

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 894**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2016 PCT/EP2016/062336**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193285**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2016 E 16728271 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 3191504**

54 Título: **Péptidos derivados de ezrina y composiciones farmacéuticas de los mismos**

30 Prioridad:

**01.06.2015 RU 2015120667**

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

**26.03.2018**

73 Titular/es:

**NEARMEDIC INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)  
Abacus Elenion Building 5 Themistocles Dervis  
St.**

**1066 Nicosia, CY**

72 Inventor/es:

**HOLMS, RUPERT;  
ATAULLAKHANOV, RAVSHAN;  
ATAULLAKHANOV, RUSTAM y  
SAYADYAN, KHACHIK**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 660 894 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados de ezrina y composiciones farmacéuticas de los mismos

5 La presente invención se refiere al campo de la medicina, específicamente al campo de las industrias química y farmacéutica, y se refiere a péptidos derivados de la ezrina, en particular a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula general (I)  $X_1$  EKKRRETVERE  $X_2X_3$ , en la que cada X representa un residuo aminoácido no polar y en la que la secuencia de aminoácidos presenta una longitud de 14 a 25 residuos. La utilización de los péptidos como agentes inmunoestimuladores, y más específicamente para la utilización en el tratamiento y  
10 prevención de infecciones antivíricas, antibacterianas y antifúngicas, y el tratamiento de enfermedades del tracto GI, en particular trastornos ulcerativos del tracto GI. La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos. Además, la invención se refiere a métodos de tratamiento de infecciones y enfermedades ulcerativas del tracto GI, que comprende administrar los péptidos en pacientes que lo necesitan.

15 La proteína ezrina, también conocida como citovilina o vilina-2, es una proteína codificada en el ser humano por el gen EZR. Los péptidos derivados de la proteína ezrina, que presentan actividad biológica, son bien conocidos. El análogo más próximo del péptido de la invención es un tetradecapéptido farmacéutico  $NH_2$ -Thr-Glu-Lys-Lys-Arg-Arg-Glu-Thr-Val-Glu-Arg-Glu-Lys-Glu-COOH, que comprende 14 residuos aminoácidos, que es conocido como péptido HEP-1 o péptido ezrina humano (ID de secuencia nº 2: TEKKRRETVEREKE) y que ha sido desarrollado para el tratamiento de la infección por el VIH [R.D.Holms, AIDS prophylactics. documento nº PCT/GB95/001285, 02.06.95, WO 95/33768] y, además, para el tratamiento de un amplio abanico de infecciones bacterianas, fúngicas y víricas.

25 El producto farmacéutico liofilizado GEPON® (autorización de comercialización nº P N00015/01-010911), que comprende aproximadamente 96% de péptido HEP-1, se utiliza ampliamente con fines médicos en la Federación Rusa (Kladova, O.V., Kharlamova, F.S., Shcherbakova, A.A., Legkova, T.P., Feldfix, L.I., Znamenskaya, A.A., Ovchinnikova, G.S., Uchaikin, V.F. The first experience of Hepon intranasal application in children with respiratory infections. // Pediatrics, 2002, nº 2, páginas 86 a 88), (Polyakova T.O., Magomedov, M.M., Artemyev, M.E., Surikov, E.V., Palchun, V.T. A new approach in the treatment of chronic diseases of the pharynx // Attending Doctor, 2002, nº 4, páginas 64 a 65), (Novokshonov, A.A., Uchaikin, V.F., Sokolova, N.V., Tikhonova, O.N., Portnykh, O.Yu. Biocenosis protecting therapy of intestinal infections in children. // Russian Medical Journal, suplemento especial "Diseases of the Digestive System ", 2004, volumen 6, nº 1), (Parfenov, A.I. The activator of the local immunity Hepon in the complex treatment of dysbiotic disorders of the intestine. // Experimental and Clinical Gastroenterology, 2003, nº 3, páginas 66 a 69). (Tishchenko, A.L. A new approach in the treatment of recurrent urogenital candidiasis. //Attending Doctor, 2002, nº 3, páginas 46 a 47), (Telunts, A. V. Treatment of candidiasis in infants. // Questions of Gynecology, Obstetrics, and Perinatology, 2004, vol. 3, nº 4, páginas 89 a 90), (Ataullakhanov, R.I., Holms, R.D., Katlinsky, A.V., Pichugin A.V., Papuashvili, M.N., Shishkova, N.M. Treatment with Hepon immunomodulator increases the efficacy of the immune control of opportunistic infections in HIV-infected patients. // Allergy, Asthma, and Clinical Immunology, 2002, nº 10, páginas 3 a 11), (Cherednichenko, T.V., Uchaikin, V.F., Chaplygina, G.V., Kurbanova, G.M. A new efficient treatment of viral hepatitis.// Attending Doctor, 2003, nº 3, páginas 82 a 83), (Gorbarets, I.P., Voronkova, N.V., Lopatina, T.V., Ivanovskaya, V.N., Braginsky, D.M., Blokhina, N.P., Malyshev, N.A. The combined use of Hepon drug product and recombinant interferon-alpha in the patients with chronic hepatitis C increases the efficiency of antiviral treatment and reduces side effects of the therapy.// Hepatology, 2003, nº 4, páginas 23 a 28), (Lazebnik, L.B., Zvenigorodskaya, L.A., Firsakova, V.Yu., Pichugin, A.V., Ataullakhanov, R.I. The application of Hepon immunomodulator in the treatment of erosive ulcerous lesions of gastroduodenal zone.// Experimental and Clinical Gastroenterology, 2003, nº 3, páginas 17 a 20), (Malakhova, N.S., Pichugin, A.V., Khalif, I.L., Ataullakhanov, R.I. The application of Hepon immunomodulator for the treatment of nonspecific ulcerative colitis.// Farmateka, 2005, nº 6 [101], páginas 105 a 108), Dudchenko, M.A., Lysenko, B.F., Chelishvili, A.L., Katlinsky, A.V., Ataullakhanov, R.R. Complex treatment of trophic ulcers.// Attending Doctor 2002, nº 10, páginas 72 a 75), (Bardychev, M.S. Treatment of local radiation injuries with the activator of local immunity.// Russian Medical Journal, 2003, volumen 11, nº 11(183):646-647), Salamov G., R.Holms, W. Bessler, R. Ataullakhanov. Treatment of hepatitis C virus infection with human ezrin peptide one (HEP1) in HIV infected patients.// Arzneimittel-Forschung (Drug Research) 57(7): 497-504, 2007].

55 HEP-1 presenta actividad biológica anti-virus de la hepatitis C y puede utilizarse para el tratamiento de los pacientes con hepatitis C [R.D.Holms, R.I.Ataullakhanov. HCV combination therapy. documento nº PCT/GB2004/000330, 27.01.2004, WO 2004067024 A2].

60 HEP-1 presenta actividad biológica antiúlcera y puede utilizarse para el tratamiento de enfermedades ulcerativas del tracto gastrointestinal [R.D. Holms, R.I. Ataullakhanov. The use of peptides in anti-ulcer therapy. documento nº PCT/GB2006/004390, 23.11.2006, WO/2007/060440].

Los presentes inventores han desarrollado un nuevo péptido que se preparó sintéticamente y que presenta una elevada actividad inmunoestimuladora. Tal como han demostrado los ensayos biológicos, el péptido de la invención

tal como ha sido descrito y las composiciones farmacéuticas del mismo, presentan una elevada actividad inmunoestimuladora, excediendo la actividad del péptido HEP-1, que es el componente principal del producto fármaco GEPON®.

5 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula general (I)  $X_1\text{EKKRRETVEREX}_2\text{X}_3$ , en la que cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  representa un residuo aminoácido no polar (SEC ID nº 5) y en la que la secuencia de aminoácidos es de 14 a 25 residuos de longitud.

10 Los residuos aminoácidos no polares pueden seleccionarse independientemente de entre el grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, metionina, isoleucina, prolina, fenilalanina y triptófano y/o combinaciones de los mismos.

15 En algunas realizaciones,  $X_1$ ,  $X_2$  y/o  $X_3$  pueden seleccionarse independientemente de entre aminoácidos no polar que presentan grupos R pequeños, en particular glicina, alanina y/o valina y/o combinaciones de los mismos. De esta manera, en algunas realizaciones de la invención, cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en glicina, alanina y valina.

20 En algunas realizaciones,  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  pueden ser todos el mismo aminoácido. En una realización preferente, por lo menos uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  es glicina. En una realización más preferente, por lo menos 2 de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  es glicina. En una realización más preferente, cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  es glicina. En una realización, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula general (I)  $X_1\text{EKKRRETVERE X}_2\text{X}_3$ , en la que cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  es no polar y además en el que por lo menos uno, o por lo menos dos de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son glicinas. En una realización preferente, el péptido presenta la secuencia GEKKRRETVEREGG.

25 En la presente exposición, los códigos de una letra han sido utilizados para designar los diversos aminoácidos. Utilizando los códigos de tres letras y de una letra, los aminoácidos también pueden denominarse de la manera siguiente: glicina (G o Gly), alanina (A o Ala), valina (V o Val), leucina (L o Leu), isoleucina (I o Ile), prolina (P o Pro), fenilalanina (F o Phe), tirosina (Y o Tyr), triptófano (W o Trp), lisina (K o Lys), arginina (R o Arg), histidina (H o His), ácido aspártico (D o Asp), ácido glutámico (E o Glu), asparagina (N o Asn), glutamina (Q o Gln), cisteína (C o Cys), metionina (M o Met), serina (S o Ser) y treonina (T o Thr). En donde un residuo pueda ser ácido aspártico o asparagina, pueden utilizarse los símbolos Asx o B. En donde un residuo pueda ser ácido glutámico o glutamina, pueden utilizarse los símbolos Glx o Z. Entre las referencias al ácido aspártico se incluye aspartato, y ácido glutámico incluye glutamato, a menos que el contexto indique lo contrario.

35 El término péptido puede incluir composiciones que comprenden las secuencias de aminoácidos dadas a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, los péptidos pueden modificarse (por ejemplo en el extremo C-terminal o N-terminal) para protegerlos de la degradación o para incrementar su biodisponibilidad y/o biocompatibilidad, según considere adecuado o necesario el experto en la materia. Se indica que las características referentes al «péptido de la invención» se aplican igualmente a la secuencia de aminoácidos especificada en la fórmula general.

40 El péptido de la invención presenta una longitud de 14 a 25 residuos aminoácidos, con la condición de que la secuencia de aminoácidos comprenda la fórmula general (I)  $X_1\text{EKKRRETVEREX}_2\text{X}_3$ , en la que cada X representa un residuo aminoácido no polar, tal como se indica en la presente memoria.

45 En algunas realizaciones, el péptido presenta una longitud de 14 a 25 residuos, por ejemplo de 14 a 20 residuos, o de 14 a 18 residuos, y comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula general (I) (o realizaciones de la misma definidas adicionalmente). En algunas realizaciones, el péptido presenta una longitud de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 residuos y comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula general (I) (o realizaciones de la misma definidas adicionalmente). En realizaciones adicionales, el péptido presenta una longitud de 14 a 25 residuos, por ejemplo 14 a 20 residuos, o 14 a 18 residuos, y comprende la secuencia de SEC ID nº 1 (GEKKRRETVEREGG).

50 En algunas realizaciones, el péptido presenta una longitud de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 y comprende la secuencia de SEC ID nº 1 (GEKKRRETVEREGG). En una realización, el péptido presenta una longitud de 14 y 18 residuos y comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula general (I)  $X_1\text{EKKRRETVERE X}_2\text{X}_3$ , en la que cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  es no polar y además en la que por lo menos dos de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son glicinas. En realizaciones preferentes, el péptido de la invención presenta una longitud de por lo menos 14 aminoácidos y comprende la SEC ID nº 1 (GEKKRRETVEREGG).

55 Preferentemente, el péptido de la invención presenta una longitud de 14 residuos aminoácidos. En la realización más preferente de la invención, el péptido presenta la secuencia NH<sub>2</sub>\_Gly-Glu-Lys-Lys-Arg-Arg-Glu-Thr-Val-Glu-Arg-Glu-Gly-Gly-COOH (secuencia ID nº 1: GEKKRRETVEREGG) (en la presente memoria denominada HP-V2).

60 El objetivo de la presente invención es la extensión del abanico de compuestos péptidos que presentan una actividad inmunoestimuladora mejorada. Además, el objetivo de la presente invención es la preparación de una

composición farmacéutica con la máxima actividad inmunoestimuladora y con un amplio abanico de acción basado en el péptido reivindicado y péptidos ezrina conocidos. Generalmente, los péptidos de la invención presentan un perfil de inmunoestimulación más elevado y/o una actividad antivírica más elevada en comparación con los péptidos que comprenden o que consisten en la SEC ID nº 2. La inmunoestimulación y actividad antivírica puede medirse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, la actividad inmunológica del péptido puede evaluarse según el efecto sobre la síntesis de ARNm de las citoquinas en las células J-96 (por ejemplo, IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6). La actividad antivírica puede medirse según el efecto citotóxico sobre el virus de la encefalomiocarditis (EMC) y/o según la IC<sub>50</sub> del péptido en la inhibición de la replicación del virus de la EMC. Otros métodos resultarán evidentes para el experto en la materia.

El objetivo deseado puede conseguirse con el nuevo péptido propuesto que comprende la secuencia de fórmula (I) y derivados de la misma tal como se comenta en la presente memoria y más particularmente la secuencia de SEC ID nº 1: GEKKRRETVEREKG. Estos péptidos de la invención se preparan sintéticamente y presentan una elevada actividad inmunoestimuladora. Una búsqueda de las secuencias peptídicas en la base de datos <http://research.bioinformatics.udel.edu/peptidematch/index.jsp> y una búsqueda de las secuencias de proteínas en la base de datos <http://www.uniprot.org/blast/> ha confirmado la novedad del péptido (HP-V2), que comprende 14 residuos aminoácidos (ID de secuencia nº 1: GEKKRRETVEREKG).

Tal como han demostrado los ensayos biológicos, el péptido de la invención y las composiciones farmacéuticas del mismo presentan una elevada actividad inmunoestimuladora, excediendo la actividad del péptido HEP-1, que es el componente principal del producto fármaco GEPON®.

Se utilizó el péptido ezrina conocido HEP-1 (ID de secuencia nº 2: TEKKRRETVEREKE) y dos péptidos más pequeños: el péptido HP1-5 de fórmula NH<sub>2</sub> Thr-Glu-Lys-Lys-Arg COOH (ID de secuencia nº 3: TEKKR) en lo sucesivo definido como HP1-5 y el péptido HP6-14 de fórmula NH<sub>2</sub> Arg-Glu-Thr-Val-Glu-Arg-Glu-Lys-Glu COOH (ID de secuencia nº 4: RETVEREKE) en lo sucesivo definido como HP6-14, para la preparación de composiciones farmacéuticas con el péptido de la invención. Los dos últimos péptidos son productos de corte del péptido HEP1 (ID de secuencia nº 2: TEKKRRETVEREKE) y presentan secuencias que son idénticas a las descritas con anterioridad [R.D.Holms. Regulatory/unfolding peptides of ezrin. Documento nº PCT/GB00/03566, 15.09.2000, WO 01/025275]. El péptido HP1-5 y el péptido HP6-14 son dos péptidos-satélite que han sido identificados en el producto fármaco GEPON® en forma de impurezas.

En algunas realizaciones, el péptido de la invención puede combinarse con HEP-1 (ID de secuencia nº 2: TEKKRRETVEREKE) o con el péptido HP1-5 de fórmula NH<sub>2</sub> Thr-Glu-Lys-Lys-Arg COOH (ID de secuencia nº 3: TEKKR) en lo sucesivo definido como HP1-5 o con el péptido HP6-14 de fórmula NH<sub>2</sub> Arg-Glu-Thr-Val-Glu-Arg-Glu-Lys-Glu COOH (ID de secuencia nº 4: RETVEREKE) en lo sucesivo definido como HP6-14.

Los péptidos de la invención y combinaciones de péptidos tal como se describen en la presente memoria pueden resultar útiles en medicina, por ejemplo para la utilización en el tratamiento y prevención de infecciones víricas, bacterianas y fúngicas, así como para el tratamiento de enfermedades ulcerativas de las membranas mucosas y tejidos blandos.

En un segundo aspecto de la invención se proporciona un péptido de la invención (tal como un péptido de fórmula general (I), en particular un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1) para la utilización en medicina. Entre los usos médicos particulares se incluye el tratamiento o la prevención de la infección. La infección puede ser una infección vírica, bacteriana o fúngica. Entre las realizaciones adicionales de la invención se incluyen el tratamiento o la prevención de la ulceración de las membranas mucosas del tracto digestivo, tales como úlceras del estómago, intestino grueso, duodeno o intestino delgado, y el tratamiento o la prevención de enfermedades intestinales inflamatorias, incluyendo enfermedades y/o trastornos relacionados con úlceras del estómago, intestino grueso, duodeno o intestino delgado, y el síndrome del intestino irritable (SII). Los péptidos de la invención se proporcionan además para la utilización en el tratamiento o la prevención de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. En realizaciones preferentes, los péptidos de la invención se proporcionan para la utilización en el tratamiento o la prevención de la inflamación y/o ulceración del tracto digestivo inferior.

Se proporciona además un péptido de la invención (tal como un péptido de fórmula general (I), en particular un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1) para la utilización en la estimulación de una respuesta inmunológica en un sujeto. En algunas realizaciones de la invención, los péptidos pueden utilizarse para estimular la producción endógena de interferón en un sujeto. Los péptidos pueden utilizarse además para estimular la activación de la ruta de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (por sus siglas en inglés, MAPK/ERK).

En algunas realizaciones de la invención, el péptido de la invención puede combinarse con HEP-1 (ID de secuencia nº 2: TEKKRRETVEREKE) o con el péptido HP1-5 de fórmula NH<sub>2</sub> Thr-Glu-Lys-Lys-Arg COOH (ID de secuencia nº 3: TEKKR), en lo sucesivo definida como HP1-5 o con el péptido HP6-14 de fórmula NH<sub>2</sub> Arg-Glu-Thr-Val-Glu-Arg-

5 Glu-Lys-Glu COOH (ID de secuencia nº 4: RETVEREKE), en lo sucesivo denominado HP6-14. Por ejemplo, un péptido de fórmula general (I), en particular un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, puede combinarse con una o más de las SEC ID nº 2, nº 3 o nº 4. Dichas combinaciones resultan útiles en los aspectos médicos de la invención, incluyendo el tratamiento o la prevención de la infección. La infección puede ser una infección vírica, bacteriana o fúngica. Las combinaciones de péptidos también resultan útiles en el tratamiento o la prevención de la ulceración de las membranas mucosas del tracto digestivo, tales como úlceras del estómago, intestino grueso, duodeno o intestino delgado, y en el tratamiento o la prevención de enfermedades intestinales inflamatorias, incluyendo enfermedades y/o trastornos relacionados con úlceras del estómago, intestino grueso, duodeno o intestino delgado, y el síndrome del intestino irritable (SII). Los péptidos de la invención se proporcionan además para la utilización en el tratamiento o la prevención de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. En realizaciones preferentes, las combinaciones de péptidos de la invención se proporcionan para la utilización en el tratamiento o la prevención de la inflamación y/o ulceración del tracto digestivo inferior.

15 Las realizaciones de la invención se extienden adicionalmente a métodos de tratamiento o prevención de infecciones, úlceras del estómago, intestino grueso, duodeno o intestino delgado, enfermedades y/o trastornos relacionados con úlceras del estómago, intestino grueso, duodeno o intestino delgado, síndrome del intestino irritable (SII), colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, que comprende administrar el péptido de la invención (tal como un péptido de fórmula general (I), en particular un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1) en un péptido que lo necesita. La infección puede ser una infección vírica, bacteriana o fúngica. Los péptidos de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz y pueden administrarse con otro u otros compuestos farmacéuticamente activos. En particular, los péptidos de la invención pueden administrarse en combinación con uno o más de los péptidos de SEC ID nº 2, nº 3 y/o nº 4.

25 De esta manera, se proporciona además la combinación de un péptido de la invención (tal como un péptido de fórmula general (I), en particular un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1) y un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2, nº 3 o nº 4 para la utilización en medicina. Entre dichos usos médicos se incluye el tratamiento o la prevención de infecciones (tales como infecciones víricas, bacterianas o fúngicas), la ulceración de las membranas mucosas del tracto digestivo (tales como las úlceras de estómago, las úlceras del intestino grueso, las úlceras duodenales y las úlceras del intestino delgado) o la enfermedad intestinal inflamatoria o una enfermedad o trastorno asociado a la enfermedad intestinal inflamatoria (tal como la SII, la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn). En realizaciones preferentes, los péptidos de la invención se proporcionan para la utilización en el tratamiento o la prevención de la inflamación y/o ulceración del tracto digestivo inferior. Entre dichos usos médicos se incluye además la estimulación de una respuesta inmunológica en un sujeto.

35 En realizaciones preferentes, en el caso de que los péptidos de la invención se utilicen en combinación con HEP-1, HP1-5 o HP6-14, el péptido adicional consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2, nº 3 o nº 4.

40 Se proporciona además un método de estimulación de una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención (tal como un péptido de fórmula general (I), en particular un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1) en un péptido que lo necesita.

45 En un tercer aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido de la invención y un portador o relleno farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica puede comprender además un compuesto farmacéuticamente activo adicional. En particular, la composición farmacéutica puede comprender además HEP-1 (ID de secuencia nº 2: TEKKRRETVEREKE), HP1-5 (ID de secuencia nº 3: TEKKR) o HP6-14 (ID de secuencia nº 4: RETVEREKE).

50 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una realización la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de entre 14 y 18 residuos de longitud, donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que presenta la secuencia  $X_1$  EKKRRETVERE  $X_2X_3$ , en la que cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son no polares y además en la que por lo menos dos de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son glicinas, y un portador o relleno farmacéuticamente aceptable.

55 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender otras sustancias farmacéuticamente activas, tales como sustancias antivíricas, antibacterianas, antifúngicas, analgésicas y/o antiinflamatorias. La composición farmacéutica puede formularse utilizando cualquier adyuvante conveniente y/o diluyentes fisiológicamente aceptables.

60 Pueden utilizarse rellenos, portadores, conservantes y estabilizantes, los cuales son utilizados habitualmente por el experto en tecnologías de administración de medicamentos, como portador o relleno aceptable para la preparación de las composiciones farmacéuticas proporcionadas. Para la inyección, se utiliza predominantemente agua destilada o solución salina fisiológica.

- 5 La composición farmacéutica puede adaptarse para la administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo por la vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Dichas composiciones pueden prepararse mediante cualquier método conocido de la técnica farmacéutica, por ejemplo mediante la mezcla del ingrediente activo con el portador o portadores, o excipiente o excipientes, bajo condiciones de esterilidad. En realizaciones particulares, la composición farmacéutica de la invención que comprende los péptidos de la invención se encuentra en la forma de una tableta para la administración oral, tal como una tableta de glucosa. En algunas realizaciones, la tableta se puede desleír.
- 10 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral pueden presentarse en forma de unidades discretas, tales como cápsulas o tabletas; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos, o como espumas o batidos comestibles, o como emulsiones). En realizaciones preferentes, la composición farmacéutica de la invención que comprende los péptidos de la invención se encuentra en forma de una tableta para la administración oral, tal como una tableta de glucosa. En algunas realizaciones, la
- 15 tableta se puede desleír.
- En algunas realizaciones de la invención, los péptidos se proporcionan en forma de polvos o gránulos liofilizados.
- 20 Entre los excipientes adecuados para tabletas o cápsulas de gelatina dura se incluyen la lactosa, el almidón de maíz o derivados de los mismos, el ácido esteárico o las sales del mismo. Entre los excipientes adecuados para la utilización con cápsulas de gelatina blanda se incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos, etc.
- 25 Para la preparación de soluciones y jarabes, entre los excipientes que pueden utilizarse se incluyen, por ejemplo, el agua, los polioles y los azúcares. Para la preparación de suspensiones, pueden utilizarse aceites (por ejemplo aceites vegetales) para proporcionar suspensiones de aceite en agua o de agua en aceite.
- 30 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica pueden presentarse en forma de parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el ingrediente activo puede administrarse a partir del parche mediante ionoforesis, tal como se indica de manera general en Pharmaceutical Research 3(6):318, 1986.
- 35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas a la administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, sprays, aerosoles o aceites. Para las infecciones oculares u otros tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las composiciones se aplican convenientemente como pomada o crema tópica. Al formularse en una pomada, el ingrediente activo puede utilizarse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Alternativamente, el ingrediente activo puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite. Entre las composiciones farmacéuticas adaptadas a la administración tópica en el ojo se incluyen las gotas oftalmológicas en las que se disuelve o se suspende el
- 40 ingrediente activo en un portador adecuado, especialmente un solvente acuoso. Entre las composiciones farmacéuticas adaptadas a la administración tópica en la boca se incluyen pastillas desleíbles en la boca, píldoras y soluciones para enjuague bucal.
- 45 Las composiciones farmacéuticas adaptadas a la administración rectal pueden presentarse como supositorios o enemas.
- 50 Entre las composiciones farmacéuticas adaptadas a la administración nasal en las que el portador es un sólido se incluyen unos polvos gruesos con un tamaño de partícula comprendido en el intervalo de, por ejemplo, 20 a 500 micras. Entre las composiciones adecuadas en las que el portador es un líquido para la administración como spray nasal o como gotas nasales se incluyen las soluciones acuosas o en aceite del ingrediente activo.
- 55 Entre las composiciones farmacéuticas adaptadas a la administración mediante inhalación se incluyen los polvos de partículas finas o nieblas que pueden generarse mediante diversos tipos de aerosoles presurizados de dosis medida, nebulizadores o insufladores.
- Las composiciones farmacéuticas adaptadas a la administración vaginal pueden presentarse como formulaciones de pesario, tampón, crema, gel, pasta, espuma o spray.
- 60 Entre las formulaciones adaptadas a la administración parenteral se incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que convierten la formulación en sustancialmente isotónica con la sangre del receptor pretendido, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Entre los excipientes que pueden utilizarse para las soluciones inyectables se incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones pueden presentarse en recipientes unidos o multidosis, por ejemplo ampollas selladas

y viales, y pueden almacenarse bajo una condición seca mediante congelación (liofilizada) que requiera únicamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para la inyección, inmediatamente antes de la utilización.

5 Pueden prepararse soluciones y suspensiones para la inyección siguiendo una receta magistral a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes conservantes, agentes solubilizadores, agentes estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, odorantes, sales (las sustancias de la presente invención pueden ellas mismas proporcionarse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable),  
15 tampones, agentes de recubrimiento o antioxidantes. Pueden contener además agentes terapéuticamente activos además de la sustancia de la presente invención.

15 Las dosis de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar entre amplios límites, según la enfermedad o trastorno que deba tratarse, la edad y condición del individuo que debe tratarse, etc., y un médico determinará finalmente las dosis adecuadas que deben utilizarse.

20 Dichas composiciones pueden formularse para medicina humana o veterinaria. La presente solicitud debe interpretarse como aplicable igualmente a seres humanos y a animales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica en forma de una tableta para la administración oral, en particular una tableta de glucosa, que comprende un péptido de entre 14 y 18 residuos de longitud, donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que presenta la secuencia  $X_1$  EKKRRETVERE  $X_2X_3$ , en la que cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  es no polar y en la que además por lo menos dos de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son glicinas y un portador o relleno farmacéuticamente aceptable. En una realización más preferente, el péptido presenta la secuencia GEKKRRETVEREGG.

30 La invención se extiende a métodos de preparación de composiciones farmacéuticas adecuadas, así como a la utilización de un péptido de la presente invención en la preparación de un medicamento para la utilización en medicina, para la utilización en cualquiera de los usos especificados en la presente memoria.

35 En un aspecto adicional de la invención se proporciona una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un péptido de la invención, en particular un péptido de fórmula general I, tal como un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 o SEC ID nº 5.

40 El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc o ARN, tal como ARNm obtenido mediante clonación o producido mediante síntesis química. El ADN puede ser de cadena sencilla o de doble cadena. El ADN de cadena sencilla puede ser la cadena de sentido codificante o puede ser la cadena no codificante o antisentido.

45 En un aspecto todavía adicional de la invención se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de la invención. En todavía otro aspecto adicional de la invención se proporciona una célula huésped que comprende el vector de la presente invención. Los métodos de preparación u obtención de dichos ácidos nucleicos, vectores y células huésped también se encuentran incluidos en la presente invención y son conocidos de la técnica.

50 El péptido de la presente invención puede sintetizarse mediante química de síntesis de péptidos, por ejemplo el péptido de la invención puede sintetizarse mediante síntesis en fase líquida (Combinatorial Chemistry: A Practical Approach, ed. Hicham Fenniri, Oxford University Press (2000)) utilizando un procedimiento estándar o mediante síntesis en fase sólida, por ejemplo la síntesis con "Fmoc" o "Bmoc" (Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (Practical Approach S.), editores W. Chan y Peter White, Oxford University Press, 2000). En el caso de que se utilice la síntesis en fase sólida, se utiliza una fase sólida tal como resina de poliestireno o resina de poliamida, o resina híbrida de poliestireno y PEG o resina a base de PEG. Se utilizan diferentes grupos protectores durante la síntesis, por ejemplo grupos protectores del extremo N-terminal y grupos protectores t-Boc o FMOC. Además, pueden utilizarse grupos protectores benciloxycarbonilo (Z) o aliloxycarbonilo (Alloc), o grupos protectores fotoescindibles (litográficos) o una técnica de protección de grupos laterales. Los productos peptídicos se purificaron mediante separación por HPLC o mediante cualquier otro método de purificación. Se confirma la estructura peptídica mediante datos del análisis de los aminoácidos, espectrometría de masas y cromatografía líquida de alto rendimiento.

60 En algunos casos, pueden sintetizarse fragmentos utilizando métodos en estado sólido y después acoplarse entre sí en solución. Los péptidos pueden sintetizarse desde el lado del grupo carbonilo al lado del grupo amino de la cadena de aminoácidos en el presente método, aunque se sintetizan péptidos en la dirección contraria en las células. En dichos métodos, se une un aminoácido con amino protegido a una perla de sustrato (es decir, una perla de resina), formando un enlace covalente entre el grupo carbonilo y la resina. A continuación, se desprotege el grupo amino y se hace reaccionar con el grupo carbonilo del siguiente aminoácido con amino protegido. Se repite el ciclo con la

frecuencia requerida con el fin de formar la cadena peptídica deseada. A continuación, el péptido sintetizado se escinde de la perla al final del procedimiento. Los grupos protectores para los grupos amino se utilizan mayoritariamente en dicha síntesis peptídica son los grupos 9-fluorenilmetiloxycarbonilo («Fmoc») y t-butiloxycarbonilo («Boc»). Se eliminó el grupo Fmoc del extremo amino-terminal con base mientras que el grupo Boc se eliminó con ácido.

Los péptidos HEP-1, HP1-5 y HP6-14, utilizados en la presente invención para la preparación de las composiciones farmacéuticas, fueron preparados mediante el método de síntesis en fase líquida por el fabricante autorizado «Immapharma», LLC (Moscú).

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método de preparación de los péptidos de la invención, en particular péptidos según la fórmula general 1, tal como péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 1 o SEC ID n° 5. El método puede comprender sintetizar los péptidos mediante síntesis en fase líquida o síntesis en fase sólida.

En una realización de la invención se proporciona un péptido de 14 aminoácidos de longitud, en el que la secuencia de aminoácidos es GEKKRRETVEREGG. El péptido resulta útil en medicina, en particular en el tratamiento de la inflamación y/o ulceración del tracto digestivo inferior. El péptido puede proporcionarse en forma de una tableta para la administración oral, en particular de una tableta con glucosa.

Las características preferentes para el segundo y posteriores aspectos de la invención son como las correspondientes al primer aspecto *mutatis mutandis*.

A continuación, se describe la presente invención mediante referencia a los Ejemplos, posteriormente, que se presentan a título de referencia únicamente y no deben interpretarse como limitativos de la invención. En los Ejemplos, se hace referencia a varios dibujos, en los que:

Figura 1. Cromatografía líquida de alto rendimiento del péptido HEP-1. Columna Luna C18 (2), 4,6 x 250 mm, partículas de 5,0 µm. Fase móvil: A - agua, 5% ACN, 0,1% TFA; B - 0,1% TFA; programa 5-25% ACN durante 20 min. Caudal: 1 ml/min. Eje X: tiempo; eje Y: Absorción de UV (mV, línea superior, con picos), presión (inferior, línea horizontal).

Figura 2. Cromatografía líquida de alto rendimiento de la mezcla de péptido HEP-1 y péptido HP 1-5. Columna Luna C18 (2), 4,6 x 250 mm, partículas de 5,0 µm. Fase móvil: A - agua, 5% ACN, 0,1% TFA; B - 0,1% TFA; programa 5-25% ACN durante 20 min. Caudal: 1 ml/min. Eje X: tiempo; eje Y: Absorción de UV (mV, línea superior, con picos), presión (inferior, línea horizontal).

Figura 3. Cromatografía líquida de alto rendimiento de la mezcla de péptido HEP-1 y péptido HP 6-14. Columna Luna C18 (2), 4,6 x 250 mm, partículas de 5,0 µm. Fase móvil: A - agua, 5% ACN, 0,1% TFA; B - 0,1% TFA; programa 5-25% ACN durante 20 min. Caudal: 1 ml/min. Eje X: tiempo; eje Y: Absorción de UV (mV, línea superior, con picos), presión (inferior, línea horizontal).

Figura 4. Cromatografía líquida de alto rendimiento de la mezcla de péptido HEP-1 y péptido HP-V2. Columna Luna C18 (2), 4,6 x 250 mm, partículas de 5,0 µm. Fase móvil: A - agua, 5% ACN, 0,1% TFA; B - 0,1% TFA; programa 5-25% ACN durante 20 min. Caudal: 1 ml/min. Eje X: tiempo; eje Y: Absorción de UV (mV, línea superior, con picos), presión (inferior, línea horizontal).

Figura 5. Cromatografía líquida de alto rendimiento de la mezcla de péptido HP-V2. Columna Luna C18 (2), 4,6 x 250 mm, partículas de 5,0 µm. Fase móvil: A - agua, 5% ACN, 0,1% TFA; B - 0,1% TFA; programa 5-25% ACN durante 20 min. Caudal: 1 ml/min. Eje X: tiempo; eje Y: Absorción de UV (mV, línea superior, con picos), presión (inferior, línea horizontal).

Figura 6. Espectro de MALDI TOF/TOF de la mezcla de péptido HEP-1 y péptido HP-V2.

## Ejemplos

Se utilizó el método de cromatografía líquida de alto rendimiento para la evaluación precisa de la concentración de cada componente durante la preparación de las composiciones farmacéuticas. Los resultados del estudio demostraron que resultaba imposible distinguir el péptido HP-V2, al presentar un número de aminoácidos similar al del péptido HEP-1 bajo las condiciones de la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y este hecho no permitió determinar el contenido cuantitativo de las composiciones a base de HP-V2 y HEP-1 (Ejemplo 4, figs. 1, 4 y 5). La composición cuantitativa del péptido HP-V2 reivindicado y péptidos-satélite HP1-5 y HP6-14 puede calcularse fácilmente basándose en los cromatogramas gracias a su buena separación (Ejemplos 2 y 3; figs. 2 y 3).

Sin embargo, la espectrometría de masas MALDI TOF detecta claramente cada péptido en la mezcla de dos péptidos, que comprende 14 residuos aminoácidos, en particular en la mezcla de péptido HP-V2 (ID de secuencia nº 1: GEKKRRETVEREGG), que se define como HP-V2 y péptido HEP-1 (ID de secuencia nº 2: TEKKRRETVEREKE), que se define como HEP-1 (Ejemplo 5; fig. 6).

#### Ejemplo 1. Preparación del péptido HP-V2.

Se llevó a cabo la síntesis del péptido HP-V2 mediante un método en fase sólida utilizando el polímero alcobencilo. Se llevaron a cabo acoplamientos utilizando el método basado en el uso de: 1) tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) o 2) 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPC). La unión de los residuos aminoácidos protegidos con Fmoc secuenciales se llevó a cabo individualmente, excepto en los casos en que se encontraron grupos amino no reaccionados en el polímero peptídico en crecimiento tras la reacción de acoplamiento. El control del contenido de grupos amino no reaccionados en el polímero peptídico se mantuvo mediante pruebas de ninhidrina. Se utilizó ácido trifluoroacético con adición de tioanisol, fenol, etanoditiol, trisopropilsilano y agua para la separación del péptido y el portador polimérico y para el desbloqueo final. Se confirmó la estructura y homogeneidad del producto deseado mediante los datos del análisis de los aminoácidos, espectrometría de masas y cromatografía líquida de alto rendimiento.

Se propusieron las composiciones farmacéuticas siguientes basadas en el péptido HP-V2 proporcionado (ID de secuencia nº 1: GEKKRRETVEREGG), así como en las mezclas de las mismas con los péptidos siguientes:

HEP-1 (ID de secuencia nº 2): TEKKRRETVEREKE);  
 HP1-5 (ID de secuencia nº 3): TEKKR);  
 HP6-14 (ID de secuencia nº 4): RETVEREKE).

#### Composiciones farmacéuticas:

La composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz del péptido según el ID de secuencia nº 1: GEKKRRETVEREGG y un portador o relleno farmacéuticamente aceptable - las otras.

La composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz del péptido según el ID de secuencia nº 1: GEKKRRETVEREGG, el péptido según el ID de secuencia nº 2: TEKKRRETVEREKE y un portador o relleno farmacéuticamente aceptable - los otros.

La composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz del péptido según la secuencia ID nº 1: GEKKRRETVEREGG, el péptido según el ID de secuencia nº 3: TEKKR, y un portador o relleno farmacéuticamente aceptable - las otras.

La composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz del péptido según la secuencia ID nº 1: GEKKRRETVEREGG, el péptido según el ID de secuencia nº 4: RETVEREKE y un portador o relleno farmacéuticamente aceptable.

Las mezclas específicas, que comprenden los péptidos HP-V2 y HEP-1, HP1-5 y HP6-14, que se utilizaron para la preparación de las composiciones farmacéuticas, se proporcionan en el Ejemplo 6.

El péptido HP-V2 o mezclas del mismo con los péptidos anteriormente indicados en una cantidad de entre 0,01 mg y 1.000 mg se disolvieron en un volumen de 1 a 10 ml de agua estéril. Pueden prepararse formas de administración basadas en la solución preparada y pueden utilizarse por vía oral, anal o vaginal, o por vía intranasal en forma de gotas, o en forma de spray para la inhalación.

El péptido HP-V2 o combinación de péptidos en una cantidad de entre 0,01 mg y 1.000 mg se añadió a una tableta o cápsula, o supositorio, o un gel, o una formulación de pomada, en combinación con rellenos, portadores, conservantes y estabilizadores apropiados habitualmente utilizados por el experto en la tecnología de administración de medicamentos.

El péptido HP-V2 o combinación de péptidos en las composiciones farmacéuticas anteriormente indicadas puede utilizarse para la preparación de formas de administración, que pueden utilizarse por vía oral, anal o vaginal, o que pueden aplicarse localmente. Se administró solución estéril que contenía 0,01 mg a 1.000 mg de péptido HP-V2 o combinación de péptidos disuelta en un volumen de 1 a 10 ml de agua para la inyección o cualquier solución salina fisiológica, en forma de inyección por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.

Ejemplo 2. Separación de los péptidos HEP-1 y HP 1-5 mediante HPLC

Se utilizó la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la separación de los péptidos basándose en los tiempos de retención de los mismos. Se prepararon soluciones madre de los péptidos HEP-1 y HP 1-5 mediante la solubilización de las mismas en agua desionizada a una concentración de entre 1 y 2 mg/ml seguido de la esterilización mediante filtración a través de poros Millipore de 0,2 µm de tamaño de poro. Se preparó la composición, que contenía 80% de péptido HEP-1 y 20% de péptido HP 1-5, mediante la mezcla de las soluciones madre correspondientes en volúmenes apropiados.

Se llevó a cabo una HPLC en una columna Luna C18 (2), de 4,6 x 250 mm de tamaño, rellena con partículas de 5 µm. Se preparó la fase móvil mediante la mezcla programada de las fases A y B, en la que A contenía agua, 5% de acetonitrilo (AC) y 0,1% de TFA, y la B contenía 0,1% de TFA. Se formó un gradiente programado de 5% a 25% de acetonitrilo (ACN) durante 20 minutos. El volumen de la muestra era de 20 µl; el caudal era de 1 ml/min. Los picos se registraron automáticamente mediante absorción de UV de los mismos en diferentes tiempos de retención.

La fig. 1 ilustra el pico de HPLC del péptido HEP-1 con un tiempo de retención típico de entre 9 y 1 minutos. La fig. 2 ilustra la clara separación de dos picos: HEP-1 (TR=9,822 min) y HP1-5 (TR=3,666 min) mediante HPLC.

Ejemplo 3. Separación de los péptidos HEP-1 y HP6-14 mediante HPLC

Se prepararon soluciones madre de los péptidos HEP-1 y HP6-14 y mezclas de los mismos tal como se indica en el Ejemplo 2. Se llevó a cabo el análisis de los péptidos y mezclas de los mismos en una columna Luna C18 (2), de 4,6 x 250 mm de tamaño, rellena con partículas de 5 µm, tal como se indica en el Ejemplo 1.

Bajo las condiciones de HPLC utilizadas, la mezcla de péptidos HEP-1 y HP6-14 se separó claramente en 2 picos (fig. 3), uno de los cuales presentaba un tiempo de retención típico del péptido HP6-14 (TR=9,495 min) y el otro presentaba un tiempo de retención típico del péptido HEP-1 (TR=9,894 min).

Ejemplo 4. Análisis de la mezcla de péptidos de HPE-1 y HP-V2 mediante HPLC

Se prepararon soluciones madre de los péptidos HEP-1 y HP-V2, así como mezclas de los mismos tal como se indica en el Ejemplo 2. Se llevó a cabo el análisis de los péptidos y mezclas en una columna Luna C18 (2), de 4,6 x 250 mm de tamaño, rellena con partículas de 5 µm, tal como se indica en el Ejemplo 2.

Bajo las condiciones de HPLC utilizadas, se eluyó la mezcla de péptidos HEP-1 y HP-V2 de la columna como un pico (fig. 4) con un tiempo de retención que era típico del péptido HEP-1. El análisis de HPLC de la solución de péptido HP-V2 solo ha mostrado (fig. 5) que el tiempo de retención de dicho péptido en efecto era igual al tiempo de retención del péptido HEP-1. Significa que resulta imposible distinguir los péptidos HP-V2 y HEP-1 bajo dichas condiciones de HPLC.

Ejemplo 5. Espectrometría de masas de la mezcla de péptidos HEP-1 y HP-V2.

Se prepararon soluciones madre de los péptidos HEP-1 y HP-V2, así como mezclas de los mismos tal como se indica en el Ejemplo 2. Se reordenaron los espectros de MALDI-TOF en el espectrómetro de masas Bruker Ultraflex TOF/TOF utilizando ácido 2,5-dihidroxibenzoico como matriz.

El espectro de masas de la mezcla de los péptidos HEP-1 y HP-V2 (figura 6) revela claramente ambos péptidos, con sus iones moleculares 1.818,0726 (PM) para HEP-1 y 1.630,9385 (PM) para HP-V2.

Introducción a los Ejemplos 6 a 8.

Los Ejemplos 6 a 8 siguientes demuestran la actividad biológica de todos los péptidos utilizados y mezclas de los mismos. Estos péptidos inducen la producción de interferón y protegen diferentes tipos de células humanas de la muerte causada por la infección por el virus de la encefalomiocarditis citopática a una dosis de 100 DICT50/ml en los cultivos celulares in vitro.

Se estudió el péptido (HP-V2) (secuencia ID nº 1: GEKKRRETVEREGG), que comprende 14 residuos aminoácidos y composiciones de los mismos con el péptido HEP-1 (secuencia ID nº 2: TEKKRRETVEREKE) o con el péptido HP1-5 (secuencia ID nº 3: TEKKR) o con el péptido HP6-14 (secuencia ID nº 4: RETVEREKE) para su capacidad de inducir la respuesta antivírica con la producción de interferón de tipo I en los cultivos de diferentes células. Los presentes inventores utilizaron la metodología convencional de ensayo de la actividad antivírica (inductora de interferón) de los compuestos en el cultivo in vitro, utilizada ampliamente para el cribado de fármacos antivíricos inmunoestimuladores e inductores de interferón.

En dicha metodología in vitro, los presentes inventores pretrataron diferentes tipos de células con los péptidos estudiados y después las células se infectaron con una dosis de 100 DL<sub>50</sub> de virus de la encefalomiocarditis. 24 horas después de la infección se evaluó el efecto citopático del virus con el fin de evaluar la actividad protectora del compuesto sometido a ensayo: si éste último presenta la capacidad de llevar las células a un estado resistente a un virus que es letal para las células.

Como es bien conocido, en la amplia mayoría de casos dicha actividad protectora de los compuestos se predica de la inducción de los interferones (el término «interferón» se refiere al compuesto que es producido por la célula y que evita la replicación del virus). Resultó posible evaluar la actividad antivírica (inductora de interferón) de dichos compuestos mediante la utilización de diferentes concentraciones de dichos péptidos y composiciones de los mismos in vitro.

A menor concentración protectora de 50% de las células frente a la muerte por infección a una dosis de 100 DL<sub>50</sub> de virus de encefalomiocarditis, mayor actividad antivírica (inductora de interferón) del compuesto sometido a ensayo.

Se estudió el péptido (HP-V2) (secuencia ID nº 1: GEKKRRETVEREGG), que comprendía 14 residuos aminoácidos y combinaciones de los mismos con el péptido HEP-1 (secuencia ID nº 2: TEKKRRETVEREKE) o con el péptido HP1-5 (secuencia ID nº 3: TEKKR) o con el péptido HP6-14 (secuencia ID nº 4: RETVEREKE) con respecto a la actividad inmunoestimuladora (antivírica, inductora de interferón).

Ejemplo 6. Estudio de actividad antivírica (inductora de interferón) de los péptidos en el cultivo de la línea celular de hepatoma humano.

Se obtuvo la línea celular de hepatoma humano PLC/PRF/5 (Alexander) del Instituto de Investigación en Virología Ivanovski (Moscú). Se preparó medio completo para el cultivo celular a base de medio MEM Eagle complementado con suero de feto bovino (SFB) al 10%, L- glutamina (300 µg/ml) y penicilina (100 U/ml).

Se sometieron a ensayo los péptidos siguientes:

HEP-1 (secuencia ID nº 2): TEKKRRETVEREKE);  
 HP1-5 (secuencia ID nº 3): TEKKR);  
 HP6-14 (secuencia ID nº 4): RETVEREKE);  
 HP-V2 (secuencia ID nº 1): GEKKRRETVEREGG).

Mezclas de péptidos:

MXHP1-5+HEP-1 - mezcla de 90% de péptido HEP-1 (secuencia ID nº 2: TEKKRRETVEREKE) y 10% de péptido HP1-5 (secuencia ID nº 3: TEKKR); MXHP6-14+ HEP-1 - mezcla de 90% de péptido HEP-1 (secuencia ID nº 2: TEKKRRETVEREKE) y 10% de péptido HP6-14 (secuencia ID nº 4: RETVEREKE); MXHP-V2+HP1-5 - mezcla de 90% de péptido HP-V2 (secuencia ID nº 1: GEKKRRETVEREGG) y 10% de péptido HP1-5 (secuencia ID nº 3: TEKKR); MXHP-V2+HP6-14 - mezcla de 90% de péptido HP-V2 (secuencia ID nº 1: GEKKRRETVEREGG) y 10% de péptido HP6-14 (secuencia ID nº 4: RETVEREKE). MXHP-V2+HEP-1 - mezcla de 95% de péptido HP-V2 (secuencia ID nº 1: GEKKRRETVEREGG) y 5% de péptido HEP-1 (secuencia ID nº 2: TEKKRRETVEREKE).

Los péptidos se disolvieron en agua destilada y después se esterizaron pasándolos por filtros de 0,2 µm de tamaño de poro con el fin de obtener las soluciones madre de 1-2 mg/ml. El día 0, las células se sembraron en los pocillos de una placa de 96 pocillos en medio de cultivo completo a una densidad celular de 200.000 células en 1 ml. El día 1, se prepararon diluciones en serie de cada muestra sometida a ensayo (24 diluciones en serie en incrementos de 2) en tripletes en los pocillos de la placa de 96 pocillos. El día 3, todos los cultivos fueron infectados por una dosis de 100 DICT<sub>50</sub>/ml de la cepa de virus de la encefalomiocarditis «Columbia SK-Col-SK». Finalmente, el día 4, se evaluó el efecto citopático del virus mediante la utilización de un microscopio invertido Leitz en presencia de diferentes concentraciones del péptido sometido a ensayo o en los cultivos sin péptido (control).

Se evaluó el efecto antivírico del producto medicamento a partir de la concentración mínima del mismo que protegía el 50% de las células frente a la muerte causada por el virus de la encefalomiocarditis a una dosis de 100 DICT<sub>50</sub>/ml. Se calculó el título de interferón (U/ml) como un valor inverso a la dilución máxima del producto medicamento, que protegía al 50% de las células frente a la muerte causada por el virus de la encefalomiocarditis a una dosis de 100 DICT<sub>50</sub>/ml.

Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 1. Resulta evidente que la totalidad de los péptidos sometidos a ensayo y combinaciones de los mismos evita la replicación del virus de la encefalomiocarditis en células de hepatoma humano. Los péptidos protegieron las células de hepatoma frente al efecto citopático del virus mediante la inducción de la producción de interferón. La eficacia de los péptidos y composiciones de los mismos era diferente. El

nivel más elevado de actividad antivírica (inductora de interferón) se registró con el péptido HP-V2 y su composición con el péptido HP1-5.

5

Tabla 1. Actividad antivírica (inductora de interferón) de los péptidos en el cultivo de la línea celular de hepatoma humano PLC/PRF/5 (Alexander).

Compuesto	Concentración máxima sometida a ensayo (µg/ml)	Eficacia antivírica (µg/ml) †	Título de interferón inducido (U/ml) ‡
HEP-1	100	3,0	320
HP1-5	100	1,6	640
HP6-14	100	0,78	1280
MXHP1-5+HEP-1	200	62,5	16
MXHP6-14+ HEP-1	200	62,5	16
MXHP-V2+HP1-5	100	0,1	10240
MXHP-V2+HP6-14	100	3,0	320
MXHP-V2+HEP1	100	0,78	1280
HP-V2	100	0,78	1280

Notas: † Se muestra la eficacia antivírica como la concentración de compuesto mínima que protege a 50% de las células frente a la muerte como resultado de la infección con 100 DL<sub>50</sub> de virus de la encefalomiocarditis.  
‡ Se calculó el título de interferón inducido como un valor inverso de la dilución máxima del compuesto que protegía frente a 50% de las células de la muerte como resultado de la infección con 100 DL<sub>50</sub> de virus de la encefalomiocarditis.

Ejemplo 7. Estudio de actividad antivírica (inductora de interferón) de los péptidos en el cultivo de la línea celular de carcinoma cervical humano.

10

Se obtuvo la línea celular de carcinoma cervical humana HELA del Instituto de Investigación en Virología Ivanovski (Moscú). El medio completo para el cultivo de las células, péptidos y composiciones de los mismos, así como el método de evaluación de su actividad antivírica (inductora de interferón) eran iguales a los indicados en el Ejemplo 5.

15

Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 2. Resulta evidente que la totalidad de los péptidos sometidos a ensayo y las composiciones evitan el desarrollo de la infección por virus de la encefalomiocarditis en las células de carcinoma cervical humano. Los péptidos han protegido a las células de carcinoma cervical frente al efecto citopático del virus mediante la inducción de la producción de interferón. Los péptidos y composiciones de los mismos presentan una actividad diferente. Se detectó una actividad antivírica (inductora de interferón) máxima al utilizar el péptido HP1-5 (secuencia ID nº 3: TEKKR) y el péptido HP 6-14 (secuencia ID nº 4: RETVEREKE), así como combinaciones de los mismos con péptido HP-V2.

20

25

Tabla 2. Actividad antivírica (inductora de interferón) de los péptidos en el cultivo de la línea celular de carcinoma cervical humano HELA.

Compuesto	Concentración máxima sometida a ensayo (µg/ml)	Eficacia antivírica (µg/ml) †	Título de interferón inducido (U/ml) ‡
HEP-1	1000	3,9	256
HP1-5	1000	0,49	2048
HP6-14	1000	0,49	2048
MXHP1-5+HEP-1	2000	7,8	256
MXHP6-14+ HEP-1	2000	1,95	1024
MXHP-V2+HP1-5	1000	0,97	1024
MXHP-V2+HP6-14	1000	0,49	2048
HP-V2,	1000	7,8	128

Notas: † Se muestra la eficacia antivírica como la concentración de compuesto mínima que protege a 50% de las células de la muerte como resultado de la infección por 100 DL<sub>50</sub> de virus de la encefalomiocarditis.  
‡ El título de interferón inducido se calculó como valor, inverso de la dilución máxima del compuesto, que protegía a 50% de las células de la muerte como resultado de la infección por 100 DL<sub>50</sub> de virus de la encefalomiocarditis.

Ejemplo 8. Estudio de actividad antivírica (inductora de interferón) de los péptidos en el cultivo de la línea celular epitelial humana Girardi Heart.

5 El cultivo de la línea celular epitelial Girardi Heart se obtuvo del Instituto de Investigación en Virología Ivanovski (Moscú). El medio completo para el cultivo de las células, péptidos y composiciones de los mismos, así como el método de evaluación de su actividad antivírica (inductora de interferón) eran iguales a los indicados en el Ejemplo 5.

10 Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3. Resulta evidente a partir de los datos presentados que todos los péptidos sometidos a ensayo y las composiciones evitan el desarrollo de infección por virus de la encefalomiocarditis en las células de la línea celular epitelial humana Girardi Heart. Los péptidos sometidos a ensayo y composiciones de los mismos resultaron altamente eficaces en la inducción de la producción de interferones y en la protección de la línea celular epitelial Girardi Heart frente al efecto citopático del virus. Se detectó una actividad antivírica (inductora de interferón) máxima al utilizar las combinaciones de péptido HEP-1 (secuencia ID nº 2: TEKKRRETVEREKE) con péptido HP1-5 (secuencia ID nº 3: TEKKR) y péptido HP6-14 (secuencia ID nº 4: RETVEREKE), así como la combinación de péptido HP-V2 (secuencia ID nº 1: GEKKRRETVEREGG) con péptido HP1-5 (secuencia ID nº 3: TEKKR) y con péptido HEP1 (secuencia ID nº 2: TEKKRRETVEREKE).

20 Tabla 3. Actividad antivírica (inductora de interferón) de los péptidos en el cultivo de la línea celular epitelial Girardi Heart.

Compuesto	Concentración máxima sometida a ensayo (µg/ml)	Eficacia antivírica (µg/ml) †	Título de interferón inducido (U/ml) ‡
HEP-1	1000	0,0015	655 360
HP1-5	1000	0,0015	655 360
HP6-14	1000	0,006	163 840
MXHP1-5+HEP-1	2000	0,0005	4 194 304
MXHP6-14+HEP-1	2000	0,0005	4 194 304
MXHP-V2+HP1-5	1000	0,0002	5 242 880
MXHP-V2+HP6-14	1000	0,006	163 840
MXHP-V2+HEP1	1000	0,0008	1 310 720
HP-V2	1000	0,0015	655 360

Notas: † Se muestra la eficacia antivírica como la concentración de compuesto mínima que protege a 50% de las células de la muerte como resultado de la infección con 100 DL<sub>50</sub> de virus de la encefalomiocarditis.  
‡ Se calculó el título de interferón inducido como un valor inverso de la dilución máxima del compuesto que protegía frente a 50% de las células de la muerte como resultado de la infección con 100 DL<sub>50</sub> de virus de la encefalomiocarditis..

25 Tal como demuestran los ejemplos y descripción de ensayos biológicos y tablas proporcionados, el nuevo péptido HP-V2 propuesto presenta una elevada actividad inmunoestimuladora que es igual (Tabla 3) o que es 4 veces superior (Tabla 1) que la actividad conocida de péptido HEP-1. Además, las composiciones farmacéuticas con la actividad inmunoestimuladora máxima y con un amplio abanico de acciones (Tablas 1 a 3), que son varias veces superiores a las conocidas del péptido HEP-1 y composiciones del mismo, se obtuvieron basándose en el péptido HP-V2 reivindicado y los péptidos ezrina conocidos.

30 Ejemplo 9. Estudio que muestra la influencia del péptido sobre el mecanismo molecular en la reparación de los tejidos y la proliferación celular

35 El estudio siguiente proporciona evidencia de que el péptido de la invención (HP-V2) participa en el mecanismo molecular de reparación de los tejidos y de proliferación celular. Es conocido que los compuestos que influyen sobre el mecanismo molecular de proliferación celular, por ejemplo la regulación de la expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ, por sus siglas en inglés) se asocia a la reparación del tracto digestivo (Monteleone et al., "Mongersen, an Oral SMAD7 Antisense Oligonucleotide, and Crohn's Disease", New England Journal of Medicine 372:1104-1113). Además, Akita et al., "Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing", Adv. Wound Care 2(2):44-49, 2013 comenta el beneficio y el papel del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, por sus siglas en inglés) en la curación sin cicatriz de heridas en la aplicación clínica y el mecanismo básico. El factor bFGF es una glucoproteína que es ampliamente utilizado en el tratamiento de las heridas y úlceras. El factor bFGF es

fácilmente aplicable a cualquier tipo de herida y conduce a un mejor resultado de color, textura y firmeza. Chen et al., "NGF Accelerates Cutaneous Wound Healing by Promoting the Migration of Dermal Fibroblasts via the PI3K/Akt-Rac1-JNK and ERK Pathways", BioMed Research International, Volume 2014, Article ID 547187) demostraron que el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) aceleraba significativamente la cicatrización de heridas por escisión en la piel en ratas y la migración de los fibroblastos inducida por el NGF podría contribuir a este proceso de cicatrización. Dicha referencia demostró además que la activación de PI3K/Akt, Rac1, JNK y ERK participaban todas en la regulación de la migración fibroblástica inducida por NGF. Además, Raffetto et al., "Mitogen-activated protein kinase pathway regulates cell proliferation in venous ulcer fibroblasts", Vasc. Endovascular Surg., 2006, 40(1):59-66 mostraron que la ruta de MAPK ERK resulta importante para la proliferación celular en fibroblastos de úlceras venosas.

Por lo tanto, los péptidos de la invención resultan útiles en la prevención y tratamiento de la inflamación y ulceración del tracto digestivo inferior.

Se demuestra que el péptido GEKKRRETVEREGG (SEC ID nº 1) induce la activación de los fibroblastos, que son el tipo celular principal responsable de la regeneración de los tejidos, así como la cicatrización de heridas y úlceras. El presente ejemplo demuestra la influencia activadora directa del péptido GEKKRRETVEREGG (SEC ID nº 1) sobre los fibroblastos de ratón, revelando una firma de activación rápida dentro de las células sobre el nivel de la ruta de señalización MAPK-ERK.

Se obtuvo el péptido GEKKRRETVEREGG (SEC ID nº 1) tal como se indica en el Ejemplo 1; se obtuvieron fibroblastos de ratones BALB/c de la American Type Culture Collection y se propagaron en medio completo que consistía en DMEM rico en glucosa complementado con suero de feto bovino al 10%, piruvato sódico 1 mM 1:50, aminoácidos no esenciales MEM, L-glutamina 2 mM, gentamicina 10 µg/ml y β-mercaptoetanol 50 µM. Las células se cultivaron en placas de cultivo de 10 cm con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Se realizaron pases celulares a una confluencia de 50% a 60%. Para el desprendimiento de las células se utilizó tripsina al 0,05%/EDTA con la consiguiente centrifugación (470x g, 15 min) a un volumen de 10 veces de medio de lavado que contenía FCS al 10% para inhibir la tripsina. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se suspendió en 10 ml de medio de cultivo completo; después se realizó un recuento del número de células utilizando un hemocitómetro antes de utilizar las células para los experimentos.

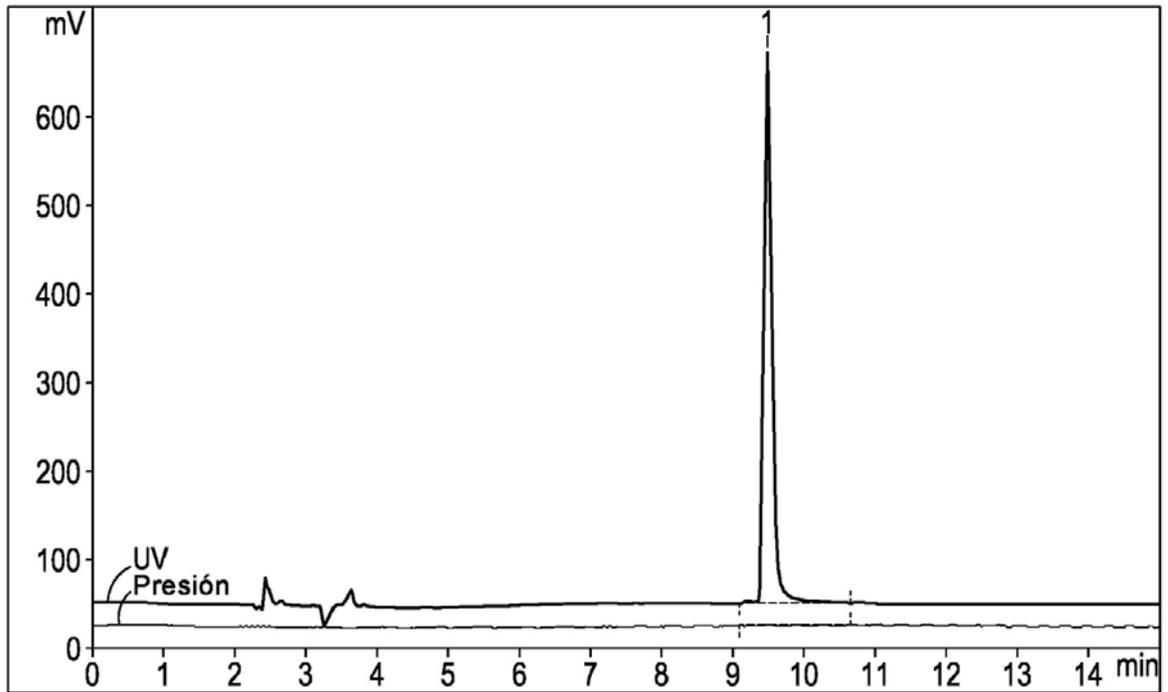
Se cultivaron fibroblastos en placas de cultivo de 8 pocillos; la solución de péptidos o citoquinas TGF-β1 (control positivo) examinada o un volumen equivalente de medio de cultivo (control negativo), se añadió a los cultivos por triplicado respectivos. Las células se incubaron en presencia del péptido GEKKRRETVEREGG SEC ID nº 1 (10 µg/ml) o TGF-β1, o sin ningún compuesto efector durante 1 o 6 horas con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. En los puntos temporales indicados, las células se recolectaron, se lavaron dos veces con PBS y se lisaron utilizando el tampón de extracción celular en presencia de inhibidores de proteasa durante 30 min a 4°C. Los extractos se clarificaron mediante centrifugación (14.000xg, 10 min, 4°C). Se midió la concentración de proteínas utilizando un reactivo de ensayo de proteínas (Pierce, 23225). A continuación, se fraccionaron diluciones apropiadas de los extractos (10 µg de proteína por carril) en SDS-PAGE al 8% y después se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham) para la transferencia inmunológica. Se detectaron las proteínas diana utilizando anticuerpos específicos para fosfo-p44/42 MAPK (Cell Signaling, 4370) y GAPDH (Abcam ab8245). Se visualizaron las bandas de proteínas y después se midieron sus intensidades utilizando software ImageJ. Los datos se expresaron como un valor (píxels por banda) de ERK1, ERK2 o fosfo-ERK1 y fosfo-ERK2 normalizado respecto al valor de las bandas de GAPDH respectivas. Se calcularon los valores medios ± SD utilizando los datos de tandas independientes.

Los resultados del experimento de los presentes inventores demostraron que el péptido GEKKRRETVEREGG (SEC ID nº 1) y TGF-β1 de control positivo indujeron una rápida activación de la ruta de señalización MAPK/ERK en los fibroblastos. En 1 hora tras la inoculación de dichos compuestos efectores, se incrementó la concentración de ERK1 (44 kD) y ERK2 (42 kD) fosforilados en un factor aproximado de 3 a 5. De esta manera, 1 hora después de la activación de los fibroblastos con el péptido GEKKRRETVEREGG (SEC ID nº 1) (10 µg/ml) o TGF-β1 (5 ng/ml), los valores normalizados de fosfo-ERK1 eran: 0,4±0,02 (p< 0,01) y 0,5±0,02 (p< 0,01), respectivamente, en comparación con 0,1±0,002 en el control negativo y los valores de fosfo-ERK2 eran de: 1,3±0,05 (p< 0,01) y 1,9±0,1 (p< 0,01) en comparación con 0,4±0,01 en el control negativo. Posteriormente, 6 horas después de la activación, los valores de fosfo-ERK1 en fibroblastos activados con el péptido GEKKRRETVEREGG (SEC ID nº 1) o TGF-β1 eran de 0,1±0,006 (p> 0,1) y 0,3 ±0,02 (p< 0,05), respectivamente, mientras que eran de 0,1±0,01 en los cultivos de control negativo. Los valores de fosfo-ERK2 en el punto temporal de las 6 horas eran de 0,1 ± 0,01 (p>0,1), 0,35±0,02 (p<0,01) y 0,1±0,007 en los cultivos con péptido, TGF-β1 y no activado, respectivamente.

El estudio anterior demuestra que la actividad de HP-V2 es similar a la actividad de TGF-β (el control positivo) y, de esta manera, el potencial de utilización en la prevención y el tratamiento de la inflamación y ulceración del tracto digestivo inferior.

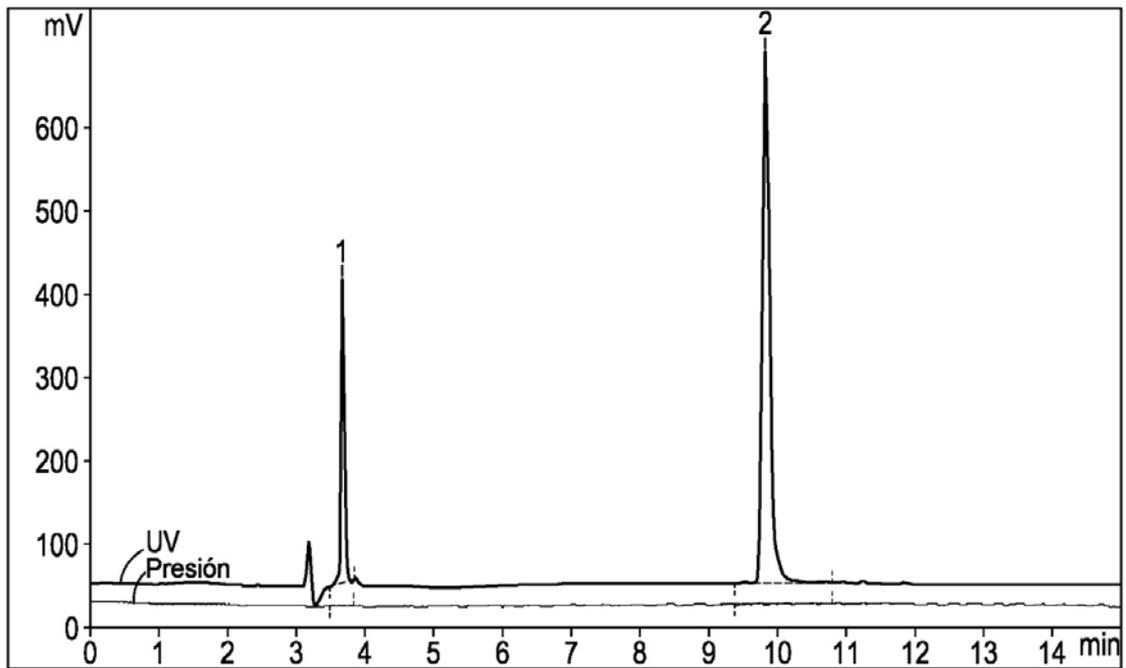
## REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula general (I)  
5  $X_1EKKRRETVEREX_2X_3$  (SEC ID nº 5),  
en la que cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  representa un residuo aminoácido no polar y en la que la secuencia de aminoácido presenta una longitud de 14 a 25 residuos.
2. Péptido según la reivindicación 1, en el que el aminoácido no polar se selecciona independientemente de  
10 entre el grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, metionina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y/o combinaciones de los mismos.
3. Péptido según la reivindicación 1 o 2, en el que  $X_1$ ,  $X_2$  y/o  $X_3$  es glicina.
4. Péptido según la reivindicación 3, en el que la secuencia de aminoácidos es GEKKRRETVEREGG (SEC ID  
15 nº 1).
5. Composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador o relleno farmacéuticamente aceptable.
- 20 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, que comprende además una cantidad eficaz del péptido según la SEC ID nº 2 (TEKKRRETVEREKE).
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, que comprende además una cantidad eficaz del péptido según la SEC ID nº 3 (TEKKR).
- 25 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, que comprende además una cantidad eficaz del péptido según la SEC ID nº 4 (RETVEREKE).
9. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o composición farmacéutica según cualquiera de las  
30 reivindicaciones 5 a 8 para la utilización en la estimulación de una respuesta inmunológica en un sujeto.
10. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o composición farmacéutica según cualquiera de las  
reivindicaciones 5 a 8 para la utilización en el tratamiento o la prevención de una infección vírica, bacteriana  
35 o fúngica.
11. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o composición farmacéutica según cualquiera de las  
reivindicaciones 5 a 8 para la utilización en el tratamiento o la prevención de la ulceración de las  
membranas mucosas del tracto digestivo.
- 40 12. Péptido o composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 11, en el que la ulceración de la membrana mucosa del tracto digestivo es una úlcera de estómago, úlcera del intestino grueso, úlcera duodenal o una úlcera del intestino delgado.
- 45 13. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para la utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad intestinal inflamatoria o una enfermedad o trastorno asociado a la enfermedad intestinal inflamatoria.
- 50 14. Péptido o composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 13, en el que la enfermedad o el trastorno asociado a la enfermedad intestinal inflamatoria se selecciona de entre el grupo que consiste en síndrome intestinal irritable (SII), colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.



Pico nº	Tiempo de retención (s)	Área, mV*s	Área, %	Identificación del pico
1	569,4	4966.50	100.00	HEP-1
1	900	4966.50	100.00	

Fig. 1



Pico nº	Tiempo de retención (min)	Altura mV	Área mV*s	Conc., mg/ml	Conc., %	Identificación del pico
1	3,666	344,77	1269,78	0,4545	18,98	HP 1-5
2	9,822	637,76	5112,29	1,94	81,02	HEP-1
2	15	982,52	6382,07	2,395	100,00	

Fig. 2

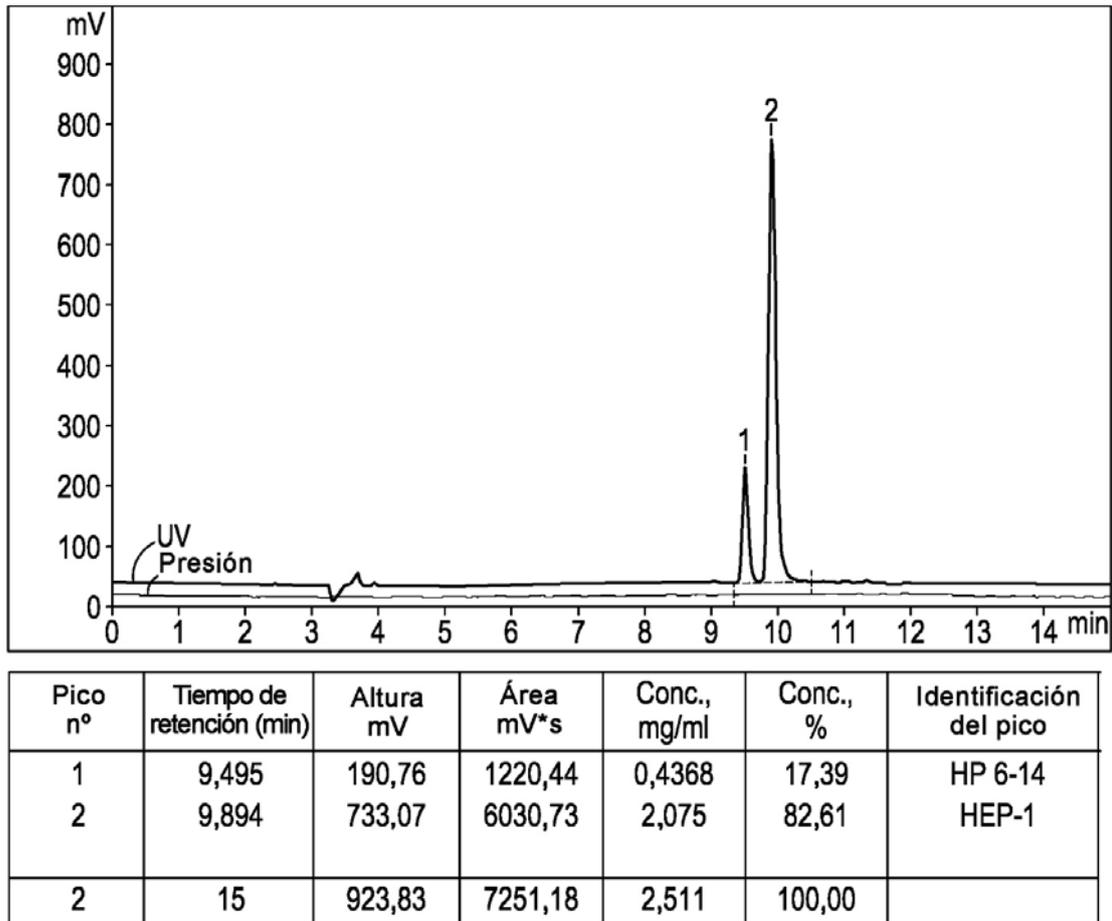
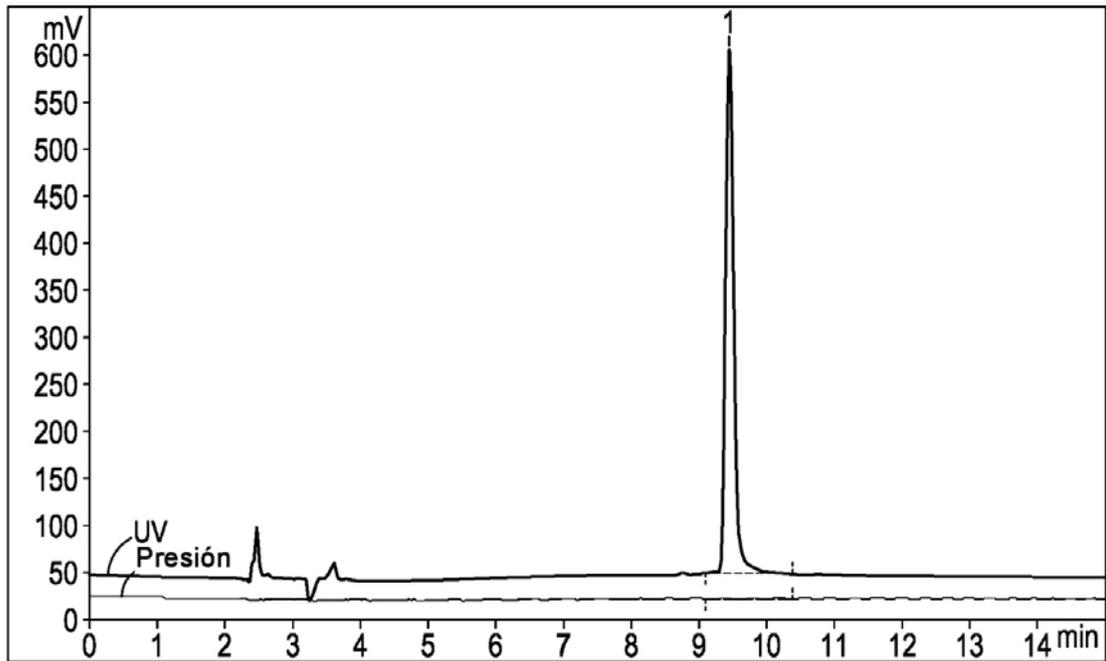
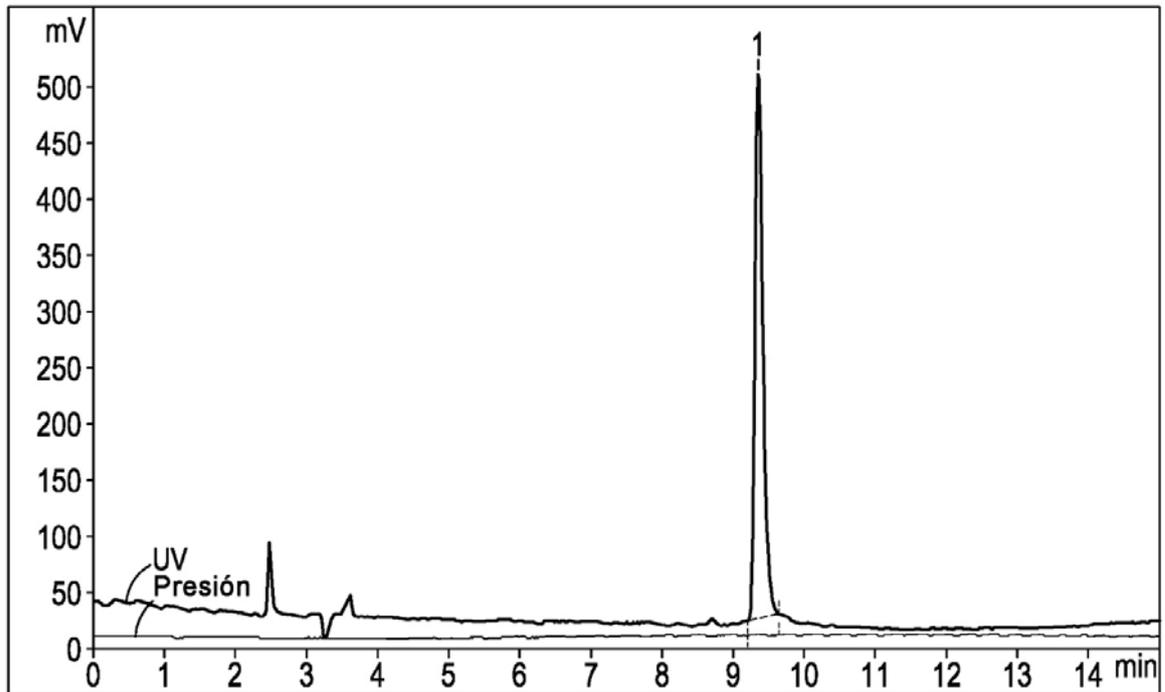


Fig. 3



Pico n°	Tiempo de retención	Altura mV	Área mV*s	Conc., mg/ml	Conc., %	Identificación del pico
1	9,444	555,66	4727,02	1,753	100,00	Posición de HEP-1
1	15	555,66	4727,02	1,753	100,00	

Fig. 4



Pico nº	Tiempo de retención (s)	Área mV*s	Área, %	Identificación del pico
1	561,1	3750,42	100,00	HP-V2
1	900	3750,42	100,00	

Fig. 5

TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC [BP=1818.1,4574]

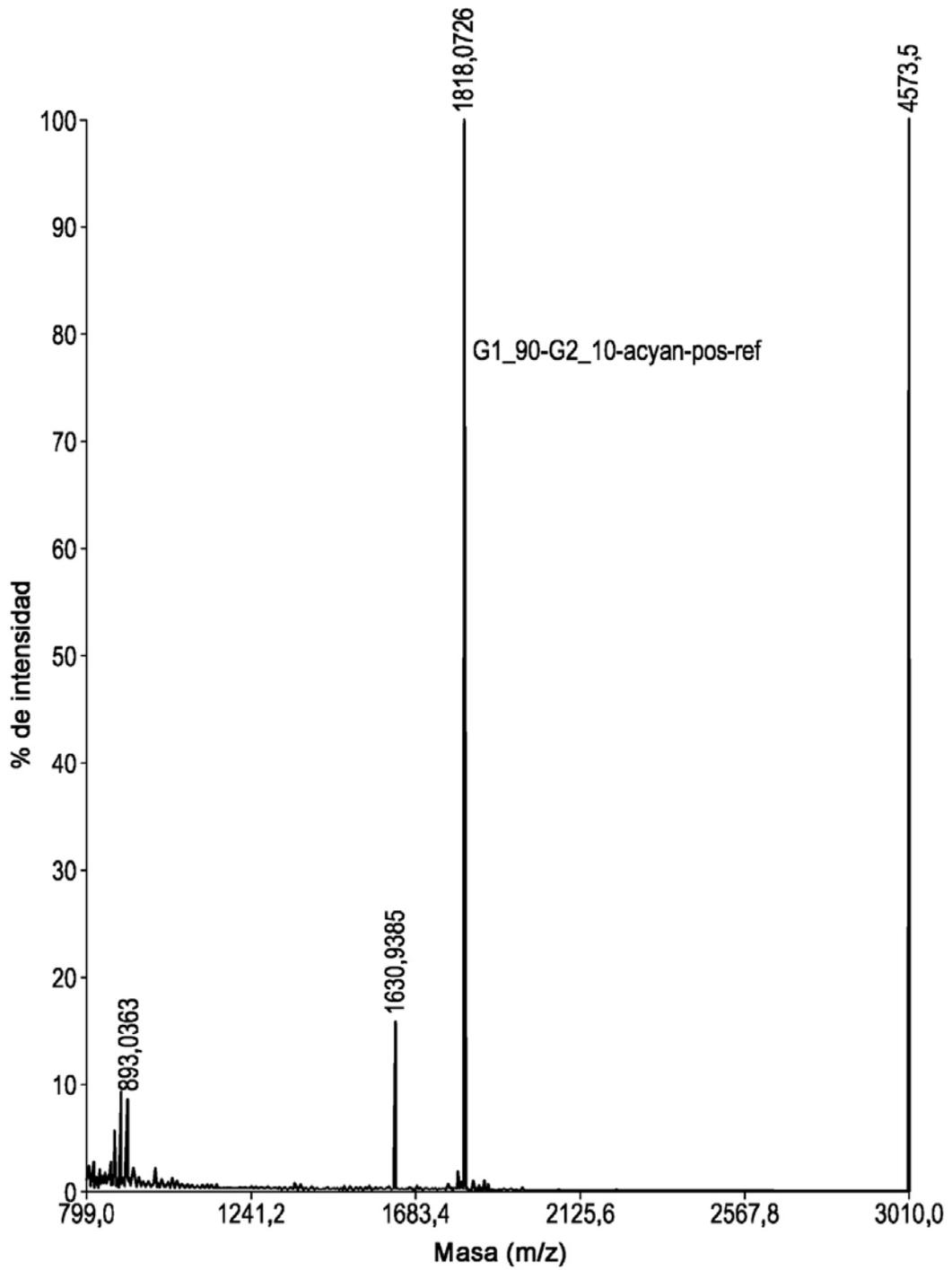


Fig. 6