

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 017**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2011 PCT/GB2011/001781**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12090002**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2011 E 11807967 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2658572**

54 Título: **Formulación de péptidos unidos a fluorocarburo**

30 Prioridad:

31.12.2010 GB 201022147

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2017

73 Titular/es:

**ALTIMMUNE UK LIMITED (100.0%)
London Bioscience Innovation Centre, 2 Royal
College Street
London NW1 0NH, GB**

72 Inventor/es:

**BROWN, CARLTON BRADLEY;
GEORGES, BERTRAND VICTOR GILBERT y
THABURET, JEAN FRANCOIS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 645 017 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

Formulación de péptidos unidos a fluorocarburo

5 Campo de la invención

La invención se refiere a formulaciones farmacéuticamente aceptables que comprenden péptidos unidos a fluorocarburos, formulaciones útiles en la preparación de tales formulaciones farmacéuticamente aceptables, un método para preparar dichas formulaciones y el uso de tales formulaciones como vacunas e inmunoterápicos.

10

Antecedentes de la invención

Los antígenos peptídicos sintéticos son de interés para su uso en vacunas para prevenir enfermedades infecciosas (tales como infecciones virales, bacterianas, parasitarias y fúngicas). Los antígenos peptídicos sintéticos también son de interés en el campo de los inmunoterápicos, incluyendo el tratamiento de infecciones, la estimulación de la inmunidad a las células cancerosas, la regulación negativa de las hormonas polipeptídicas y el control de las respuestas inmunitarias inapropiadas tales como anafilaxia y alergia.

15

Una dificultad en el uso práctico de vacunas e inmunoterapias basadas en péptidos es garantizar la inducción de una respuesta inmunitaria mediante la administración eficaz de los antígenos peptídicos a una célula presentadora de antígeno. Sin tal selección de la diana, pueden requerirse cantidades no viables del péptido, lo que no solo sería poco rentable para la fabricación sino que también podría conducir a problemas de toxicidad.

20

Una administración mayor de péptidos se puede conseguir a través de vehículos de administración especializados, tales como estructuras basadas en materia en partículas que permiten una liberación sostenida. Además, se han desarrollado derivados peptídicos o péptidos modificados que comprenden el péptido de interés unido covalentemente a un agente potenciador de la administración para mejorar la biodisponibilidad y presentación del péptido a las células diana y receptores específicos.

25

Una clase particular de péptidos modificados para mejorar la administración a las células presentadoras de antígeno se construyen a través de la unión covalente de una cadena de fluorocarburo al extremo N o C del péptido o en cualquier posición entre ellos para crear un péptido unido a fluorocarburo (FCP). Ejemplos de péptidos unidos a fluorocarburo se dan en los documentos WO2005/099752 y WO2009/027688 y se proporcionan las ventajas conseguidas por la unión del fluorocarburo en cuanto a la mejora de las respuestas inmunitarias al péptido.

30

35

Los diseñadores de vacunas entenderán que se puede requerir más de un péptido para proporcionar un efecto profiláctico o inmunoterápico más amplio. Tales productos de múltiples componentes son deseables puesto que son probablemente más eficaces para provocar respuestas inmunitarias apropiadas.

40

Con el fin de fabricar un producto farmacéutico de esta naturaleza, los péptidos unidos a fluorocarburo deben ser sintetizados, purificados, mezclados entre sí en relaciones apropiadas, esterilizados y presentados en un formato homogéneo adecuado para la administración.

Sumario de la invención

45

Los presentes inventores han encontrado que los péptidos unidos a fluorocarburo son a menudo poco solubles en medios acuosos, tales como agua o solución salina tamponada con fosfato, incluso cuando los péptidos no unidos son solubles en medios acuosos. Han descubierto además que la longitud y la hidrofobicidad del componente peptídico del péptido unido a fluorocarburo afecta a la solubilidad del péptido unido a fluorocarburo. En particular, se ha descubierto que los vectores de fluorocarburo unidos a péptidos más largos y más hidrófobos que muestran mejores propiedades inmunogénicas son particularmente insolubles.

50

Los péptidos unidos a fluorocarburos son anfifílicos y característicamente forman estructuras de tipo micelar multimoleculares tanto en disolventes polares (próticos y apróticos) como no polares. Tales estructuras generalmente no están formadas por péptidos no unidos nativos. Sin embargo, los inventores han encontrado que muchos péptidos unidos a fluorocarburo, especialmente aquellos con las mejores propiedades inmunogénicas, tienen una tendencia a formar grandes agregados visibles en medios acuosos y otros disolventes. La formación de tales agregados es inaceptable en un proceso de fabricación farmacéutica, que requiere la producción de una formulación homogénea y caracterizable.

55

60

Habiendo identificado este problema, los presentes inventores lo han abordado y han ideado un método para preparar formulaciones de péptidos unidos a fluorocarburo en las cuales se mantienen estructuras supramoleculares que soportan la solubilidad de los péptidos unidos a fluorocarburo. El proceso de formulación desarrollado por los inventores hace posible fabricar un producto estable que comprende los péptidos inmunógenos unidos a fluorocarburo que se ha demostrado que son problemáticos para formular, cuyo producto es fácil de reconstituir con un medio acuoso para obtener una solución farmacéuticamente aceptable.

65

En particular, los inventores han encontrado que el uso de una solución ácida promueve la formación de micelas y evita la formación de agregados insolubles. Los péptidos unidos a fluorocarburo solubilizados pueden esterilizarse por filtración sin pérdida de los péptidos unidos a fluorocarburo de la solución. Después de la liofilización, generalmente en presencia de un crioprotector, los péptidos unidos a fluorocarburo pueden almacenarse en una forma estable y disolverse en un medio acuoso para obtener una solución farmacéuticamente aceptable para la administración.

Los inventores han encontrado que el ácido acético es un disolvente particularmente apropiado para una amplia gama de péptidos unidos a fluorocarburo, a pesar del alto grado de variabilidad en carga e hidrofobicidad de los diferentes péptidos. Por lo tanto, el ácido acético también es particularmente adecuado para solubilizar una mezcla de péptidos unidos a fluorocarburo.

Por consiguiente, la invención proporciona una formulación acuosa ácida que comprende ácido acético y un primer péptido unido a fluorocarburo, en el que:

- (i) el péptido unido al fluorocarburo tiene una longitud de al menos 20 restos de aminoácidos, comprende al menos 50 % de restos de aminoácidos hidrófobos y tiene un punto isoeléctrico mayor o igual que 7 y
- (ii) el péptido unido a fluorocarburo está presente en micelas con un diámetro de menos de 0,22 μm .

La formulación acuosa puede tener, por ejemplo, un pH de 5 o menos.

El péptido unido a fluorocarburo puede estar presente en micelas con un diámetro de menos de 0,22 μm . La formulación puede comprender uno o más péptidos unidos a fluorocarburo presentes en micelas. Preferiblemente, al menos el 80 % de las micelas de péptido unido a fluorocarburo presentes en la formulación tienen un diámetro de menos de 100 nm.

En una realización, la formulación de acuerdo con la invención no comprende un péptido unido a fluorocarburo en el cual el péptido unido al fluorocarburo: (i) tiene un punto isoeléctrico de menos de 7; (ii) no comprende un aminoácido cargado positivamente en los últimos 15 aminoácidos contiguos distales al fluorocarburo y/o (iii) comprende una secuencia contigua de 20 restos de aminoácidos que comprende más de 80 % de restos de aminoácidos hidrófobos.

Los péptidos unidos a fluorocarburo son generalmente péptidos inmunógenos derivados de un patógeno, una proteína autóloga o una célula tumoral. La formulación de acuerdo con la invención puede comprender además un vehículo o diluyente y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona:

- Un método para obtener una formulación farmacéuticamente aceptable de péptido unido a fluorocarburo, comprendiendo dicho método:
 - (i) solubilizar un péptido unido a fluorocarburo en ácido acético;
 - (ii) esterilizar por filtración del péptido unido a fluorocarburo y
 - (iii) secar el péptido unido a fluorocarburo, esterilizado por filtración.
- una formulación de péptido unido a fluorocarburo obtenible por un método de acuerdo con la invención;
- una formulación farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia y
- una formulación farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento o prevención de una infección patógena, una enfermedad autoinmunitaria o cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un ejemplo de un flujo de proceso de fabricación de un péptido unido a fluorocarburo típico.

La Figura 2 muestra un flujo de proceso de fabricación de un péptido unido a fluorocarburo alternativo.

La Figura 3 es una tabla que muestra los resultados de un examen visual de FCP individuales solubilizados en diversos disolventes. Tras el mezclado en vórtice, cada solución se examinó visualmente para mayor claridad, asignándose una puntuación de “+++” a una solución transparente y una puntuación de “-” a una solución muy turbia. El grado de formación de espuma y la presencia de materia e partículas también se registraron, donde “+++” indica niveles altos y “-” indica ausencia de cada uno. “**” indica que la solución se volvió viscosa.

La Figura 4 es una tabla que muestra los resultados de un examen visual de FCP individuales solubilizados en diversos disolventes después de la dilución con una solución de manitol. Cada solución se examinó visualmente para mayor claridad, asignándose una puntuación de “+++” a una solución transparente y una puntuación de “-” a una solución muy turbia. El grado de formación de espuma y la presencia de materia en partículas también se registraron, donde “+++” indica niveles altos y “-” indica ausencia de cada uno.

La Figura 5 muestra el tamaño de partícula de péptidos unidos a fluorocarburo en solución después del mezclado y dilución evaluado por dispersión de luz dinámica (DLS).

La Figura 6 muestra el tamaño y la forma de partículas de péptido unidas a fluorocarburo en solución después del mezclado y dilución evaluado microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La Figura 7 muestra las distribuciones de tamaño en volumen de partículas peptídicas unidas a fluorocarburo antes (A) y después (B) de la filtración en grado de esterilización evaluadas por DLS.

5 La Figura 8 muestra las distribuciones de tamaños en volumen de partículas de péptido unidas a fluorocarburo reconstituidas en Tris 10 mM pH 7,85 (A) y agua (B) evaluadas por DLS.

La Figura 9 muestra los resultados del análisis RP-HPLC de una mezcla de siete péptidos unidos a fluorocarburo expuestos a ácido acético al 50 % (v/v) durante 24 horas.

10 La Figura 10 muestra fotografías de mezclas formuladas y no formuladas de péptidos unidos a fluorocarburo después de ser agitadas a mano. Vial A: formulado + manitol/agua; Vial B: formulado + manitol/histidina; Vial C: no formulado + manitol/agua; Vial D: no formulado + manitol/histidina.

La Figura 11 muestra fotografías de mezclas formuladas y no formuladas de péptidos unidos a fluorocarburo después de ser mezcladas en vórtice y sonicadas. Vial A: formulado + manitol/agua; Vial B: formulado + manitol/histidina; Vial C: no formulado + manitol/agua; Vial D: no formulado + manitol/histidina.

15 La Figura 12 muestra micrografías electrónicas de transmisión de una formulación que comprende seis péptidos del virus de la gripe unidos a fluorocarburo (FP-01.1).

La Figura 13 muestra el perfil de HPLC de FR01.1 después de la filtración a las 24 h (panel superior) y después de 24 horas (panel inferior).

La Figura 14 muestra el perfil de HPLC de FP01.1 después de la reconstitución en agua.

20 La Figura 15 muestra una comparación de péptidos fluorocarbonados formulados reconstituidos (FP01.1) y péptidos no formulados en agua. La fotografía izquierda fue tomada después de 20 minutos de reposo y la fotografía derecha fue tomada después de 3 minutos de sonicación.

La Figura 16 muestra una comparación de péptidos fluorocarbonados formulados reconstituidos (FP01.1) y péptidos no formulados en L- Histidina 28 mM. La fotografía izquierda fue tomada después de 20 minutos de reposo y la fotografía derecha fue tomada después de 3 minutos de sonicación.

25 La Figura 17 muestra la respuesta de dosis ajustada en volumen en ratas. FP-01.1 indujo una respuesta positiva de linfocitos T IFN- γ en todos los niveles de dosis ensayados de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 18 muestra respuestas de linfocitos T inducidas por vacunas observadas usando un ensayo IFN- γ ELISpot *ex vivo*. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron estimuladas con 6 péptidos individuales (correspondientes a los péptidos contenidos en la vacuna) durante 18 horas. Las respuestas de ensayo positivas se definieron como la media del número de puntos en los pocillos de control negativo + 2 desviaciones estándar de la media. El número de puntos para cada uno de los 6 péptidos se acumuló para obtener la "suma de péptidos largos" y se expresó como un número de puntos por millón de PBMC de entrada.

35 **Breve descripción del listado de secuencias**

El listado de secuencias corresponde a los péptidos usados en los ejemplos como se muestra en la siguiente Tabla.

Secuencia	Péptido
SEQ ID NO: 1	P1 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 2	P8 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 3	P9 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 4	P2 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 5	P4 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 6	P5 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 7	P1 variante sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 8	P8 variante sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 9	P8 variante sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 10	P10 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 11	P3 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 12	P4 variante sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 13	P6 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 14	P7 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 15	P11 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 16	P12 sin lisina N-terminal
SEQ ID NO: 17	P1 con lisina N-terminal
SEQ ID NO: 18	P8 con lisina N-terminal
SEQ ID NO: 19	P9 con lisina N-terminal
SEQ ID NO: 20	P2 con lisina N-terminal

Secuencia	Péptido
SEQ ID NO: 21	P4 con lisina N-terminal
SEQ ID NO: 22	P5 con lisina N-terminal
SEQ ID NO: 23	P3 con lisina N-terminal
SEQ ID NO: 24	P6 con lisina N-terminal
SEQ ID NO: 25	P7 con lisina N-terminal
SEQ ID NO: 26	P10 con lisina N-terminal
SEQ ID NO: 27	P11 con lisina N-terminal
SEQ ID NO: 28	P12 con lisina N-terminal

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona un método de formulación de péptidos unidos a fluorocarburo para administración a un ser humano o animal y formulaciones de péptidos unidos a fluorocarburo farmacéuticamente aceptables que se pueden obtener mediante el método de la invención. El método de la invención comprende la etapa de solubilizar el péptido unido a fluorocarburo en una solución ácida, preferiblemente en ácido acético. La invención también proporciona formulaciones acuosas que son ácidas y por lo tanto inadecuadas para la administración a un ser humano o animal pero que son importantes para obtener la formulación farmacéuticamente aceptable.

10 Generalmente, al menos un péptido unido a fluorocarburo usado en el proceso de formulación o presente en la formulación ácida acuosa o formulación farmacéuticamente aceptable de la invención comprende un péptido de al menos 20 restos de aminoácidos, que tiene al menos 50 % de restos de aminoácidos hidrófobos y que tiene un punto isoelectrico mayor o igual que 7.

15 Una formulación de la invención puede comprender, o el método de formulación de la invención puede utilizar, al menos un péptido unido a fluorocarburo, en el que el péptido comprende al menos aproximadamente 20 aminoácidos en los cuales al menos aproximadamente el 50 % de los aminoácidos son hidrófobos. Otros péptidos unidos a fluorocarburo presentes en la formulación pueden ser más cortos que 20 aminoácidos y/o pueden tener menos de 50 % de restos hidrófobos.

20 Las formulaciones de la presente invención pueden contener péptidos unidos a fluorocarburo que comprenden una secuencia de al menos siete aminoácidos hasta aproximadamente 100 aminoácidos, tal como de aproximadamente 9 a aproximadamente 50 aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 aminoácidos, tal como de aproximadamente 25 a aproximadamente 38, por ejemplo 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 o 37 aminoácidos.

30 La formulación de la invención puede comprender al menos un péptido unido a fluorocarburo, en el que al menos el 50 % de los aminoácidos en el péptido son hidrófobos. Generalmente, entre aproximadamente 50 % y aproximadamente 80 %, tal como aproximadamente 70 % o aproximadamente 75 %, de restos son hidrófobos. El límite inferior podría ser 48 % o 49 %. Preferiblemente, el péptido comprende de aproximadamente 55 % a aproximadamente 60 o aproximadamente 65 % de restos hidrófobos. Cuando la formulación comprende otros péptidos unidos a fluorocarburo, los otros péptidos unidos a fluorocarburo pueden tener menos del 50 % de hidrofobicidad. Por ejemplo, el componente peptídico de otro péptido unido a fluorocarburo puede comprender de aproximadamente 30 % a aproximadamente 70 % de restos hidrófobos, por ejemplo, aproximadamente 40 %, tal como aproximadamente 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o 65 % de restos hidrófobos. Triptófano (W), tirosina (Y), isoleucina (I), fenilalanina (F), leucina (L), valina (V), metionina (M), arginina (A), prolina (P), glicina (G) y cisteína (C) son aminoácidos hidrófobos. En una realización preferida, ninguno de los péptidos presentes en la formulación comprende una secuencia contigua de 20 o más restos de aminoácidos en los cuales más del 80 % de los restos son hidrófobos.

40 Uno o más de los otros péptidos unidos a fluorocarburo pueden comprender un péptido que: tiene una longitud de al menos 20 restos de aminoácidos; comprende al menos un 50 % de restos de aminoácidos hidrófobos; y/o tiene un punto isoelectrico mayor o igual que 7. El primer péptido unido a fluorocarburo y/o uno o más de los otros péptidos unidos a fluorocarburo pueden comprender un péptido que: comprende un aminoácido cargado positivamente en los últimos 15 aminoácidos contiguos distales al fluorocarburo; y/o no comprende una secuencia contigua de 20 restos de aminoácidos que comprende más del 80 % de restos de aminoácidos hidrófobos.

45 En una realización, ninguno de los péptidos en una formulación de la invención tiene un punto isoelectrico inferior a 7, no comprende un aminoácido cargado positivamente en los últimos 15 aminoácidos contiguos distales al fluorocarburo y/o comprende una secuencia contigua de 20 restos de aminoácidos que comprende más de 80 % de restos de aminoácidos hidrófobos.

50 Los péptidos unidos a fluorocarburo en la formulación de la invención están generalmente presentes en micelas con

- un diámetro de menos de 0,22 μm . Las micelas generalmente tienen un diámetro de aproximadamente 15 a aproximadamente 200 nm, generalmente de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm, tal como de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 30 nm o de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 50 nm. Sin embargo, pueden estar presentes algunas micelas más grandes. En general, no más del 20 %, tal como de
- 5 aproximadamente 10 % a aproximadamente 15 % de los agregados tienen un diámetro mayor que 100 nm. Preferiblemente, al menos 80 % de las micelas de péptido unidas a fluorocarburo tienen un diámetro de menos de 100 nm. El tamaño de la micela se puede determinar por cualquier método adecuado, tal como por dispersión dinámica de luz (DLS) o usando microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- 10 La formación de micelas puede facilitarse solubilizando los péptidos unidos a fluorocarburo en una solución ácida. Por ejemplo, los péptidos unidos a fluorocarburo pueden solubilizarse en ácido acético como se describe en la presente memoria. La formulación acuosa de la invención para su uso en la preparación de una formulación farmacéuticamente aceptable puede ser ácida, teniendo, por ejemplo, un pH de 5 o menos.
- 15 La formulación farmacéuticamente aceptable de la invención puede estar en forma seca, tal como liofilizada. La formulación farmacéuticamente aceptable de la invención puede ser una solución acuosa, por ejemplo formada disolviendo un liofilizado u otra formulación seca en un medio acuoso. La solución acuosa tiene generalmente pH neutro.
- 20 En una formulación acuosa (líquida) de la invención, la solución es generalmente transparente sin agregados visibles. En particular, no es visible material en partículas en la solución después del mezclado en vórtice y sonicación. Esto se aplica tanto a la formulación ácida como a la formulación farmacéuticamente aceptable.
- 25 El péptido es generalmente un antígeno o alérgeno peptídico capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal, incluyendo seres humanos, es decir, el péptido es generalmente un péptido inmunógeno. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria tendrá un efecto beneficioso en el hospedador. Los péptidos inmunógenos pueden derivarse de un agente infeccioso (patógeno), tal como un virus, bacteria, micobacteria, parásito u hongo o de una proteína autóloga, tal como un antígeno de cáncer (proteína derivada de una célula tumoral) o de un alérgeno.
- 30 Ejemplos de virus incluyen y no se limitan a virus animales y humanos tales como: virus de la gripe, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis A (VHA), virus respiratorio sincitial (RSV), virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus de la encefalitis japonesa (JEV), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (EBV), virus del herpes (HSV-1 o HSV-2), virus del Ébola, virus de Marburg, virus del dengue, virus del Nilo occidental y virus de la fiebre amarilla, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) y virus de la inmunodeficiencia felina (FIV).
- 35 Ejemplos de bacterias y micobacterias incluyen, pero no se limitan a *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella*, *Rickettsiae*, *Chlamydiae* y *Listeria monocytogenes*.
- 40 Ejemplos de parásitos incluyen, pero no se limitan a, *Plasmodium falciparum* y otras especies de la familia *Plasmodiidae*.
- Ejemplos de hongos incluyen, pero no se limitan a, *Candida albicans*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Pneumocystis*.
- 45 Los antígenos autólogos o autoantígenos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes antígenos asociados con cánceres: P53, MAGE-A3, NY-ESO-1, SURVIVIN, WT1, HER-2/neu, MUC1, hTERT, MAGE-1, LAGE-1, PAP, T21, TRP-2, PSA, Livin, HAGE, SSX-1, PRAME, PASD1, IMP-3, SSX-4, CDCA-1 y/o BAGE.
- 50 Los alérgenos incluyen, pero no se limitan a fosfolipasa A₂ (API ml) asociados con reacciones graves a la abeja, Derp-2, Der p 2, Der f, Der p 5 y Der p 7 asociados con la reacción contra el ácaro del polvo doméstico *Dermatophagoides pteronyssinus*, el alérgeno de la cucaracha Bla g 2 y el principal alérgeno del polen de abedul Bet v 1.
- 55 En una realización, el péptido se deriva del virus de la gripe. El antígeno peptídico del virus de la gripe puede comprender uno o más epítopos de una proteína de tipo A del virus de la gripe, una proteína de tipo B del virus de la gripe o una proteína de tipo C del virus de la gripe. Ejemplos de las proteínas del virus de la gripe, tanto de los tipos A como B, incluyen: hemaglutinina, neuraminidasa, proteína de matriz (M1), M2, nucleoproteína (NP), PA, PB1, PB2, NS1 o NS2 en cualquier combinación.
- 60 Como se usa en la presente memoria, el término “inmunógeno” se refiere a una molécula que tiene la capacidad de ser reconocida por receptores inmunológicos tales como el receptor de linfocitos T (TCR) o el receptor de linfocitos B (BCR o anticuerpo). El péptido inmunógeno puede ser natural o no natural, siempre que presente al menos un epítipo, por ejemplo un epítipo de linfocitos T y/o de linfocitos B. El péptido puede contener uno o más epítopos de linfocitos T, incluyendo epítopos de linfocitos T auxiliares y/o epítopos de linfocitos T citotóxicos (CTL) y/o uno o más epítopos de linfocitos B o combinaciones de epítopos de linfocitos T y B, tales como epítopos de MHC de clase I o epítopos de MHC de clase II. Los métodos para identificar epítopos son bien conocidos en la técnica.
- 65

El péptido puede comprender uno o más epítomos. El péptido puede comprender más de un epítomo unidos entre sí. Uno de tales ejemplos es el uso de péptidos de fusión donde un epítomo de linfocito T auxiliar promiscuo puede estar unido covalentemente a uno o múltiples epítomos CTL o uno o múltiples epítomos de linfocitos B. Como ejemplo, el epítomo de linfocito T auxiliar promiscuo podría ser el péptido PADRE, el péptido del toxoide tetánico (830-843) o la hemaglutinina del virus de la gripe, HA (307-319).

Los epítomos pueden ser epítomos lineales solapantes de tal manera que el péptido comprende un grupo de epítomos multiespecíficos densamente empaquetados.

El extremo del péptido que no está conjugado con la unión de fluorocarburo puede alterarse para promover la solubilidad de la construcción mediante la formación de micelas. Por ejemplo, se podría añadir un aminoácido cargado positivamente al péptido con el fin de promover el ensamblaje de micelas. El extremo N-terminal o C-terminal del péptido puede acoplarse al vector para crear la construcción. Para facilitar la síntesis a gran escala de la construcción, los restos de aminoácidos N o C-terminales del péptido pueden ser modificados. Cuando el péptido deseado es particularmente sensible a la escisión por las peptidasas, el enlace peptídico normal puede ser reemplazado por un imitador del péptido no escindible. Tales enlaces y métodos de síntesis son bien conocidos en la técnica.

También se pueden incorporar aminoácidos no normales no naturales en las secuencias de péptidos, siempre que no interfieran con la capacidad del péptido para interactuar con moléculas MHC y puedan sufrir reacciones cruzadas con linfocitos T que reconocen las secuencias naturales. Los aminoácidos no naturales pueden usarse para mejorar la resistencia de los péptidos a la proteasa o la estabilidad química. Ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen los aminoácidos D y modificaciones de cisteína.

El péptido puede derivarse por purificación de la proteína nativa o puede producirse mediante tecnología recombinante o mediante síntesis química. Los métodos para la preparación de péptidos son bien conocidos en la técnica.

Los diseñadores de vacunas entenderán que se puede requerir más de un péptido para proporcionar un efecto profiláctico o inmunoterapéutico más amplio. Tales productos de múltiples componentes son deseables puesto que son probablemente más eficaces para provocar respuestas inmunitarias apropiadas. Por ejemplo, la formulación óptima de una vacuna contra la gripe puede comprender una serie de epítomos peptídicos de diferentes proteínas del virus de la gripe o la formulación óptima de un inmunoterápico para el VIH puede comprender una serie de epítomos de diferentes proteínas del VIH. En otra alternativa, se pueden incorporar múltiples epítomos en una formulación con el fin de conferir inmunidad contra una serie de patógenos. Por ejemplo, una vacuna contra la infección respiratoria puede contener epítomos del virus de la gripe y del virus respiratorio sincitial.

Una formulación de la invención puede comprender múltiples péptidos inmunógenos. Generalmente, cada péptido comprende un epítomo diferente. Cada péptido puede estar unido a un vector de fluorocarburo común. Más prácticamente, las combinaciones de péptidos unidos a fluorocarburo pueden estar presentes en una formulación de la invención, en la que diferentes péptidos están unidos independientemente a cadenas de fluorocarburo. En una mezcla de péptidos unidos a fluorocarburo, cada péptido puede estar unido a una cadena de fluorocarburo de estructura única. En otra alternativa, la mezcla puede comprender péptidos unidos a cadenas de fluorocarburo con estructuras diferentes.

Una formulación de la invención puede comprender uno o más péptidos unidos a fluorocarburo, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 10. En realizaciones particulares, la vacuna de múltiples componentes puede contener 4, 5, 6, 7, 8 o 9 péptidos unidos a fluorocarburo. Esto ayuda a la generación de una respuesta inmunitaria multi-epitópica.

Los diferentes péptidos presentes en un producto de múltiples componentes pueden ser diferentes antígenos del mismo patógeno, o pueden ser antígenos de diferentes patógenos. En otra alternativa, los péptidos pueden ser diferentes antígenos tumorales o antígenos de diferentes partes de una proteína autóloga.

En los Ejemplos se usan péptidos unidos a fluorocarburo que comprenden péptidos del virus de la gripe inmunógenos. La presente invención no se limita a estos péptidos particulares sino que se extiende a cualquier péptido inmunógeno que tenga las propiedades descritas anteriormente. Sin embargo, las formulaciones preferidas de la invención incluyen uno o más de los siguientes seis péptidos inmunógenos del virus de la gripe que se seleccionan de segmentos altamente conservados de las proteínas PA, PB1, PB2, NP y M1:

HMAIIKKYTSGRQEKNPSLRMKWMMAMKYPITADK (SEQ ID NO: 1)

VAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLTQG (SEQ ID NO: 2)

YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE (SEQ ID NO: 3)

APIMFSNKMARLGKGYMFESKRMKLRTQIPAEMLA (SEQ ID NO: 4)

DQVRESRNPNGAEIEDLIFLARSALILRGsvAHKS (SEQ ID NO: 5)

DLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPSER (SEQ ID NO: 6)

Preferiblemente, cada uno de los péptidos está unido por separado a un vector fluorocarburo. Las formulaciones particularmente preferidas de la invención comprenden los seis péptidos unidos a fluorocarburo anteriores y no incluyen péptidos unidos a fluorocarburos que comprenden péptidos que tienen las secuencias mostradas en cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 14, 23 y 24. Otros péptidos unidos a fluorocarburo pueden incluirse en las formulaciones preferidas de la invención. Sin embargo, se prefiere que la formulación comprenda los seis péptidos unidos a fluorocarburo descritos anteriormente y ningún otro péptido unido a fluorocarburo.

Uno o más de los seis péptidos pueden estar sustituidos por un péptido variante que comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos. Los péptidos variantes pueden comprender una secuencia derivada de diferentes cepas del virus de la gripe. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 puede ser reemplazada por la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 2 puede ser reemplazada por la SEQ ID NO: 8 o 9, la SEQ ID NO: 3 puede ser reemplazada por la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 4 por la SEQ ID NO: 11 y/o la SEQ ID NO: 5 por la SEQ ID NO: 12.

Los péptidos pueden estar unidos al vector de fluorocarburo a través de un resto espaciador como se describe a continuación. El resto espaciador es preferiblemente un resto de lisina. Por consiguiente, la formulación preferida de la invención puede comprender péptidos unidos a fluorocarburo en los cuales los péptidos tienen una o más de las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 17 a 22. La lisina N-terminal en los péptidos está preferiblemente unida a un fluorocarburo que tiene la fórmula $C_8F_{17} (CH_2)_2COOH$. El fluorocarburo está acoplado preferiblemente a la cadena épsilon del resto de lisina N-terminal.

De este modo, en una realización preferida, la formulación farmacéuticamente aceptable puede consistir en, o consistir esencialmente en, seis péptidos unidos a fluorocarburo que comprenden las SEQ ID NO: 1 a 6 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante.

En cada uno de los seis péptidos unidos a fluorocarburo, los péptidos consisten preferiblemente en uno de las SEQ ID NO: 1 a 6 con un resto de lisina N-terminal añadido (es decir, uno de la SEQ ID NO: 17 a 22), cuyo resto de lisina está acoplado a una cadena de fluorocarburo que tiene la fórmula $C_8F_{17} (CH_2)_2COOH$ a través de la cadena épsilon del resto de lisina.

La unión de fluorocarburo en el péptido unido a fluorocarburo puede comprender una o más cadenas derivadas de perfluorocarburo o radicales de fluorocarburo/hidrocarburo mixtos, y puede ser saturada o insaturada, teniendo cada cadena de 3 a 30 átomos de carbono.

De este modo, las cadenas en la unión de fluorocarburo son generalmente saturadas o insaturadas, preferiblemente saturadas. Las cadenas en la unión del fluorocarburo pueden ser lineales o ramificadas, pero son preferiblemente lineales. Cada cadena tiene generalmente de 3 a 30 átomos de carbono, preferiblemente de 5 a 25, más preferiblemente de 8 a 20.

Con el fin de unir covalentemente la unión de fluorocarburo al péptido, se incluye un grupo reactivo, o un ligando, por ejemplo $-CO-$, $-NH-$, S, O o cualquier otro grupo adecuado. El uso de tales ligandos para conseguir enlaces covalentes es bien conocido en la técnica. El grupo reactivo puede estar situado en cualquier posición sobre la molécula de fluorocarburo.

El acoplamiento del resto fluorocarburo al péptido se puede conseguir a través de grupos funcionales tales como $-OH$, $-SH$, $-COOH$ y $-NH_2$ naturalmente presentes o introducidos en cualquier sitio del péptido. Ejemplos de tales enlaces incluyen enlaces amida, hidrazona, disulfuro, tioéter y oxima.

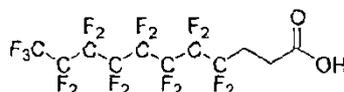
Opcionalmente, se puede incorporar un elemento espaciador (peptídico o no peptídico) para permitir la escisión del péptido del elemento fluorocarbonado para procesamiento dentro de una célula presentadora de antígeno y para optimizar la presentación estérica del péptido. El espaciador también se puede incorporar para ayudar en la síntesis de la molécula y para mejorar su estabilidad y/o solubilidad. Ejemplos de espaciadores incluyen polietilenglicol (PEG) o aminoácidos tales como lisina o arginina que pueden ser escindidos por enzimas proteolíticas.

En una realización, el péptido unido a fluorocarburo puede tener la estructura química $C_mF_n-C_yH_x-(Sp)-R$ o derivados de la misma, donde $m = 3$ a 30 , $n \leq 2m + 1$, $y = 0$ a 15 , $x \leq 2y$, $(m + y) = 3$ a 30 y Sp es un resto espaciador químico opcional y R es un antígeno peptídico. Generalmente m y n satisfacen la relación $2m-1 \leq n \leq 2m + 1$, y preferiblemente $n = 2m + 1$. Generalmente x e y satisfacen la relación $2y-2 \leq x \leq 2y$, y preferiblemente $x = 2y$. Preferiblemente, el resto $C_mF_n-C_yH_x$ es lineal.

Se prefiere que m sea de 5 a 15, más preferiblemente de 8 a 12. También se prefiere que y sea de 0 a 8, más

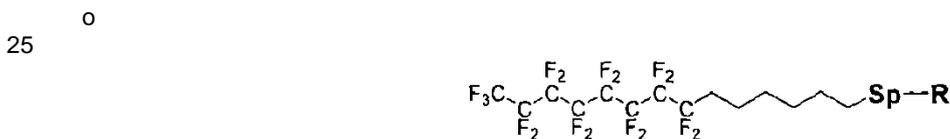
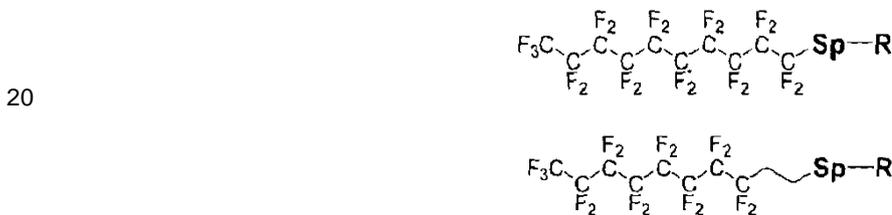
preferiblemente de 0 a 6 o de 0 a 4. Por lo tanto, se prefiere particularmente que el resto $C_mF_n-C_yH_x$ (es decir, $n = 2m + 1$ y $x = 2y$) sea lineal, y que $m = 8$ a 12 e $y = 0$ a 6 o 0 a 4 .

5 En un ejemplo particular, la unión de fluorocarburo se deriva del ácido 2H, 2H, 3H, 3H-perfluoroundecanoico de la siguiente fórmula:



10 Así, una unión de fluorocarburo preferida es el resto saturado lineal $C_8F_{17}(CH_2)_2-$.
 Otros ejemplos de uniones de fluorocarburo tienen las siguientes fórmulas: $C_6F_{13}(CH_2)_2-$, $C_7F_{15}(CH_2)_2-$, $C_9F_{19}(CH_2)_2-$, $C_{10}F_{21}(CH_2)_2-$, $C_5F_{11}(CH_2)_3-$, $C_6F_{13}(CH_2)_3-$, $C_7F_{15}(CH_2)_3-$, $C_8F_{17}(CH_2)_3-$ y $C_9F_{19}(CH_2)_3-$ las cuales se derivan de $C_6F_{13}(CH_2)_2COOH$, $C_7F_{15}(CH_2)_2COOH$, $C_9F_{19}(CH_2)_2COOH$, $C_{10}F_{21}(CH_2)_2COOH$, $C_5F_{11}(CH_2)_3COOH$, $C_6F_{13}(CH_2)_3COOH$, $C_7F_{15}(CH_2)_3COOH$, $C_8F_{17}(CH_2)_3COOH$ y $C_9F_{19}(CH_2)_3COOH$ respectivamente.

Ejemplos preferidos de estructuras adecuadas para las construcciones vector de fluorocarburo-antígeno tienen la fórmula:



30 en las cuales Sp y R son como se han definido anteriormente. Preferiblemente, Sp se deriva de un resto de lisina y tiene la fórmula $-CONH-(CH_2)_4-CH(NH_2)-CO-$. Preferiblemente, R es una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 6. El grupo amino del aminoácido N-terminal de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 o 6 forma así un enlace amida con el grupo carboxilo C-terminal del espaciador de fórmula $-CONH-(CH_2)_4-CH(NH_2)-CO-$.

35 En el contexto de la presente invención, la unión de fluorocarburo puede modificarse de tal manera que el compuesto resultante sea todavía capaz de administrar el péptido a las células presentadoras de antígeno. Así, por ejemplo, varios átomos de flúor pueden ser reemplazados por otros átomos de halógeno tales como cloro, bromo o yodo. Además, es posible sustituir una serie de átomos de flúor por grupos metilo y conservar todavía las propiedades de la molécula descrita en la presente memoria.

40 La presente invención proporciona tanto una formulación acuosa ácida como una formulación farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más, tales como dos o más péptidos unidos a fluorocarburo y opcionalmente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, al menos un péptido unido a fluorocarburo en la formulación comprende un péptido de al menos 20 restos de aminoácidos, que tiene al menos un 50 % de restos de aminoácidos hidrófobos y que tiene un punto isoeléctrico mayor o igual que 7. El excipiente puede ser un estabilizante o un agente voluminoso necesario para una liofilización eficaz. Los ejemplos incluyen sorbitol, manitol, polivinilpirrolidona y mezclas de los mismos, preferiblemente manitol. Otros excipientes que pueden estar presentes incluyen conservantes tales como antioxidantes, lubricantes, crioconservantes y aglutinantes bien conocidos en la técnica.

50 La presente invención proporciona un método para preparar las formulaciones de la invención.

55 En un método de la invención, al menos un péptido unido a fluorocarburo se solubiliza en ácido acético como una primera etapa en la formulación de un producto farmacéutico. El péptido unido a fluorocarburo usado como material de partida está generalmente en forma desecada. El péptido(s) unido a un fluorocarburo solubilizado en ácido acético comprende generalmente un péptido que tiene al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud en el cual al menos aproximadamente el 50 % de los aminoácidos son hidrófobos. Otros péptidos unidos a fluorocarburo pueden solubilizarse en ácido acético o en otros disolventes. En particular, los péptidos unidos a fluorocarburo que comprenden péptidos de menos de 20 aminoácidos y/o que tienen menos de 50 % de restos hidrófobos se pueden

solubilizar en un disolvente distinto del ácido acético.

El término “solubilización” se usa en la presente memoria para designar la dispersión de péptidos unidos a fluorocarburos en un disolvente para formar una solución visualmente transparente que no pierde material tras la filtración estéril. Los péptidos unidos a fluorocarburo pueden estar presentes en una estructura micelar multimolecular. Por “dispersión” se entiende la disolución de los péptidos unidos a fluorocarburo liofilizados con el fin de alterar el material en partículas y alcanzar la solubilidad mediante la formación de estructuras micelares.

El término “agregados” se utiliza en la presente memoria para describir estructuras peptídicas macromoleculares unidas a fluorocarburo. Los agregados micelares de péptidos unidos a fluorocarburo pueden ayudar a la solubilización. Los agregados macromoleculares de péptidos unidos a fluorocarburo dan como resultado materia en partículas visibles. La expresión “materia en partículas” se utiliza aquí para indicar agregados de péptidos unidos a fluorocarburo visibles a simple vista.

La solubilización del péptido unido a fluorocarburo en ácido acético generalmente da como resultado la formación de una solución transparente que contiene agregados micelares de péptidos unidos a fluorocarburo. Los agregados micelares tienen generalmente un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 50 nm, por ejemplo de aproximadamente 17 nm a aproximadamente 30 nm. Sin embargo, algunos agregados mayores que tienen un diámetro de más de aproximadamente 50 nm, generalmente no más de 20 %, tal como de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 % de los agregados, tienen un diámetro mayor que 100 nm. Preferiblemente, ningún agregado es visible a simple vista. El tamaño de partícula se puede determinar por cualquier método adecuado, tal como mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) o utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM). Por ejemplo, utilizando TEM en tinción negativa, se depositan 20 µl de solución de péptido unido a fluorocarburo en una rejilla de microscopio electrónico de cobre revestida con carbono Formvar (malla 300). Después se añaden 20 µl de acetato de uranilo (acuoso al 1 %). Después de 30 segundos, el exceso de solución se elimina rápidamente con un papel de filtro Whatman. La muestra se deja secar a continuación durante al menos 2 minutos antes del análisis. La microscopía electrónica de transmisión se realiza a continuación en un Philips CM120 BioTWIN a 120 kV de voltaje de aceleración. La adquisición de imágenes se realiza con un aumento directo que varía de 50.000x a 150.000x.

La concentración de péptido unido a fluorocarburo en la solución es generalmente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, tal como aproximadamente 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 2,5 mM o 5 mM. Un ejemplo de una concentración adecuada es aproximadamente 10 mg/ml.

En las Figuras 1 y 2 se proporcionan ejemplos de flujos del proceso de fabricación típicos, que comienzan en la etapa inicial de solubilización y llegan hasta la presentación final del producto. Estos enfatizan el requisito de que el disolvente no solo logre la solubilidad del péptido unido al fluorocarburo, sino que también sea compatible con los procesos posteriores, incluyendo la mezcla con estabilizadores potenciales, filtración estéril y liofilización. En los diagramas de flujo la letra *n* se utiliza para indicar un número variable de péptidos unidos a fluorocarburo adicionales que podrían ser incluidos en la formulación.

Se permiten variaciones en el flujo del proceso, como es conocido por los expertos en la materia, para conseguir las mismas características de producto resultantes; por ejemplo, que los componentes de entrada se mezclen homogéneamente juntos hasta obtener las proporciones deseadas con cualquier agregado dispersado, estéril y presentado en un formato adecuado para la administración. Tales ejemplos podrían incluir la introducción de una etapa de mezclado en vórtice y/o sonicación después de la mezcla o después de la dilución para facilitar la solubilización. Otras permutaciones del flujo del proceso de fabricación podrían incluir la filtración estéril que se realiza en una etapa anterior del proceso o la omisión de la liofilización para permitir una presentación final líquida.

Como alternativa, se puede solubilizar individualmente un conjunto de péptidos unidos a fluorocarburo en un disolvente orgánico, mezclarse después y filtrarse estérilmente, con un segundo conjunto de péptidos unidos a fluorocarburo que se solubilizan en un disolvente alternativo, se mezclan y se filtran estériles (Figura 2) antes de mezclar entre sí los dos grupos de péptidos unidos a fluorocarburo para su procesamiento adicional.

El disolvente inicial puede ser el mismo o diferente para cada péptido unido a fluorocarburo de manera que uno o más de los péptidos unidos a fluorocarburo pueda solubilizarse en ácido acético y uno o más de los péptidos unidos a fluorocarburo puedan solubilizarse en otro disolvente que tenga propiedades aceptables. Por ejemplo, en el flujo de proceso de la Figura 1, B puede ser un disolvente diferente de A.

Como alternativa, se puede usar ácido acético como el disolvente inicial para diferentes péptidos unidos a fluorocarburo, pero se pueden usar en diferentes concentraciones optimizadas para los diferentes péptidos unidos a fluorocarburo. Por ejemplo, en el flujo de proceso de la Figura 1, B puede ser una concentración diferente del mismo disolvente que A.

Los diferentes péptidos unidos a fluorocarburo pueden mezclarse antes de la solubilización.

El ácido acético puede utilizarse a una concentración de 5 a 80 % (v/v) de ácido acético acuoso, tal como a una

concentración del 10 al 70 % (v/v), tal como una concentración de aproximadamente el 20 % (v/v) o 50 % (v/v). En un método para formular una mezcla de péptidos unidos a fluorocarburo, se pueden solubilizar diferentes péptidos en diferentes concentraciones de ácido acético antes de la mezcla. Por ejemplo, uno o más péptidos unidos a fluorocarburo pueden solubilizarse en ácido acético al 10 % (v/v) y uno o más péptidos pueden ser solubilizados en ácido acético al 80 % (v/v).

Cuando se usa más de un disolvente en el proceso de fabricación, cada disolvente utilizado es generalmente: capaz de solubilizar el péptido unido a fluorocarburo que se está usando para solubilizar a concentraciones relativamente altas (por ejemplo, hasta 10 milimolar, tal como hasta 2 milimolar); miscible en agua para facilitar la dilución con agua antes de la liofilización; compatible con estabilizadores de liofilización, tales como manitol, que pueden usarse en el proceso de fabricación; tiene un perfil de seguridad aceptable para las autoridades reguladoras farmacéuticas, por ejemplo, cumple con los requisitos de ICH Q3C (Nota explicativa sobre impurezas: Disolventes residuales) y con los requisitos de los Disolventes de Clase III, según lo definido por la USP Disolventes residuales <467> (límite de disolvente residual de 50 mg/día en producto acabado o menos de 5000 ppm o 0,5 %); susceptible de liofilización, es decir, suficientemente volátil para ser eliminado a niveles seguros después de la liofilización; capaz de dispersar eficientemente las moléculas de péptido unidas a fluorocarburo de una manera reproducible y uniforme de forma que se minimicen las pérdidas de rendimiento en la filtración de grado de esterilización; incapaz de reaccionar con, o promover la degradación de la molécula de péptido unida a fluorocarburo y/o compatible con los materiales usados rutinariamente en la fabricación de productos farmacéuticos (envases/membranas de filtro/tuberías, etc.).

Ejemplos de disolventes que pueden usarse para dispersar uno o más de los péptidos unidos a fluorocarburo en la mezcla incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS), propan-2-ol, terc-butanol, acetona y otros disolventes orgánicos.

Cuando los diferentes péptidos unidos a fluorocarburo se solubilizan por separado, por ejemplo en diferentes disolventes o en diferentes concentraciones de ácido acético, los péptidos solubilizados se mezclan para crear una mezcla de péptidos unidos a fluorocarburo.

También se pueden añadir uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables al péptido o mezcla de péptidos unidos a fluorocarburos solubilizados.

Por “*excipiente*” se entiende una sustancia inactiva utilizada como un vehículo para los péptidos unidos a fluorocarburo. Generalmente, los péptidos solubilizados unidos a fluorocarburo se mezclan con el excipiente. Los excipientes potenciales que se pueden usar en el proceso de fabricación incluyen estabilizadores o agentes de carga necesarios para una liofilización eficaz. Los ejemplos incluyen sorbitol, manitol, polivinilpirrolidona y mezclas de los mismos, preferiblemente manitol. Otros excipientes incluyen conservantes tales como antioxidantes, lubricantes, crioconservantes y aglutinantes bien conocidos en la técnica.

Para aumentar la amplitud e intensidad de la respuesta inmunitaria asociada al antígeno peptídico, se pueden incluir en la formulación uno o más adyuvantes y/u otros agentes inmunopotenciadores. Un “*adyuvante*” en este contexto es un agente que es capaz de modular la respuesta inmunitaria dirigida a un antígeno coadministrado aunque tenga pocos o ningún efecto directo cuando se administra por sí mismo. Tales adyuvantes pueden ser capaces de potenciar la respuesta inmunitaria en términos de magnitud y/o perfil de citocinas.

Los adyuvantes adecuados incluyen:

- (1) refinamientos naturales o derivados sintéticos de componentes naturales de bacterias tales como adyuvante de Freund y sus derivados, derivados de muramildipéptido (MDP), CpG, monofosforil lípido A;
- (2) otros agentes adyuvantes o potenciadores conocidos tales como saponinas, sales de aluminio y citocinas;
- (3) adyuvantes de aceite en agua, tales como la emulsión submicrónica de aceite en agua MF-59, adyuvantes de agua en aceite, complejo de inmuoestimulación (ISCOM), liposomas, nanopartículas y micropartículas formuladas;
- (4) toxinas bacterianas y toxoides y
- (5) otros adyuvantes útiles bien conocidos por los expertos en la materia.

Después de la solubilización y la mezcla, se diluye la solución de péptido(s) unido(s) a fluorocarburo. Por ejemplo, la mezcla puede diluirse en agua.

La solución que contiene los péptidos unidos a fluorocarburo se esteriliza preferiblemente. La esterilización es particularmente preferida cuando la formulación está destinada a un uso sistémico. Se puede usar cualquier medio adecuado de esterilización, tal como esterilización por UV o esterilización por filtración. Preferiblemente, se utiliza la esterilización por filtración. La filtración estéril puede incluir un filtro de 0,45 µm seguido por un tren de filtración de grado de esterilización de 0,22 µm.

La esterilización puede llevarse a cabo antes o después de la adición de cualquier excipiente y/o adyuvante.

Después de la esterilización por filtración, el rendimiento del péptido unido a fluorocarburo presente en la solución estéril es generalmente al menos 80 %, preferiblemente al menos 90 %, más preferiblemente al menos 95 % de la cantidad de péptido unido a fluorocarburo presente antes de la esterilización. Puede obtenerse un rendimiento de más del 95 %, tal como un rendimiento de 98 %, 99 % o más, tal como un rendimiento del 100 %.

Después de la esterilización, el péptido unido a fluorocarburo está generalmente presente en la solución en estructuras micelares que tienen diámetros de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm, tal como aproximadamente 30 nm o aproximadamente 50 nm. Las partículas más grandes presentes en la solución antes de la esterilización pueden generalmente ser remodeladas mediante esterilización por filtración. La solución esterilizada puede almacenarse en un recipiente estéril.

La formulación estéril se seca para eliminar el ácido acético. El secado de la formulación también facilita el almacenamiento a largo plazo. Se puede usar cualquier método de secado adecuado. La liofilización se prefiere, pero se pueden usar otros métodos de secado adecuados, tales como secado al vacío, secado por pulverización, secado por congelación o secado en lecho fluido. El procedimiento de secado puede dar como resultado la formación de una torta amorfa dentro de la cual se incorporan los péptidos unidos a fluorocarburo.

Para el almacenamiento a largo plazo, la formulación estéril puede ser liofilizada. La liofilización puede conseguirse por secado por congelación. El secado por congelación incluye generalmente la congelación y luego el secado. Por ejemplo, la mezcla de péptidos unidos a fluorocarburo puede congelarse durante 2 horas a -80 °C y secarse por congelación en una máquina liofilizadora durante 24 horas.

Las formulaciones farmacéuticamente aceptables de la invención pueden ser composiciones sólidas. La composición peptídica unida a fluorocarburo puede obtenerse en forma de polvo seco. Una torta resultante de la liofilización se puede moler en forma de polvo. Una composición sólida de acuerdo con la invención puede así tomar la forma de partículas fluidas. La composición sólida se proporciona generalmente como un polvo en un vial, ampolla o jeringa sellados. Si es para inhalación, el polvo se puede proporcionar en un inhalador de polvo seco. Como alternativa, la matriz sólida puede proporcionarse como un parche. Un polvo se puede comprimir en forma de comprimido.

La formulación de péptido unido a fluorocarburo secada, por ejemplo, liofilizada, puede reconstituirse antes de la administración. El término "*reconstitución*" tal como se usa en la presente memoria significa disolución del producto de vacuna seco antes de su uso. Después del secado, tal como liofilización, el producto peptídico unido a fluorocarburo se reconstituye preferiblemente para formar una suspensión homogénea isotónica, de pH neutro. La formulación se reconstituye generalmente en la fase acuosa, por ejemplo añadiendo agua para inyección (Hyclone), solución tampón de histidina (tal como tampón de L-histidina 28 mM) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). La formulación reconstituida se dispensa generalmente en envases estériles, tales como viales, jeringas o cualquier otro formato adecuado para almacenamiento o administración.

La invención proporciona una formulación de péptido unido a fluorocarburo que puede obtenerse por un método de acuerdo con la invención. La formulación puede ser un intermedio en la preparación de un producto farmacéutico.

La invención proporciona una formulación acuosa adecuada para su uso como un intermedio en la preparación de una formulación de péptido unido a fluorocarburo para administración a un ser humano o animal, cuya composición acuosa es ácida y comprende uno o más péptidos solubilizados unidos a fluorocarburo como se ha descrito anteriormente. La solución ácida comprende ácido acético. Al menos uno de los péptidos unidos a fluorocarburo puede tener al menos 20 restos de aminoácidos de longitud, comprender al menos un 50 % de restos de aminoácidos hidrófobos y tener un punto isoeléctrico mayor o igual a 7 y/o estar presente en micelas con un diámetro inferior a 0,22 µm. Preferiblemente, la solución acuosa es estéril. Puede comprender además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona una formulación de péptido unida a fluorocarburo farmacéuticamente aceptable. La formulación farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido, tal como un polvo, una torta o un comprimido. La formulación farmacéutica puede ser una solución acuosa.

La formulación puede almacenarse en un envase, tal como un vial o jeringa estéril.

La invención proporciona así, en una realización, una formulación que comprende un péptido unido a fluorocarburo, en el que el péptido unido a fluorocarburo está presente en estructuras micelares, y una cantidad farmacéuticamente aceptable de ácido acético. En otras formulaciones de la invención, el ácido acético se elimina completamente en la etapa de secado.

El máximo recomendado de ácido acético por la ICH es de 50 mg al día. Generalmente, el nivel de acetato en una formulación de la invención es inferior a 5.000 ppm o 0,5 % de acuerdo con los requisitos para Disolventes de Clase III definidos por la USP Disolventes residuales <467>. La invención también proporciona una formulación intermedia que comprende un péptido unido a fluorocarburo solubilizado en ácido acético.

En un aspecto, la formulación de la invención comprende dos o más péptidos unidos a fluorocarburo, en los que los péptidos unidos a fluorocarburo están presentes en estructuras micelares.

- 5 En otro aspecto, la formulación de la invención comprende un péptido unido a fluorocarburo, en el que el péptido unido a fluorocarburo está presente en estructuras micelares y la formulación está en forma liofilizada.

10 En una formulación de la invención, los péptidos unidos a fluorocarburo están generalmente presentes en múltiples estructuras micelares. Las estructuras micelares tienen generalmente un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm, tal como aproximadamente 50 nm o 70 nm. Se prefiere que al menos el 80 %, tal como al menos el 90 % o al menos el 95 % de las estructuras micelares presentes en la formulación tengan un diámetro de menos de 100 nm tal como un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 50 nm.

15 En un aspecto adicional, la formulación de la presente invención comprende además un excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, en una realización la formulación comprende además manitol y/u otros excipientes.

20 La formulación de la invención puede ser para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia. También se proporciona la formulación de la invención para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un ser humano o animal y la formulación de la invención para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad del cuerpo humano o animal.

25 La formulación de la invención puede usarse en un método para inducir una respuesta inmunitaria en un ser humano o animal que lo necesite, comprendiendo dicho método administrar a dicho ser humano o animal una cantidad profiláctica o terapéutica de una formulación de la presente invención. La respuesta inmunitaria puede ser eficaz en el tratamiento o prevención de una enfermedad.

30 La enfermedad es generalmente una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una alergia, una enfermedad hormonal o cáncer. El péptido unido a fluorocarburo en la formulación se selecciona para incluir uno o más epítomos del patógeno que causa la enfermedad infecciosa, la proteína autóloga implicada en la enfermedad autoinmunitaria o la enfermedad hormonal, el alérgeno responsable de la alergia o un antígeno tumoral expresado en células cancerosas.

35 Ejemplos de enfermedades infecciosas que pueden ser tratadas o evitadas usando una formulación de péptido unida a fluorocarburo de la invención incluyen, pero no se limitan a, infecciones causadas por los siguientes virus, bacterias, micobacterias, parásitos y hongos: virus de la gripe, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis A (VHA), virus sincitial respiratorio (VSR), virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus de la encefalitis japonesa (JEV), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (EBV), virus del herpes (HSV-1 o HSV-2), virus del Ébola, virus de Marburg, virus del dengue, virus del Nilo Occidental y virus de la fiebre amarilla, virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella*, *Rickettsiae*, *Chlamydiae* y *Listeria monocytogenes*, *Plasmodium falciparum* y otras especies de la familia *Plasmodiidae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*, *Clostridium tetani*, *Rhodotorula* y *Pneumocystis*.

45 Ejemplos de cánceres que pueden tratarse o prevenirse usando una formulación de péptido unido a fluorocarburo de la invención incluyen cáncer de mama, melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt y otros cánceres humanos.

50 En una realización preferida, la formulación de la invención se puede usar para tratar o vacunar contra la gripe. En un aspecto adicional de esta realización, la formulación de la vacuna contra la gripe puede administrarse en combinación con una composición terapéutica antiviral, incluyendo tratamientos con inhibidores de la neuraminidasa tales como amantadina, rimantidina, zanamivir u oseltamivir. En otro aspecto adicional, la formulación de la vacuna contra la gripe puede administrarse en combinación con otras vacunas contra la gripe, tales como las vacunas contra la gripe generadoras de anticuerpos convencionales. La otra vacuna contra la gripe es preferiblemente una
55 vacuna contra la gripe estacional.

La administración puede ser contemporánea o separada por el tiempo. La formulación farmacéuticamente aceptable de la invención puede administrarse antes, junto con o después de la composición terapéutica antiviral y/u otra
60 vacuna contra la gripe.

Las formulaciones que comprenden péptidos del virus de la gripe, en particular los seis péptidos del virus de la gripe que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 1 a 6, se proporcionan para su uso en un método de vacunación contra la gripe. Por consiguiente, las formulaciones farmacéuticamente aceptables de la invención que comprenden dicho péptido pueden utilizarse en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la gripe. Las
65 formulaciones de la invención pueden administrarse a un sujeto humano o animal *in vivo* utilizando una variedad de rutas y técnicas conocidas. Por ejemplo, la formulación puede proporcionarse como una solución inyectable,

suspensión o emulsión y administrarse por vía parenteral, subcutánea, oral, epidérmica, intradérmica, intramuscular, interarterial, intraperitoneal, intravenosa usando una aguja y jeringa convencionales o utilizando un sistema de inyección de chorro líquido. La formulación puede administrarse por vía tópica a la piel o tejido mucosal, tal como por vía nasal, intratraqueal, intestinal, sublingual, rectal o vaginal, o ser proporcionada como un pulverizador finamente dividido adecuado para administración respiratoria o pulmonar.

El método de tratamiento puede comprender además la etapa de procesar la mezcla en una formulación adecuada para la administración como una inyección líquida. Preferiblemente, el método comprende además la etapa de procesar la mezcla en una formulación adecuada para administración vía ingestión o vía pulmonar.

La formulación se administra a un sujeto en una cantidad que es compatible con la formulación de dosificación y que será profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. La administración de la formulación de la invención puede ser para cualquier propósito "profiláctico" o "terapéutico". Como se usa en la presente memoria, el término "terapéutico" o "tratamiento" incluye uno o más de los siguientes: la prevención de la infección o reinfección; la reducción o eliminación de los síntomas y la reducción o eliminación completa de un patógeno. El tratamiento puede efectuarse profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (después de la infección).

La elección del vehículo si se requiere es con frecuencia una función de la vía de administración de la composición. Dentro de esta invención, las composiciones se pueden formular para cualquier ruta y medio de administración adecuados. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los utilizados en formulaciones adecuadas para administración oral, ocular, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, transdérmica).

La formulación puede administrarse en cualquier forma adecuada, por ejemplo como un líquido, sólido, aerosol o gas. Por ejemplo, las formulaciones orales pueden tomar la forma de emulsiones, jarabes o soluciones o comprimidos o cápsulas, que pueden estar recubiertas entéricamente para proteger el componente activo de la degradación en el estómago. Las formulaciones nasales pueden ser aerosoles o soluciones. Las formulaciones transdérmicas pueden adaptarse para su sistema de administración particular y pueden comprender parches. Las formulaciones para inyección pueden ser soluciones o suspensiones en agua destilada u otro disolvente o agente de suspensión farmacéuticamente aceptable.

La dosis apropiada de la vacuna o del inmunoterápico a administrar a un paciente se determinará en la clínica. Sin embargo, a modo de orientación, una dosis humana adecuada, que puede ser dependiente de la vía de administración preferida, puede ser de 1 a 1.000 µg, tal como aproximadamente 100 µg, 200 µg o 500 µg. Pueden requerirse dosis múltiples para conseguir un efecto inmunológico o clínico, que, si se requiere, se administrará generalmente con entre 2 a 12 semanas de diferencia. Cuando se requiere el refuerzo de la respuesta inmunitaria durante períodos más largos, se pueden aplicar dosis repetidas entre 1 mes a 5 años de diferencia.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

Ejemplo 1: Síntesis de péptidos

Se sintetizaron péptidos que tenían las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 1 a 6, 10, 11 y 13 a 16. La síntesis de cada péptido se realizó en fase sólida utilizando una estrategia clásica Fmoc/*t*-butilo y una resina TentaGel HL NH₂. Se añadió un resto de lisina al extremo N de cada secuencia. Las secuencias con el resto de lisina N-terminal añadido se muestran en las SEQ ID NO: 17 a 28. Después de la adición de un resto de lisinilo N-terminal, el bloque de resina se dividió en dos partes. Se utilizó una parte para incorporar la cadena de fluorocarburo (C₈F₁₇(CH₂)₂COOH) sobre la cadena épsilon de la lisina N-terminal para derivar el péptido unido a fluorocarburo (FCP). Con la segunda parte, se realizó la acetilación de la cadena épsilon de la lisina N-terminal para derivar el péptido nativo para su uso en estudios comparativos. Se obtuvieron péptidos unidos a fluorocarburo (FCP) purificados y péptidos nativos mediante escisión en presencia de ácido trifluoroacético (TFA) y una purificación final mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC). Tanto los FCP como los péptidos nativos descritos a continuación poseen un grupo amido en el extremo C-terminal. Todas las preparaciones tenían una pureza de 95 % o más y se presentaron un polvo seco, liofilizado. La masa neta de péptidos se calculó basándose en el análisis del contenido de nitrógeno.

Los siguientes péptidos P1 a P12 se unieron a una cadena de fluorocarburo para crear los FCP, o se acetilaron para crear los péptidos nativos (se ha utilizado la representación estándar de código de una sola letra de aminoácidos; X = vector de fluorocarburo (péptidos unidos a fluorocarburo); Z = acetilo (péptidos nativos):

P1: NH₂-K(X o Z)HMAIIKKYTSGRQEKNP SLRMKWMAMKYPITADK-CONH₂
 P2: NH₂- K(X o Z)APIMFSNKMARLGKGYMFESKRMKLRTQIPAEMLA-CONH₂
 P3: NH₂- K(X o Z)APIMFSNKMARLGKGYMFESKSMKLRTQIPAEMLA-CONH₂
 P4: NH₂- K(X o Z)DQVRESRNPNGNAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKS-CONH₂
 P5 NH₂- K(X o Z)DLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVP SER-CONH₂
 P6: NH₂- K(X o Z)SPGMMMGMFNM LSTVLGVSILNLGQKKYKTTY-CONH₂

P7: NH2- K(X o Z)KKKSYINKTGTFEFTSFFYRYGFVANFSMELPSFG-CONH₂
 P8: NH2- K(X o Z)VAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLTQG-CONH₂
 P9: NH2- K(X o Z)YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE-CONH₂
 P10: NH2- K(X o Z)YITKNQPEWFRNLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE-CONH₂
 P11: NH2- K(X o Z)QSRMQFSSLTVNVRGSGMRILVRGNPVPFNYNK-CONH₂
 P12: NH2- K(X o Z)PDLYDYKENRFIEIGVTRREVHIYYLEKANKIKSE-CONH₂

Las propiedades fisicoquímicas de los péptidos nativos se exponen en la Tabla 1 a continuación. Los restos considerados hidrófobos son W, Y, I, F, L, V, M, A, P, G y C. Los restos cargados son (+): K, R, H. (-): D, E

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de péptidos seleccionados

Péptido	Porcentaje de restos hidrófobos	Cargas positivas (incluido el resto lisina añadido en el extremo N-terminal)	Cargas negativas
P1	51	10	2
P2	60	8	2
P3	60	7	2
P4	49	7	5
P5	60	5	4
P6	61	4	0
P7	55	6	2
P8	60	6	3
P9	60	6	2
P10	60	6	2
P11	48	6	0
P12	46	9	7

Ejemplo 2: Solubilidad de péptidos nativos y FCP en agua

Se evaluó la solubilidad de cada FCP en agua. Cada FCP se dispersó en 300 µl de agua hasta una concentración final de 1,333 mM y se mezcló en vórtice y se sonicó. Las condiciones de dispersión típicas fueron cuatro secuencias de tres minutos en el baño de sonicación intercaladas con 30 segundos de mezclado en vórtice. Después de la inspección, la solución resultante se diluyó con una solución de manitol (un medio de liofilización candidato, concentración final del péptido 0,167 mM, manitol al 1,33 % (p/v)). La solubilidad se evaluó mediante la observación visual de la turbidez de la dispersión resultante (escala: Claro / Turbio - / Turbio / Turbio +) y la presencia de materia en partículas. Los resultados se muestran en la Tabla 2

Tabla 2: Dispersabilidad y solubilidad de los FCP en agua y solución de manitol al 1,33 % (p/v)

Péptido unido a fluorocarburo	Dispersión en agua	Dilución adicional en Manitol : Agua
	Solubilidad	Solubilidad
FCP1	Turbia / materia en partículas	Transparente / materia en partículas
FCP2	Turbia - / sin materia en partículas	Transparente / sin materia en partículas
FCP3	Turbia - / materia en partículas	Transparente / materia en partículas
FCP4	Transparente / sin materia en partículas	Transparente / sin materia en partículas
FCP5	Turbia / materia en partículas	Turbia / materia en partículas
FCP6	Turbia - / materia en partículas	Transparente / materia en partículas
FCP7	Turbia + / sin materia en partículas	Turbia + / sin materia en partículas
FCP8	Turbia / materia en partículas	Turbia / materia en partículas
FCP9	Turbia - / materia en partículas	Transparente / materia en partículas
FCP10	Turbia - / materia en partículas	Transparente / materia en partículas
FCP11	Transparente / sin materia en partículas	Transparente / sin materia en partículas
FCP12	Turbia / materia en partículas	Turbia / materia en partículas

La inspección visual de la solución de péptido unido a fluorocarburo individual después de la dispersión inicial en agua mostró que solo P4 y P11 eran completamente solubles en agua; cada una de estas soluciones era transparente sin presencia de partículas. Todas las soluciones restantes estaban turbias y contenían partículas, lo que indica que estos FCP no eran totalmente solubles. En la dilución posterior con la solución de manitol, P2, P4 y P11 fueron completamente solubles produciendo soluciones transparentes y sin materia en partículas visibles. Las soluciones P1, P3, P6, P9 y P10 también fueron transparentes, pero se observaron partículas, lo que indica que eran parcialmente solubles en la solución de manitol/agua. P5, P7, P8 y P12 eran insolubles en la solución de manitol/agua, dando soluciones turbias que contenían materia en partículas. Ni el porcentaje de hidrofobicidad de la secuencia peptídica ni las cargas positivas o negativas se correlacionaban con la solubilidad.

Como comparación, la solubilidad del péptido nativo se evaluó también en agua a la misma concentración molecular; con todos los péptidos nativos excepto P8 las soluciones eran transparentes, no detectándose visualmente materia en partículas.

En conclusión, la solubilidad de cada péptido unido a fluorocarburo depende de sus propiedades de agregación; la mayoría de los FCP no eran totalmente solubles en agua ni en la solución de manitol. La solubilidad de cada FCP no pudo predecirse por sus características fisicoquímicas. Los péptidos nativos equivalentes eran más solubles en agua que los FCP en la misma concentración.

También se evaluó la solubilidad de mezclas de los péptidos unidos a fluorocarburo. Se prepararon formulaciones octavalentes (concentración final de cada péptido 0,167 mM, manitol al 1,33 % (p/v), composiciones FCP proporcionadas en la Tabla 3). La recuperación de cada péptido después de la filtración estéril (Millex 0,22 µm, filtro PVDF 25 mm) se determinó por RP-HPLC.

Tabla 3: Composición de mezclas octavalentes de FCP y recuperaciones de cada FCP después de la filtración estéril

Péptido unido a fluorocarburo	MEZCLA 1 Después de mezclar	RENDIMIENTO %	Péptido unido a fluorocarburo	MEZCLA 2 después de mezclar	RENDIMIENTO %
FCP1	Turbia con materia en partículas	89,9	FCP10	Turbia con materia en partículas	90,7
FCP4		25,1	FCP2		97,3
FCP5		93,8	FCP4		82,3
FCP6		74,1	FCP5		35,6
FCP7		31,7	FCP6		8,8
FCP3		28,6	FCP7		63,2
FCP9		22,9	FCP8		25,3
FCP12		29,6	FCP11		49,4

Las observaciones visuales fueron confirmadas por los resultados de recuperación tras la filtración por HPLC. Los rendimientos totales de la recuperación tras la filtración por RP-HPLC fueron aproximadamente 50 % y 57 % para MIX 1 y MIX 2, respectivamente, lo que indica que la materia en partículas grandes de los FCP se eliminó por filtración. Por lo tanto, las mezclas de FCP son también poco solubles en agua.

Ejemplo 3: Solubilidad de los FCP en excipientes y dispersantes

Con el fin de mejorar la solubilidad de los péptidos unidos a fluorocarburos en agua, se evaluaron diferentes excipientes y dispersantes que han demostrado ser beneficiosos previamente en la fabricación de productos farmacéuticos. Estos incluyen polietilenglicoles, tensioactivos plurónicos, lecitina, glicerina, aceite de soja, aceite de cártamo, glicofurol, dipalmitoilfosfatidilcolina, Labrafac CC (un glicérido de cadena media), hidroxilpropil betaciclodextrina (HPBCD) y sulfobutil éter beta-ciclodextrina y combinaciones de los mismos. La solubilidad de una mezcla equimásica heptavalente de péptidos unidos a fluorocarburo se determinó mediante inspección microscópica (concentración final 2,5 mg/ml).

Ninguna de las condiciones ensayadas fue capaz de conseguir una buena dispersión de los péptidos unidos a fluorocarburo. Se observó que la HPBCD mejoraba la solubilización, pero se necesitaba un día de incubación a temperatura ambiente para conseguir una solubilidad del 70-80 %. En conclusión, los péptidos unidos a fluorocarburo eran resistentes a la acción de dispersantes tales como ciclodextrinas, tensioactivos o copolímeros de bloques.

Ejemplo 4: Solubilidad de los FCP en disolventes orgánicos

La solubilidad de los péptidos unidos a fluorocarburo se evaluó en diferentes disolventes orgánicos. Para propan-2-ol, *terc*-butanol, DMSO y acetona al 80 % (v/v), se prepararon soluciones a la misma concentración final de 1,33 mM de péptido unido a fluorocarburo. Para ácido acético, al 80 % (v/v) la concentración final del péptido unido a fluorocarburo fue 2,0 mM. Los resultados se presentan en la Figura 3.

En conclusión, todos los péptidos unidos a fluorocarburo eran solubles en ácido acético al 80 % (v/v), no observándose espuma ni material en partículas. Las soluciones con propan-2-ol, *terc*-butanol, DMSO y acetona al 80 % (v/v) no fueron capaces de proporcionar una solubilidad completa para los FCP evaluados.

Ejemplo 5: Efectos del manitol sobre la solubilización

Se investigó el efecto de la dilución y la adición de manitol en la solubilización en diversos disolventes. Cada péptido unido a fluorocarburo se dispersó en disolvente al 80 % v/v en agua de acuerdo con la Figura 4 y se mezcló en

vórtice, seguido por una dilución de siete veces con una solución de manitol. Para el propan-2-ol, *terc*-butanol, DMSO y acetona al 80 % v/v, se prepararon soluciones a la misma concentración final del péptido unido a fluorocarburo de 0,167 mM y una concentración final de manitol de 1,33 % (p/v). Para el ácido acético al 80 % v/v, la concentración final del péptido unido a fluorocarburo fue de 0,25 mM. Los resultados se presentan en la Figura 4.

5 También se prepararon mezclas equimolares de péptidos unidos a fluorocarburo igual que antes, que contenían los siguientes péptidos en cada disolvente:

Mezcla 1: FCP1, FCP3, FCP4, FCP5, FCP6, FCP7, FCP9, FCP12.

10 Mezcla 2: FCP2, FCP4, FCP5, FCP6, FCP7, FCP8, FCP10, FCP11.

La solubilidad efectiva de los FCP individuales y de las Mezclas 1 y 2 solo se consiguió usando ácido acético al 80 % (v/v) como se muestra en la figura 4.

15 Ejemplo 6: Recuperación de FCP después de la filtración estéril de soluciones de FCP

La recuperación después de la filtración estéril (Millex 0,22 µm filtro PVDF 25 mm) de cada péptido unido a fluorocarburo en las mezclas preparadas en el Ejemplo 4 se determinó por RP-HPLC. Los resultados se muestran en las Tablas 4 y 5 a continuación.

20

Tabla 4: Porcentaje de recuperaciones de la filtración de FCP individuales de la mezcla octavalente Mezcla 1

Péptido unido a fluorocarburo	80 % v/v ácido acético	80 % v/v Propan-2-ol	80 % v/v <i>Terc</i> -butanol	80 % v/v DMSO	80 % v/v Acetona
FCP1	100,2	97,8	96,1	95,1	89,9
FCP12	100,2	16,9	6,6	32,0	12,7
FCP3	100,5	97,9	102,0	100,8	99,6
FCP4	99,8	20,5	19,3	77,2	24,4
FCP7	99,4	90,9	99,9	47,8	42,7
FCP9	99,8	84,3	84,9	87,7	69,1
FCP5	100,2	34,3	90,2	17,2	3,2
FCP6	101,3	78,4	62,3	85,8	63,2
Media	100,2	65,1	70,2	67,9	50,6

Tabla 5: Porcentaje de recuperaciones de la filtración de FCP individuales de la mezcla octavalente Mezcla 2

Péptido unido a fluorocarburo	80 % v/v ácido acético	80 % v/v Propan-2-ol	80 % v/v <i>Terc</i> -butanol	80 % v/v DMSO	80 % v/v Acetona
FCP11	99,5	57,4	52,3	85,4	76,4
FCP2	99,8	92,7	99,5	98,2	85,4
FCP4	100	21,6	10,0	73,0	4,5
FCP7	93,3	90,5	89,2	46,4	43,7
FCP8	99,8	20,7	21,2	34,9	17,6
FCP10	98,1	87,7	87,3	89,4	79,4
FCP5	99,1	35,9	51,8	18,1	2,9
FCP6	97,4	69,5	82,1	91,0	64,1
Media	98,4	59,5	61,7	67,1	46,7

25 No se detectó pérdida de péptido unido a fluorocarburo después de filtración estéril para las mezclas preparadas usando ácido acético al 80 % (v/v). Se concluye que el ácido acético con posterior dilución acuosa es el disolvente preferido para la disolución y filtración de péptidos unidos a fluorocarburo, pero será necesario reducir la concentración utilizada para minimizar los niveles de ácido acético residual en el producto final.

30 Ejemplo 7: Efecto de la concentración de ácido acético sobre la solubilidad de los FCP

Con el fin de limitar la concentración de ácido acético en etapas posteriores del proceso de formulación y en el producto final, se determinó la menor concentración de ácido acético en agua para conseguir una dispersión eficiente y mantener una solubilidad visible para cada péptido unido a fluorocarburo. Cuando se utiliza manitol como crioprotector, es importante minimizar la concentración de ácido acético en la etapa de liofilización con el fin de conseguir un producto liofilizado estable y amorfo. Se determinó la concentración mínima de ácido acético para conseguir una dispersabilidad y solubilidad aceptables de los péptidos individuales unidos a fluorocarburo. La concentración final de péptido unido a fluorocarburo después de la dispersión inicial de ácido acético fue de 2 µmol/ml y después de la dilución con manitol, 0,250 µmol/ml.

40 Tabla 6: Dispersabilidad y solubilidad de FCP individuales y una mezcla heptavalente (Mezcla 3) en ácido acético

Péptido unido a fluorocarburo	Porcentaje de ácido acético	Facilidad de dispersión por	Aspecto visual después de la	Aspecto visual de la mezcla después de
-------------------------------	-----------------------------	-----------------------------	------------------------------	--

	(% v/v)	sonicación/mezcla en vórtice	dispersión	la dispersión: Mezcla 3
FCP1	10	+++	Transparente	Transparente
FCP2	10	+++	Transparente	
FCP4	10	+++	Transparente	
FCP8	80	+	Transparente	
FCP9	80	+	Transparente	
FCP5	10	+++	Transparente	
FCP6	80	+	Transparente	

Se observó que una concentración de ácido acético tan baja como del 10 % v/v proporcionaba una dispersión adecuada para varios de los péptidos unidos a fluorocarburo. Sin embargo, mientras que algunos péptidos unidos a fluorocarburo requerían menos del 80 % (v/v) de ácido acético para conseguir una disolución completa, la formulación resultante resultó ser físicamente inestable con el tiempo formándose un gel o material en partículas solubles (por ejemplo FCP6, FCP8 y FCP9). Para estos tres péptidos, se observó que el ácido acético al 80 % (v/v) alcanzaba una dispersión completa mientras se evitaba cualquier cambio en el estado físico.

La recuperación de la filtración se midió mediante RP-HPLC comparando las áreas de los picos de cada péptido unido a fluorocarburo dentro de la mezcla de Mezcla 3 antes y después de la filtración estéril. El porcentaje de recuperación se midió para cada FCP y se calculó una recuperación media calculada como un promedio del porcentaje de recuperación de cada FCP individual. Las recuperaciones totales de filtración (basadas en un filtro de 0,22 µm) medidas después de la combinación y dilución fueron generalmente superiores al 95 %.

Tabla 7: Recuperación de la filtración

FCP	Recuperación de la filtración
FCP1	100,0
FCP2	99,3
FCP4	98,6
FCP5	98,7
FCP6	100,0
FCP8	97,0
FCP9	95,4
Media	98,4

Ejemplo 8: Caracterización de estructuras formadas por péptidos unidos a fluorocarburo

La formación de estructuras micelares multimoleculares auto-ensambladas puede jugar un papel fundamental en el proceso de solubilización de péptidos unidos a fluorocarburo. De esta manera, la solubilidad de los péptidos unidos a fluorocarburo puede mantenerse después de la dispersión y posteriormente a lo largo de todo el proceso de formulación, particularmente en la reconstitución del producto liofilizado. La caracterización física de las estructuras multimoleculares ensambladas durante la dispersión se realizó utilizando dispersión dinámica de la luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Se empleó un Zetasizer Nano S (que permitía la medición de partículas de 0,6 nm a 6 micrómetros) para monitorizar el tamaño de partícula de una mezcla de péptidos unidos a fluorocarburo basado en DLS. Se preparó la Mezcla 1 (FCP1, FCP3, FCP4, FCP5, FCP6, FCP7, FCP9 y FCP12) como se describe en el Ejemplo 1 (Tabla 3) con diluyente manitol.

El tamaño medio de partícula (nm) de cada mezcla se midió a 25 °C usando un Nanosizer (Zetasizer Nano Series ZS, Malvern Instruments, Reino Unido). Se utilizaron 250 µl de solución y se añadieron a una microcubeta de plástico. Los tiempos de correlación se basaron en 10s por análisis y se realizaron un total de 5 análisis por medida. Los resultados se analizaron usando el software Dispersion Technology (Malvern Instruments, Reino Unido). Se obtuvo la distribución por volumen y en intensidad para la Mezcla 1. La medición volumétrica basada en el tamaño medio se calculó mediante el software Dispersion Technology.

La DLS de péptidos unidos a fluorocarburo en solución demuestra la presencia de estructuras multimoleculares de diámetro centrado alrededor de 20 a 50 nm (> 95 % en volumen) con aproximadamente 12-16 % (en intensidad) de la población con un tamaño mayor de 100 nm (Figura 5).

La TEM mostró la presencia de una población homogénea de estructuras esféricas de dimensiones coherentes con la DLS (Figura 6).

Ejemplo 9: Impacto de la filtración de grado de esterilización en estructuras FCP multimoleculares

Se investigó el impacto de la filtración de grado de esterilización sobre las estructuras multimoleculares. La Mezcla 1 del Ejemplo 7 se filtró a través de un filtro estéril Millex 0,22 µm PVDF 25 mm y luego se analizó mediante DLS usando un Zetasizer Nano S como se describe en el Ejemplo 7.

El análisis de DLS demostró que las estructuras formadas son muy dinámicas con reproducibilidad variable incluso dentro del mismo conjunto de análisis. Se recogieron entre cinco y siete mediciones para calcular el tamaño medio de partícula (representado por los diferentes perfiles de la Figura 7).

Sorprendentemente, se vio que la filtración de 0,22 µm puede volver a conformar las estructuras multimoleculares formadas por péptidos unidos a fluorocarburo inicialmente solubilizados en ácido acético. DLS muestra que las partículas grandes se vuelven a conformar en partículas más pequeñas después de la filtración y que el Kcount (un parámetro que se correlaciona con el número de partículas en solución) también se reduce drásticamente después de la filtración (pre-filtración, 200 Kcounts, filtración, 120 Kcounts). Además, la introducción de un filtro de 0,45 µm por delante del filtro de 0,22 µm no redujo las recuperaciones de la filtración. Por lo tanto, la filtración de grado esterilizante puede influir en el tamaño resultante de las estructuras ensambladas, no simplemente eliminando partículas grandes de la formulación y restringiendo su paso en etapas posteriores del proceso de fabricación (con una reducción concomitante en el rendimiento), sino volviendo a conformar las estructuras por deformación de manera que son capaces de pasar a través del filtro. Las partículas con un tamaño superior a 220 nm representan alrededor del 12 al 16 % (por intensidad) de las partículas en la mezcla, según los datos de la DLS. Estas parecen no ser eliminadas de la solución ya que la recuperación de la filtración determinada por HPLC es superior al 97 %.

La distribución del tamaño de partícula de la formulación de la MEZCLA 1 también se evaluó después de la liofilización después de la reconstitución de las muestras en Tris-HCl 10 mM o agua (Figura 8). La formulación de la MEZCLA 1 se reconstituyó fácilmente obteniendo una solución transparente o ligeramente opalescente con agua o Tris-HCl 10 mM, respectivamente. Los tamaños de partícula se centraron alrededor de 20-50 nM con un perfil ampliamente similar al observado durante la formulación (pre-liofilización). Esto demuestra que después de la reconstitución; las estructuras multimoleculares de los FCP se mantienen sin la formación de grandes agregados visibles.

Ejemplo 10: Estabilidad química de los FCP

La estabilidad química de los péptidos unidos a fluorocarburo se evaluó exponiendo una formulación liofilizada de siete péptidos unidos a fluorocarburo a ácido acético al 50 % (v/v) durante 24 horas. La Mezcla 3 se preparó por solubilización inicial de los FCP en ácido acético (concentración de disolvente para cada FCP como se da en el Ejemplo 6), seguido por dilución y combinación con una solución de manitol. Después se liofilizó la mezcla antes de la reconstitución en ácido acético al 50 % (v/v).

No se observó degradación por RP-HPLC en comparación con un control no tratado (véase la Figura 9). Esto demostró que los péptidos seleccionados unidos a fluorocarburo son químicamente estables en ácido acético al 50 % v/v durante la duración de una etapa de combinación típica durante un proceso de fabricación farmacéutico.

Ejemplo 11: Concentración de acetato residual en la presentación final

Es importante minimizar la concentración de ácido acético en la formulación de las etapas posteriores. Esto permitirá la formación de una torta estable durante la liofilización y elevará el pH de la preparación hasta un valor más cercano a la neutralidad deseada. El ácido acético es volátil y su contenido se reduce durante el proceso de liofilización.

Para la liofilización, las formulaciones de la Mezcla 3 preparada como se describe en el ejemplo 9 (viales de liofilización de 3 ml rellenos con 1,4 ml de volumen) se congelaron primero durante dos horas en un congelador a -80 °C y luego se liofilizaron (liofilizador de laboratorio Christ Alpha2-4 LSC) durante 24 horas. Este procedimiento permitió la producción de tortas liofilizadas con una estructura estable y consistencia homogénea. La concentración de pre-liofilización de acetato en la formulación calculada era 8,8 % v/v.

Para tres lotes diferentes, se determinó experimentalmente que la concentración de acetato residual después de la liofilización (contraiones de acetato más ácido acético) en los viales era 0,3 - 0,4, 0,7 y 0,5 % (p/p) respectivamente. La desviación estándar de este análisis se validó como +/- 0,07 % (p/p) para el acetato; el límite de cuantificación como 0,1 % (p/p). El valor medio del acetato residual equivale a un nivel aceptable de aproximadamente 0,35 mg por dosis humana, muy por debajo de la recomendación de la ICH (máximo 50 mg al día).

Ejemplo 12: Reconstitución de las preparaciones de FCP liofilizadas

La reconstitución de péptidos unidos a fluorocarburo formulados (Heptavalente, Mezcla 3) se comparó con una preparación equivalente no formulada. Los FCP individuales se solubilizaron en ácido acético como se describe en el Ejemplo 9, se mezclaron y se diluyeron con una solución de manitol y se liofilizaron (concentración final 0,35 mg

por FCP). Se reconstituyó un vial de la mezcla formulada con 0,7 ml de agua por inyección (Hyclone); se reconstituyó un vial adicional con 0,7 ml de solución tampón de histidina 28 mM. Para la mezcla no formulada se dispusieron 0,35 mg de cada FCP no tratado en un vial sin procesamiento adicional. Se reconstituyó un vial de la mezcla no formulada con 0,7 ml de solución de manitol al 4,5 % para proporcionar una concentración de excipiente idéntica a la de los viales formulados. Se reconstituyó un vial adicional de la mezcla no formulada con 0,7 ml de histidina 28 mM en una solución de manitol al 4,5 %.

Las siguientes fotografías (Figuras 10 y 11) ilustran la solubilidad de los FCP después de la dispersión inicial mediante agitación manual y posterior mezcla en vórtice durante 30 segundos y sonicación con baño durante un período de una hora.

La inspección visual de las muestras no formuladas después de la reconstitución con ambas soluciones de manitol/agua y tampón de histidina mostró que las soluciones no estaban completamente dispersas y solubilizadas. Cada solución era turbia y se podía observar materia en partículas grandes, en particular adheridas en los laterales del vial de vidrio y que no se dispersó con el tiempo. Por el contrario, las soluciones de la vacuna formulada dispersada tanto en el agua como en las soluciones tampón de histidina eran transparentes sin presencia de partículas.

Estos resultados demuestran que el método de solubilización inicial tiene un impacto sobre las propiedades agregantes de la formulación reconstituida final. La dispersión del FCP en ácido acético a principios del proceso de formulación dirige la formación de estructuras micelares, las cuales se mantienen a través de los subsiguientes procesos de combinación, filtración y liofilización. Esto facilita la reconstitución de la presentación final liofilizada en una fase acuosa en forma no particulada.

Conclusiones

Se demostró que el ácido acético era un buen disolvente para todos los péptidos individuales unidos a fluorocarburo evaluados. Se consiguió una solubilización completa a altas concentraciones de FCP (hasta 2000 nmoles/ml, aproximadamente 10 mg/ml) sin que se observaran partículas tras la perturbación por mezclado con vórtice y sonicación. La solubilidad se mantuvo durante el procesamiento en etapas posteriores debido a las propiedades anfífilas de los péptidos unidos a fluorocarburo dirigiendo la formación de estructuras macromoleculares auto-ensambladas espontáneamente como se observa por difusión de luz dinámica y microscopía electrónica de transmisión. Por lo tanto, el disolvente cumple un doble papel; en primer lugar garantiza que existe suficiente capacidad disruptiva para asegurar que las grandes estructuras en partículas desordenadas se rompen y, en segundo lugar, soporta un entorno en el que se pueden crear y soportar estructuras micelares ordenadas y multimoleculares. Estas estructuras son lo suficientemente pequeñas para permitir la solubilización del FCP de manera que no se produzca pérdida de material durante la filtración estéril. Las estructuras micelares también se mantienen durante la liofilización y son esenciales para facilitar la resolubilización del liofilizado en un medio acuoso antes de su administración a seres humanos. Los FCP que no se habían solubilizado previamente en ácido acético no se pudieron reconstituir satisfactoriamente a partir de un estado liofilizado en agua o tampón de histidina (Ejemplo 12).

Se observó que el ácido acético al 80 % (v/v) solubilizaba todos los FCP. Sin embargo, un exceso de ácido acético puede impedir la formación de una torta de liofilizado aceptable después de la liofilización. Además, existen restricciones reglamentarias impuestas en cuanto a los niveles de acetato en los productos farmacéuticos. Por lo tanto, se examinaron menores concentraciones de ácido acético; siendo el 10 % (v/v) adecuado para cuatro de los siete FCP, mientras que el 80 % (v/v) fue la concentración más baja viable para los tres FCP restantes. En el procesamiento, esta mezcla de siete FCP produjo una torta de liofilizado aceptable con niveles de acetato compatibles por dosis humana.

Todos los demás disolventes investigados no pudieron lograr la solubilización completa de todos los FCP. El éxito del ácido acético no era predecible, ya que la cadena de fluorocarburo imparte propiedades fisicoquímicas inusuales a la molécula (comparar, por ejemplo, las solubilidades de los FCP y los péptidos nativos equivalentes en el Ejemplo 1). Además, no hubo correlación entre el éxito del ácido acético al 10 % (v/v) en la solubilización de un FCP y la hidrofobicidad o contenido de restos cargados del péptido.

En resumen, el ácido acético tiene las siguientes ventajas:

- es capaz de proporcionar una solubilidad adecuada no solo para los FCP individuales, sino también para sus mezclas;
- es adecuado para todos los FCP evaluados;
- produce productos homogéneos y uniformes;
- es miscible en agua a las concentraciones previstas para su uso (10-80 % (v/v));
- es capaz de solubilizar los FCP a concentraciones relativamente altas (al menos 10 milimolar);
- está clasificado como un disolvente de la clase III de la ICH, adecuado para uso humano;

- se puede liofilizar (con niveles que se reducen después de una etapa típica de liofilización);
- da lugar, después de la mezcla y dilución posteriores, a una solución que se somete a filtración de grado de esterilización con pérdidas de rendimiento mínimas;
- da lugar, después de la liofilización, a un producto que puede reconstituirse fácilmente para formar una suspensión isotónica, de pH neutro y homogénea;
- no reacciona con, ni promueve la degradación del péptido unido a fluorocarburo y
- es compatible con los materiales utilizados habitualmente en la fabricación de productos farmacéuticos.

Ejemplo 13: Preparación de una vacuna del virus de la gripe de péptido unido a fluorocarburo

El objetivo de este estudio es demostrar el beneficio de un proceso de formulación diseñado para la fabricación de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (GMP) de una vacuna universal de la gripe A farmacéuticamente aceptable (FP01.1) que contiene seis fluoropéptidos, que comprende péptidos con las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 1 a 6. Los objetivos específicos son:

1. Evaluar parámetros clave de formulación para la fabricación de FP-01.1.

- a. Facilidad de solubilización de los fluoropéptidos en soluciones de ácido acético;
- b. Determinación del tamaño de la micela en el punto de filtración;
- c. Recuperación de la filtración;
- d. Estabilidad química y física de los fluoropéptidos y

2. Comparar la calidad de la vacuna FP-01.1 reconstituida (fluoropéptidos formulados) con una preparación equivalente que contiene fluoropéptidos no formulados.

Hemos desarrollado un proceso de formulación y aplicado a la fabricación de una vacuna universal de la gripe A-FP-01.1 compuesta por seis péptidos unidos a fluorocarburo que comprenden las SEQ ID NO: 1 a 6, respectivamente. Los seis péptidos que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 1 a 6 se acoplan a la cadena de fluorocarburo $C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$ a través de la cadena épsilon de un espaciador de lisina N-terminal. Los seis péptidos unidos a fluorocarburo corresponden de este modo a FCP1, FCP8, FCP9, FCP2, FCP4 y FCP5 descritos en los Ejemplos anteriores. El proceso de formulación se basa en el uso de ácido acético, un disolvente ácido que hemos visto que garantiza una buena dispersabilidad de los fluoropéptidos manteniendo al mismo tiempo la estabilidad física y química de los fluoropéptidos durante el proceso. El ácido acético es muy volátil y puede sublimarse durante la liofilización y se ha visto que se reduce constantemente a niveles residuales que tienen poco impacto sobre el pH del producto reconstituido.

El proceso de formulación descrito a continuación consigue la fabricación de una vacuna liofilizada FP01.1 (que garantiza la estabilidad a largo plazo) para ser reconstituida con una solución tampón (L-Histidina 28 mM) para generar una solución homogénea estable (sin agregados visibles) con pH neutro (6-7,5) y osmolalidad aceptable (280-320 mOsm). Varios lotes clínicos GMP han sido convenientemente producidos y se ha demostrado que el producto es seguro e inmunógeno en seres humanos.

Materiales e instrumentos

- Fluoropéptidos (contenidos en FP-01.1) fabricados por la American Peptide Company
- Ácido acético glacial (Sigma N.º 27225), D-Manitol (Merck Emprove)
- Agua de Hyclone (Fisher N.º HYC-001-189G)
- Millex, PVDF Durapore, 0,2 µm (ø33 mm) Millipore.
- 30 viales liofilizados (Adelphi N.º VC002-13C) + tapones (Adelphi N.º FDW13) esterilizados en autoclave.
- HPLC equipado con columna Discovery C18, 250x2,1 mm, 5 µm
- Puntas de pipeta Combitips 10 ml (Fisher N.º PMP-117-523N) + Eppendorf Stepper
- Liofilizador 2-4-LSC (Christ)
- Osmómetro: Osmomat 030 (Gonotec)
- Medidor de pH equipado con micro electrodo Inlab® (Mettler)

Métodos

Preparación de la solución

1. Manitol 3,3 % p/p en 50 ml en agua (6,6 g en 200 ml de agua), enfriado a 4 °C.
2. Soluciones de 5 ml de ácido acético al 10 % (v/v) en agua estéril.
3. Soluciones de 5 ml de ácido acético al 80 % (v/v) en agua estéril.

Pesaje de péptidos unidos a fluorocarburo

Tabla 8: Pesaje de péptidos y dispersión

FCP	Masa (mg) (neto)	Contenido peptídico (%)	Masa (mg) Teór. (bruto)	Masa (mg) Experim.	Conc. ácido acético (%)	Vol (µl) de ácido acético-Teór.	Vol (µl) de ácido acético-Experim.
FCP1	10	87,0	11,49	12,27	10	1000	1068
FCP2	10	87,6	11,41	12,49	10	1000	1094
FCP4	10	90,6	11,04	11,68	10	1000	1058
FCP5	10	92,0	10,87	11,67	10	1000	1074
FCP9	10	90,3	11,07	11,60	80	1000	1048
FCP8	10	92,0	10,87	11,78	80	1000	1084

5 Preparación de formulación para FP-01-1

1. Pesar cada péptido (objetivo 10 mg de péptido neto) en un vial de vidrio de 2 ml
- 10 2. Dispersar cada fluoropéptido a 10 mg neto/ml en ~ 1,0 ml (ajustar los volúmenes en función del peso para obtener exactamente 10 mg neto/ml) de solución de ácido acético al 10 % o 80 % en agua (véase la tabla 10)
3. Mezclar en vórtice y sonicar y registrar el aspecto visual
- 15 4. Repetir la etapa 3 hasta la disolución completa
5. Combinar entre sí 950 µl de cada uno de los 6 fluoropéptidos dispersados en un recipiente de vidrio de 40 ml. A continuación, añadir 950 µl de ácido acético al 80 % (6,65 ml de volumen total). Cada péptido está a una concentración de 1,428 mg/ml en ácido acético al 40 %.
- 20 6. Registrar el aspecto visual de la solución combinada
7. Diluir los fluoropéptidos mezclados con 25,93 ml de manitol al 3,3 % (solución a 0,2915 mg/ml de cada péptido), ácido acético total 8,16 %.
- 25 8. Registrar el aspecto visual de la solución diluida
9. Filtrar la solución de ~32 ml con un Millex 0,2 µm PVDF 33 mm, (manteniendo 0,3 ml de solución no filtrada para recuperación de filtración).

30 Llenado

Se tomaron alícuotas de 2 ml para congelar de acuerdo con la Tabla 9 (volumen de llenado: 1,2 ml para cada formulación), usando Combitips de 10 ml.

35 Tabla 9: Preparación de la formulación de fluoropéptidos FP-01.1

Volumen total (ml)	Conc. de péptido (mg/pépt./ml)	Alícuota para el liofilizado (µl)	Cantidad de péptido (µg/vial/péptido)	Vol. de tampón para la reconstitución (µl)	Concentración final después de la reconstitución
29-30	0,2915/ind	1200 (24-25 viales)	350	700	0.500 mg/pépt./ml

Liofilización

1. Congelar los viales a -80 ° C durante una hora.
- 40 2. Liofilizar durante 40 horas
3. La ventilación de la liofilización se realiza con nitrógeno y el taponamiento de los viales se lleva a cabo a una presión entre 400 y 600 mbar.

Preparación de equivalente de FP-01.1 usando fluoropéptidos no formulados

- 45 Se prepararon dos viales que contenían 0,35 mg de cada uno de los 6 fluoropéptidos FCP1, FCP8, FCP9, FCP2, FCP4 y FCP5.

Microscopio de transmisión electrónica

Con TEM en tinción negativa, se depositan 20 µl de solución de péptido unido a fluorocarburo sobre una rejilla de microscopio electrónico de cobre revestida con carbono Formvar (malla 300). Después se añaden 20 µl de acetato de uranilo (acuoso al 1 %). Después de 30 segundos, el exceso de solución se elimina rápidamente con un papel de filtro Whatman. La muestra se deja luego secar durante al menos 2 minutos antes del análisis. La microscopía electrónica de transmisión se realiza a continuación en un Philips CM120 BioTWIN a 120 kV de voltaje de aceleración. La adquisición de imágenes se realiza con una ampliación directa que varía de 50000x a 150000x.

Análisis de RP-HPLC

Método HPLC: FP-01.1

- Columna: Discovery C18: 2,1 x 25 mm, 5 µm, Caudal 0,3 ml/min.
- Disolvente A: agua 90 %/acetonitrilo 10 %/TFA 0,04 %
- Disolvente B: acetonitrilo 90 %/agua 10 %/TFA 0,04 %.
- Gradiente:

Tiempo (min)	Disolvente B
0,01	10 %
1	10 %
6	28 %
46	44 %
50	57 %
60	70 %
68	82 %
70	82 %
71	10 %

Resultados

Etapa de formulación (antes de la liofilización)

Dispersión de péptidos

Tabla 10: Facilidad de la solubilidad de cada péptido después del ciclo de mezclado en vórtice/sonicación

FCP	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3	
	Mezcla en vórtice	Sonicación	Mezcla en vórtice	Sonicación	Mezcla en vórtice	Sonicación
FCP1	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
FCP2	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
FCP4	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
FCP5	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
FCP9	Materia en partículas-	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
FCP8	Materia en partículas+	Parte de materia en partículas	Parte de materia en partículas	1 o 2 materia en partículas	1 o 2 materia en partículas	Transparente

Los péptidos eran fácilmente solubles sin necesidad de sonicación, mientras que los dos péptidos solubles en ácido acético al 80 % requerían al menos 1 ciclo de sonicación.

Combinación/dilución

La solución de los 6 péptidos combinados era transparente (sin agregados visibles). Una vez diluido con el manitol al 3,3 %, la solución seguía siendo transparente (no se aprecian agregados visibles).

Tabla 11: Aspectos visuales de las preparaciones

Péptido	Porcentaje de ácido acético (% v/v)	Facilidad de dispersión (véase Tabla 12)	Aspecto visual después de la dispersión	Aspecto visual de la mezcla después de la combinación	Aspecto visual de la mezcla después de la dilución
FCP1	AcOH 10 %	+++	Transparente	Transparente	Transparente
FCP2	AcOH 10 %	+++	Transparente		
FCP4	AcOH 10 %	+++	Transparente		
FCP5	AcOH 10 %	+++	Transparente		
FCP9	AcOH 80 %	++	Transparente		
FCP8	AcOH 80 %	+	Transparente		

5 *Recuperaciones de la filtración*

Se lograron recuperaciones de la filtración muy buenas (>99 % para cada péptido)

Tabla 12: Recuperaciones de péptidos después de la filtración

FCP	FCP1	FCP2	FCP4	FCP5	FCP9	FCP8
% Recuperación de péptido	100,2	101,6	100,8	100,2	99,8	99,6

10

Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El análisis mediante TEM de las micelas formadas antes de la filtración muestra la presencia de una población homogénea de pequeñas micelas esféricas con un tamaño que varía de 17 a 30 nm (Figura 12).

15

Estabilidad química (después de la filtración)

La estabilidad química se determinó mediante RP-HPLC en T₀ y después de 24 horas después de la filtración. Los resultados se muestran en la Figura 13 y la Tabla 13.

20

Tabla 13: Pureza después de la filtración a lo largo del tiempo

	T ₀	2 h	8 h	24 h
% Pureza	96,9	97,1	97,1	96,9
Archivo HPLC	8644	8645	8649	8651

Análisis realizado en el producto FP-01.1 terminado (después de la liofilización)

25 *Aspecto de la torta después de la liofilización*

Tabla 14: Resultados de la inspección de la torta

Producto	Torta estable	Tarta colapsada	Viales totales
FP01.1	25	0	25

30

El producto liofilizado forma una torta sólida uniforme y estable.

Análisis de pureza del producto liofilizado FP-01.1

Se reconstituyó una muestra en 0,70 ml de agua para obtener una concentración de 0,5 mg/péptido. No se produjo degradación durante la liofilización, con una pureza del 97 %.

35

Reconstitución de FP-01.1 liofilizado - Comparación con fluoropéptidos no formulados

Para demostrar el beneficio del proceso de formulación aplicado a la producción de FP-01.1, se comparó la calidad de la vacuna FP-01.1 reconstituida (fluoropéptidos formulados) con una preparación equivalente que contenía fluoropéptidos no formulados.

40

El equivalente FP-01.1 basado en fluoropéptidos no formulados se preparó pesando los 6 fluoropéptidos en un único vial (0,35 mg de cada péptido). El equivalente de FP-01.1 no formulado se reconstituyó con 0,7 ml de agua (que contenía manitol al 4,5 % para ser equivalente a FP-01.1) o L-histidina 28 mM (que contenía manitol al 4,5 %) y se comparó con el FP-01.1 formulado obtenido a través del proceso de formulación descrito anteriormente) y reconstituido en las mismas condiciones. El FP01.1 formulado reconstituido se analizó por RP-HPLC y los resultados

45

del análisis se muestran en la Figura 14.

El producto formulado FP-01.1 se reconstituyó fácilmente en agua mientras que el equivalente FP-01.1 no formulado es insoluble con grandes agregados en suspensión y adherido a la pared de vidrio (véase la Figura 15). FP-01.1 reconstituido en agua dio lugar a una solución homogénea ligeramente opalescente sin agregados visibles. Los fluoropéptidos no formulados no consiguen la solubilidad en el tiempo e incluso después de la sonicación y el mezclado en vórtice.

De forma similar, el producto formulado FP-01.1 se reconstituyó fácilmente en L-histidina 28 mM (tampón diseñado para que el producto clínico alcanzara un pH neutro) mientras que los péptidos no formulados son insolubles (formación de grandes agregados) (véase la Figura 16). FP-01.1 reconstituido en agua conduce a una solución homogénea ligeramente opalescente sin agregados visibles. Los fluoropéptidos no formulados no consiguen la solubilidad en el tiempo incluso después de la sonicación y el mezclado en vórtice.

Basándose en estos resultados, un producto basado en los fluoropéptidos no formulados no se consideraría farmacéuticamente aceptable debido a su escasa dispersabilidad y a la ausencia de homogeneidad de la preparación.

Osmolalidad y pH de la formulación en L-histidina

TABLA 15: pH y osmolalidad de la formulación reconstituida en L-histidina

	FP-01.1 reconstituido en histidina 28 mM
Osmolalidad (mOsm/kg)	302
pH	6,65

Conclusiones

- Todos los fluoropéptidos consiguieron una solubilidad total en el punto de dispersión.
- Se formaron micelas con un tamaño que variaba de 17 a 30 nm compatible con la filtración estéril (corte de 220 nm).
- La recuperación de la filtración estéril fue superior al 99 % para todos los fluoropéptidos.
- FP-01.1 se reconstituyó fácilmente con sus sistemas de tampón de L-histidina específicos a 28 mM, conduciendo a una solución homogénea ligeramente opalescente con pH cercano a neutro y osmolalidad aceptable (~ 300 mOsm).
- Se demostró que una preparación equivalente a FP-01.1 obtenida a partir de fluoropéptidos no formulados era difícil de reconstituir con fluoropéptidos que formaban grandes agregados insolubles y con una gran proporción adherida a la pared de vidrio. Esto contrasta con la reconstitución de un FP-01.1 formulado y demuestra el beneficio del proceso de formulación en la generación de un producto farmacéuticamente aceptable.

Ejemplo 14: Inmunogenicidad de FP01.1 en ratas

La respuesta inmunitaria que puede ser generada por la formulación de FP-01.1 se evaluó en ratas que fueron inmunizadas intramuscularmente en el flanco inferior izquierdo por miembros del personal de CBS, St Mary's Campus, Imperial College de acuerdo con GD_RD004.

Preparación de esplenocitos

Las ratas fueron sacrificadas de acuerdo con las normas internas y GD_RD004. Se recogieron los bazos (se fotografiaron todos los bazos anormales) y se prepararon suspensiones de células individuales de acuerdo con GD_RD007, con el número de células determinado como se describe en GD_RD001 (Método TruCount). Los esplenocitos se resuspendieron a 1×10^7 /ml en medios completos y se sembraron para IFN γ ELISpot y CBA.

IFN γ ELISpot

Los antígenos para la estimulación se prepararon en el momento a una concentración 4X a partir de las existencias y se sembraron en placas en pocillos duplicados para IFN γ ELISpot. Las células se sembraron en placas a $0,5 \times 10^6$ esplenocitos/pocillo (50 μ l de suspensión celular), con 50 μ l de preparación de antígeno 4X (es decir, péptidos largos individuales y LPMIX6 para estimulación) y 100 μ l de medio completo (volumen total = 200 μ l). Las placas ELISpot se incubaron durante 18 horas a 37 °C, 5 % de CO $_2$ en un ambiente humidificado.

Se ajustaron tres dosis del FP-01.1 por volumen manteniendo una concentración de FCP constante de 500 μ g/ml por péptido. Las ratas SD fueron inyectadas IM con 12,5, 50 o 100 μ g/péptido de FP-01.1 en los días 0 y 14 y los bazos se recogieron el día 24 para el análisis IFN- γ ELISpot después de 18 horas de incubación con péptidos nativos

individuales de FP-01.1. Se inyectaron dosis de 12,5 µg/péptido y 50 µg/péptido en un único sitio en un volumen de 25 µl y 100 µl respectivamente, mientras que la dosis de 100 µg/péptido se inyectó en dos volúmenes de 100 µl en dos sitios diferentes.

- 5 FP-01.1 indujo una respuesta positiva de linfocitos T IFN-γ en todos los niveles de dosis ensayados de una manera dependiente de la dosis (Figura 17).

Ejemplo 15: Datos de ensayos clínicos para FP01.1

- 10 Se evaluaron tres dosis ascendentes de FP-01.1 (50, 150, 500 µg/péptido) y placebo en los días 1, 29 en cuanto a seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad en un ensayo clínico de fase I en un total de 48 individuos sanos.

15 FCP-01.1 fue bien tolerado por las tres cohortes, después de dos inyecciones intramusculares. No hubo evidencia clara de una relación dependiente de la dosis en la incidencia de TEAE, parámetros de laboratorio o reacciones en el sitio de inyección. Ningún sujeto mostró ninguna reacción marcada local o sistémica a la vacunación en la primera o segunda exposición en ninguna de las tres cohortes.

20 Las respuestas de los linfocitos T inducidas por la vacuna se evaluaron utilizando un ensayo IFN-γELISpot ex vivo. Las CMSP fueron estimuladas con 6 péptidos individuales (correspondientes a los péptidos contenidos en la vacuna) durante 18 horas. Las respuestas de ensayo positivas se definieron como la media del número de puntos en los pocillos de control negativo + 2 desviaciones estándar de la media. El número de puntos para cada uno de los 6 péptidos se acumuló para obtener la "suma de péptidos largos" y se expresó como un número de puntos por millón de CMSP de entrada.

25 Se demostró que el FP-01.1 era inmunógeno. El grupo de dosis de 150 µg de FP-01.1 muestra una respuesta más alta en comparación con las otras dos dosis de vacuna y el grupo de placebo como se observa en la Figura 18. En este grupo de dosis, se observa un efecto de refuerzo después de la segunda inyección, lo que respalda el concepto de amplificación de refuerzo con inyecciones múltiples para vacunas peptídicas.

30 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Immune Targeting Systems (ITS) Ltd

35 <120> Formulación de péptidos unidos a fluorocarburo

<130> N110619A

<150> GB 1022147.1

40 <151> 31-12-2010

<160> 28

<170> Patent In versión 3.5

45 <210> 1

<211> 35

<212> PRT

<213> Virus de la gripe

50 <400> 1

His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn
1 5 10 15

Pro Ser Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr
20 25 30

Ala Asp Lys
35

55 <210> 2

<211> 35

<212> PRT

ES 2 645 017 T3

<213> Virus de la gripe

<400> 2

Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu
 1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu
 20 25 30

Thr Gln Gly
 35

5

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

10 <213> Virus de la gripe

<400> 3

Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val Leu Ser Ile
 1 5 10 15

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr
 20 25 30

Met Phe Glu
 35

15

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

20 <213> Virus de la gripe

<400> 4

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr
 1 5 10 15

Met Phe Glu Ser Lys Arg Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala Glu
 20 25 30

Met Leu Ala
 35

25

<210> 5

<211> 35

<212> PRT

<213> Virus de la gripe

30

<400> 5

ES 2 645 017 T3

Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp
1 5 10 15

Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala
20 25 30

His Lys Ser
35

5
<210> 6
<211> 35
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 6

Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser
1 5 10 15

Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro
20 25 30

10
Ser Glu Arg
35

15
<210> 7
<211> 35
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 7

His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn
1 5 10 15

Pro Ala Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr
20 25 30

Ala Asp Lys
35

20
<210> 8
<211> 35
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

25
<400> 8

ES 2 645 017 T3

Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu
1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Ile Tyr Ile Glu Val Leu His Leu
20 25 30

Thr Gln Gly
35

5
<210> 9
<211> 35
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 9

Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu
1 5 10 15

Pro Val Ser Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu
20 25 30

Thr Gln Gly
35

10
15
<210> 10
<211> 35
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 10

Tyr Ile Thr Lys Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Ile Leu Ser Ile
1 5 10 15

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr
20 25 30

Met Phe Glu
35

20
25
<210> 11
<211> 35
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 11

ES 2 645 017 T3

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr
 1 5 10 15

Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala Glu
 20 25 30

Met Leu Ala
 35

5
 <210> 12
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 12

Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp
 1 5 10 15

Leu Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala
 20 25 30

His Lys Ser

10 35

15
 <210> 13
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 13

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

Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Lys Lys Tyr Thr Lys Thr Thr
 20 25 30

Tyr

20
 25
 <210> 14
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 14

ES 2 645 017 T3

Lys Lys Lys Ser Tyr Ile Asn Lys Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser
 1 5 10 15

Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro
 20 25 30

Ser Phe Gly
 35

5 <210> 15
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 15

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

Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn
 20 25 30

10 Lys
 15 <210> 16
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 16

Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr Lys Glu Asn Arg Phe Ile Glu Ile Gly Val
 1 5 10 15

Thr Arg Arg Glu Val His Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile
 20 25 30

20 Lys Ser Glu
 35
 25 <210> 17
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 17

ES 2 645 017 T3

Lys His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys
1 5 10 15

Asn Pro Ser Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile
20 25 30

Thr Ala Asp Lys
35

5
<210> 18
<211> 36
<212> PRT
<213> Virus de la gripe
<400> 18

Lys Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe
1 5 10 15

Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His
20 25 30

Leu Thr Gln Gly
35

10
15
<210> 19
<211> 36
<212> PRT
<213> Virus de la gripe
<400> 19

Lys Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val Leu Ser
1 5 10 15

Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly
20 25 30

Tyr Met Phe Glu
35

20
25
<210> 20
<211> 36
<212> PRT
<213> Virus de la gripe
<400> 20

ES 2 645 017 T3

Lys Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly
1 5 10 15

Tyr Met Phe Glu Ser Lys Arg Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala
20 25 30

Glu Met Leu Ala
35

5
<210> 21
<211> 36
<212> PRT
<213> Virus de la gripe
<400> 21

Lys Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu
1 5 10 15

Asp Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val
20 25 30

Ala His Lys Ser
35

10
15
<210> 22
<211> 36
<212> PRT
<213> Virus de la gripe
<400> 22

Lys Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu
1 5 10 15

Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val
20 25 30

Pro Ser Glu Arg
35

20
25
<210> 23
<211> 36
<212> PRT
<213> Virus de la gripe
<400> 23

ES 2 645 017 T3

Lys Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly
 1 5 10 15

Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala
 20 25 30

Glu Met Leu Ala
 35

5
 <210> 24
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 24

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

Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Lys Lys Tyr Thr Lys Thr
 20 25 30

10
 Thr Tyr

15
 <210> 25
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 25

Lys Lys Lys Lys Ser Tyr Ile Asn Lys Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Ser Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu
 20 25 30

Pro Ser Phe Gly
 35

20
 <210> 26
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 25
 <400> 26

ES 2 645 017 T3

Lys Tyr Ile Thr Lys Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Ile Leu Ser
1 5 10 15

Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly
20 25 30

Tyr Met Phe Glu
35

5
<210> 27
<211> 34
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 27

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

Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr
20 25 30

10
Asn Lys

15
<210> 28
<211> 36
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 28

Lys Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr Lys Glu Asn Arg Phe Ile Glu Ile Gly
1 5 10 15

Val Thr Arg Arg Glu Val His Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys
20 25 30

Ile Lys Ser Glu
35

20

REIVINDICACIONES

1. Una formulación acuosa ácida que comprende ácido acético y un primer péptido unido a fluorocarburo, en la que:
- 5 (i) el péptido unido al fluorocarburo tiene una longitud de al menos 20 restos de aminoácidos, comprende al menos 50 % de restos de aminoácidos hidrófobos y tiene un punto isoeléctrico mayor o igual que 7 y
(ii) el péptido unido a fluorocarburo está presente en micelas.
- 10 2. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que:
- (i) la formulación tiene un pH de 5 o menos;
(ii) el péptido unido a fluorocarburo está presente en micelas con un diámetro de menos de 0,22 μm y/o
(iii) al menos 80 % de las micelas de péptido unido a fluorocarburo tienen un diámetro de menos de 100 nm.
- 15 3. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende uno o más péptidos unidos a fluorocarburo que:
- (i) tienen una longitud de al menos 20 restos de aminoácidos;
(ii) comprenden al menos un 50 % de restos de aminoácidos hidrófobos; y/o
20 (iii) tienen un punto isoeléctrico mayor o igual a 7;
- y/o en el que el primer péptido unido a fluorocarburo y/o uno o más de los otros péptidos unidos a fluorocarburo comprenden un péptido que:
- 25 (iv) comprende un aminoácido cargado positivamente en los últimos 15 aminoácidos contiguos distales al fluorocarburo y/o
(v) no comprende una secuencia contigua de 20 restos de aminoácidos que comprende más de 80 % de restos de aminoácidos hidrófobos.
- 30 4. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación no comprende un péptido unido a fluorocarburo en el cual el péptido unido al fluorocarburo:
- (i) tiene un punto isoeléctrico menor que 7;
(ii) no comprende un aminoácido cargado positivamente en los últimos 15 aminoácidos contiguos distales al
35 fluorocarburo y/o
(iii) comprende una secuencia contigua de 20 restos de aminoácidos que comprende más de 80 % de restos de aminoácidos hidrófobos.
- 40 5. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que:
- (i) el péptido unido al fluorocarburo es un péptido inmunógeno derivado de un patógeno, una proteína autóloga o una célula tumoral y/o
(ii) la formulación comprende seis péptidos unidos a fluorocarburo, en la que los péptidos unidos al fluorocarburo
45 tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 1 a 6 y en las que la formulación no comprende otros péptidos unidos a fluorocarburo.
6. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el fluorocarburo comprende una cadena de 3 a 20 átomos de carbono.
- 50 7. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el fluorocarburo tiene la fórmula $\text{C}_8\text{F}_{17}(\text{CH}_2)_2$.
8. Un método para obtener una formulación de péptido unido a fluorocarburo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho método:
- 55 (i) solubilizar un péptido unido a fluorocarburo en ácido acético;
(ii) esterilizar por filtración el péptido unido a fluorocarburo solubilizado y
(iii) secar el péptido unido a fluorocarburo esterilizado por filtración.
- 60 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que:
- (a) el péptido unido al fluorocarburo tiene una longitud de al menos 20 restos de aminoácidos y comprende al menos 50 % de restos de aminoácidos hidrófobos y tiene un punto isoeléctrico mayor o igual que 7;
(b) una mezcla del péptido unido a fluorocarburo y uno o más péptidos unidos a fluorocarburo adicionales se
65 solubilizan en ácido acético;
(c) el método comprende además combinar el péptido solubilizado unido a fluorocarburo solubilizado con uno o

- más péptidos unidos a fluorocarburo solubilizados adicionales;
- (d) el ácido acético es ácido acético acuoso de 5 a 80 % (v/v);
- (e) el péptido unido a fluorocarburo solubilizado se seca por liofilización;
- 5 (f) el método comprende además reconstituir el péptido unido a fluorocarburo seco en una fase acuosa;
- (g) se añade un vehículo, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable antes de la etapa (ii);
- (h) el método comprende además almacenar el péptido unido a fluorocarburo seco o reconstituido, en un envase estéril;
- 10 (i) el péptido unido al fluorocarburo es un péptido inmunógeno derivado de un patógeno, una proteína autóloga o una célula tumoral y/o
- (j) el fluorocarburo comprende una cadena de 3 a 20 átomos de carbono.
10. Una formulación que puede obtenerse por un método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9.
11. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende una mezcla seca estéril de péptidos unidos a fluorocarburo en forma sólida.
- 15 12. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 11, que es una torta o polvo amorfo.
13. Un vial, ampolla o jeringa sellado que comprende una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.
- 20 14. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.
- 25 15. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para su uso en un método de tratamiento o prevención de una infección patógena, una enfermedad autoinmunitaria o cáncer.

Figura 1

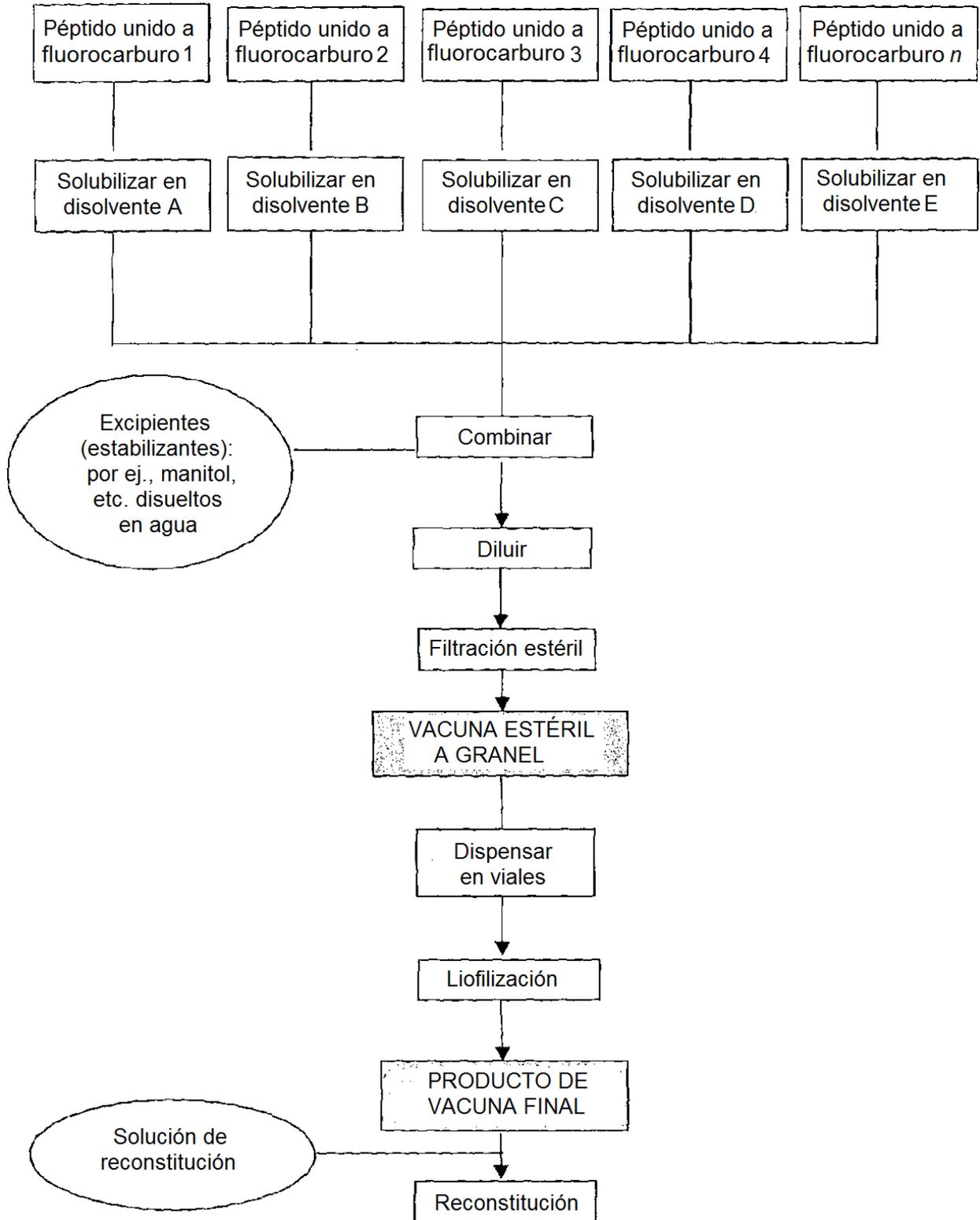


Figura 2

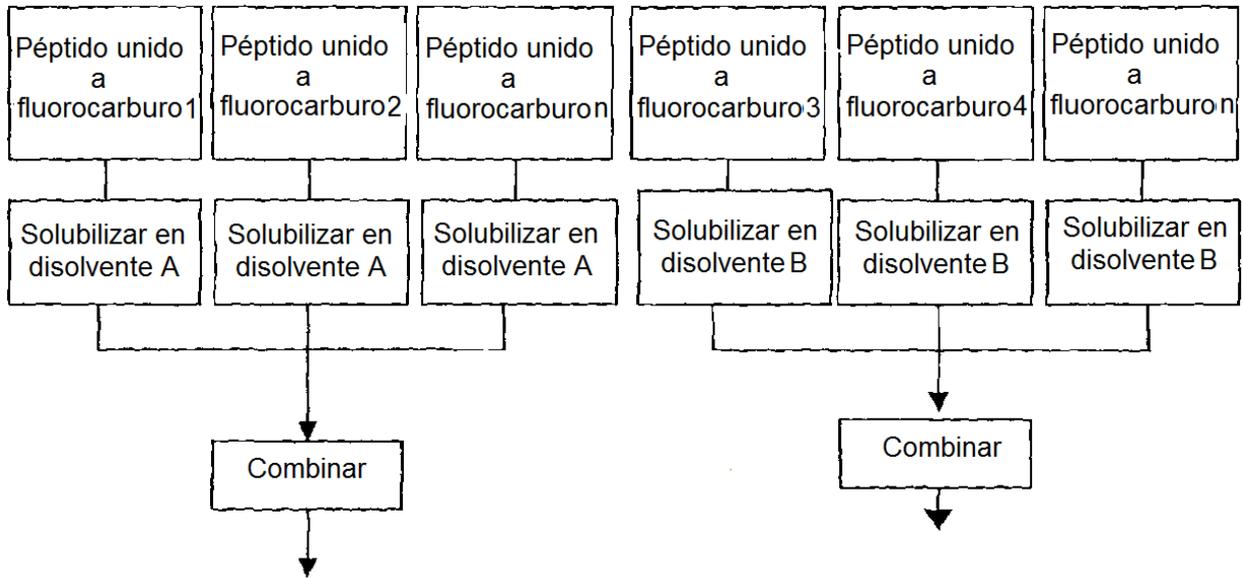


Figura 3

FCP	80% v/v Ácido acético		80% v/v Propan-2-ol		80% v/v terc-butanol		80% v/v DMSO		80% v/v Acetona	
	Trans- parencia	Espuma / materia en partículas	Trans- parencia	Materia en partículas	Trans- parencia	Espuma / materia en partículas	Trans- parencia	Espuma / materia en partículas	Trans- parencia	Materia en partículas
FCP1	+++	- / -	+	++	+	- / +++	+	+++ / ++	+	++
FCP2	+++	- / -	+	++	+	- / +++	+	++ / ++	+	++
FCP3	+++	- / -	+	++	+	- / +++	+	++ / ++	+	++
FCP4	+++	- / -	+	++	+++	- / +++	+	++ / ++	+++	++
FCP5	+++	- / -	-	++	+	- / +++	+	++ / ++	+	++
FCP6	+++	- / -	+	++	+	- / +++	+	++ / +++*	-	++
FCP7	+++	- / -	-	++	+	- / +++	+	++ / ++	+	++
FCP8	+++	- / -	-	++	+	- / +++	+	++ / ++	+	++
FCP9	+++	- / -	-	++	+	- / +++	+	++ / ++	+	++
FCP10	+++	- / -	-	++	+	- / +++	+	++ / ++	+	++
FCP11	+++	- / -	-	++	+	- / +++	+	++ / ++	+	++
FCP12	+++	- / -	-	++	+	- / +++	+	++ / ++	+	++

Figura 4

FCP	80% v/v Ácido acético		80% v/v Propan-2-ol		80% v/v terc-butanol		80% v/v DMSO		80% v/v Acetona	
	Transparencia	Espuma / materia en partículas	Transparencia	Espuma / materia en partículas	Transparencia	Espuma / materia en partículas	Transparencia	Espuma / materia en partículas	Transparencia	Espuma / materia en partículas
FCP1	+++	- / -	+++	- / -	+++	++ / -	+++	- / -	++	++ / -
FCP2	+++	- / -	+++	- / -	+++	++ / -	+++	++ / -	+++	++ / -
FCP3	+++	- / -	+++	- / -	+++	++ / -	+++	++ / -	+++	++ / -
FCP4	+++	- / -	+++	++ / ++	+++	+ / ++	+	++ / ++	+++	- / ++
FCP5	+++	- / -	•	- / ++	+++	+ / ++	+	++ / ++	+	- / ++
FCP6	+++	- / -	+	++ / -	+	+ / +	+++	- / ++	+++	- / •
FCP7	+++	- / -	+++	++ / -	+++	- / •	+	++ / ++	+	- / ++
FCP8	+++	- / -	•	++ / -	+	++ / ++	+	++ / •	+	++ / ++
FCP9	+++	- / -	+++	- / -	+++	++ / +	+++	++ / -	+++	++ / -
FCP10	+++	- / -	+++	- / -	+++	++ / +	+++	++ / -	+++	++ / -
FCP11	+++	- / -	•	++ / -	+	++ / ++	+	+++ / -	+	++ / -
FCP12	+++	- / -	•	++ / •	+	++ / ++	+	++ / •	+	++ / ++
Mezcla 1	+++	- / -	++	- / ++	+	- / ++	+	- / ++	+	++ / ++
Mezcla 2	+++	- / -	++	- / ++	+	- / ++	+	- / ++	+	++ / ++

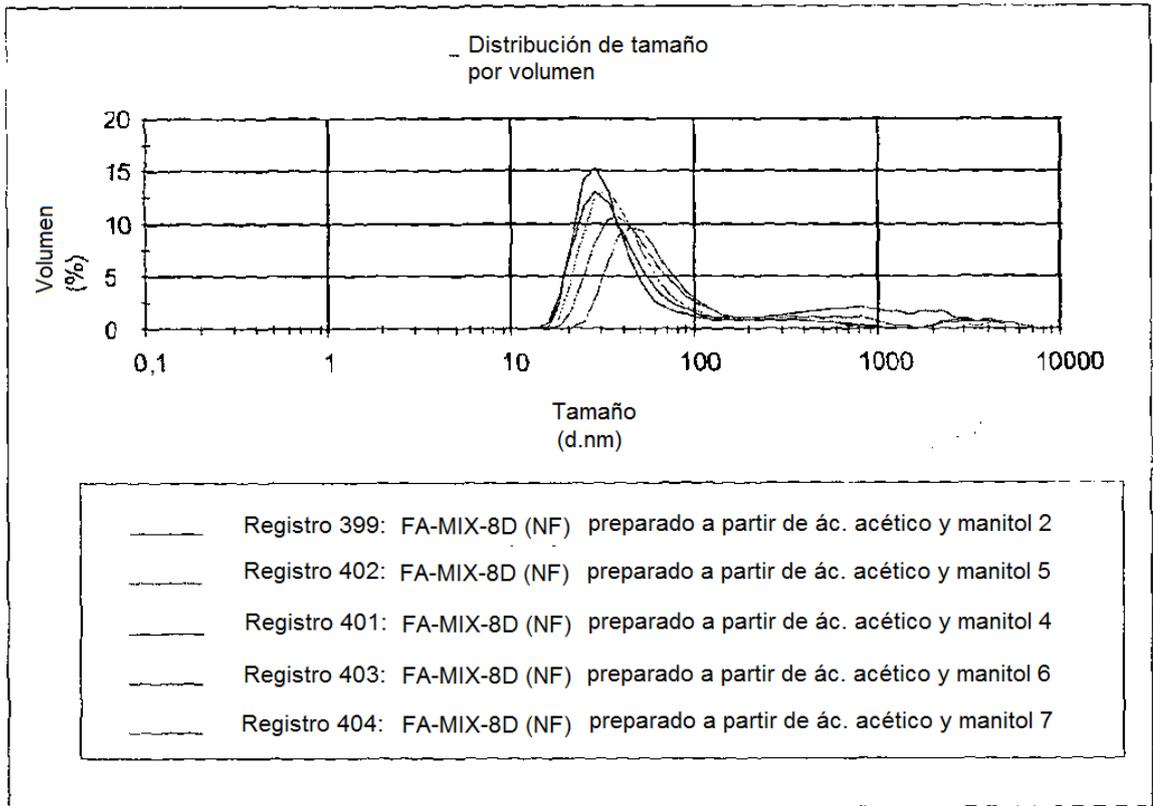


Figura 5

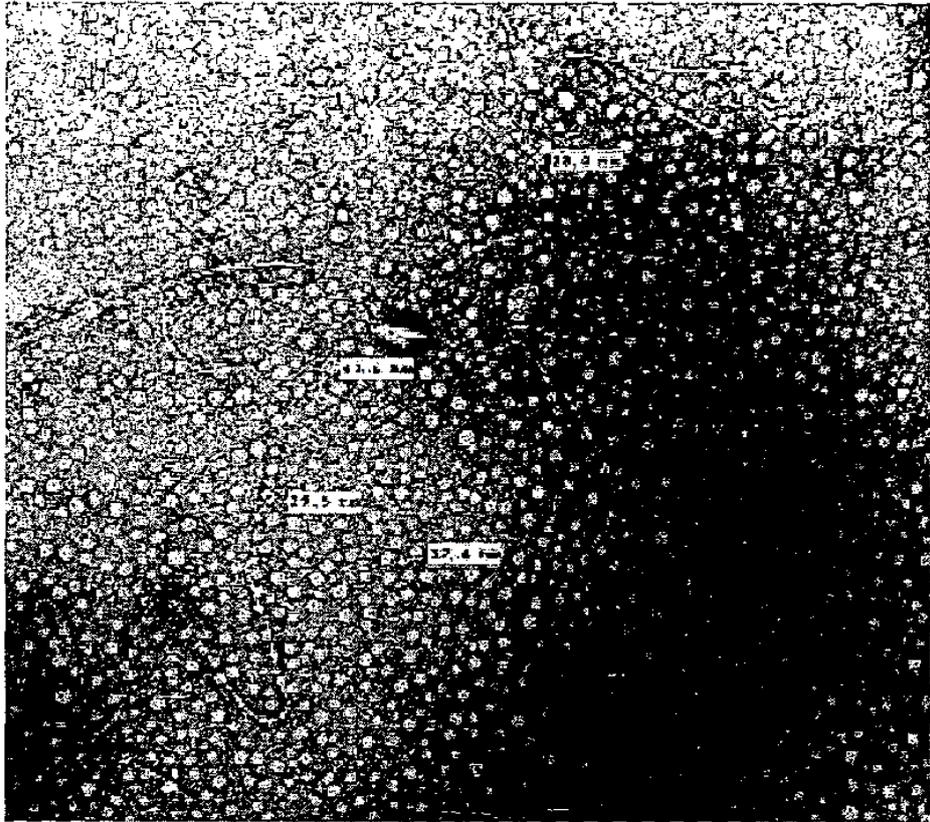


Figura 6

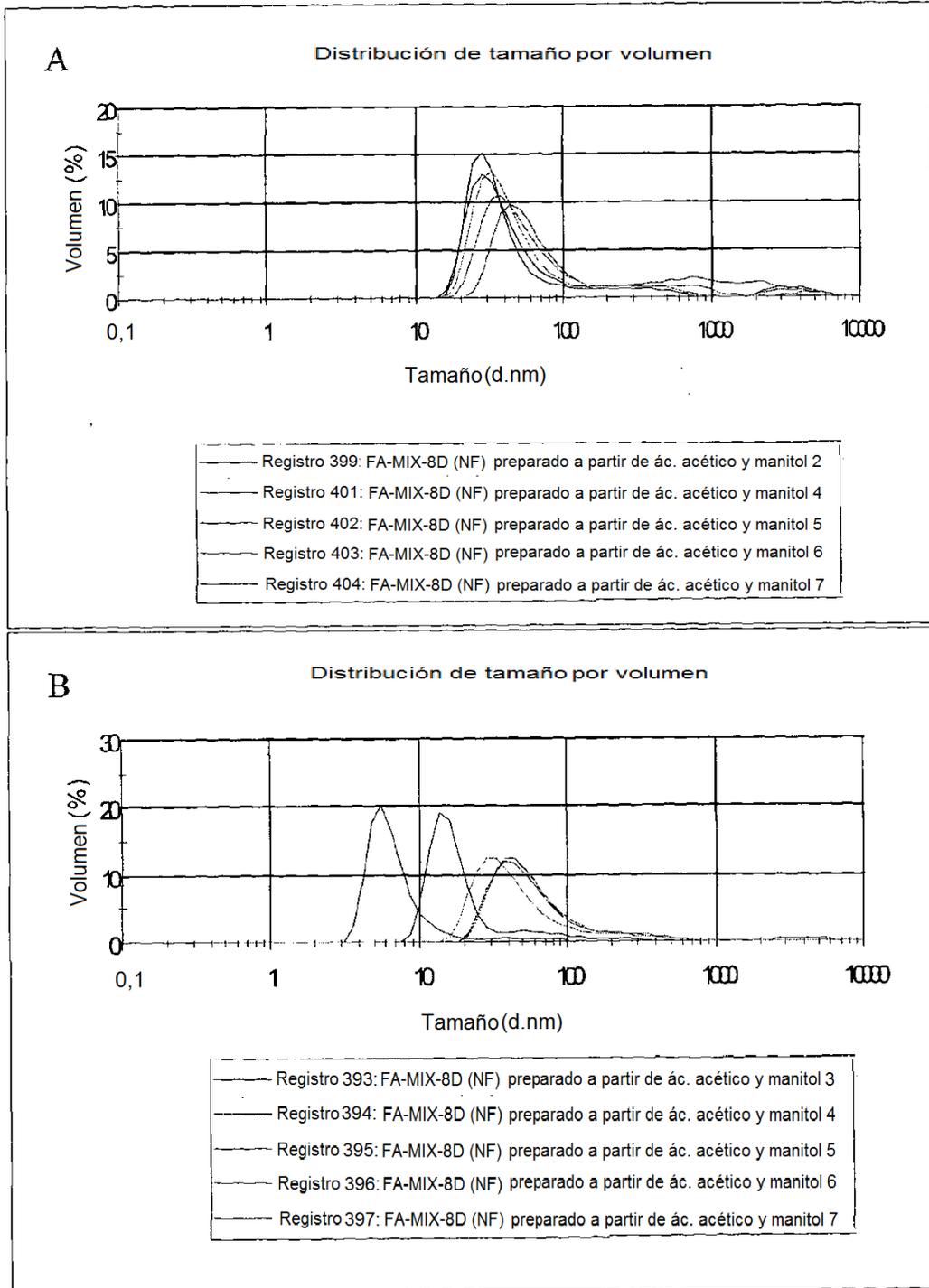


Figura 7

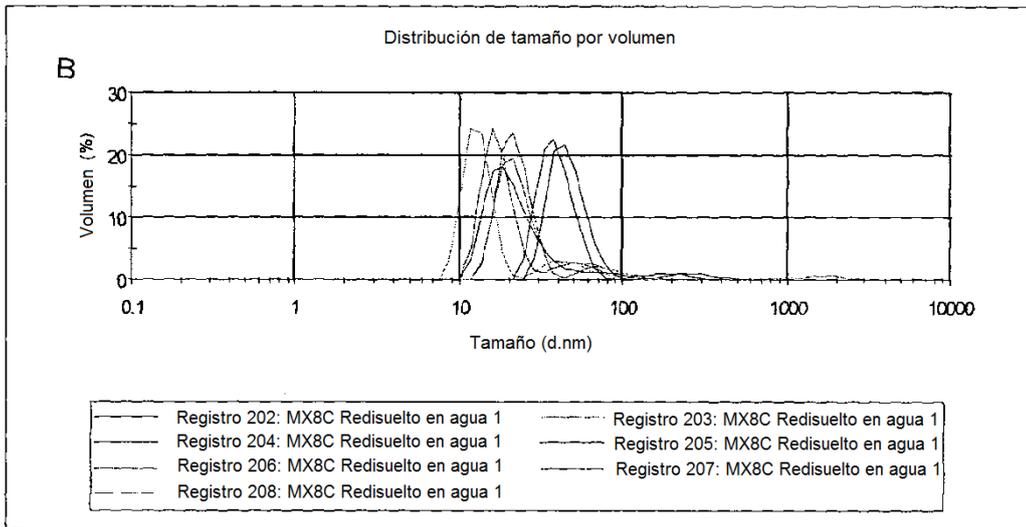
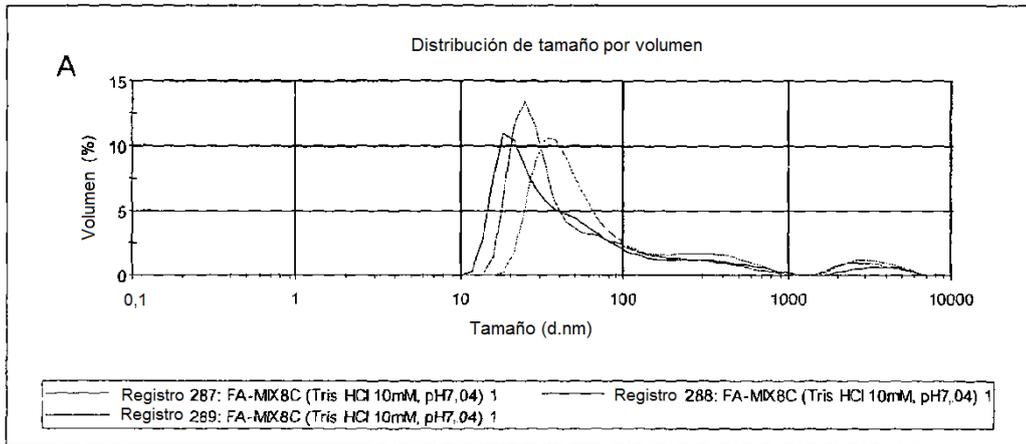


Figura 8

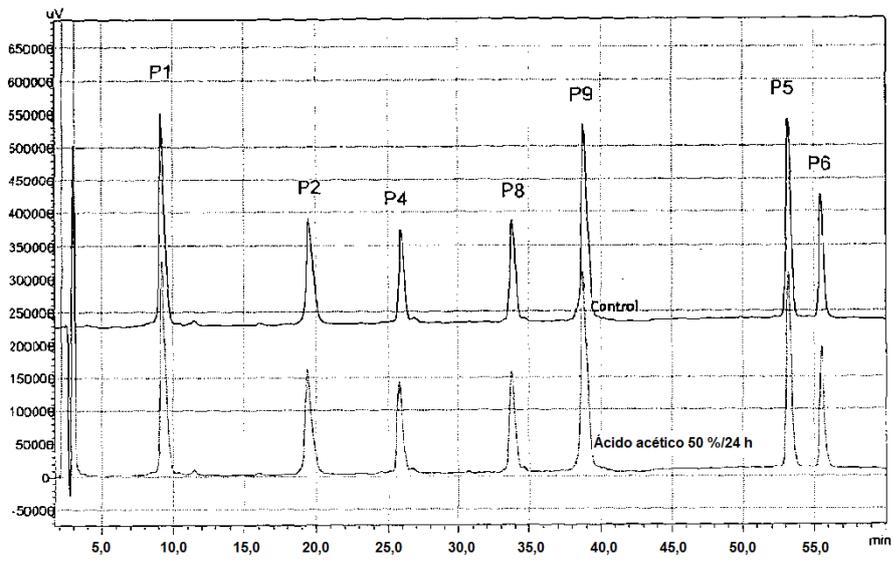


Figura 9

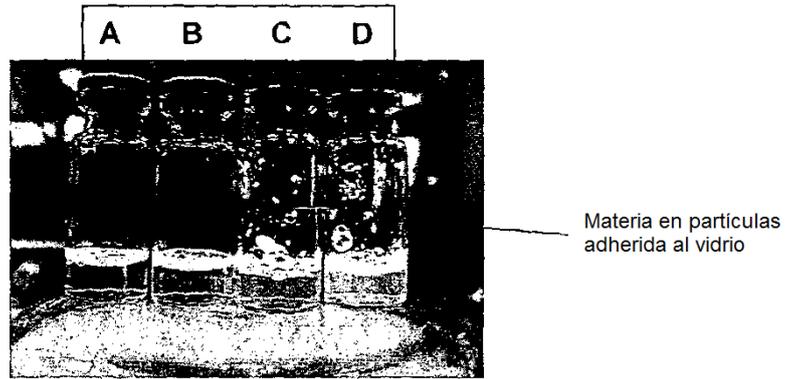


Figura 10

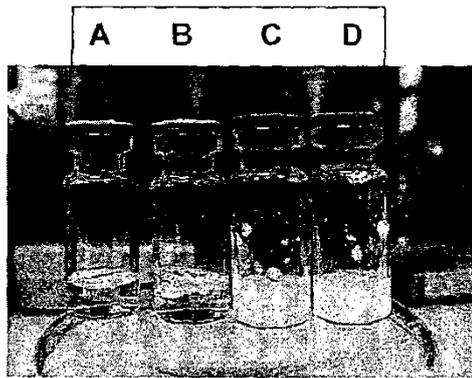


Figura 11

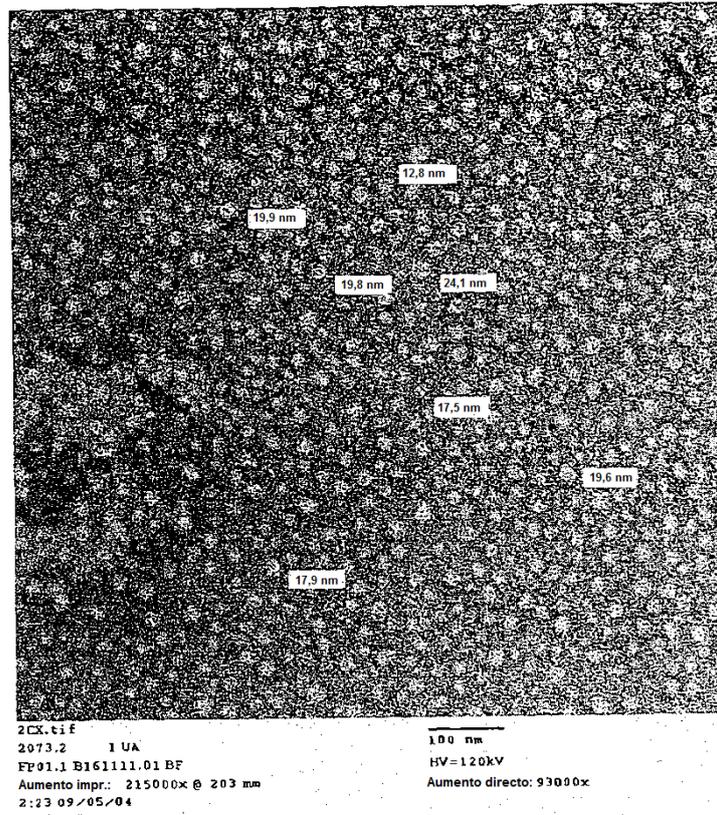


Figura 12

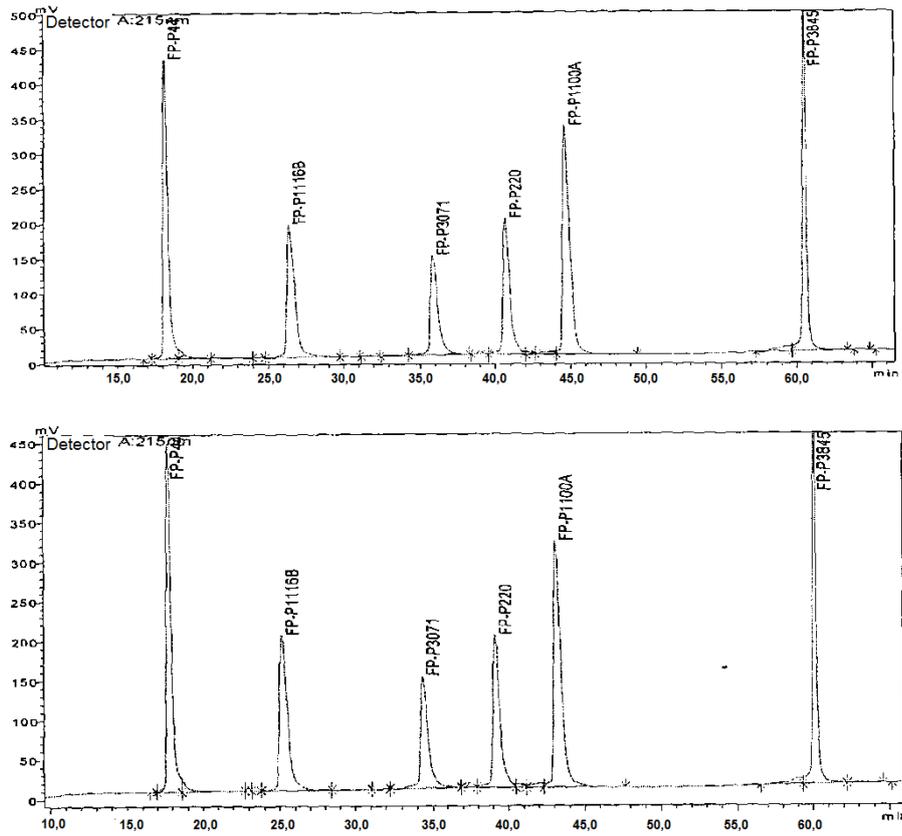


Figura 13

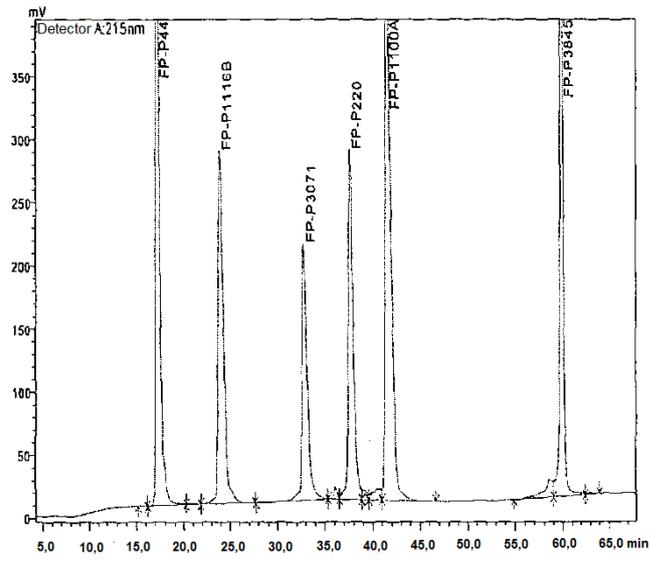


Figura 14



Figura 15

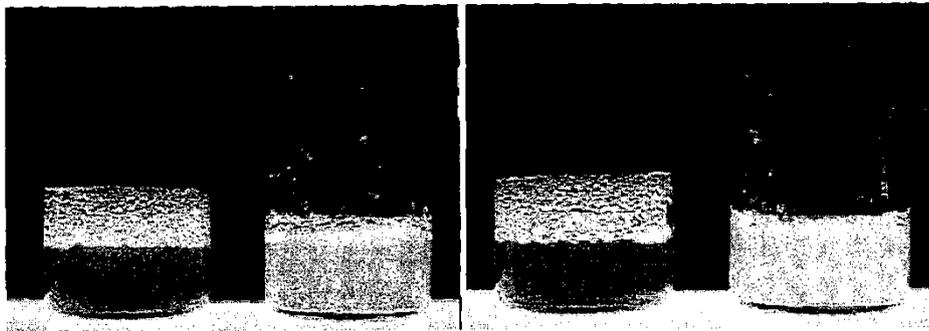


Figura 16

Figura 17

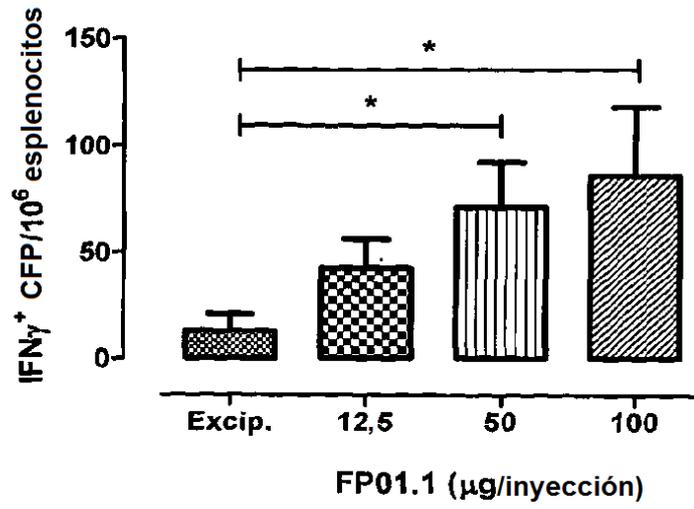


Figura 18

