación química o enzimática de proteínas recombinantes producidas o proteínas nativas aisladas. En otra forma de realización los péptidos se aíslan directamente a partir de células eucariotas y procariotas. En los tres casos la purificación adicional del péptido o polipéptido de interés en algunas ocasiones será necesaria antes de que se liofilicen o se mezclen juntos.

Dependiendo de la aplicación, varía el número de péptidos individuales y especialmente su concentración en la mezclas. En una forma de realización preferida de la presente invención la concentración de los péptidos individuales abarca entre 5 µg/ml y 5 mg/ml, preferentemente entre 50 µg/ml y 4 mg/ml, más preferentemente entre 100 µg/ml y 3 mg/ml.

A menudo los péptidos se usan en formulaciones farmacéuticas para su uso como, por ejemplo, hormonas o vacunas. Por tanto es un requerimiento básico que los ácidos orgánicos usados en disoluciones acuosas para la solubilización de los péptidos sean farmacéuticamente aceptables. En una forma de realización preferida de la presente invención los ácidos orgánicos son ácido acético y/o ácido fórmico que contienen opcionalmente acetonitrilo.

Los experimentos revelaron, dependiendo de la composición de la mezcla de péptidos, que la concentración del ácido orgánico en la disolución acuosa tiene que ser de al menos el 10%, preferentemente de al menos el 20%, preferentemente de al menos el 30%, preferentemente de al menos el 40%, preferentemente de al menos el 50%, preferentemente de al menos el 60%.

En algunos casos la adición de derivados de ácidos orgánicos (por ejemplo, acetonitrilo) a la disolución acuosa puede ser de ayuda para solubilizar mezclas de péptidos que contienen una mayor cantidad de péptidos hidrófobos. Además los disolventes orgánicos tales como el DMSO y la DMF contribuyen a una disolución mejorada de las mezclas de péptidos que contienen una concentración incrementada de péptidos hidrófobos. No obstante, las mezclas de péptidos acuosos que contienen DMSO y/o DMF no se pueden crio-desechar.

En una forma de realización preferida se añaden agentes de carga a la mezcla de péptidos cuando el producto está destinado a ser liofilizado. Especialmente a bajas concentraciones de péptidos, no está garantizada la formación de una buena pasta de liofilización. Por tanto a bajas cantidades de péptidos se añaden agentes de carga. Los agentes de carga preferidos son sorbitol, manitol, polivinilpirrolidona (PVP) y sus mezclas.

En otra forma de realización preferida la mezcla de péptidos solubilizada se esteriliza por filtración. Para conseguir una mayor recuperación del producto y permitir la filtración de grandes cantidades de la mezcla de péptidos, los péptidos contenidos se deben solubilizar completamente y no se puede formar un gel.

La mezcla de péptidos solubilizada y opcionalmente esterilizada se puede liofilizar directamente o después de introducirse en viales. La liofilización es un procedimiento útil y eficaz para prolongar la vida de almacenamiento de las mezclas de péptidos como se ha descrito anteriormente. Con los péptidos solubilizados se puede obtener una preparación liofilizada de una mezcla de péptidos, que contiene un máximo del 5% de disolvente residual (agua en sistemas acuosos) y trazas del ácido orgánico, que se puede reconstituir en una disolución acuosa tamponada que contiene NaCl y/o sorbitol en 10 minutos en >95%, preferentemente en el 98%, especialmente en el 99%, dando como resultado una suspensión turbia o una disolución clara (dependiendo de la composición de la mezcla de péptidos). Esa reconstitución rápida es específicamente necesaria en casos de emergencia, en los que se debe preparar una disolución lista para usar en unos pocos minutos con una resolvtación casi completa de toda la dosis de un vial liofilizado.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y la figura dibujada sin estar restringida a ellos.

La figura muestra la estabilidad de almacenamiento de una mezcla de péptidos según la presente invención (A, B) comparada con suspensiones según la técnica anterior (C).

Ejemplo 1

Crio-dsecación de una mezcla de péptidos (5 péptidos TB más poli-L-arginina)

La mezcla de péptidos contiene 6 péptidos (véase tabla 1), que presentan un intervalo de solubilidad amplio. Los péptidos 1240 y 1242 son solubles en agua y también se pueden disolver en DMSO. El péptido 1236 no se disuelve en DMSO, pero se disuelve lentamente en agua. Los péptidos 1235 y 1241 son hidrófobos y sólo se disuelven en DMSO.

Los péptidos 1236, 1240, y 1242 se pueden disolver secuencialmente en agua, siempre que el pH final se ajuste a pH 8,5. A un pH inferior se forma un gel presumiblemente debido a interacciones de carga y/o la formación de enlaces de hidrógeno. Este gel no se puede esterilizar por filtración puesto que bloquea inmediatamente el filtro. No obstante, tras la adición de poli-L-arginina (pR) a la disolución acuosa de los tres péptidos, se forma un precipitado que hace imposible la esterilización por filtración de la disolución.

Por tanto, para conseguir una formulación en suspensión, se deben preparar tres disoluciones madre: una que contiene los péptidos 1236, 1240 y 1242 disueltos en un tampón a pH 8,5, una que contiene poli-L-arginina (pR) disuelta en una disolución de NaCl y una que contiene los péptidos 1235 y 1241 disueltos en DMSO. Cada disolución se puede esterilizar por filtración. La combinación de dos cualquiera de estas tres disoluciones da lugar a la formación de un precipitado, que da como resultado una suspensión turbia. La formulación final obtenida mediante este procedimiento no se puede esterilizar por filtración y no se puede crio-dsecar cuando contiene DMSO al 10%.

También se probó si estos péptidos se disuelven en DMSO, DMF, dimetilacetamida, ácido fórmico/agua al 0,1%, formamida o mezclas de agua/acetonitrilo. No obstante resultó que ninguno de estos disolventes usados habitualmente dio una disolución que se pudiese esterilizar por filtración; el bloqueo del filtro demostró que cantidades considerables de péptidos no disueltos permanecían en la disolución.

Sorprendentemente se encontró que ácido acético/agua al 50% es un disolvente excelente para esta mezcla de péptidos (pR, 1235, 1236, 1240, 1241, y 1242) puesto que disuelve los péptidos hidrófilos así como los péptidos hidrófobos. Además, debido a que es ella misma una molécula cargada, también es capaz de disociar complejos iónicos. Así el ácido acético al 50% fue capaz de disolver la mezcla anteriormente mencionada a las concentraciones requeridas (1 mg/ml de cada péptido, 2 y 4 mg/ml de pR). La disolución se pudo esterilizar por filtración usando un filtro resistente al ácido acético (por ejemplo, teflón hidrófilo). Además, las mezclas de agua y ácido acético se congelan fácilmente y se pueden crio-dsecar usando ciclos de liofilización normales.

De manera muy sorprendente la mezcla crio-dsecada de los cinco péptidos (0,5 mg/vial) y poli-L-arginina (1 mg/vial) presentó una estabilidad excelente. Incluso después de 4 meses a 37°C, el contenido en péptidos estaba entre el 96,1% y 100,5% del valor original. En contraste, incluso una formulación en suspensión optimizada mostró una degradación considerable después de 2 meses a 37°C (< 90% de recuperación para el Ipep 1240; < 75% de recuperación del Ipep 1236 e Ipep 1241) y en los cromatogramas se observaron numerosos picos de degradación (ausentes en la formulación liofilizada)

TABLA 1

Mezcla de péptidos I

<i>ID del péptido</i>	<i>Secuencia del péptido</i>
1235	IDELKTNSSLLTSILTYHVV
1236	TGSGAGIAQAAAGTVNI
1240	VSDLKSSTAVIPGYPVAGQV
1241	NFLLPDAQAAAAGFASK
1242	YNINISLPSYYPDQKSLNY

Ejemplo 2

Solubilización de mezclas de péptidos (péptidos del VHC más poli-L-arginina)

La mezcla de péptidos contiene los péptidos 83, 84, 87, 89, 1426 y pR como inmunizador (véase tabla 2), en la que los péptidos 83 y 84 son solubles en agua y DMSO, los péptidos 87 y 89 son poco solubles en agua, pero se disuelven fácilmente en DMSO y el péptido 1426 sólo es soluble en DMSO. Como con la formulación del ejemplo 1, para la fabricación de una formulación en suspensión primero es necesario disolver los péptidos 83 y 84 en una disolución tampón acuosa y los péptidos 87, 89, y 1426 en DMSO. Después de la esterilización por filtración las disoluciones se pueden combinar para formar la suspensión final.

Las mezclas de agua/acetonitrilo así como de DMSO y DMF no funcionan como disolventes y dieron como resultado suspensiones que no se podían esterilizar por filtración debido al bloqueo del filtro. Sorprendentemente, se encontró que una mezcla de ácido acético/agua al 50% disuelve todos los componentes. La disolución de péptidos obtenida que contiene los péptidos anteriormente mencionados se puede esterilizar fácilmente por filtración sin el bloqueo del filtro.

TABLA 2

Mezcla de péptidos II

ID del péptido	Secuencia del péptido
83	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRRL
84	GYKVLVLNPSVAAT
87	DLMGYIPAV
89	CINGVCWTV
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA

Los siguientes ejemplos (ejemplos 2.1 a 2.12, tablas 3 a 14) ilustran que las mezclas de péptidos que contienen al menos dos péptidos con una longitud y una composición de aminoácidos variable son adecuadas para ser solubilizadas según la presente invención. Además las tablas muestran los epítomos conocidos de clase I y clase II del HLA contenidos en los péptidos.

Ejemplo 2.1

TABLA 3

Mezcla de péptidos III

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
1835	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRRLGVRATRK	A2, A3, B7	DR11
87	DLMGYIPAV	A2	
1624	LEDORSELSPLLLSTTEW	B60	DR7
1846	DYPYRLWHYPCTVNFITFKV	A2, A11, Cw7	DR1, 4, 7, 11
84	GYKVLVLNPSVAAT		DR1, 4, 7, 11
89	CINGVCWTV	A2	
1799	AAWYELTPAETTVRLR	B35	DR1, 4
1547	YLVAYQATVCARAQAPPPSWD	A2	DR1, 4, 7, 11
1827	TAYSQQTRGLLG	A24	DR1, 7, 11
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1, 4, 7, 11
1798	IGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFK	A2, A3, A11	DR1, 4, 7
1829	SMSYTWGTGALITP	A2, B7	DR1, 7, 11

ES 2 297 688 T3

Ejemplo 2.2

TABLA 4

Mezcla de péptidos IV

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
1835	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRK	A2, A3, B7	DR11
1846	DYPYRLWHYPCTVNFTIFKV	A2, A11, Cw7	DR1, 4, 7, 11
1799	AAWYELTPAETTVRLR	B35	DR1, 4
1827	TAYSQQTRGLLG	A24	DR1, 7, 11
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1, 4, 7, 11
1798	IGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFK	A2, A3, A11	DR1, 4, 7
1829	SMSYTWGALITP	A2, B7	DR1, 7, 11

Ejemplo 2.3

TABLA 5

Mezcla de péptidos V

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
C134	TTLLFNILGGWVAAQ	A2	DR1, 7, 11
1815	TVNYTIFKI	A11	
1006	MWNFISGIQYLAGLSTLPGN		

Ejemplo 2.4

TABLA 6

Mezcla de péptidos VI

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
84	GYKVLVLNPSVAAT		DR1, 4, 7, 11
87	DLMGYIPAV	A2	
89	CINGVCWTV	A2	
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1, 4, 7, 11

Ejemplo 2.5

TABLA 7

Mezcla de péptidos VII

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
1051	YLLPRRGPR	A2	
84	GYKVLVLNPSVAAT		DR1, 4, 7, 11
87	DLMGYIPAV	A2	
89	CINGVCWTV	A2	
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1, 4, 7, 11

Ejemplo 2.6

TABLA 8

Mezcla de péptidos VIII

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
1006	MWNFISGIQYLAGLSTLPGN		
1827EX	GWRLAPITAYSQOTRGLLCIV	B8	

Ejemplo 2.7

TABLA 9

Mezcla de péptidos IX

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
1604	WVCCMSYTWGALITPC		
83	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPR	B8	
A130	DYPYRLWHYPCTVNF		
B46	AGAAWYELTPAETTV		

ES 2 297 688 T3

Ejemplo 2.8

TABLA 10

Mezcla de péptidos X

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
B84	GSIGLGKVLVDILAG		DR1, 4

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
B96	LAGYGAGVAGALVAF		DR1, 4, 7, 11
1829	SMSYTWGTALITP	A2, B7	DR1, 7, 11
A135	LWHYPCTVNFTIFKV		DR7
A130	DYPYRLWHYPCTVNF		DR1, 4
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1, 4, 7, 11
1817	RMVVGGEHRL		DR4
87EX	DLMGYIPLVGAPL	A2, 24	
1816	TINYTIFK	A11	

Ejemplo 2.9

TABLA 11

Mezcla de péptidos XI

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
1650	VDYPYRLWHYPCTVNFTIFKVRMYVG-GVEHRL	Cw7, A2, A24, A11, A3	DR1, 4, 7, 11
1836	DYPYRLWHYPCTVNFTIFKI	Cw7, A2, A24, A11	DR1, 4, 7, 11
1846	DYPYRLWHYPCTVNFTIFKV	Cw7, A2, A24, A1, A11	DR1, 4, 7, 11
1651	VDYPYRLWHYPCTVNYTIFKIRMYVG-GVEHRL		
1800	DYPYRLWHYPCTVNYTIFKI	Cw7, A24, A11	DR7

ES 2 297 688 T3

Ejemplo 2.10

TABLA 12

Mezcla de péptidos XII

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
1835	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRK	A2, A3, B7	DR11
83	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRRL	A2 B7	DR11
84EX	AYAAQGYKVLVLNPSVAAT	A24	DR1,4,7,11
87EX	DLMGYIPLVGAPL	A2,A24	
89EX	GEVQVVSTATQSFLATCINGVCWTV	A2	DR 4, 7

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1,4,7,11

Ejemplo 2.11

TABLA 13

Mezcla de péptidos XIII

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
C114	TAYSQQTRGLLGCIIV	A24, B8	DR1,4,7,11
1798	IGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFK	A2,24,3,11	DR1,4,7
1604	VVCCSMSYTWGALITPC	A2,A24,B7	DR1,4,7,11
1624	LEDRDRSELSPLLLSTTEW	A1,2,3,26	DR7

Ejemplo 2.12

TABLA 14

Mezcla de péptidos XIV

ID del péptido	Secuencia del péptido	HLA de clase I	HLA de clase II
1547	YLVAQATVCARAQAPPPSWD	A2	DR1,4,7,11
A1A7	MSTNPKPQRKTKRNTNR	A11,B08,B27	
A122EX	LINTNGSWHINRTALNCNDSL	A2,2,3,B8	DR1,4,7,11
A241	TTILGIGTVLDQAET	A2,A3	DR1, 4
B8B38	FDSSVLCECYDAGAAWYE	A1,2,3,26	
C70EX	ARLIVFPDLGVRVCEKMALY	A2,A3,B27	
C92	AFCSAMYVGDLGGSV	A2,B51	DR1,4
C97	GVLFGLAYFSMVGNW	A2,3,26, B2705, 51	DR1,4,7
C106	TRVPYFVRAQGLIRA	A3,24,B7,B8,B2705	DR1,4,7
C134	TTLLFNILGGWVAAQ	A2	DR1, 7,11

Ejemplo 2

Estabilidad de mezclas de péptidos según la presente invención

5 Se proporcionó otra mezcla de péptidos que contiene los siguientes 8 péptidos derivados del VHC:

	Ipep 1827:	TAYSQQTRGLLG
10	Ipep 1835:	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRK
	Ipep 84:	GYKVLVLNPSVAAT
	Ipep 1799:	AAWYELTPAETTVRLR
15	Ipep 1624:	LEDRDRSELSPLLLSTTEW
	Ipep 1846:	DYPYRLWHYPCTVNFTIFKV
	Ipep 1426:	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA
20	Ipep 1798:	IGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFK

Como en los ejemplos previos, la mezcla de péptidos no se disolvió en disoluciones acuosas. Específicamente, el Ipep 1798, aunque él mismo soluble en agua, interaccionó con los otros péptidos Ipep 84 y 1835 solubles en agua, que dio lugar a la precipitación. Además, el Ipep 1624 muy probablemente interacciona iónicamente con el Ipep 1835 y por tanto también se tenía que añadir a la disolución de DMSO. Por tanto se tuvo que preparar una mezcla que contenía Ipep 84, Ipep 1835 e Ipep 1827 en tampón acuoso y una mezcla que contenía los otros cinco péptidos en DMSO y mezclarse en una relación 9:1 (v/v) para dar la suspensión final. Sorprendentemente, toda la mezcla era soluble en ácido acético al 30% y al 50% y se podía crio-desechar en esta disolución. Incluso más sorprendentemente, la formulación final resultó ser estable durante al menos 6 meses incluso a una temperatura de hasta 37°C. De hecho apenas había ninguna diferencia entre el almacenamiento a 5°C y a 37°C. En ambos casos la recuperación después de 6 meses estuvo entre el 95% y el 110% del valor inicial (Figura A y B). En contraste, una formulación en suspensión almacenada a temperatura ambiente (como comparación a la técnica anterior) presentó un grado de degradación superior, principalmente la oxidación de Ipep 1846 a su dímero (Figura C). No obstante, la recuperación de algunos otros péptidos (Ipep 1426 e Ipep 1624) fue de sólo el 80% demostrando la superioridad de la formulación liofilizada (Figura C comparada con A o B).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la fabricación de una preparación farmacéutica que comprende la solubilización de una mezcla de péptidos, **caracterizado** porque la mezcla de péptidos se solubiliza con una disolución acuosa que contiene al menos un ácido orgánico seleccionado del grupo constituido por ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y sus formas halogenadas o hidroxiladas, por lo que la concentración del ácido orgánico en la disolución acuosa es de al menos el 10%.
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la mezcla de péptidos contiene al menos tres, preferentemente al menos cuatro, especialmente al menos cinco péptidos.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la mezcla de péptidos contiene al menos un péptido hidrófilo y/o al menos un péptido hidrófobo.
- 15 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque los péptidos contienen al menos 6, preferentemente al menos 8, más preferentemente al menos 10, especialmente al menos 12 aminoácidos.
- 20 5. El procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, **caracterizado** porque los péptidos hidrófilos son solubles a una concentración superior a 100 µg/ml en disoluciones acuosas.
6. El procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, **caracterizado** porque los péptidos hidrófobos son solubles a una concentración inferior a 100 µg/ml en disoluciones acuosas.
- 25 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque la mezcla de péptidos comprende péptidos o polipéptidos obtenidos a partir de antígenos asociados a bacterias, virus, hongos, parásitos o tumores o sus fragmentos.
- 30 8. El procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque los antígenos se seleccionan del grupo constituido por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis A y B, virus de la hepatitis C (VHC), virus del sarcoma de Rous (VSR), virus de Epstein-Barr (VEB), virus Influenza, Rotavirus, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trochomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*, *Plasmodium sp.*, *Pl. falciparum*, *Pl. vivax*, *Aspergillus sp.*, *Candida albicans* y antígenos tumorales.
- 35 9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque la mezcla de péptidos comprende un compuesto policatiónico, preferentemente un polímero policatiónico, más preferentemente un péptido policatiónico, especialmente un péptido antimicrobiano o un péptido que contiene al menos dos motivos KKK separados por un enlazador de 3 a 7 aminoácidos hidrófobos.
- 40 10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque los péptidos son péptidos sintetizados químicamente.
- 45 11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque los péptidos se obtienen por degradación enzimática o química de proteínas recombinantes o nativas.
12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque los péptidos se aíslan a partir de organismos eucariotas o procariotas.
- 50 13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque la concentración de cada péptido solubilizado varía entre 5 µg/ml y 5 mg/ml, preferentemente entre 50 µg/ml y 4 mg/ml, más preferentemente entre 100 µg/ml y 3 mg/ml.
- 55 14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque el ácido orgánico es un ácido orgánico farmacéuticamente aceptable.
15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** porque el ácido orgánico es ácido acético y/o ácido fórmico que contienen opcionalmente acetonitrilo.
- 60 16. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque la concentración del ácido orgánico en la disolución acuosa es de al menos el 20%, preferentemente de al menos el 30%, preferentemente de al menos el 40%, preferentemente de al menos el 50%, preferentemente de al menos el 60%.
- 65 17. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado** porque la disolución acuosa contiene adicionalmente al menos un derivado de un ácido orgánico, especialmente acetonitrilo.

ES 2 297 688 T3

18. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado** porque la disolución acuosa contiene adicionalmente al menos un disolvente orgánico.

5 19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado** porque la disolución acuosa contiene adicionalmente un agente de carga.

20. El procedimiento según la reivindicación 19, **caracterizado** porque el agente de carga se selecciona del grupo constituido por sorbitol, manitol, polivinilpirrolidona (PVP) y sus mezclas.

10 21. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, **caracterizado** porque la mezcla de péptidos solubilizada se esteriliza por filtración.

15 22. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, **caracterizado** porque la mezcla de péptidos solubilizada se liofiliza y es reconstituible en una disolución acuosa tamponada que contiene NaCl y/o sorbitol en 10 minutos en >95%, preferentemente en el 98%, especialmente en el 99%, dando como resultado una suspensión turbia o una disolución clara.

20 23. Una disolución acuosa de una mezcla de péptidos obtenibles con un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.

24. La disolución acuosa de la reivindicación 23, **caracterizada** porque dicha disolución es una vacuna.

25

30

35

40

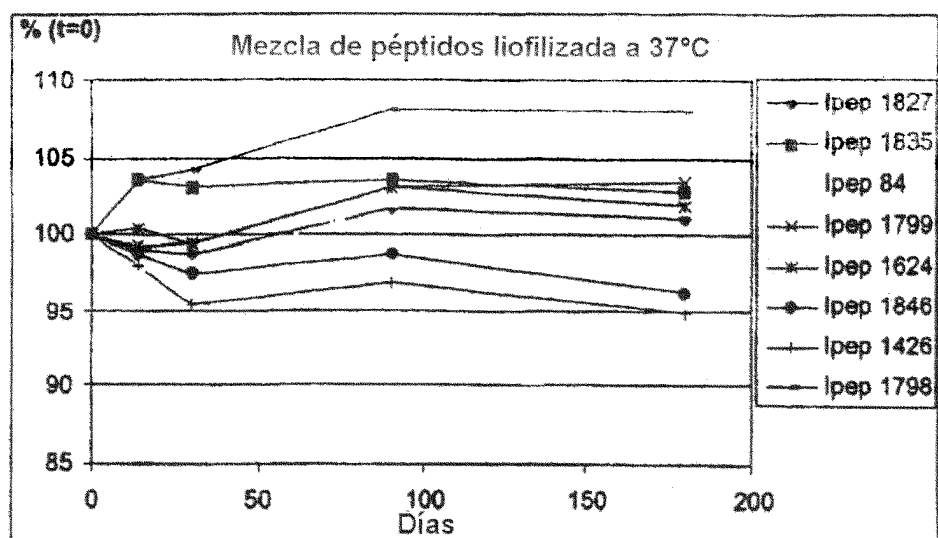
45

50

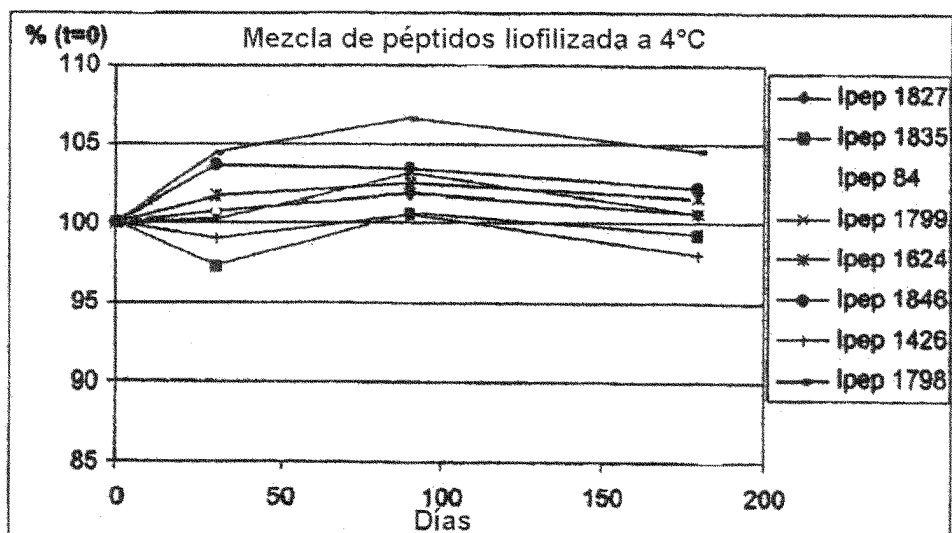
55

60

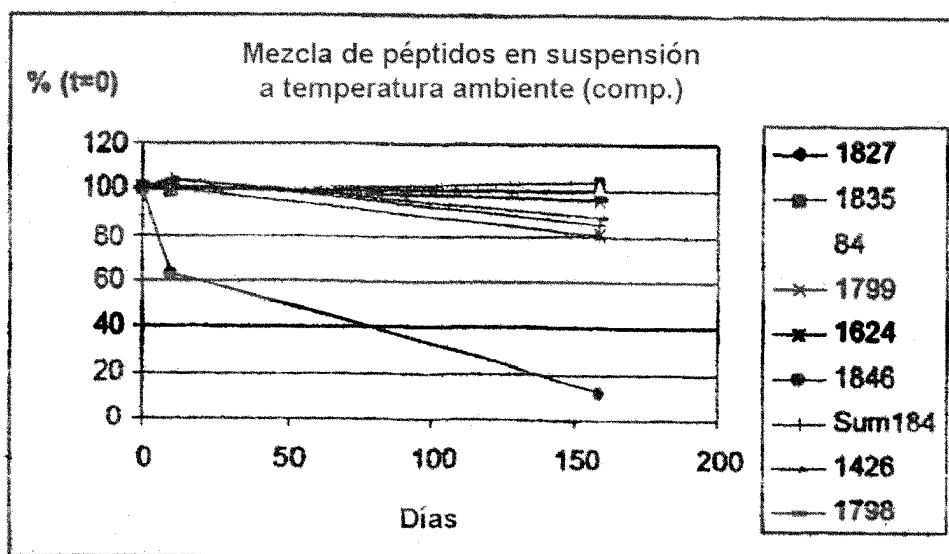
65



A



B



C

FIG. 1

ES 2 297 688 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Intercell AG
- 5 <120> Procedimiento para solubilizar mezclas de péptidos
- <130> R 45101
- 10 <140> PC7/EP2005/002583
<141> 2005-03-11
- <150> EP 04450061.9
- 15 <151> 2004-03-12
- <160> 47
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 20
- 25 <212> PRT
<213> Artificial
- <220>
30 <223> Péptido artificial
- <400> 1
- 35 Ile Asp Glu Leu Lys Thr Asn Ser Ser Leu Leu Thr Ser Ile Leu Thr
 1 5 10 15
- Tyr His Val Val
 20
- 40
- <210> 2
<211> 17
- 45 <212> PRT
<213> Artificial
- <220>
50 <223> Péptido artificial
- <400> 2
- 55 Thr Gly Ser Gly Ala Gly Ile Ala Gln Ala Ala Ala Gly Thr Val Asn
 1 5 10 15
- Ile
- <210> 3
- 60 <211> 20
<212> PRT
<213> Artificial
- 65 <220>
<223> Péptido artificial

ES 2 297 688 T3

<400> 3

Val Ser Asp Leu Lys Ser Ser Thr Ala Val Ile Pro Gly Tyr Pro Val
1 5 10 15

5 Ala Gly Gln Val
20

<210> 4
<211> 17
10 <212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido artificial

<400> 4

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

Lys

25 <210> 5
<211> 20
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> Péptido artificial

35 <400> 5

Tyr Asn Ile Asn Ile Ser Leu Pro Ser Tyr Tyr Pro Asp Gln Lys Ser
1 5 10 15

40 Leu Glu Asn Tyr
20

<210> 6
45 <211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Péptido artificial

<400> 6

55 Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro
1 5 10 15

60 Arg Arg Gly Pro Arg Leu
20

<210> 7
65 <211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 297 688 T3

<220>

<223>

5 <400> 7

Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr
1 5 10

<210> 8

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido artificial

20 <400> 8

Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Ala Val
1 5

25 <210> 9

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

35

<400> 9

Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val
1 5

40

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

50

<400> 10

His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser
1 5 10 15

55

Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala
20

<210> 11

60 <211> 29

<212> PRT

<213> Artificial

65

<220>

<223> Péptido artificial

ES 2 297 688 T3

<400> 11

5 Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys
 20 25

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 12

20 Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr
 1 5 10 15
25 Thr Glu Trp

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 13

40 Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr
 1 5 10 15
 Ile Phe Lys Val
 20

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 14

60 Ala Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg
 1 5 10 15

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 297 688 T3

<220>

<223> Péptido artificial

5 <400> 15

Tyr Leu val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro
1 5 10 15

10 Pro Pro Ser Trp Asp
20

<210> 16

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223>

<400> 16

25 Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
1 5 10

<210> 17

30 <211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 17

40 Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala
1 5 10 15

45 Gly val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys
20 25

<210> 18

<211> 13

50 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

55 <223> Péptido artificial

<400> 18

60 Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro
1 5 10

<210> 19

65 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 297 688 T3

<220>
 <223> Péptido artificial
 5 <400> 19
 Thr Thr Leu Leu Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln
 1 5 10 15
 10 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial
 20 <400> 20
 Thr Val Asn Tyr Thr Ile Phe Lys Ile
 1 5
 25 <210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial
 35 <400> 21
 Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Asn
 20
 45 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial
 55 <400> 22
 Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu
 1 5 10
 60 <210> 23
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 297 688 T3

<220>

<223> Péptido artificial

5 <400> 23

Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg
1 5 10 15

10 Gly Leu Leu Gly Cys Ile Val
20

<210> 14

<211> 18

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Péptido artificial

<400> 24

25 Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr
1 5 10 15

Pro Cys

30 <210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Péptido artificial

40 <400> 25

Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe
1 5 10 15

45 <210> 26

<211> 15

<212> PPT

50 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

55

<400> 26

Ala Gly Ala Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val
1 5 10 15

60

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

65

<213> Artificial

ES 2 297 688 T3

<220>
 <223> Péptido artificial
 5 <400> 27
 Gly Ser Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 10 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial
 20 <400> 28
 Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe
 1 5 10 15
 25 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial
 35 <400> 29
 Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val
 1 5 10 15
 40 <210> 30
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Péptido artificial
 <400> 30
 55 Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
 1 5 10
 <210> 31
 60 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 65 <220>
 <213> Péptido artificial

ES 2 297 688 T3

<400> 31

Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
1 5 10

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 32

Thr Ile Asn Tyr Thr Ile Phe Lys
1 5

<210> 33

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 33

Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe
1 5 10 15

Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
20 25 30

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 34

Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr
1 5 10 15

Ile Phe Lys Ile
20

<210> 35

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

ES 2 297 688 T3

<400> 35

Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Tyr
1 5 10 15

5 Thr Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
20 25 30

<210> 36
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido artificial

20 <400> 36

Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Tyr Thr
1 5 10 15

25 Ile Phe Lys Ile
20

<210> 37
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> Péptido artificial

<400> 37

40 Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val
1 5 10 15

Ala Ala Thr

45 <210> 38
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Péptido artificial

55 <400> 38

Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr
1 5 10 15

60 Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val
20 25

<210> 39
<211> 15
65 <212> PRT
<213> Artificial

ES 2 297 688 T3

<220>

<223> Péptido artificial

5 <400> 39

Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Val
1 5 10 15

10 <210> 40

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

20

<400> 40

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

25 Arg

<210> 41

30 <211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Péptido artificial

<400> 41

40 **Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn**
1 5 10 15

Cys Asn Asp Ser Leu
20

45

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

50

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

55

<400> 42

Thr Thr Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr
1 5 10 15

60

<210> 43

<211> 18

65

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 297 688 T3

<220>

<223> Péptido artificial

5 <400> 43

Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Ala Ala Trp
1 5 10 15

10 **Tyr Glu**

<210> 44

<211> 20

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Péptido artificial

<400> 44

25 **Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys**
1 5 10 15

Met Ala Leu Tyr
20

30 <210> 45

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

40 <400> 45

Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val
1 5 10 15

45 <210> 46

<211> 15

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

55 <223> Péptido artificial

<400> 46

60 **Gly Val Leu Phe Gly Leu Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn Trp**
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

65 <212> PRT

<213> Artificial

ES 2 297 688 T3

<220>

<223> Péptido artificial

5 <400> 47

Thr	Arg	Val	Pro	Tyr	Phe	Val	Arg	Ala	Gln	Gly	Leu	Ile	Arg	Ala
1				5					10					15

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65