

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 676**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 16172509 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3115370**

54 Título: **Péptidos biológicamente activos**

30 Prioridad:

17.04.2008 US 9326 P

10.11.2008 US 113055 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2020

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)

Zählerweg 4

6300 Zug, CH y

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHEIFLINGER, FRIEDRICH y

DOCKAL, MICHAEL

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 739 676 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 biológicamente activos

5 La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/009.326, presentada el 17 de abril de 2008 y solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/113.055 presentada el 10 de noviembre de 2008.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a péptidos de bajo peso molecular con actividad procoagulante para el tratamiento de pacientes con una deficiencia en FV, FVII, FVIII, Fx y/o FXI.

Antecedentes de la invención

15 La cascada de coagulación sanguínea implica una serie de enzimas serina proteasa (zimógenos) y cofactores proteicos. Cuando sea necesario, un precursor de zimógeno inactivo se convierte en la forma activa, que posteriormente convierte la siguiente enzima en la cascada. Se divide en tres segmentos distintos: las rutas intrínsecas (activación por contacto), extrínseca (factor tisular) y común.

20 En la ruta intrínseca de la cascada, la hemofilia es el trastorno hemorrágico más pronunciado, que da como resultado generación insuficiente de factor Xa por complejo de factor FIX (FIXa)/ factor VIIIa (FVIIIa) (el complejo de tenasa intrínseca) que conduce a una formación de coágulos insuficiente. Puede producirse entonces hemorragia espontáneamente o después de lesión.

25 La hemofilia es un trastorno hemorrágico heredado y se conocen dos formas de hemofilia, hemofilia A y B. La hemofilia A es la consecuencia de una deficiencia de FVIII y se caracteriza por hemorragia en las articulaciones y músculos. FVIII circula en plasma a una concentración muy baja y se une de forma no covalente con factor de von Willebrand (vWF). Durante la hemostasia, FVIII se activa por trombina, se separa del vWF y actúa como un cofactor para activación de FX mediada por FIXa activado potenciando la tasa de activación.

30 Se considera que los pacientes con menos de 1 % de FVIII normal tienen hemofilia grave, con 1-5%, hemofilia moderadamente grave y con más de 5 % pero menos de 40 %, hemofilia leve.

35 En la actualidad el tratamiento preferido para el tratamiento de la hemofilia A es terapia de reemplazo con diversos concentrados de FVIII recombinantes o derivados de plasma. Aunque están disponibles etapas de inactivación viral específicas, incluyendo tratamiento con disolvente-detergente o tratamiento por calor en fase líquida, para inactivar virus, la posible transmisión de agentes escasamente caracterizados (por ejemplo, priones) en concentrados derivados de plasma aún es un problema analizado en la técnica.

40 FVIII también se sintetiza como una proteína recombinante para uso terapéutico en trastornos hemorrágicos. Dichos productos han reducido el riesgo de contaminación viral. Hay muchos productos recombinantes en el mercado para el tratamiento de hemofilia A. Uno de estos concentrados es la composición de FVIII Advate®, que se produce en células de CHO y se fabrica por Baxter Healthcare Corporation. No se añade ninguna proteína de plasma humano o animal en el proceso de cultivo celular, purificación o formulación final de este producto.

45 Aunque se han realizado progresos en la producción de FVIII para asegurar la pureza, eficacia y seguridad vírica durante las últimas décadas, aún sigue habiendo limitaciones. En primer lugar, los pacientes con hemofilia A grave se ven afectados frecuentemente por formación de anticuerpos inhibidores anti FVIII, haciendo la terapia ineficaz.

50 Aproximadamente el 30 % de los pacientes con HA grave desarrollan inhibidores de aloanticuerpos que pueden neutralizar FVIII (Hay, Haemophilia 2006; 12 Supl 6: 23-9; Peerlinck y Hermans, Haemophilia 2006; 12: 579-90). Estos inhibidores son típicamente inmunoglobulina G (IgG), predominantemente de la subclase IgG4, que no fijan el complemento y no dan como resultado el daño de órganos finales observado con complejos inmunitarios en circulación. Los inhibidores aparecen a una edad joven (aproximadamente el 50 % a los 10 años), principalmente en pacientes con menos de un 1 % de FVIII. Además, puede aparecer hemofilia adquirida, que es el desarrollo de inhibidores de anticuerpos de FVIII en personas sin historial de deficiencia de FVIII. Esta afección puede ser idiopática (aparece en personas de > 50 años), puede estar asociada con enfermedad vascular de colágeno o el periodo de parto, o puede representar una reacción farmacológica (por ejemplo, a la penicilina). Para fines clínicos, la magnitud de la respuesta de anticuerpo puede cuantificarse mediante la realización de un ensayo inhibidor funcional del que puede obtenerse el título de inhibidor de unidad de Bethesda (UB). La definición de la Sociedad Internacional de la Trombosis y Hemostasia (ISTH) de una respuesta a alto título es > 5 UB y su definición de una respuesta de bajo título es de entre 0,5 y 5 UB.

65 Se han realizado intentos de superar los inhibidores con grandes dosis de FVIII humano. También se ha administrado FVIII porcino, que tiene baja reactividad cruzada con anticuerpo de FVIII humano. Más frecuentemente,

también se han usado agentes de evitación de FVIII, incluyendo concentrados de complejo de protrombina activada (por ejemplo, FEIBA (agente de evitación de inhibidor de factor ocho) y factor activado recombinante FVII (FVIIa).

Debido a que los fármacos polipeptídicos terapéuticos tales como FVIII también se degradan rápidamente por enzimas proteolíticas además de la desventaja del desarrollo de inhibidor, es necesario administrar frecuentemente por vía intravenosa FVIII. Teniendo en cuenta las semividas promedio de los diversos productos de FVIII en la circulación, esto puede conseguirse habitualmente proporcionando FVIII de dos a tres veces por semana. Por lo tanto este tratamiento es más bien complicado para una población de pacientes externos, especialmente en niños pequeños.

Por lo tanto actualmente el objetivo de muchos fabricantes de FVIII es desarrollar un producto de nueva generación con propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas potenciadas, manteniendo al mismo tiempo todas las otras características del producto. Debido a que fármacos polipeptídicos mejorados con una semivida en circulación más larga reducirían el número de administraciones necesarias, la modificación química o enzimática de los fármacos polipeptídicos es uno de los enfoques preferidos para conseguir este objetivo.

Uno de dichos ejemplos es pegilación de fármacos polipeptídicos que protegen y mejoran sus perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos (Harris y Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003; 2: 214-21). El documento US 6.037.452 describe un conjugado de poli(alquilenóxido)-FVIII o FIX, en el que la proteína está unida covalentemente con un poli(alquilenóxido) mediante grupos carbonilo de dicho FVIII.

Incluso si estos procedimientos reducen el desarrollo de inhibidor aún no anularían la necesidad de administración intravenosa. La opción más elegante, que hace obsoletas la mayoría de las desventajas del tratamiento de hemofilia analizado anteriormente sería el desarrollo de un compuesto de bajo peso molecular tal como un péptido (peptidomimético) con la capacidad de mejorar la coagulación y que puede administrarse mediante una vía no intravenosa. Aunque ya se ha analizado durante muchos años (por ejemplo Kaufman y Pipe, Haemophilia 1998; 4, 370-9; Llung, Thromb Haemost. 1999; 82: 525-30) no está disponible o en desarrollo clínico en la actualidad ningún agente tal.

El estado actual de la técnica para el uso de péptidos pequeños en coagulación sanguínea está documentado por ejemplo en las siguientes publicaciones:

DK Liles, DM Monroe y HR Roberts (1997) Blood Vol 90 n.º 10 Suplemento 1, 463a es un resumen de póster que desvela un péptido 698-712 de FVIII que puede promover la activación mediada por FIXa de FX en una superficie fosfolipídica. Sin embargo, en presencia de FVIIIa, el péptido inhibe la activación mediada por FIXa de FX en una superficie fosfolipídica. Hasta la fecha, no ha habido ninguna publicación con revisión por pares de estos autores que confirme resultados desvelados en este resumen de póster.

Blostein y col. (2000) Biochemistry 39: 12000-12006 desvela que las hélices alfa anfipáticas pueden interactuar con dominios Gla de FIXa y aumenta la activación de FX en ausencia de fosfolípido. Los péptidos parecen actuar independientemente de la secuencia de aminoácidos imitando fosfolípidos. No hay ninguna sugerencia de uso de dichos péptidos en terapia. En condiciones normales, las plaquetas activadas proporcionan la superficie lipídica [0] que apoya la coagulación. Ya que las plaquetas se activan por trombina, que se forma en sitios de lesión vascular, los procesos de coagulación se restringen a los sitios de lesiones. Es altamente indeseable proporcionar al cuerpo péptidos que sean sustitutos generales de lípidos procoagulantes ya que esto provocaría coagulación sistémica y en última instancia conduciría a coagulación intravascular diseminada (DIC). Por lo tanto, los péptidos descritos por Blostein no serían útiles en terapia.

Las patentes de Estados Unidos n.º 7.109.170 y 6.624.289 desvelan regiones del dominio de proteasa FIXa que interactúan con FVIIIa. Los péptidos comprenden el sitio de unión a FVIIIa de FIXa e inhiben la unión de FIXa con FVIIIa. Sin embargo, solamente son útiles como anticoagulantes para prevenir o tratar la trombosis.

El documento US20010014456A1 desvela moléculas de unión para FVIII y proteínas de tipo FVIII humanos. Estos polipéptidos se unen con FVIII y/o polipéptidos de tipo FVIII y son útiles para la detección y purificación de FVIII y/o polipéptidos tipo FVIII humanos de soluciones tales como sangre o medio acondicionado.

En la patente de Estados Unidos n.º 7.033.590 se usan anticuerpos y derivados de anticuerpos activadores de FIX/FIXa para aumentar la actividad amidolítica de FIXa, y para tratar trastornos de coagulación sanguínea tales como hemofilia A y diátesis hemorrágica.

En la patente de Estados Unidos n.º 7.084.109 se desvelan antagonistas de FVIIa. Estos antagonistas son péptidos que inhiben la actividad de FVIIa y se dice que son útiles para la prevención de trombosis arterial en combinación con terapia trombolítica.

El documento US 2005/0124544 A1 describe señuelos peptídicos o pseudopeptídicos que se unen con anticuerpos para la preparación de medicamentos destinados para la prevención o el tratamiento de las patologías autoinmunitarias, o para la prevención o el tratamiento de los trastornos asociados con la aparición de anticuerpos

dirigidos contra proteínas exógenas.

UniProt entry Q22C06 describe una supuesta proteína transmembrana.

5 La enumeración o el análisis de un documento previamente publicado en la presente memoria descriptiva no debería interpretarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o el conocimiento general común.

10 Sigue existiendo una gran necesidad en la técnica de un péptido de bajo peso molecular con actividad procoagulante para el tratamiento de pacientes con hemofilia A (deficiencia en FVIII). La presente invención proporciona nuevos péptidos de bajo peso molecular con actividad procoagulante que pueden usarse para el tratamiento no intravenoso de hemofilia A. La presente invención también proporciona estos péptidos nuevos para el tratamiento de una deficiencia en FV, FVII, FX y/o FXI.

15 **Sumario de la invención**

Un primer aspecto de la divulgación proporciona un péptido o derivado peptídico que comprende:

- 20 (i) WDLYFEIVW (SEQ ID NO: 1); o
- (ii) una secuencia de aminoácidos variante que comprende una, dos, tres o cuatro sustituciones de L- aminoácidos en WDLYFEIVW (SEQ ID NO: 1); o
- 25 (iii) la variante retroinversa del péptido o derivado peptídico de una de las partes (i) y (ii),
en el que dicho péptido o derivado peptídico tiene actividad procoagulante.

Para evitar la duda, las secuencia WDLYFEIVW (SEQ ID NO: 1) puede representarse como los L-aminoácidos Trp-Asp-Leu-Tyr-Phe-Glu-Ile-Val-Trp usando el código de tres letras para aminoácidos. La variante retroinversa de WDLYFEIVW (SEQ ID NO: 1) es wwiefyldw y comprende D-aminoácidos.

Un primer aspecto de la invención proporciona un péptido o derivado peptídico que comprende:

- 35 (i) una secuencia de aminoácidos que comprende imfwydcye; o
- (ii) una secuencia de aminoácidos variante que comprende una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos en imfwydcye, tal como se define por las reivindicaciones,
en los que dicho péptido o derivado peptídico tiene actividad procoagulante, y en el que el péptido o derivado peptídico tiene un peso molecular de entre 0,5 y 3,5 kD.

Para evitar la duda, la secuencia cimfwydcye puede representarse como D aminoácidos ile-met-phe-trp-tyr-asp-cys-tyr-glu usando el código de tres letras para aminoácidos.

45 Un segundo aspecto de la invención proporciona un péptido doble que comprende un péptido o derivado peptídico del primer aspecto conjugado con un péptido o derivado peptídico adicional del primer aspecto, en el que los dos péptidos/derivados pueden ser iguales o diferentes entre sí y en el que el péptido doble tiene actividad procoagulante.

50 Un tercer aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la invención o el péptido doble del segundo aspecto de la invención.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la invención o un péptido doble del segundo aspecto de la invención para uso en el tratamiento de un paciente que tiene una deficiencia en FV, FVII, FVIII, FX y/o FXI.

55 Un quinto aspecto de la invención proporciona un uso de un péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la invención o un péptido doble del segundo aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una deficiencia en FV, FVII, FVIII, FX y/o FXI en un paciente.

60 Un segundo aspecto de la divulgación proporciona un método para tratar a un paciente que tiene una deficiencia en FV, FVII, FVIII, FX y/o FXI que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica del tercer aspecto.

65 Un sexto aspecto de la invención proporciona péptido o derivado peptídico tal como se define por las reivindicaciones que tiene actividad procoagulante, en el que el péptido o derivado peptídico no es FVIII o un

fragmento del mismo y en el que la actividad procoagulante es un tiempo de generación de trombina de péptido, derivado peptídico o péptido doble 25, 50 o 100 μ M equivalente al de al menos 100 mU/ml de actividad de evitación de inhibidor de factor ocho (FEIBA), preferentemente al menos 300 mU/ml de FEIBA, más preferentemente al menos 900 mU/ml de FEIBA, más preferentemente al menos 1200 mU/ml de FEIBA en el ensayo de generación de trombina intrínseca definido.

Un séptimo aspecto de la invención proporciona un péptido o derivado peptídico tal como se define por las reivindicaciones que tiene actividad procoagulante, en el que el péptido o derivado peptídico no es FVIII o un fragmento del mismo y en el que la actividad procoagulante es un tiempo de generación de trombina de péptido, derivado peptídico o péptido doble 25, 50 o 100 μ M en un ensayo de generación de trombina intrínseca definido que alcanza un pico en un periodo de 30 minutos, preferentemente en un periodo de 15 minutos y más preferentemente en un periodo de 10 minutos.

Un octavo aspecto de la invención proporciona un péptido o derivado peptídico tal como se define por las reivindicaciones que tiene actividad procoagulante, en el que el péptido o derivado peptídico no es FVIII o un fragmento del mismo y en el que el péptido o derivado peptídico puede compensar al menos parcialmente la ausencia de FVIII biológicamente activo cuando se administra en un modelo animal de hemofilia humana A grave.

Descripción de las figuras

Figura 1: efecto de productos terapéuticos aprobados para tratamiento de la hemofilia en la generación de trombina pico y tiempo pico de trombina en un ensayo de generación de trombina de ruta doble definido.

Figura 2: efecto de A01 en modelo de hemorragia-pérdida de sangre de ratón FVIII -/-.

Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención

Se entiende que el término "aminoácido" dentro del alcance de la presente invención incluye todos los L aminoácidos de origen natural. Se usan en el presente documento las abreviaturas de una y tres letras para aminoácidos de origen natural (Lehninger, Biochemistry, 2a ed., Worth Publishers, Nueva York, 1995: 71-92). El término "aminoácido" también incluye estereoisómeros (por ejemplo D-aminoácidos) y modificaciones de aminoácidos de origen natural, aminoácidos no proteínogénicos y estructuras diseñadas para imitar aminoácidos.

Se describen aminoácidos modificados y no proteínogénicos en general en Grant, Synthetic Peptides: A User's Guide, Oxford University Press, 1992.

Es posible proporcionar, por ejemplo, estabilidad y solubilidad mejoradas, resistencia a degradación de proteasa y actividad del péptido mediante la introducción de diversos aminoácidos que no aparecen de forma natural, o mediante modificación del aminoácido como se analiza en el presente documento.

Los aminoácidos no proteínogénicos pueden incluir pero sin limitación p-alanina (p-Ala), norvalina (Nva), norleucina (Nle), ácido 4-aminobutírico (γ -Abu), ácido 2-aminoisobutírico (Aib), 6-ácido 6-aminohexanoico (ϵ -Ahx), ornitina (orn), hidroxiprolina (Hyp), sarcosina, citrulina, ácido cisteico (Coh), y ciclohexilalanina, metioninasulfóxido (Meo), metioninasulfona (Moo), homoserinametilester (Hsm), propargilglicina (Eag), 5-fluorotriptófano (5Fw), 6-fluorotriptófano (6Fw), 3',4'-dimetoxifenil-alanina (Ear), 3',4'-difluorofenilalanina (Dff), 4'-fluorofenil-alanina (Pff), 1-Naftil-alanina (1Ni), 1-metilriptófano (1Mw), penicilamina (Pen), homoserina (HSe). Además, dichos aminoácidos pueden incluir pero sin limitación, ácido α -amino isobutírico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina (Phg), benzotienilalanina (Bta), L-homo-cisteína (L-Hcis), N-metil-fenilalanina (NMF), 2-tienilalanina (Thi), 3,3-difenilalanina (Ebw), homofenilalanina (Hfe), s-bencil-L-cisteína (Ece) o ciclohexilalanina (Cha). Estos y otros aminoácidos no proteínogénicos pueden existir como D o L-isómeros. Cuando no se proporcione ningún indicio del isómero, se entiende el L-isómero.

Las estructuras que se diseñan para imitar aminoácidos son compuestos en los que el grupo amino y/o carboxilo de un aminoácido se reemplaza por otro grupo. Son ejemplos no limitantes la incorporación de tioamidas, ureas, tioureas, acilhidracidas, ésteres, olefinas, sulfonamidas, amidas de ácido fosfórico, cetonas, alcoholes, amidas de ácido borónico, benzodiazepinas y otros heterociclos aromáticos o no aromáticos (para una revisión véase M. A. Estiarte, D. H. Rich en Burgers Medicinal Chemistry, 6ª edición, volumen 1, parte 4, John Wiley and Sons, Nueva York, 2002). Si estas estructuras se incluyen en un derivado peptídico se conectan habitualmente con el resto del derivado peptídico con al menos uno de los grupos funcionales mencionados anteriormente en lugar de un enlace amida.

Por "péptido" se incluyen no solamente moléculas en las que los restos de aminoácidos se unen por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino también moléculas en las que el enlace peptídico se invierte. Un péptido "retro modificado" es un péptido que está compuesto de aminoácidos en los que los restos de aminoácidos se ensamblan en dirección opuesta al péptido nativo con respecto al que se retro modifica. Cuando el péptido nativo comprende L-aminoácidos, el péptido "retro modificado" también comprenderá L-aminoácidos. Sin embargo, cuando el péptido

nativo comprenda D-aminoácidos, el péptido “retro modificado” comprenderá D-aminoácidos. Los retro péptidos contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH. Un péptido “inverso modificado” es un péptido en el que los restos de aminoácidos se ensamblan en la misma dirección que el péptido nativo con respecto al que están inverso modificados, pero la quiralidad de los aminoácidos se invierte. Por lo tanto, cuanto el péptido nativo comprenda L-aminoácidos, el péptido “inverso modificado” comprenderá D-aminoácidos. Cuando el péptido nativo comprenda D-aminoácidos, el péptido “inverso modificado” comprenderá L-aminoácidos. Los péptidos inversos aún tienen enlaces peptídicos CO-NH. Un péptido “modificado retroinverso” se refiere a un péptido que está compuesto de restos de aminoácidos que se ensamblan en la dirección opuesta y que tienen quiralidad invertida con respecto al péptido nativo con respecto al que es retroinverso modificado. Un análogo retroinverso tiene extremos invertidos y dirección invertida de enlaces peptídicos (es decir NH-CO) manteniendo aproximadamente la topología de las cadenas laterales como en la secuencia peptídica nativa. Guichard y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci USA 91: 97659769 describieron que un péptido retroinverso imitaba la estructura y actividad antigénica del L-péptido natural IRGERA, pero no de los péptidos D y retro. Dichos peptidomiméticos retroinversos pueden prepararse usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo tales como los descritos en Meziere y col. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Son análogos de péptidos retroinversos parciales, polipéptidos en los que solamente parte de la secuencia se invierte y reemplaza con restos de aminoácidos enantioméricos. Se describen procesos para preparar dichos análogos en Pessi, A., Pinori, M., Verdini, A. S. y Viscomi, G. C. (1987) “Totally solid phase synthesis of peptide(s)-containing retro-inverted peptide bond, using crosslinked sarcosinyl copolymer as support”, patente europea 97994-B.

Convencionalmente, los L-aminoácidos se designan usando mayúsculas, y los D-aminoácidos se designan en minúsculas. Los péptidos y derivados peptídicos de la invención se designan en su forma preferida, pero sin limitarlos a la forma preferida. Se designa que el péptido del primer aspecto de la divulgación comprende WDLYFEIVW (SEQ ID NO: 1) o una variante de la misma. El péptido del primer aspecto de la divulgación también puede ser la variante retroinversa de WDLYFEIVW (SEQ ID NO: 1) o una variante de la misma, concretamente wwiefyldw o una variante de la misma. El péptido del primer aspecto de la invención se ha designado que comprende cimfwydcye o una variante de la misma.

Convencionalmente, cuando los aminoácidos se unen por enlaces peptídicos, un péptido está representado de modo que el grupo amino en el extremo N terminal aparezca a la izquierda y el grupo carboxilo en el extremo C terminal a la derecha. Se representan de esta manera péptidos y derivados peptídicos de acuerdo con la presente invención.

Un “derivado peptídico” contiene una modificación de uno o más restos de aminoácidos o un grupo enlazador u otro grupo con enlaces covalentes.

Los ejemplos de derivados incluyen derivados de N-acilo del amino terminal o de otro grupo amino libre, ésteres del carboxilo terminal o de otro carboxilo libre o grupo hidroxilo, amidas del carboxilo terminal o de otro grupo carboxilo libre producido por reacción con amoniaco o con una amina adecuada, derivados glucosilados, derivados hidroxilados, derivados nucleotilados, derivados ribosilados con ADP, derivados pegilados, derivados fosforilados, derivados conjugados con restos lipófilos y derivados conjugados con un anticuerpo u otro ligando biológico. También se incluyen entre los derivados químicos los obtenidos por modificación del enlace peptídico --CO--NH--, por ejemplo por reducción a --CH₂--NH-- o alquilación a --CO--N(alquilo)--.

Una derivatización preferida es la amidación C terminal. La amidación C terminal de un péptido retira la carga negativa del extremo C terminal. Los derivados peptídicos que tienen una amida C terminal están representados con “NH₂” en el extremo C terminal, por ejemplo Ac-WDLYFEiVw-NH₂ (SEQ ID NO: 1). Otra derivatización preferida es acetilación N terminal. Esta retira la carga positiva en el extremo N terminal. El bloqueo del extremo C o N terminal, tal como por amidación C terminal o acetilación N terminal, pueden mejorar la estabilidad proteolítica debido a susceptibilidad reducida a digestión exoproteolítica.

Los enlazadores adecuados incluyen el enlazador flexible 4, 7, 10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (Ttds), glicina, ácido 6-aminohexanoico, beta-alanina o combinaciones de Ttds, glicina, ácido 6-aminohexanoico y beta-alanina.

Los péptidos de la presente invención pueden producirse por síntesis química, tecnología de ADN recombinante, fragmentación bioquímica o enzimática de moléculas mayores, combinaciones de los anteriores o por cualquier otro procedimiento.

Los péptidos (al menos los que contienen enlaces peptídicos entre restos de aminoácidos) pueden sintetizarse por la estrategia de Fmoc de síntesis peptídica en fase sólida como se describe en “Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach”, editado por W.C.Chan, P.D. White, Oxford University Press, Nueva York 2000 y referencias en la misma. Se proporciona protección de grupo N-amino temporal por el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). Se efectúa escisión repetitiva de este grupo protector altamente lábil por bases usando piperidina 20% en N,N-dimetilformamida. Las funcionalidades de cadenas laterales pueden protegerse como sus butil éteres (en el caso de serina, treonina y tirosina), butil ésteres (en el caso de ácido glutámico y ácido aspártico), derivado de butiloxycarbonilo (en el caso de lisina e histidina), derivado de tritilo (en el caso de cisteína, asparagina y glutamina) y

derivado de 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (en el caso de arginina). El soporte de fase sólida se basa en un polímero de polidimetilo-acrilamida constituido a partir de los tres monómeros dimetilacrilamida, (monómero de cadena principal), bisacriloletilendiamina (agente de reticulación) y acrilolisarcosina metil éster (agente funcionalizante). El agente unido de forma escindible de péptido a resina usado es el derivado de ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético lábil por ácidos, o en el caso de aminas C terminales, el enlazador de Rink-amida. Todos los derivados de aminoácidos se añaden como sus derivados de anhídridos simétricos preformados con la excepción de asparagina y glutamina, que se añaden usando un procedimiento de acoplamiento mediado por N,N-diciclohexil-carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol invertido. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se supervisan usando ninhidrina, ácido trinitrobenceno sulfónico o procedimientos de ensayo de isotina. Tras completar la síntesis, los péptidos se escinden del soporte de resina con retirada conjunta de grupos protectores de cadenas laterales mediante tratamiento con ácido trifluoroacético al 95 % que contiene una mezcla de neutralizantes al 50 %. Los neutralizantes habitualmente usados son etanoditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se sintetiza. Se retira ácido trifluoroacético por evaporación al vacío, con trituración posterior con dietiléter que proporciona el péptido en bruto. Se retira cualquier neutralizante presente por un procedimiento de extracción sencillo que tras la liofilización de la fase acuosa proporciona el péptido en bruto sin neutralizantes. Están disponibles habitualmente reactivos para síntesis peptídica de Calbiochem-Novabiochem (Reino Unido) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, Reino Unido. Puede efectuarse purificación por una cualquiera de, o una combinación de, técnicas tales como cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, solubilidad diferencial y (principalmente) cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa. Puede llevarse a cabo análisis de péptidos usando cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, análisis de aminoácidos después de hidrólisis ácida y por análisis espectrométrico de masas de bombardeo atómico rápido (FAB).

También puede usarse síntesis de SPOT, que permite la síntesis química direccionable posicional de los péptidos en membranas de celulosa continuas (R Frank Tetrahedron (1992) 48, 9217).

Como alternativa a las técnicas de síntesis peptídicas de fase sólida, los péptidos también pueden producirse por expresión de proteína recombinante o sistemas de traducción in vitro (Sambrook y col., "Molecular cloning: A laboratory manual", 2001, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Por supuesto, solamente los péptidos que contengan restos de aminoácidos de origen natural unidos por enlaces peptídicos de origen natural son codificables por un polinucleótido. Dichos procedimientos se prefieren frente a técnicas de síntesis peptídica de fase sólida en las que el péptido es particularmente grande, tal como mayor de 50 aminoácidos, o mayor de 100 aminoácidos.

Una secuencia de aminoácidos "variante" como se define en relación con el primer aspecto de la divulgación puede comprender una, dos, tres o cuatro sustituciones de L-aminoácidos en WDLYFEIWW (SEQ ID NO: 1).

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos variante comprende una secuencia de aminoácidos que comprende $X_1X_2X_3YX_4EX_5X_6X_7$ en la que X_1 es W, L o P, X_2 es D o S, X_3 es L o F, X_4 es F, Phg, L, Ebw, Pff, Thi, 1Ni, Hfe, Ece o Cha, X_5 es I o F, X_6 es S, V o G y X_7 es W o L (SEQ ID NO: 1).

Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos variante comprende una secuencia de aminoácidos que comprende $X_1X_2X_3YX_4EX_5X_6X_7$ en la que X_1 es W o L, X_2 es D o S, X_3 es L o F, X_4 es F, Phg o L, X_5 es I o F, X_6 es S, V o G y X_7 es W o L (SEQ ID NO: 1).

Una secuencia de aminoácidos "variante" como se define en relación con el primer aspecto de la invención puede comprender una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos en imfwydcye tal como se define por las reivindicaciones.

Preferentemente, al menos una, dos, tres o cuatro de dichas sustituciones en imfwydcye son D-aminoácidos.

Cualquier sustitución dentro de la variante puede ser no conservativa o conservativa.

Por "sustituciones conservativas" se entiende sustituciones dentro de los siguientes grupos: Val, Ile, Leu, Ala, Met; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr, Gly, Ala; Lys, Arg, His; y Phe, Tyr, Trp.

Preferentemente, el péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la divulgación comprende RMEFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 2) o RMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 2); o una secuencia de aminoácidos variante que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácidos RMEFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 2) o RMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 2).

Para evitar las dudas, la secuencia RMEFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 2) puede representarse como Arg-Met-Glu-Phe-Asp-Val-Trp-Asp-Leu-Tyr-Phe-Glu-Ile-Val-Trp usando el código de tres letras para aminoácidos. RMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 2) puede representarse como Arg-Met-Lys-Phe-Asp-Val-Trp-Asp-Leu-Tyr -Phe-Glu-Ile-Val-Trp usando el código de tres letras para aminoácidos.

Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos variante comprende una secuencia de aminoácidos que comprende $X_8X_9X_{10}FDVX_1X_2X_3YX_4EX_5X_6X_7$ en la que X_8 es R o P, X_9 es M, Nva, Moo, N, Nie, Meo, Q, Eag, X_{10} es E, K o D, X_1 es W, L o P, X_2 es D o S, X_3 es L o F, X_4 es F, Phg, L, Ebw, Pff, Thi, 1Ni, Hfe, Ece, Cha, X_5 es I o F, X_6 es S, V o G y X_7 es W o L (SEQ ID NO: 2).

5 Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos variante comprende una secuencia de aminoácidos que comprende $X_8X_9X_{10}FDVX_1X_2X_3YX_4EX_5X_6X_7$ en la que X_8 es R o P, X_9 es M o Nva, X_{10} es E, K o D, X_1 es W o L, X_2 es D o S, X_3 es L o F, X_4 es F, Phg o L, X_5 es I o F, X_6 es S, V o G y X_7 es W o L (SEQ ID NO: 2).

10 Convenientemente, el péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la divulgación es un péptido o derivado peptídico como se representa en la tabla posterior, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de un péptido o derivado peptídico como se representa en las Tablas 1 a 3 posteriores:

Tabla 1: péptidos más preferidos de la divulgación

15

| | Péptido | Secuencia |
|--------------|----------------|------------------------------------|
| SEQ ID NO: 2 | A01 | Ac-RMKFDVWDLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A02 | Ac-PMKFDVWDLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A03 | Ac-RMDFDVWDLYFEIVW-NH ₂ |

ES 2 739 676 T3

| | | |
|---------------|-----|--|
| SEQ ID NO: 2 | A04 | Ac-RMEFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A05 | Ac-WDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 3 | A06 | Ac-WDLYFEIWE |
| SEQ ID NO: 1 | A07 | Ac-WDLYFEIWW-ttds-E |
| SEQ ID NO: 2 | A08 | ttds-RMEFDVWDLYFEIWW-ttds-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 4 | A09 | ERMEFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 5 | A12 | ERXEFDVWDLYFEIWW-NH ₂ X es Nva |
| | A13 | ttds-RMEFDVWDLYXEIWW-ttds-NH ₂ X es Phg |
| SEQ ID NO: 6 | A14 | Ac-WSLYFEIWE |
| SEQ ID NO: 1 | A15 | Ac-WDLYFEISW-ttds-E |
| SEQ ID NO: 2 | A16 | PEG5000-RMKFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 6 | A17 | PEG5000-WSLYFEIWE |
| SEQ ID NO: 4 | A18 | PEG5000-ERMEFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 7 | A19 | Ac-VW DLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 8 | A21 | Ac-FDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 9 | A24 | EWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A25 | E-ttds-WDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A26 | Ac-WDLYFEIWW-ttds-E-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A27 | Ac-RMEFDVWDLYFEIWW |
| SEQ ID NO: 2 | A28 | RMEFDVWDLYFEIWW |
| SEQ ID NO: 2 | A29 | Ac-K-ttds-RMEFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 10 | A30 | Ac-RMEFDVWDLYFEIWWK |
| SEQ ID NO: 10 | A31 | Ac-RMEFDVWDLYFEIWWK-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A32 | Ac-RMEFDVWDLYFEIWW-ttds-K-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 11 | A33 | Ac-WDLYFEISWE |
| SEQ ID NO: 12 | A34 | Ac-WDLYLEIWE |
| SEQ ID NO: 13 | A35 | Ac-WDLYFEIVLE |
| SEQ ID NO: 1 | A38 | WDLYFEIWW |
| SEQ ID NO: 2 | A49 | RMEFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A50 | Ac-RMEFDVWDLYFEIWW-ttds-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 14 | A52 | Ac-KRMEFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A53 | K-ttds-RMEFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A54 | Ac-RMEFDVWDLYFEIWW-ttds-K |
| SEQ ID NO: 1 | A55 | Ac-LDLYFEIWW-ttds-E |
| SEQ ID NO: 1 | A56 | Ac-W DLYFEIVL-ttds-E |
| SEQ ID NO: 15 | A57 | E-RMEFDVLDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 16 | A58 | E-RMEFDVWDLYFEIVL-NH ₂ |

ES 2 739 676 T3

| | | |
|---------------|-----|------------------------|
| SEQ ID NO: 17 | A84 | Ac-WDFYFEIVWE |
| SEQ ID NO: 18 | A85 | Ac-WDLYFEFVWE |
| SEQ ID NO: 19 | A86 | Ac-LDLYFEIVWE |
| SEQ ID NO: 20 | A87 | Ac-WDLYFEIGWE |
| SEQ ID NO: 21 | A89 | Ac-WDLYLEISLE |
| | A90 | Ac-WDLYXEIVLE X es Phg |
| | A91 | Ac-WSLYXEIVWE X es Phg |
| SEQ ID NO: 22 | A92 | Ac-LDLYFEIVLE |
| SEQ ID NO: 23 | A93 | Ac-LDLYFEISLE |
| | A94 | Ac-LDLYXEISWE X es Phg |
| SEQ ID NO: 24 | A95 | Ac-LSLYFEIVWE |
| SEQ ID NO: 25 | A96 | Ac-LSLYFEIVLE |
| SEQ ID NO: 26 | A97 | Ac-LSLYFEISLE |

Tabla 2: péptidos preferidos

ES 2 739 676 T3

| | Péptido | Secuencia |
|----------------|----------------|---|
| SEQ ID NO: 1 | A20 | Ac-WDLYFEIWW-ttds-K |
| SEQ ID NO: 27 | A22 | Ac-DVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| | A23 | Ac-wviefyldwvdfkmr-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A37 | Ac-WDLYFEIWW |
| SEQ ID NO: 1 | A39 | Ac-ttds-WDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A40 | ttds-WDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A41 | Ac-WDLYFEIWW-ttds-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A42 | Ac-ttds-WDLYFEIWW-ttds-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A43 | ttds-WDLYFEIWW-ttds |
| SEQ ID NO: 1 | A44 | ttds-WDLYFEIWW-ttds- NH ₂ |
| SEQ ID NO: 28 | A45 | Ac-KWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A46 | Ac-K-ttds-WDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 29 | A47 | Ac-WDLYFEIWWK |
| SEQ ID NO: 29 | A48 | Ac-WDLYFEIWWK-NH ₂ |
| | A71 | E-R(Moo)EFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 30 | A73 | E-RNEFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| | A78 | ttds-RMEFDVWDLY(Ebw)EIVW-ttds-NH ₂ |
| | A83 | ttds-RMEFDVWDLY(Pff)EIVW-ttds-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 31 | A88 | Ac-PDLYFEIWE |
| SECT ID NO: 32 | A98 | Ac-LSLYLEIVLE |
| SEQ ID NO: 33 | A99 | Ac-LSLYLEISLE |
| | A100 | Ac-LSLYXEIVLE X es Phg |
| SEQ ID NO: 1 | A101 | Ac-WDLYFEIWW-ttds-K-NH ₂ |

Tabla 3: péptidos activos

ES 2 739 676 T3

| | Péptido | Secuencia |
|--|----------------|---|
| SEQ ID NO: 34 | A10 | E-PMKFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A11 | ttts-RMDFDWDLYFEIWW-ttts-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A16 | PEG5000-RMKFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A36 | WDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 14 | A51 | KRMEFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A59 | ttts-PMKFDVWDLYFEIWW-ttts-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 35 | A60 | E-RMDFDWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A61 | (Coh)-ttts-RMEFDVWDLYFEIWW-ttts-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A62 | Glucosil-aminooxiacetil-ttts-RMEFDVWDLYFEIWW-ttts-NH ₂ |
| | A63 | Ac-P(Moo)KFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A64 | Ac-P(Nle)KFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A65 | Ac-PNKFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| | A66 | Ac-R(Moo)DFDWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A67 | Ac-R(Nle)DFDWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A68 | Ac-RNDFDWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A69 | ttts-R(Nle)EFDVWDLYFEIWW-ttts-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A70 | ttts-RNEFDVWDLYFEIWW-ttts-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 321 | A72 | E-R(Nle)EFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| | A74 | E-R(Meo)EFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 36 | A75 | E-R(Gln)EFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| | A76 | E-R(Eag)EFDVWDLYFEIWW-NH ₂ |
| | A77 | ttts-RMEFDVWDLY(Thi)EIVW-ttts-NH ₂ |
| | A79 | ttts-RMEFDVWDLY(1Ni)EIVW-ttts-NH ₂ |
| | A80 | ttts-RMEFDVWDLY(Hfe)EIVW-ttts-NH ₂ |
| | A81 | ttts-RMEFDVWDLY(Ece)EIVW-ttts-NH ₂ |
| | A82 | ttts-RMEFDVWDLY(Cha)EIVW-ttts-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 28 | A102 | KWDLYFEIWW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A103 | K-ttts-WDLYFEIWW-NH ₂ |
| En las tablas anteriores, -ttts- es 4, 7, 10-trioxa-1,13-tridecanodiamina. "N" es asparagina. "NH ₂ " es un grupo amida C-terminal. | | |

Preferentemente, el péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la divulgación no comprende o consiste en un péptido representado en la lista a continuación:

5
10
AMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 37), CMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 38), DMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 39), EMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 40), FMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 41), GMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 42), HMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 43), IMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 44), KMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 45), LMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 46), MMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 47), NMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 48), QMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 49), SMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 50), TMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 51), VMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 52), WMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 53), YMKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 54), RAKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 55), RCKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 56), RDKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 57), REKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 58), RFKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 59), RGKFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 60),

5 RMKFDVWDLYHEIVW (SEQ ID NO: 229), RMKFDVWDLYIEIVW (SEQ ID NO: 230), RMKFDVWDLYKEIVW (SEQ ID NO: 231), RMKFDVWDLYLEIVW (SEQ ID NO: 232), RMKFDVWDLYMEIVW (SEQ ID NO: 233), RMKFDVWDLYNEIVW (SEQ ID NO: 234), RMKFDVWDLYPEIVW (SEQ ID NO: 235), RMKFDVWDLYQEIVW (SEQ ID NO: 236), RMKFDVWDLYREIVW (SEQ ID NO: 237), RMKFDVWDLYSEIVW (SEQ ID NO: 238),
 10 RMKFDVWDLYTEIVW (SEQ ID NO: 239), RMKFDVWDLYVEIVW (SEQ ID NO: 240), RMKFDVWDLYWEIVW (SEQ ID NO: 241), RMKFDVWDLYYEIVW (SEQ ID NO: 242), RMKFDVWDLYFAIVW (SEQ ID NO: 243), RMKFDVWDLYFCIVW (SEQ ID NO: 244), RMKFDVWDLYFDIVW (SEQ ID NO: 245), RMKFDVWDLYFFIVW (SEQ ID NO: 246), RMKFDVWDLYFGIVW (SEQ ID NO: 247), RMKFDVWDLYFHIVW (SEQ ID NO: 248),
 15 RMKFDVWDLYFIIVW (SEQ ID NO: 249), RMKFDVWDLYFKIVW (SEQ ID NO: 250), RMKFDVWDLYFLIVW (SEQ ID NO: 251), RMKFDVWDLYFMIVW (SEQ ID NO: 252), RMKFDVWDLYFNIVW (SEQ ID NO: 253), RMKFDVWDLYFPVW (SEQ ID NO: 254), RMKFDVWDLYFQIVW (SEQ ID NO: 255), RMKFDVWDLYFRIVW (SEQ ID NO: 256), RMKFDVWDLYFSIVW (SEQ ID NO: 257), RMKFDVWDLYFTIVW (SEQ ID NO: 258), RMKFDVWDLYFVIVW (SEQ ID NO: 259), RMKFDVWDLYFWIVW (SEQ ID NO: 260), RMKFDVWDLYFYIVW (SEQ ID NO: 261), RMKFDVWDLYFEAVW (SEQ ID NO: 262), RMKFDVWDLYFECVW (SEQ ID NO: 263),
 20 RMKFDVWDLYFEDVW (SEQ ID NO: 264), RMKFDVWDLYFEEVW (SEQ ID NO: 265), RMKFDVWDLYFEFVW (SEQ ID NO: 266), RMKFDVWDLYFEGVW (SEQ ID NO: 267), RMKFDVWDLYFEHVW (SEQ ID NO: 268), RMKFDVWDLYFEKVV (SEQ ID NO: 269), RMKFDVWDLYFELVW (SEQ ID NO: 270), RMKFDVWDLYFEMVW (SEQ ID NO: 271), RMKFDVWDLYFENVW (SEQ ID NO: 272), RMKFDVWDLYFEPVW (SEQ ID NO: 273), RMKFDVWDLYFEOVW (SEQ ID NO: 274), RMKFDVWDLYFERVW (SEQ ID NO: 275), RMKFDVWDLYFESVW (SEQ ID NO: 276), RMKFDVWDLYFETVW (SEQ ID NO: 277), RMKFDVWDLYFEVVW (SEQ ID NO: 278), RMKFDVWDLYFEIIVW (SEQ ID NO: 279), RMKFDVWDLYFEIYVW (SEQ ID NO: 280), RMKFDVWDLYFEIAW (SEQ ID NO: 281), RMKFDVWDLYFEICW (SEQ ID NO: 282), RMKFDVWDLYFEIDW (SEQ ID NO: 283), RMKFDVWDLYFEIEW (SEQ ID NO: 284), RMKFDVWDLYFEIFW (SEQ ID NO: 285), RMKFDVWDLYFEIGW (SEQ ID NO: 286), RMKFDVWDLYFEIHW (SEQ ID NO: 287), RMKFDVWDLYFEIIVW (SEQ ID NO: 288),
 25 RMKFDVWDLYFEIKW (SEQ ID NO: 289), RMKFDVWDLYFEILW (SEQ ID NO: 290), RMKFDVWDLYFEIMW (SEQ ID NO: 291), RMKFDVWDLYFEINW (SEQ ID NO: 292), RMKFDVWDLYFEIPW (SEQ ID NO: 293), RMKFDVWDLYFEIQW (SEQ ID NO: 294), RMKFDVWDLYFEIRW (SEQ ID NO: 295), RMKFDVWDLYFEISW (SEQ ID NO: 296), RMKFDVWDLYFEITW (SEQ ID NO: 297), RMKFDVWDLYFEIYW (SEQ ID NO: 298), RMKFDVWDLYFEIYW (SEQ ID NO: 299), RMKFDVWDLYFEIVA (SEQ ID NO: 300), RMKFDVWDLYFEIVC (SEQ ID NO: 301), RMKFDVWDLYFEIVD (SEQ ID NO: 302), RMKFDVWDLYFEIVE (SEQ ID NO: 303), RMKFDVWDLYFEIVF (SEQ ID NO: 304), RMKFDVWDLYFEIVG (SEQ ID NO: 305), RMKFDVWDLYFEIVH (SEQ ID NO: 306), RMKFDVWDLYFEIVI (SEQ ID NO: 307), RMKFDVWDLYFEIVK (SEQ ID NO: 308), RMKFDVWDLYFEIVL (SEQ ID NO: 309), RMKFDVWDLYFEIVM (SEQ ID NO: 310), RMKFDVWDLYFEIVN (SEQ ID NO: 311), RMKFDVWDLYFEIVP (SEQ ID NO: 312), RMKFDVWDLYFEIVQ (SEQ ID NO: 313), RMKFDVWDLYFEIVR (SEQ ID NO: 314), RMKFDVWDLYFEIVS (SEQ ID NO: 315), RMKFDVWDLYFEIVT (SEQ ID NO: 316), RMKFDVWDLYFEIVV (SEQ ID NO: 317), RMKFDVWDLYFEIVY (SEQ ID NO: 318), RMKFDVWDLYFEIVW (SEQ ID NO: 319), KFDVWDLYFEIWW (SEQ ID NO: 320).

Preferentemente, el péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la invención comprende:

- 40 (i) una secuencia de aminoácidos que comprende cimfwydcye; o
- (ii) una secuencia de aminoácidos variante que comprende una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos en cimfwydcye, tal como se define por las reivindicaciones.

45 Preferentemente, al menos una, dos, tres o cuatro de dichas sustituciones en cimfwydcye son D- aminoácidos.

Preferentemente, el péptido o derivado peptídico de la divulgación comprende: una secuencia de aminoácidos que comprende $X_1X_2X_3YX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$, en la que X_1 cuando está presente, es c, s, y, i, D-Pen, C, t, D-Nva, D-Nle o k, X_2 es i, y, w o d, X_3 es c o m, X_4 es f, t, v o c, X_5 es w o c, X_6 es y o c, X_7 es d, e o f, X_8 es c, e, f, y o d, X_9 es y o w y X_{10} es e o i, con no más de siete sustituciones de aminoácidos en comparación con cimfwydcye.

Preferentemente, el péptido o derivado peptídico de la divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que comprende $X_1X_2X_3YX_4wydX_8ye$, en la que X_1 es c, C, D-Pen o s, X_2 es l, y o w, X_3 es c o m, X_4 es f, t, o v y X_8 es c o e.

Preferentemente, el péptido o derivado peptídico de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que comprende $X_1X_2mX_4wydX_8ye$, en la que X_1 es c, C o D-Pen, X_2 es i o y, X_4 es f, t, o v y X_8 es c o e.

60 De manera adecuada, el péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la invención es un péptido o derivado peptídico como se representa en la tabla posterior, o que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de un péptido o derivado peptídico como se representa en las Tablas 4 a 6 posteriores:

Tabla 4: péptidos más preferidos

65

ES 2 739 676 T3

| Péptido | Secuencia |
|----------------|--|
| B03 | Ac-ci mfwydeye- NH ₂ |
| B04 | Disulfuro-dímero(Ac-cimfwydeye-NH ₂) ₂ |
| B05 | Ac-TTDS-(cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B06 | K-TTDS-(cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B14 | Ac-(cimtwydc)-ye-NH ₂ |
| B15 | Ac-(cimvwydc)-ye-NH ₂ |
| B17 | (cymfwydc)-ye |
| B18 | Ac-(cymfwydc)-yeG-NH ₂ |
| B19 | Ac-(D-Pen)imfwydeye-NH ₂ |
| B23 | O(CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CO-imfwydeye-NH ₂) ₂ |
| B24 | Piridina-3 (SEQ ID NO: 1),5-(CO-imfwydeye-NH ₂) ₂ |
| B34 | H ₂ N-E-TTDS-(cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B35 | Ac-(cymfwydc)-yeK |
| B37 | Ac-(cymfwydc)-ye-TTDS-K |

En una realización preferida, los péptidos B05, B06, B14, B15, B17, B18, B34, B35 y B37 son cíclicos.

5 Tabla 5: péptidos preferidos

| Péptido | Secuencia |
|----------------|--|
| B07 | Ac-simfwydeye-NH ₂ |
| B07 | Ac-simfwydeye-NH ₂ |
| B09 | Ac-yd mcwcefyi-NH ₂ |
| B10 | Ac- idmccyfywe- NH ₂ |
| B16 | Ac-cimfwyddye-NH ₂ |
| B26 | Ac-(cymfwydc)-ye |
| B27 | Ac-(cymfwydc)-ye-TTDS-NH ₂ |
| B28 | Ac-TTDS-(cymfwydc)-ye-TTDS-NH ₂ |
| B30 | K-(cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B31 | Ac-K-(cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B32 | E-(cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B33 | Ac-K-TTDS-(cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B36 | Ac-(cymfwydc)-yeK-NH ₂ |
| B38 | Ac-(cymfwydc)-ye-TTDS-K-NH ₂ |

| | |
|-----|---|
| B39 | Ac-(cymfwydc)-ye-TTDS-E-NH ₂ |
| B41 | Ac-timfwydeye-NH ₂ |

En una realización preferida, los péptidos B26, B27, B28, B30, B31, B32, B33, B36, B38 y B39 son cíclicos.

5 Tabla 6: péptidos activos

| Péptido | Secuencia |
|---------|---|
| B01 | Ac-(cimfwydc)-ye-NH ₂ |
| B02 | Ac-(cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B11 | Ac-(cwmfwydc)-ye-NH ₂ |
| B13 | Ac-cicfwydcye-NH ₂ |
| B20 | Ac-(D-Nva)imfwydeye-NH ₂ |
| B21 | Ac-(D-Nle)imfwydeye-NH ₂ |
| B22 | Ac-(Cys)imfwydeye-NH ₂ |
| B25 | (cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B29 | TTDS-(cymfwydc)-ye-TTDS-NH ₂ |
| B40 | Ac- ki mfwydeye-NH ₂ |

En una realización preferida, los péptidos B01, B02, B11, B25 y B29 son cíclicos.

10 En las tablas anteriores, -TTDS- es 4, 7, 10-trioxa-1,13-tridecanodiamina. "NH₂" es un grupo amida C-terminal.

B08 está suprimido en las tablas anteriores, ya que es idéntico a B01. B12 está suprimido en las tablas anteriores, ya que es idéntico a B02.

15 Preferentemente, el péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la divulgación no comprende o consiste en un péptido representado en la lista a continuación:

20 feiycwdcym, ywcfiymced, dnmwceyfcyi, ceicwyfdym, ccwfiemdy, cemdwycyfi, aimfwydcye, dimfwydcye, eimfwydcye, fimfwydcye, himfwydcye, iimfwydcye, kimfwydcye, limfwydcye, mimfwydcye, nimfwydcye, pimfwydcye, qimfwydcye, rimfwydcye, simfwydcye, timfwydcye, vimfwydcye, wimfwydcye, yimfwydcye, camfwydcye, ccmfwydsye, cdmfwydcye, cemfwydcye, cfmfwydcye, chmfwydcye, ckmfwydcye, clmfwydcye, cmmfwydcye, cnmfwydcye, cμmfwydcye, cqmfwydcye, crmfwydcye, csmfwydcye, ctmfwydcye, cvmfwydcye, ciamfwydcye, ciamfwydcye, cidfwydcye, ciefwydcye, ciffwydcye, cihfwydcye, ciifwydcye, cikfwydcye, cilfwydcye, cinfwydcye, cipfwydcye, ciqfwydcye, cirfwydcye, cisfwydcye, citfwydcye, civfwydcye, ciwfwydcye, ciyfwydcye, cimawydcye, cimcwysye, cimdwydcye, cimewydcye, cimhwycye, cimiwydcye, cimkwydcye, cimlwydcye, cimmwydcye, ciminwydcye, cimpwydcye, cimqwydcye, cimrwydcye, cimswydcye, cimwwydcye, cimyywycye, cimfaydcye, cimfcydsye, cimfdydcye, cimfeydcye, cimffycye, cimfhycye, cimfiycye, cimfkycye, cimflydcye, cimfmydcye, cimfnycye, cimfpydcye, cimfqydcye, cimfrydcye, cimfsydcye, cimftydcye, cimfydcye, cimfydcye, cimfwadcy, cimfwcdsye, cimfwddcye, cimfwedcye, cimfwfdcye, cimfwhdcye, cimfwidcye, cimfwkdcye, cimfwldcye, cimfwmdcye, cimfwndcye, cimfwpcye, cimfwqdcye, cimfwrdcye, cimfwsdcye, cimfwtdcye, cimfwvdcye, cimfwwdcye, cimfwyacye, cimfwycsye, cimfwyecye, cimfwyfcye, cimfwyhcy, cimfwyicye, cimfwykye, cimfwylcy, cimfwymcy, cimfwyncye, cimfwypcy, cimfwyqcy, cimfwyrcye, cimfwyscy, cimfwytcye, cimfwyvcye, cimfwywcye, cimfwyycye, cimfwydaye, cimfwydfye, cimfwydhye, cimfwydiye, cimfwydkye, cimfwydlcy, cimfwydmcy, cimfwydnyc, cimfwydpcy, cimfwydye, cimfwydrye, cimfwydsye, cimfwydtcy, cimfwydvyc, cimfwydwyc, cimfwydye, cimfwydcye, cimfwydsce, cimfwydcde, cimfwydcce, cimfwydcfe, cimfwydcche, cimfwydcie, cimfwydccke, cimfwydcle, cimfwydcme, cimfwydcne, cimfwydcpe, cimfwydcqe, cimfwydcrc, cimfwydcse, cimfwydcye, cimfwydcwe, cimfwydcya, cimfwydsyc, cimfwydcyd, cimfwydcyf, cimfwydcyh, cimfwydcyi, cimfwydcyk, cimfwydcyl, cimfwydcym, cimfwydcyn, cimfwydcyp, cimfwydcyq, cimfwydcyr, cimfwydcys, cimfwydcyt, cimfwydcyv, cimfwydcyw, cimfwydcyy.

Preferentemente, el péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la invención es un péptido cíclico. El péptido o los derivados peptídicos del primer aspecto de la divulgación también pueden ser cíclicos.

5 La expresión "péptido cíclico" como se usa en el presente documento se refiere a un derivado cíclico de un péptido al que, por ejemplo, se han añadido dos o más grupos adicionales adecuados para ciclación, con frecuencia en el extremo carboxilo terminal y en el extremo amino terminal. Los grupos adecuados incluyen restos de aminoácidos. Un péptido cíclico puede contener un enlace disulfuro intramolecular, es decir --S--S--, un enlace amina intramolecular entre los dos restos añadidos, es decir --CONH-- o --NHCO--, o enlaces S-alquilo intramoleculares, es decir --S--(CH₂)_n --CONH-- o --NH--CO(CH₂)_n --S--, en los que n es 1, 2 o más y preferentemente no más de 6. La ciclación también puede llevarse a cabo por química de triazina como se ejemplifica en Scharn, D. y col. (2001) J. Org. Chem 66; 507. Las secuencias peptídicas cíclicas se indican con el prefijo "ciclo" delante de la secuencia peptídica y la parte cíclica de la secuencia se incorpora entre paréntesis y separada adicionalmente del resto de la secuencia por guiones.

15 Un péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la invención puede modificarse por conjugación con polietilenglicol (PEG). Se desvelan métodos adecuados de pegilación en las patentes de Estados Unidos n.º 5.122.614 (Zalipsky; Enzon, Inc.) y 5.539.063 (Hakimi y col.; Hoffmann-La Roche Inc.). Pueden usarse diversos pesos moleculares de PEG, convenientemente de 5000 a 40000 kD. Un peso molecular preferido es 5000 kD. Preferentemente, el PEG es monodisperso, lo que significa que hay poca variación en el peso molecular entre moléculas de PEG. La pegilación puede mejorar la solubilidad y semivida en plasma de un péptido.

20 Un segundo aspecto de la invención proporciona un péptido doble que comprende un péptido o derivado peptídico del primer aspecto conjugado con un péptido o derivado peptídico adicional del primer aspecto, en el que el péptido o derivado peptídico puede ser igual que o diferente del péptido o derivado peptídico adicional, y en el que el péptido doble tiene actividad procoagulante.

25 El péptido doble puede comprender dos de los mismos, o dos diferentes, péptidos o derivados peptídicos del primer aspecto de la invención unidos covalentemente entre sí, bien por un enlazador flexible que puede ser peptídico, peptidomimético o no peptídico, o bien por un enlazador conformacionalmente restringido que puede comprender componentes básicos peptídicos, peptidomiméticos o no peptídicos conformacionalmente restringidos por ejemplo restos de triazina, o por cualquier otro método posible conocido en la técnica.

30 El péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la invención y el péptido doble del segundo aspecto de la invención tiene un peso molecular de entre 0,5 y 3,5 kD. Por "peso molecular" se entiende la masa teórica de un monómero de péptido o derivado peptídico exclusivo de cualquier contraión o aducto. Para péptidos pegilados el peso molecular se define como la masa de la molécula monomérica exclusiva de cualquier contraión o aducto y exclusiva del resto o los restos de PEG. Los péptidos, derivados peptídicos y péptidos dobles de entre 0,5 kD y 3,5 kD se sintetizan más fácilmente que los péptidos mayores, tienen un riesgo reducido de ser inmunogénicos y se administran en general fácilmente a un paciente. Los péptidos de menos de 0,5 kD pueden sintetizarse y administrarse fácilmente y es menos probable que sean inmunogénicos, pero pueden no poseer la actividad procoagulante requerida. No obstante, la divulgación abarca péptidos, derivados peptídicos y péptidos dobles de menos de 0,5 kD y más de 3,5 kD si poseen la actividad apropiada.

35 Los péptidos y derivados peptídicos del primer aspecto de la invención y el péptido doble del segundo aspecto de la invención poseen actividad procoagulante.

40 Por "actividad procoagulante" se entiende la capacidad de promover la generación de trombina y/o deposición de fibrina en un sistema de ensayo adecuado.

45 Se apreciará que están disponibles diferentes ensayos para determinar la actividad procoagulante. De hecho, hay diferentes tipos de actividad procoagulante. Los péptidos y derivados peptídicos pueden promover la coagulación en plasma con agotamiento de FV, FVII, FVIII, FX o FXI. En una realización preferida, un péptido o derivado peptídico de la invención promueve la generación de trombina y/o deposición de fibrina en plasma en el que está agotado o ausente FVIII. Este tipo de actividad se denomina actividad de coagulación de FVIII. Cuando el plasma es de un individuo que carece de FVIII, la actividad se denomina típicamente actividad equivalente de FVIII. Cuando el plasma contiene inhibidores contra FVIII, la actividad se denomina típicamente actividad equivalente de evitación de inhibidor de FVIII. Otras actividades procoagulantes incluyen actividad de FV, actividad de FVII, actividad de FX y actividad de FXI.

50 Los péptidos y derivados peptídicos individuales pueden variar en su eficacia relativa entre diferentes tipos de ensayo. Por lo tanto, incluso si un péptido o derivado peptídico parece tener una baja eficacia en un ensayo particular, puede poseer no obstante un nivel convenientemente alto de actividad procoagulante en otro ensayo.

55 Un ensayo adecuado para determinar la actividad procoagulante es el ensayo de generación de trombina intrínseco definido descrito posteriormente. En este ensayo, se considera que un compuesto tiene actividad procoagulante si, a

una concentración de 25, 50 o 100 μM , puede estimular la generación de trombina 5 nM en 60 minutos, y preferentemente en 50, 40, 30, 20 o 10 minutos. Preferentemente, puede estimular la generación de trombina 10 nM en 60 minutos, y más preferentemente en 50, 40, 30, 20 o 10 minutos. Un ensayo alternativo es el ensayo de generación de trombina de ruta doble definido descrito posteriormente. En este ensayo, se considera que un compuesto tiene actividad procoagulante si, a una concentración de 25, 50 o 100 μM , puede estimular la generación de trombina 5 nM en 70 minutos, y preferentemente 60, 50, 40, 30 o 20 minutos. Preferentemente, puede estimular la generación de trombina 10 nM en 70 minutos, y más preferentemente 60, 50, 40, 30 o 20 minutos. Los ensayos anteriores son particularmente útiles para determinar la actividad de coagulación FVII porque se realizan en presencia de plasma con FVIII agotado o inhibido. Sin embargo, pueden adaptarse fácilmente para ensayar con respecto a otros tipos de actividad procoagulante sustituyendo un plasma con FVIII agotado o inhibido por un plasma agotado o inhibido adecuado.

Convenientemente, la actividad procoagulante es un tiempo de generación de trombina de 25, 50 o 100 μM de compuesto en un ensayo de generación de trombina intrínseco definido equivalente al de al menos 100 mU/ml de actividad de evitación de inhibidor de factor ocho (FEIBA), preferentemente al menos 300 mU/ml de FEIBA, más preferentemente al menos 600 mU/ml de FEIBA y más preferentemente al menos 1200 mU/ml de FEIBA. El tiempo de generación de trombina o tiempo pico es el intervalo de tiempo desde la adición del plasma precalentado a los otros componentes en el ensayo descrito posteriormente, hasta el tiempo del máximo de pico de trombina.

Como alternativa, la actividad procoagulante es un máximo de pico de trombina de 25, 50 o 100 μM de compuesto en un ensayo de generación de trombina de ruta doble definido (DDPTGA) equivalente a al menos 1 mU/ml de actividad de evitación de inhibidor de factor ocho (FEIBA), preferentemente al menos 5 mU/ml de FEIBA, más preferentemente al menos 10 mU/ml de FEIBA. El máximo de pico de trombina, también denominado pico IIa es la concentración de trombina máxima generada durante el ensayo. El ensayo de generación de trombina de ruta doble definido puede usarse para determinar las actividades de coagulación distintas de la actividad FVIII si el plasma deficiente en FVIII o con FVIII inhibido se sustituye por plasma de factor agotado adecuado. Se considera que un péptido, derivado peptídico o péptido doble de la invención tiene actividad FV, FVII, FX o FXI si, a una concentración de 25, 50 o 100 μM , puede estimular la generación de más trombina en un DDPTGA usando plasma deficiente en FV, FVII, FX o FXI respectivamente durante 120 minutos que lo que se estimula en ausencia de péptido.

Convenientemente, la actividad procoagulante es un tiempo de generación de trombina de 25, 50 o 100 μM de compuesto en un ensayo de generación de trombina intrínseco definido que alcanza un pico en un periodo de 30 minutos, preferentemente 15 minutos y más preferentemente en un periodo de 10 minutos. [0] Como alternativa, la actividad procoagulante es un tiempo de generación de trombina de 25, 50 o 100 μM de compuesto en un ensayo de generación de trombina de ruta doble definido que alcanza un máximo en un periodo de 50 minutos, preferentemente en un periodo de 45 minutos y más preferentemente en un periodo de 30 minutos.

El efecto de un péptido o derivado peptídico o péptido doble en la generación de trombina puede determinarse en plasma de paciente con FVIII inmunoinhibido, FVIII inmunoagotado, FVIII inhibidor o paciente con hemofilia A u otros tipos de plasmas deficientes en factor de coagulación, por ejemplo supervisando continuamente la escisión lenta del sustrato fluorogénico específico de trombina I-1140 (Bachem) en una microplaca de 96 pocillos negra (Cliniplate, Thermo Labsystems) como se describe posteriormente. Son parámetros que pueden medirse con utilidad en ensayos de generación de trombina para determinar el efecto del péptido o derivado peptídico la concentración de trombina en tiempo máximo; el tiempo de generación de trombina a trombina pico; pendiente de la fase de propagación de la curva de generación de trombina y tiempo de retardo de generación de trombina (fase de iniciación).

La ruta intrínseca de generación de trombina puede ensayarse en un ensayo de generación de trombina incluyendo FXIa y fosfolípidos. En dicho ensayo, que es similar a un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), la generación de trombina se dirige solamente mediante la ruta intrínseca y depende de FVIII. Un ensayo adecuado es el ensayo de generación de trombina intrínseco definido descrito posteriormente. Como alternativa, empleando bajas concentraciones de TF y fosfolípidos en lugar de FXIa y fosfolípidos, se genera trombina por las rutas tanto extrínseca (factor tisular) como intrínseca. Esta forma del ensayo de generación de trombina es la más fisiológica, ya que están implicadas ambas rutas de generación de trombina; y depende parcialmente de FVIII. Un ensayo adecuado es el ensayo de generación de trombina de ruta doble definido.

El ensayo de generación de trombina intrínseco definido se realiza de la siguiente manera. Se inhibe la actividad de FVIII de plasma humano incubando (2 horas, 37 °C) más de 40 μl de plasma normal humano con 10 μl de plasma anti FVIII humano inactivado por calor en cabra (600 UB/ml, 6 horas incubado a 56 °C). Se añaden 15 μl de mezcla de FXIa (16,67 nM) (Enzyme Research Laboratories) y fosfolípidos (fosfatidilcolina / fosfatidilserina 60% / 40%, 120 mM) (Avanti Polar Lipids), 15 μl de mezcla de I-1140 3,33 mM y CaCl_2 50 mM y 10 μl de solución peptídica (diferentes concentraciones) a 10 μl de HNa/HSA5 2x (Hepes 50 mM, NaCl 350 mM, pH 7,35, HSA 10 mg/ml). Después de seis minutos de incubación a 37 °C, se inicia la generación de trombina mediante la adición de 50 μl de plasma con FVIII inhibido precalentado (37 °C). En lugar de plasma con FVIII inhibido, puede usarse plasma de paciente inhibidor de FVIII o varios plasmas empobrecidos. La microplaca se pone inmediatamente en un lector de

fluorescencia GENios Plus (Tecan) o Safire 2 (Tecan) y la señal de fluorescencia (ex 340 nm / em 440 nm) se sigue cinéticamente leyendo la placa cada 21 segundos. Desviando los datos de fluorescencia originales se calcula la cantidad de trombina generada a partir de una curva patrón construida usando un intervalo de concentración de trombina.

5 Para cálculo de unidades equivalentes de actividad se realizan experimentos con diluciones de agente de evitación de inhibidor de factor ocho (FEIBA, Baxter AG), patrón de referencia de Immunate (FVIII humano, derivado de plasma purificado) (Baxter AG) o patrón de Recombinate (FVIII humano, recombinante purificado, Baxter AG). Un ajuste lineal del logaritmo de la concentración de FEIBA (FVIII) representada frente al tiempo de generación de trombina en trombina pico da como resultado una curva patrón. Con esta curva se calcula la actividad equivalente de FEIBA (FVIII) para una concentración peptídica definida.

15 Cuando se proporciona una concentración peptídica en el presente documento, debe entenderse que no es la concentración de péptido en el volumen de ensayo final, sino una concentración corregida con respecto a volumen de plasma. La concentración en el volumen de ensayo final es la concentración corregida dividida por 2,5. Por lo tanto, cuando se proporciona una concentración de 100 μM , la concentración real en el volumen de ensayo final es de 40 μM . De forma similar, la actividad equivalente de FEIBA también se corrige con respecto a volumen de plasma. Por lo tanto, si se indica que a 100 μM un péptido tiene una actividad equivalente a 100 mU/ml de FEIBA en el DITGA, la concentración de péptido en el volumen de ensayo final es de 40 μM y la concentración equivalente de FEIBA en el ensayo de control es de 40 mU/ml de FEIBA.

25 El ensayo de generación de trombina de ruta doble definido se realiza como se describe posteriormente, usando un kit de ensayo comercial (Technothrombin TGA, Technoclone GmbH, Viena, Austria). Brevemente, se incuba una mezcla de 40 μl de sustrato fluorogénico 1,25 mM (Z-GGR-AMC), CaCl_2 18,75 mM, 10 μl de reactivo B de TGA (vesículas fosfolipídicas de fosfatidilcolina / fosfatidilserina 80 % / 20 % (3,2 μM) que contienen factor tisular humano recombinante 17,9 pM; Technoclone GmbH) o 10 μl de reactivo C de TGA alto (vesículas fosfolipídicas de fosfatidilcolina / fosfatidilserina 80 % / 20 % (32 μM) que contienen factor tisular humano recombinante 71,6 pM; Technoclone GmbH) y 10 μl de dilución peptídica, patrón de referencia de FEIBA o diluciones convencionales de FVIIa (Enzyme Research Laboratories, South Bend, Indiana Estados Unidos) durante cuatro minutos a 37 °C. Preferentemente, se usa reactivo C alto. Se inicia la generación de trombina mediante la adición de 40 μl de uno de varios tipos de plasma humano (37 °C). La conversión del sustrato fluorogénico por trombina se sigue poniendo inmediatamente la placa en un lector de fluorescencia de microplaca precalentado (37 °C) (Tecan Safire 2, ex 360 nm / em 460 nm) y leyendo cinéticamente la placa cada 30 segundos. Desviando los datos de fluorescencia originales se calcula la cantidad de trombina generada a partir de una curva patrón construida usando un intervalo de concentración de trombina. El análisis de regresión no lineal de factor VIIa o de las concentraciones de FEIBA representadas frente a la trombina en el pico de la curva de generación de trombina o tiempo hasta pico de trombina da como resultado curvas patrón. Con estas curvas, se puede calcular la actividad de factor VIIa o equivalente de FEIBA para una concentración peptídica definida. Como se describe en relación con DITGA, cuando se proporciona una concentración peptídica en el presente documento en relación con el DDPTGA, debe entenderse que no es la concentración de péptido en el volumen de ensayo final, sino una concentración corregida con respecto a volumen de plasma. La concentración en el volumen de ensayo final es la concentración corregida dividida por 2,5. La actividad equivalente de FEIBA también se corrige con respecto a volumen de plasma aplicando el mismo factor de corrección.

45 Otro ensayo adecuado para determinar la actividad procoagulante, y particularmente la actividad equivalente de FVIII o actividad de evitación de inhibidor de FVIII, es el ensayo de deposición de fibrina definido como se describe posteriormente. Convenientemente, la actividad procoagulante de una muestra de compuesto de ensayo 25 μM en el ensayo de deposición de fibrina definido es equivalente a al menos 30 mU/ml de actividad de evitación de inhibidor de factor ocho (FEIBA), preferentemente al menos 80 mU/ml de FEIBA, más preferentemente al menos 200 mU/ml de FEIBA. Este ensayo es particularmente útil para determinar la actividad de coagulación de FVIII porque se realiza en presencia de plasma con FVIII agotado o inhibido.

55 El ensayo de deposición de fibrina definido se realiza de la siguiente manera. Se inhibe en primer lugar la actividad FVIII de plasma citratado humano (Baxter AG) incubando (2 horas, 37 °C) 100 μl de plasma normal humano con 25 μl de plasma anti FVIII humano inactivado por calor (300 UB/ml, 6 horas incubado a 56 °C) inducido en cabra. Para cada muestra para ensayar, se transfieren 125 μl de este plasma normal humano con FVIII inhibido a una cubeta precalentada y se añaden 75 μl de dilución de un compuesto de ensayo o patrón de referencia de FEIBA (Baxter AG). Las diluciones del compuesto de ensayo o patrón de referencia de FEIBA contienen imidazol 50 mM, NaCl 100 mM y albúmina de suero humano 10 mg/ml (Sigma) pH 7,4. Como desencadenante y para proporcionar superficies procoagulantes se incluyen 100 μl de una mezcla de factor XIa humano (3,13 nM, Enzyme Research Laboratories) y vesículas fosfolipídicas (PL) (fosfatidilcolina / fosfatidilserina 60 % / 40 %, 30 μM ; Avanti Polar Lipids) en imidazol 50 mM, NaCl 100 mM, albúmina de suero humano 10 mg/ml (Sigma) pH 7,4. Después de incubar durante tres minutos a 37 °C la reacción de coagulación se inicia añadiendo 100 μl de CaCl_2 25 mM. La formación de coágulos se controla por un coagulómetro (KC10A, Amelung, Alemania). Brevemente, cada cubeta rota lentamente por encima del dispositivo de detección magnético y contiene una bola metálica magnética pequeña.

65

Aunque los componentes de plasma permanecen en solución, la bola se queda en el fondo de la cubeta. A lo largo del tiempo, comienza a formarse un coágulo, de modo que la bola comienza a rotar con el coágulo en desarrollo en la cubeta rotatoria. El "tiempo de coagulación" se registra y se define como el tiempo desde la adición de CaCl_2 hasta el momento en que el coágulo en desarrollo comienza a rotar la bola metálica. Una curva patrón para diluciones de patrones de referencia de FEIBA se calcula por regresión lineal de concentraciones de FEIBA logarítmicas (eje x) frente al tiempo de coagulación (eje y). Basándose en el tiempo de coagulación de cada concentración de compuesto se calculan actividades de equivalentes de FEIBA de acuerdo con esta curva patrón.

Cuando se proporciona una concentración peptídica en el presente documento en relación con el ensayo de deposición de fibrina definido, debe entenderse que no es la concentración del péptido en el volumen de ensayo final, sino la concentración corregida con respecto al volumen de plasma. La concentración en el volumen de ensayo final es la concentración corregida dividida por 4. Por tanto, cuando se proporciona una concentración de $100 \mu\text{M}$, la concentración real en el volumen de ensayo final es de $25 \mu\text{M}$. De forma similar, la actividad equivalente de FEIBA también se corrige con respecto a volumen de plasma. Por lo tanto, si se indica que a $100 \mu\text{M}$ un péptido tiene una actividad equivalente a 100 mU/ml de FEIBA en el ensayo de deposición de fibrina definido, la concentración de péptido en el volumen de ensayo final es de $25 \mu\text{M}$ y la concentración equivalente de FEIBA en el ensayo de control es de 25 mU/ml de FEIBA.

Preferentemente, los péptidos y derivados peptídicos del primer aspecto de la invención y el péptido doble del segundo aspecto de la invención pueden compensar al menos parcialmente la ausencia de FVIII biológicamente activo cuando se administran en un modelo animal de hemofilia A humana grave. Por ejemplo, pueden estar activos en el control de la hemorragia en ratones deficientes en FVIII, tales como las cepas descritas en detalle en Bi y col. (Nat Genet. 1995;10: 119-21), en las que el exón 17 o exón 16 de FVIII está alterado. Están disponibles ratones exón 16 de FVIII -/- de Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609 Estados Unidos (nombre de cepa: B6:12954-F8^{tm1Kaz/J}).

Un ensayo adecuado para ensayar la capacidad de un compuesto para controlar la hemorragia es el ensayo de corte de la cola. Se administran péptidos, derivados peptídicos o péptidos dobles a ratones en un vehículo adecuado, típicamente i.v., i.p. o s.c. Pueden administrarse diferentes dosis de cada péptido o derivado peptídico a diferentes grupos de ratones para determinar la dependencia de la dosis. Los grupos de ratones, típicamente 8 - 16 ratones con supresión de exón 17 de FVIII machos y hembras con diátesis hemorrágica grave, reciben una única inyección de embolada i.v. (vena de la cola) o s.c. (10 ml/kg de peso corporal). Dos minutos antes del corte de la cola los animales se anestesian mediante la aplicación i.p. de ketamina 100 mg/kg y xilacina 5 mg/kg . Cinco minutos después de la administración de péptido o derivado peptídico i.v. y 60 minutos después de i.p. o s.c. se cortan $0,5 \text{ cm}$ de la punta de la cola. Se recoge sangre que gotea de la herida en tubos que contienen $5,0 \text{ ml}$ de NH_3 $0,04 \%$ durante periodos de tiempo definidos tal como 0-2 minutos, 2-4 minutos, 4-6 minutos, 6-8, 8-10, 10-12, 12-14, 14-16, 16-20, 20-24, 24-28, 28-32, 32-42, 42-52 y 52-62 minutos. Las células sanguíneas en cada tubo se rompen y se extrae la hemoglobina durante un periodo de incubación de tres horas a temperatura ambiente seguido de tratamiento con ultrasonidos. Se determina la absorbancia a 414 nm y 620 nm de los extractos en placas de microtitulación. 620 nm es una longitud de onda de referencia y la lectura de A_{620} se resta de la lectura de A_{414} . La cantidad de sangre en el extracto correspondiente a la lectura restada se calcula a partir de una curva patrón creada por cantidades conocidas de sangre de ratones de control de tipo silvestre, tales como ratones C57/Bl6. Los parámetros de las características de hemorragia de los ratones para registrar son pérdida de sangre total, velocidad de hemorragia, tiempo de hemorragia, supervivencia a las 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 24 h y 48 h. La pérdida de sangre acumulada se calcula sumando las cantidades de sangre para cada periodo de tiempo. Se promedian los datos para los animales de un grupo y se representan frente al tiempo de hemorragia. En cada punto temporal se analizan conjuntos de datos para grupos de tratamiento y de control de vehículo mediante ensayo de t de Student con respecto a significación estadística.

Preferentemente, los ratones a los que se ha administrado el péptido, derivado peptídico o péptido doble tienen una pérdida de sangre en el ensayo de corte de la cola a los 62 minutos desde el corte de la cola de no más del 70% de la pérdida de sangre de ratones a los que se ha administrado el vehículo solamente, más preferentemente no más del 60% y más preferentemente no más del 50% de la pérdida de sangre de ratones a los que se ha administrado el vehículo solamente.

Preferentemente, la supervivencia de ratones a los que se ha administrado el péptido, derivado peptídico o péptido doble en el ensayo anterior es de al menos 40% , más preferentemente al menos 60% y más preferentemente al menos 80% a las 2 horas después del corte de la cola. Preferentemente, la supervivencia de ratones a los que se ha administrado el péptido o derivado peptídico en el ensayo de corte de la cola es de al menos 20% , más preferentemente al menos 30% y más preferentemente al menos 40% a las 24 horas después del corte de la cola.

Preferentemente, el péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la invención o el péptido doble del segundo aspecto de la invención tiene una estabilidad en plasma humano a los 30 minutos de al menos 50% , preferentemente al menos 70% , más preferentemente al menos 80% y más preferentemente al menos 90% . Se describe en los ejemplos un ensayo adecuado para determinar la estabilidad en el plasma humano.

Preferentemente, el péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la invención o el péptido doble del segundo aspecto de la invención tiene una solubilidad acuosa en solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 a 25 °C de al menos 25 µM, preferentemente al menos 60 µM y más preferentemente al menos 100 µM. Se describe en los ejemplos un ensayo adecuado para determinar la solubilidad acuosa en solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 a 25 °C.

En el presente documento, la expresión "factor VIII" o "FVIII" se refiere a cualquier resto de FVIII que muestre actividad local que esté asociado con FVIII nativo. La secuencia de FVIII puede encontrarse como el número de referencia NCBI NP 000123 o la entrada de UniProtKB/Swiss-Prot P00451.

Como se usa en el presente documento, "FVIII derivado de plasma" incluye todas las formas de la proteína halladas en sangre obtenida de un mamífero que tiene la propiedad de activar la ruta de coagulación.

Como se usa en el presente documento, "rFVIII" indica FVIII obtenido mediante tecnología de ADN recombinante.

Un tercer aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido o derivado peptídico del primer aspecto de la invención o el péptido doble del segundo aspecto de la invención. Los péptidos, derivados peptídicos y péptidos dobles pueden estar en forma de sales, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables. Convenientemente, la composición farmacéutica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede ser preferentemente una formulación líquida y es preferentemente una solución tamponada, isotónica, acuosa. Convenientemente, la composición farmacéutica tiene un pH que es fisiológico o cercano al fisiológico. Convenientemente tiene osmolaridad y salinidad fisiológicas o cercanas a las fisiológicas. Puede contener cloruro sódico y/o acetato sódico. Los péptidos, derivados peptídicos y péptidos dobles de la invención pueden prepararse sin pirogenicidad significativa que podría aparecer en la producción de tratamientos biológicos. Esto puede ser importante, especialmente para formulaciones intravenosas en las que solamente pueden tolerarse bajos niveles de endotoxina. Se prefiere que las formulaciones subcutáneas, intraperitoneales, bucales, intravenosas y otras parenterales sean estériles y sin endotoxinas.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables también incluyen excipientes, tales como diluyentes y similares, y aditivos, tales como agentes estabilizantes, conservantes, agentes solubilizantes, y similares. Los péptidos de la presente invención también pueden estar en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de los Estados Unidos o la Unión Europea u otro gobierno o enumerado en la farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida en general para su uso en seres humanos.

La composición también puede ser por ejemplo una suspensión, emulsión, formulación de liberación sostenida, crema, gel o polvo. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos.

Aunque es posible el suministro intravenoso de los péptidos, derivados peptídicos y péptidos dobles de la presente invención, se prefiere una vía no intravenosa, particularmente suministro subcutáneo, nasal, bucal, oral o pulmonar. También puede usarse suministro intraperitoneal (i.p.).

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente, por ejemplo, uno o más de agua, tampones, (por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), etanol, aceite mineral, aceite vegetal, dimetilsulfóxido, carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, adyuvantes, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión y/o conservantes. Además, pueden incluirse (aunque no es necesario) uno o más principios activos adicionales en las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para cualquier modo apropiado de administración incluyendo, por ejemplo, administración tópica (por ejemplo, transdérmica u ocular), oral, bucal, nasal, vaginal, rectal o parenteral. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular, espinal, intracraneal, intratraqueal, intraocular, periocular, intraorbital, intrasinoval e intraperitoneal, así como cualquier técnica de inyección o infusión similar. Las formas adecuadas para uso oral incluyen, por ejemplo, comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden formularse como un liofilizado.

Las suspensiones acuosas contienen el principio o los principios activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen agentes de suspensión (por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga); y agentes de dispersión o humectantes (por ejemplo, fosfátidos de origen natural tales como lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos tales como polioxitileneestearato, productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga tales

como heptadecaetilenoxietanol, productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como polioxietilensorbitol monooleato, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol tales como polietilensorbitan monooleato). Las suspensiones acuosas también pueden comprender uno o más conservantes, por ejemplo etil o n-propil p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saporíferos y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Los péptidos o derivados peptídicos pueden formularse para administración local o tópica, tales como para aplicación tópica a la piel, heridas o membranas mucosas, tal como en el ojo. Las formulaciones para administración tópica típicamente comprenden un vehículo tópico combinado con un agente o agentes activos, con o sin componentes adicionales opcionales. Se conocen bien en la técnica vehículos tópicos adecuados y componentes adicionales, y resultará evidente que la elección de un vehículo dependerá de la forma física particular y el modo de suministro. Los vehículos tópicos incluyen agua, disolventes orgánicos tales como alcoholes (por ejemplo, etanol o alcohol isopropílico) o glicerina; glicoles (por ejemplo, butilen, isopren o propilenglicol); alcoholes alifáticos (por ejemplo, lanolina); mezclas de agua y disolventes orgánicos y mezclas de disolventes orgánicos tales como alcohol y glicerina; materiales basados en lípidos tales como ácidos grasos, acilgliceroles (incluyendo aceites, tales como aceite mineral, y grasas de origen natural o sintético), fosfoglicéridos, esfingolípidos y ceras; materiales basados en proteínas tales como colágeno y gelatina; materiales basados en silicona (tanto volátiles como no volátiles); y materiales basados en hidrocarburos tales como microesponjas y matrices poliméricas. Una composición puede incluir además uno o más componentes adaptados para mejorar la estabilidad o eficacia de la formulación aplicada, tales como agentes estabilizantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, reguladores de la viscosidad, agentes gelificantes, conservantes, antioxidantes, potenciadores de la penetración cutánea, humectantes y materiales de liberación sostenida. Se describen ejemplos de dichos componentes en Martindale - The Extra Pharmacopoeia (Pharmaceutical Press, Londres 1993) y Martin (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences. Las formulaciones pueden comprender microcápsulas, tales como hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas o nanocápsulas.

Una composición farmacéutica puede formularse como formulaciones inhaladas, incluyendo pulverizaciones, nebulizaciones o aerosoles. Para formulaciones de inhalación, los compuestos proporcionados en el presente documento pueden suministrarse mediante cualquier procedimiento de inhalación conocido por los expertos en la materia. Dichos procedimientos y dispositivos de inhalación incluyen, pero sin limitación, inhaladores de dosis medida con propulsores tales como CFC o HFA o propulsores que son fisiológica y ambientalmente aceptables. Otros dispositivos adecuados son inhaladores accionados por respiración, inhaladores de polvo seco multidosis y nebulizadores en aerosol. Las formulaciones de aerosol para uso en el procedimiento objeto típicamente incluyen propulsores, tensioactivos y codisolventes y pueden cargarse en recipientes de aerosol convencionales que se cierran por una válvula de medición adecuada.

Las composiciones inhalantes pueden comprender composiciones líquidas o en polvo que contienen el principio activo que son adecuadas para nebulización y uso intrabronquial, o composiciones de aerosol administradas mediante una unidad de aerosol que dosifica dosis medidas. Las composiciones líquidas adecuadas comprenden el principio activo en un disolvente inhalante acuoso, farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, solución salina isotónica o agua bacteriostática. Las soluciones se administran por medio de una bomba o dosificador de pulverización nebulizada accionado por presión, o mediante cualquier otro medio convencional para provocar o permitir la inhalación de la cantidad de dosificación requerida de la composición líquida en los pulmones del paciente. Las formulaciones adecuadas, en las que el vehículo es un líquido, para administración, como por ejemplo, una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo.

Las formulaciones o composiciones adecuadas para administración nasal, en las que el vehículo es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros que se administra de la misma manera que se administra el rapé (es decir, mediante inhalación rápida a través del orificio nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz). Las composiciones de polvo adecuadas incluyen, como ilustración, preparaciones en polvo del principio activo entremezclado exhaustivamente con lactosa u otros polvos inertes aceptables para administración intrabronquial. Las composiciones en polvo pueden administrarse mediante un dosificador en aerosol o encerrarse en una cápsula rompible que puede insertarse por el paciente en un dispositivo que perfora la cápsula y expulsa el aire en un torrente continuo adecuado para inhalación.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como formulaciones de liberación sostenida (es decir, una formulación tal como una cápsula que efectúa una liberación lenta del modulador después de la administración). Dichas formulaciones pueden en general prepararse usando tecnología bien conocida y administrarse, por ejemplo, mediante implantación oral, rectal o subcutánea, o mediante implantación en el sitio diana deseado. Los vehículos para el uso dentro de dichas formulaciones son biocompatibles y también pueden ser biodegradables; preferentemente la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación de modulador. La cantidad de modulador contenida dentro de una formulación de liberación sostenida depende, por ejemplo, del sitio de implantación, la velocidad y duración esperada de liberación y la naturaleza de la afección para tratar o prevenir.

Pueden formularse composiciones farmacéuticas con un agente para mejorar la biodisponibilidad, tal como un

disolvente orgánico. Por ejemplo, Cremophor EL® (Producto n.º 00647/1/63; BASF Aktiengesellschaft, Alemania) es un aceite de ricino polietoxilado que se prepara haciendo reaccionar 35 moles de óxido de etileno con cada mol de aceite de ricino. Puede usarse para estabilizar emulsiones de materiales no polares en sistemas acuosos. Como alternativa, el péptido, derivado peptídico o péptido doble puede incorporarse dentro de, o unido a, una micro o nanopartícula proteica para una biodisponibilidad mejorada. Se describen micro y nanopartículas adecuadas en el documento US 5.439.686 (Desai y col.; Vivorx Pharmaceuticals, Inc., CA) y documento US 5.498.421 (Grinstaff y col.; Vivorx Pharmaceuticals, Inc., CA). Convenientemente, la nanopartícula proteica comprende albúmina de suero humano, particularmente albúmina de suero humano o una forma recombinante de la misma. El documento WO 2007/077561 (Gabbai; Do-Coop Technologies Ltd., Israel) describe otro vehículo adecuado que comprende nanoestructuras y un líquido, denominado en el mismo Neowater™.

Para administración oral y parenteral a pacientes, incluyendo pacientes humanos, el nivel de dosificación diario del péptido, derivado peptídico o péptido doble de la invención será habitualmente de 2 a 2000 mg por adulto (es decir de aproximadamente 0,03 a 30 mg/kg), administrados en dosis individuales o divididas.

Por lo tanto, por ejemplo, los comprimidos o las cápsulas del péptido, derivado peptídico o péptido doble de la invención pueden contener de 2 mg a 2.000 mg de compuesto activo para administración individual o dos o más a la vez, según sea apropiado. El médico determinará en cualquier caso la dosis real que será más adecuada para cualquier paciente individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular. Las dosificaciones anteriores son ejemplares del caso promedio. Puede haber, por supuesto, casos individuales en los que se requieran intervalos de dosificación mayores o menores y estos están dentro del alcance de la presente divulgación.

Para uso veterinario, un péptido, derivado peptídico o péptido doble de la invención se administra como una formulación convenientemente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la vía de administración que sea la más apropiada para un animal particular.

Los péptidos, derivados peptídicos y péptidos dobles desvelados en el presente documento pueden usarse para aplicaciones médicas y cría de animales o aplicaciones veterinarias. Típicamente, el producto se usa en seres humanos. Se entiende que el término "paciente" indica un individuo mamífero y se usa de este modo en toda la memoria descriptiva y en las reivindicaciones.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un péptido o derivado peptídico del primer aspecto o un péptido doble del segundo aspecto de la invención para tratar un paciente que tiene una deficiencia en FV, FVII, FVIII, FX y/o FXI.

Un quinto aspecto de la invención proporciona un uso de un péptido o derivado peptídico del primer aspecto o un péptido doble del segundo aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una deficiencia en FV, FVII, FVIII, FX y/o FXI en un paciente.

Un segundo aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un paciente que tiene una deficiencia en FV, FVII, FVIII, FX y/o FXI que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica del tercer aspecto.

Los péptidos, derivados peptídicos y péptidos dobles de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de una deficiencia en FV, FVII, FVIII, FX y/o FXI tanto para la profilaxis como para el tratamiento de hemorragias agudas. Los pacientes con deficiencia de FVIII (hemofilia A) desarrollan con frecuencia anticuerpos inhibidores de FVIII. También se conoce desarrollo de inhibidor (para FIX) en deficiencia de FIX (hemofilia B). Ya que las deficiencias de FV, FVII, FXI y FX son trastornos congénitos muy poco habituales se sabe poco acerca del desarrollo de inhibidores, aunque es factible que los pacientes que tengan dichos trastornos puedan desarrollar inhibidores. Se prefiere el tratamiento de pacientes inhibidores. Dichos pacientes inhibidores pueden tener una respuesta de alto título de más de 5 UB o una respuesta de bajo título de entre 0,5 y 5 UB. Típicamente, los inhibidores se dirigen contra FVIII y los pacientes tienen hemofilia A.

La magnitud de la respuesta de anticuerpo a FVIII puede cuantificarse usando un ensayo inhibidor funcional, tal como el descrito en [0]Kasper CK y col. (1975) Proceedings: A more uniform measurement de factor VIII inhibitors. Thromb Diath Haemorrh. 34(2): 612. Los inhibidores de FXI podrían cuantificarse mediante un ensayo de aPTT como se describe en Kasper. Los inhibidores de FV, FVII y FX podrían cuantificarse por un ensayo basado en PT siguiendo el procedimiento de Kasper.

Un péptido o derivado peptídico según el sexto, séptimo u octavo aspecto de la invención se define por las reivindicaciones y no es FVIII o un fragmento del mismo. Típicamente, no consiste en o comprende la secuencia de aminoácidos de cualquier proteína FVIII, ya sea de origen humano, mamífero o vertebrado. Tampoco consiste en un fragmento de una proteína FVIII. Típicamente, o comprende menos de 50, menos de 20, menos de 10, menos de 5 aminoácidos contiguos de una proteína FVIII, tal como una proteína FVIII humana.

Los péptidos y derivados peptídicos del sexto, séptimo u octavo aspecto de la invención pueden formularse como

composiciones farmacéuticas, como se ha descrito anteriormente, y pueden usarse en medicina como se ha descrito anteriormente.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos, sin ninguna limitación a los mismos.

5

Ejemplo 1: síntesis e identificación de compuestos con actividad generadora de trombina

10 Se exploraron compuestos usando el “ensayo de generación de trombina intrínseco definido” en el que se cuantificó la generación de trombina in vitro en plasma humano con FVIII inhibido en presencia de factor XIa y vesículas fosfolípidicas. Se exploraron compuestos adicionales en el ensayo anterior, y en el “ensayo de generación de trombina de ruta doble definido” usando factor tisular y fosfolípidos en lugar de factor XIa y fosfolípidos, como se describe en la descripción específica.

15 Los compuestos, que son péptidos y derivados peptídicos, se sintetizaron mediante síntesis de péptidos de fase sólida clásica o síntesis de SPOT a 50-100 nmol de péptido por punto, lo que permite la síntesis química, posicionalmente direccionable, de péptidos en membranas de celulosa continuas. Los péptidos se disolvieron en DM SO 10 % o 50 % en agua.

20 Se llevó a cabo pegilación de péptidos y derivados peptídicos de la siguiente manera. Se acopló PEG5000 NHS-éster al extremo N terminal de los péptidos purificados por HPLC en solución. Si estaba presente lisina en la secuencia peptídica, este aminoácido se protegió con el grupo protector ivDde para evitar la pegilación en el grupo ε-amina. Después de acoplar el PEG5000 al extremo N terminal, se separó por escisión el grupo protector de ivDde mediante hidrato de hidracina 3 % en dimetilformamida seguido de repurificación del producto final por HPLC.

25 Se identificaron compuestos que se consideraba que promovían la generación de trombina, como se indica en las Tablas 7 y 8 posteriores.

Tabla 7: compuestos basados en A01

| | Péptido | Secuencia |
|--|----------------|--|
| SEQ ID NO: 2 | A01 | Ac-RMKFDVWOLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A02 | Ac-PMKFDVW DLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A03 | Ac-RMDFDVWDLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A04 | Ac-RMEFDVWDLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A05 | Ac-WDLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 3 | A06 | Ac-WDLYFEIWWE |
| SEQ ID NO: 1 | A07 | Ac-WDLYFEIVW-O-E |
| SEQ ID NO: 2 | A08 | O-RMEFDVWDLYFEIVW-O-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 4 | A09 | ERMEFDVWDLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 34 | A10 | EPMKFDVWDLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 2 | A11 | O-RMDFDVWDLYFEIVW-O-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 5 | A12 | ERXEFDVWDLYFEIVW-NH ₂ X es Nva |
| | A13 | O-RMEFDVWDLYXEIVW-O-NH ₂ X es Phg |
| SEQ ID NO: 6 | A14 | Ac-WSLYFEIWWE |
| SEQ ID NO: 1 | A15 | Ac-WDLYFEISW-O-E |
| SEQ ID NO: 2 | A16 | PEG5000-RMKFDVWDLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 6 | A17 | PEG5000-WSLYFEIWWE |
| SEQ ID NO: 4 | A18 | PEG5000-ERMEFDVWDLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 7 | A19 | Ac-VWDLYFEIVW-NH ₂ |
| SEQ ID NO: 1 | A20 | Ac-WDLYFEIVW-O-K |
| En la tabla anterior, O- es 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (ttds) | | |

Tabla 8: Compuestos basados en B01

| Péptido | Secuencia |
|---------|--|
| B01 | Ac-(ci mfwydc)-ye-NH ₂ |
| B02 | Ac-(cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B03 | Ac-cimfwydeye-NH ₂ |
| B04 | Disulfuro-Dímero (Ac-cimfwydeye-NH ₂) ₂ |
| B05 | Ac-O-(cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B06 | K-O-(cymfwydc)-ye-NH ₂ |
| B07 | Ac-simfwydeye-NH ₂ |

En la tabla anterior, -O- es 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (ttds). Los péptidos reales usados en este estudio, designados B01, B02, B05 y B06, fueron cíclicos.

Ejemplo 2: Ensayos de compuestos en ensayos de generación de trombina de ruta doble e intrínseco

5 Se ensayaron diversas concentraciones de cada péptido en el ensayo de generación de trombina intrínseco definido usando plasma con FVIII inhibido humano. Los resultados se proporcionan en la tabla posterior.

Tabla 9: actividad de compuestos peptídicos en el ensayo de generación de trombina intrínseco definido (desencadenado por FXIa). El tiempo máximo de trombina se proporciona como unidad equivalente de FEIBA (mU/ml) calculada basándose en una curva de calibración patrón de FEIBA.

10

| Compuesto | Concentración (µM) | | | | | |
|-----------|--------------------|------|------|-----|------|------|
| | 200 | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6,25 |
| A01 | | 338 | 227 | 160 | 138 | 97 |
| A03 | | 1396 | 1069 | 762 | 639 | 477 |
| A05 | | 816 | 631 | 562 | 487 | 390 |
| A19 | | 826 | 663 | 525 | 495 | 383 |
| B01 | | 103 | 89 | 62 | 35 | |
| A02 | | 1305 | 1018 | 780 | 674 | 577 |
| B03 | | 1394 | 1030 | 738 | 602 | 454 |
| B05 | 1089 | 649 | 270 | 152 | 126 | |
| B06 | 902 | 378 | 172 | 157 | 95 | |
| A06 | | 879 | 919 | 843 | 750 | 571 |
| A20 | | 1101 | 873 | 597 | 501 | 391 |
| A07 | | 1129 | 965 | 750 | 585 | 415 |
| A08 | | 1213 | 958 | 764 | 656 | 563 |
| A09 | | 1365 | 1170 | 896 | 742 | 600 |

15

Se desarrolló un ensayo de generación de trombina in vitro basándose en la escisión de Z-GGR-AMC para liberar el fluoróforo AMC usando plasma humano normal, es decir el ensayo de generación de trombina de ruta doble definido. La dependencia de factor tisular de generación de trombina pico y tiempo pico de trombina se caracterizó en una composición que contenía una concentración fija de fosfolípido (concretamente 3,2 µM). La dependencia de fosfolípidos se caracterizó en una composición que contenía una concentración fija de factor tisular (concretamente 7,2 pM). El tiempo pico (tiempo hasta generación de trombina pico) dependió de la concentración de fosfolípido o factor tisular. La versión final de este ensayo es como se describe en la descripción específica, en la que se usan 10 µl de reactivo C alto que contiene (fosfolípido 32 µM y factor tisular 71,6 pM) en un volumen total de 100 µl.

20

25

Se realizaron estudios adicionales usando fosfolípidos 3,2 µM y factor tisular 7,2 pM en plasma deficiente en FVIII o con FVIII inhibido, para caracterizar el efecto en la generación de trombina pico y tiempo pico de trombina de diversas preparaciones de factor de coagulación. Estos estudios proporcionaron una base a partir de la que comparar la eficacia de los compuestos en el ensayo. Brevemente, se ensayó rFVIII (Recombinate® FVIII de Baxter) a 0, 5, 10, 20, 40 y 80 mU/ml en plasma deficiente en FVIII. Se ensayó FEIBA a 0, 8, 16, 31, 63 y 125 mU/ml en plasma inhibido para FVIII. Se ensayó FVIIa a 0, 0,1, 0,4, 1,6, 6,3 y 25 nM en plasma con FVIII inhibido. Los resultados se muestran en la Figura 1. Para FVIII recombinante (Recombinate®) en plasma deficiente en FVIII y tanto para FEIBA como para FVIIa en plasma inmunoinhibido para FVIII se observa una mejora dependiente de la

30

concentración de los parámetros de generación de trombina. La trombina pico aumentó y tanto el tiempo de retardo como el tiempo pico de trombina se redujeron.

5 Los compuestos se ensayaron en este ensayo de generación de trombina de ruta doble definido (DDPTGA) usando reactivo C alto (Technoclone) para desencadenar generación de trombina. Los resultados se proporcionan en la tabla posterior. Incluso aunque este ensayo es menos sensible para actividad de tipo FVIII que el ensayo de generación de trombina intrínseco definido (DITGA), varios compuestos poseían actividad detectable.

Tabla 10: resumen de resultados

10

| | | Plasma inhibido para FVIII de DDPTGA | | | | Plasma deficiente en FVIII de DDPTGA | |
|---------|-----------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Péptido | Conc [µM] | Tiempo pico FEIBA EU (mU/ml) | Pico Ila FEIBA EU (mU/ml) | Tiempo pico FVIIa EU (nM) | Pico Ila FVIIa EU (nM) | Tiempo pico FVIII EU (mU/ml) | Pico Ila FVIII EU (mU/ml) |
| A02 | 50 | 10,2 | BLS | 0,4 | BLS | BLS | BLS |

ES 2 739 676 T3

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|
| A03 | 100 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A03 | 50 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A05 | 100 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A05 | 50 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A08 | 50 | 9,1 | BLS | 0,4 | BLS | BLS | BLS |
| A09 | 50 | BLS | 8,6 | BLS | BLS | 27,2 | BLS |
| A09 | 25 | 7,9 | BLS | 0,2 | BLS | 15,6 | BLS |
| A18 | 100 | BLS | BLS | BLS | BLS | 17,1 | BLS |
| A18 | 50 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A01 | 90 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A01 | 50 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A16 | 100 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A16 | 50 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| B03 | 100 | BLS | 12,3 | BLS | 0,6 | 7,5 | 5,3 |
| B03 | 40 | BLS | 7,2 | BLS | 0,2 | 8,7 | 4,8 |
| B04 | 100 | BLS | 13,3 | BLS | 0,7 | 1,6 | 5,0 |
| B04 | 40 | BLS | 12,8 | BLS | 0,6 | 7,3 | 4,8 |
| B04 | 16 | BLS | BLS | BLS | 0,1 | 4,1 | 4,4 |
| A07 | 100 | BLS | BLS | BLS | 0,1 | BLS | BLS |
| A07 | 50 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A15 | 100 | BLS | 13,6 | BLS | 0,7 | 12,7 | 5,0 |
| A15 | 50 | BLS | BLS | BLS | BLS | 14,4 | 4,3 |
| A06 | 100 | BLS | BLS | 0,4 | BLS | BLS | BLS |
| A06 | 50 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A14 | 100 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A14 | 50 | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS | BLS |
| A17 | 100 | BLS | BLS | 0,1 | BLS | 5,9 | BLS |
| A17 | 50 | BLS | BLS | BLS | BLS | 5,1 | BLS |

El "pico IIa" es la cantidad de trombina generada en el pico de la curva de generación de trombina. El "tiempo pico" es el tiempo desde el inicio de la reacción de generación de trombina hasta cuando se genera la cantidad máxima. BLS = por debajo del patrón más bajo.

5

Aún se genera trombina en este ensayo incluso en ausencia de péptido añadido. Por lo tanto, cuando el pico IIa es "BLS" a una concentración de péptido particular, aún hay un pico de trombina, pero es menor que el conseguido por la concentración más baja de patrón, que es FVIII 5 mU/ml, 8 mU/ml de FEIBA o FVII 0,1 nM. De forma similar, cuando el tiempo pico es "BLS", el tiempo hasta la generación de trombina pico es mayor que el tiempo pico obtenido por la concentración más baja de patrón. Un péptido puede tener un efecto significativo en el tiempo pico pero no el pico IIa, o viceversa. Sin embargo, se prefiere que un péptido tenga un efecto tanto en el tiempo pico como en el pico IIa. B03, B04 y A15 afectaron positivamente a ambos aspectos de la generación de trombina. En el caso de algunos péptidos, la dependencia de la concentración de un efecto en la generación de trombina no se vio a alta concentración de péptido, lo que podría explicarse por interacciones no específicas.

10

15

Ejemplo 3: Ensayos de compuestos en ensayos de generación de trombina con varios plasmas empobrecidos

5 El ensayo de generación de trombina in vitro basado en la escisión de Z-GGR-AMC para liberar el fluoróforo AMC, descrito en la descripción específica, es decir el ensayo de generación de trombina de ruta doble definido se usó para caracterizar el efecto de los compuestos en varios plasmas humanos empobrecidos. En estos experimentos, cada reacción de 100 µl contenía 10 µl de reactivo B, que comprende vesículas fosfolipídicas de fosfatidilcolina / fosfatidilserina 80 % / 20 % (3,2 µM) y factor tisular humano recombinante 17,9 pM. 10 µl de dilución de péptido, 40 µl de sustrato de TGA y 40 µl de plasma se usaron como se describe en la descripción específica.

10 Los plasmas usados en los experimentos fueron congelados nuevos y eran deficientes en factor V, factor VII / VIIa, factor VIII, factor X o factor XI (George King Bio-Medical, Inc.). Los niveles de factor de coagulación residual de plasmas deficientes se especificaron como menos del 1 %.

15 Para cada plasma empobrecido usado en los experimentos, los compuestos se ensayaron a dos concentraciones, concretamente 50 µM y 80, 90 o 100 µM. Se usó un control negativo, en el que no se incluyó ningún compuesto de ensayo. Los resultados se resumen en la tabla posterior.

20 Tabla 11: Sumario de resultados del efecto de compuestos en la generación de trombina en diversos plasmas empobrecidos

| Plasma empobrecido | Compuestos | | | | | | | | |
|--------------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Control | A01 | A02 | A05 | B03 | A06 | A07 | A08 | A09 |
| FV | - | - | - | - | - | + | - | | - |
| FVII | - | + | + | + | + | + | + | | + |
| FVIII | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| FX | - | - | + | + | + | + | + | | + |
| FXI | - | + | + | + | + | + | + | | + |

Estimulación de generación de trombina: "+" significa que estimula; "-" significa que no estimula. En experimentos de control, no se incluyó péptido.

25 Todos los plasmas empobrecidos ensayados mostraron ninguna o muy poca generación de trombina en ausencia de péptidos, lo que indica que a la concentración de factor tisular usada la interacción de todos los factores de coagulación es importante para la generación de trombina. Varios péptidos estimularon la generación de trombina en todos los plasmas empobrecidos para zimógeno (FVII, FX o FXI) mientras que la generación de trombina en plasmas empobrecidos para FV es baja, lo que indica que la ruta común es importante para la generación de trombina estimulada por péptido.

30 Ejemplo 4: actividad de compuestos en ensayo de deposición de fibrina definido

35 Se ensayaron diversos péptidos con respecto a la capacidad para estimular la deposición de fibrinas en ensayo de deposición de fibrina definido como se describe en la descripción específica. Los resultados se muestran en la tabla posterior.

Tabla 12: caracterización de compuestos en el ensayo de deposición de fibrina definido

| Compuesto | Concentración (µM) | FEIBA EU (mU/ml) |
|-----------|--------------------|------------------|
| A01 | 100 | 145 |
| A01 | 50 | 127 |
| A01 | 25 | 80 |
| B01 | 100 | 94 |

| | | |
|-----|------|-----|
| B01 | 50 | 47 |
| B01 | 25 | 31 |
| A05 | 50 | 219 |
| A05 | 25 | 193 |
| A05 | 10 | 119 |
| B03 | 25 | 325 |
| B03 | 12,5 | 291 |
| B03 | 6,3 | 264 |
| A06 | 25 | 168 |
| A06 | 12,5 | 232 |
| A06 | 6,3 | 251 |
| A07 | 50 | 199 |
| A07 | 25 | 246 |
| A07 | 12,5 | 268 |

5 Todos los compuestos de ensayo acortaron el tiempo de coagulación y formación de fibrina de plasma con FVIII inhibido. En combinación con los experimentos de generación de trombina esto confirma las actividades 5 procoagulantes de los compuestos de ensayo. La mayoría de los compuestos actuaron de una manera dependiente de la concentración, aunque un número pequeño tuvo actividad reducida a mayores concentraciones, lo que puede deberse a interacciones no específicas.

10 Ejemplo 5: ensayos in vitro para la caracterización de compuestos

Los compuestos se caracterizan no solamente con respecto a actividad en los ensayos de generación de trombina sino también con respecto a farmacocinética, solubilidad, inhibición de HERG y peso molecular.

15 Estudios farmacocinéticos (PK)

Se requieren estudios PK para el diseño e interpretación de estudios de eficacia in vivo. En esta categoría se incluye unión a proteína de plasma, estabilidad en plasma y estabilidad microsómica.

20 1. Unión a proteína en plasma

25 El alcance de la unión del compuesto con plasma humano (Bioreclamation, Hicksville, NY), plasma de ratón (Lampire Laboratory, Pipersville, PA) o albúmina de suero de ratón (Sigma, St. Louis, MO), referidos como matrices, se determinó en un sistema de bloque de diálisis en microequilibrio de 96 pocillos (HDT-96; HTDialysis, LLC, Gales Ferry, CT). Brevemente, cada unidad del sistema comprende una cámara donante y una cámara receptora separadas por una membrana semipermeable. El principio del experimento es que las proteínas (y compuesto que 20 se une a las proteínas) se conservan en la cámara donantes y no pueden cruzar la membrana. El compuesto libre puede difundir entre ambas cámaras a través de la membrana a y alcanza el equilibrio durante el experimento. En estos experimentos, la membrana semipermeable se preparó a partir de celulosa regenerada y tuvo un punto de corte de peso molecular de 12-14 kD (cat. n.º 1101, HTDialysis, ILc).

30 Se incluyó un cóctel de inhibidores de proteasa (P2714-1 BTL), obtenido de Sigma, en el ensayo para inhibir la 25 proteólisis de compuestos de ensayo. Se preparó nuevo en solución de reserva 50x en agua destilada. Se preparó nueva albúmina de suero de ratón en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 40 g/l. La PBS se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA), y se ajustó a un pH de 7,4 antes de su uso. Los plasmas se usaron sin dilución. La

solución de reserva de inhibidor de proteasa se añadió a cada matriz (es decir albúmina de suero de ratón en PBS) a una concentración final 1 x. se prepararon soluciones de reserva de cada compuesto de ensayo en DMSO con el compuesto de control, warfarina. Se incluyó warfarina, que es un compuesto de alta unión a proteína, en cada solución de reserva para asegurar la integridad de la membrana durante el experimento. Se añadió una alícuota de la solución de reserva a cada matriz para producir una concentración final de 5 µM del compuesto de ensayo y 10 µM de warfarina. La concentración final de DMSO fue de 0,72 % (v/v). La dilución de las matrices mediante la adición de los dos componentes fue insignificante (menos de 4 %). Las tiras de membrana se hidrataron en agua destilada durante 1 hora; la membrana se empapó en solución acuosa de etanol 30 % durante 20 minutos, y después se aclaró la membrana dos veces con agua destilada. Después del aclarado, la membrana se colocó en PBS y estaba lista para su uso. El ensamblaje del bloque de diálisis siguió el protocolo del fabricante. Después del ensamblaje, se añadió una alícuota de 150 µl de cada matriz / compuesto de ensayo a una cámara donante separada y se añadieron 150 µl de PBS a la cámara receptora correspondiente en el otro lado de la membrana. El resto de cada matriz / compuesto de ensayo se almacena a -80 °C para análisis adicional. Las concentraciones de los compuestos de ensayo y warfarina en estas matrices se midió y los valores se usaron en los cálculos de recuperación. El bloque de diálisis de 96 pocillos se colocó después en un balancín caliente, cerrado, que se precalentó a 37 °C, y se permitió que se incubara durante 6 horas. Después de la incubación, se tomaron muestras de ambos lados. Las concentraciones de los compuestos de ensayo, así como warfarina, se midieron por análisis de CL/EM/EM.

La recuperación y los valores de unión a proteína se calcularon de la siguiente manera:

$$\% \text{ recuperación} = [(\text{conc. en donante} + \text{conc. en receptor}) / (\text{conc. medida en matriz})] \times 100 \% (1)$$

$$\% \text{ unido} = [(\text{conc. en donante} - \text{conc. en receptor}) / (\text{conc. en donante})] \times 100 \% (2)$$

El “% de recuperación” es una medida de cuánto del compuesto añadido a la matriz es recuperable de las cámaras donante y receptora. Cuando la recuperación es menor de 100 %, una proporción del compuesto puede haberse unido a la membrana o las superficies de plástico de las cámaras o puede haberse degradado. El “% unido” es una medida de cuánto del compuesto se ha unido a la matriz y es por tanto incapaz de equilibrar entre las cámaras donante y receptora.

Los resultados se muestran con respecto a A01 y warfarina (control) en las tablas posteriores.

Tabla 13: Unión a proteína de A01 en matrices ensayadas

| Matriz | Conc. A01 en matriz (µM) | Concentraciones de receptor (µM) | | | Concentraciones de donante (µM) | | | % promedio unido | % promedio de recuperación |
|----------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------|--------|---------------------------------|-------|-------|------------------|----------------------------|
| | | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | | |
| Plasma humano | 1,69 | <0,025 | <0,025 | <0,025 | 1,47 | 1,57 | 1,45 | >98,3 | >88,6 |
| Plasma de ratón | 4,48 | <0,025 | <0,025 | <0,025 | 3,18 | 3,43 | 3,24 | >99,2 | >73,3 |
| Albúmina de suero de ratón | 1,42 | <0,005 | <0,005 | <0,005 | 1,50 | 1,43 | 1,47 | >99,7 | >103 |

Tabla 14: Unión a proteína de warfarina en matrices ensayadas

| Matriz | Conc. De warfarina en matriz (μM) | Concentraciones de receptor (μM) | | | Concentraciones de donante (μM) | | | % promedio unido (DT) | % promedio de recuperación (DT) |
|----------------------------|--|---|--------|--------|--|-------|-------|-----------------------|---------------------------------|
| | | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | | |
| Plasma humano | 9,88 | 0,0749 | 0,0765 | 0,0791 | 9,86 | 9,43 | 9,91 | 99,2 (0,03) | 99,3 (2,68) |
| Plasma de ratón | 10,1 | 0,457 | 0,403 | 0,400 | 8,37 | 8,72 | 8,50 | 95,1 (0,462) | 88,6 (1,53) |
| Albúmina de suero de ratón | 9,61 | 0,365 | 0,354 | 0,347 | 9,78 | 9,14 | 8,34 | 96,1 (0,218) | 98,3 (7,60) |

2. Estabilidad en plasma

5 La semivida de los compuestos en plasma humano o de ratón, o el porcentaje de compuesto restante después de una incubación en plasma humano o de ratón, se determina de la siguiente manera. En el procedimiento experimental, las concentraciones de compuestos de ensayo son 5 μM , preparadas a partir de soluciones de reserva de compuesto de ensayo de 10 mM en DMSO. Se usa propantelina como un patrón. Para preparar muestras de ensayo, se prepara una dilución 1/20 de la solución de reserva del compuesto de ensayo en DMSO en acetonitrilo 50 %/H₂O 50 %, y después esta se diluye 1/100 en plasma precalentado (37 °C) (5 μl de compuesto [dilución 1/20] + 495 μl de plasma) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. El compuesto patrón propantelina 2 mM se diluye 1/4 en DMSO y posteriormente 1/100 en plasma precalentado (5 μl de compuesto [dilución 1/4] + 495 μl de plasma) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Todas las muestras se incuban en un baño de agua a 37 °C. Se añaden 500 μl de acetonitrilo inmediatamente después de haberse mezclado los compuestos, o el patrón de propantelina, con plasma (designado como t = 0 min). Después de una duración de incubación seleccionada (generalmente a t = 60 min) cada muestra se mezcla con 500 μl de acetonitrilo adicionales. Las muestras se mezclan en un mezclador vorticial durante 30 s y se colocan en hielo durante 10 min y se recogen para centrifugación. Las muestras se centrifugan a 20.000 g durante 10 min a 4 °C. Se transfieren 500 μl de sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 ml nuevo y se añade un volumen igual de acetonitrilo. La muestra se mezcla de nuevo durante 30 s usando un mezclador vorticial. Después de una segunda etapa de centrifugación (20.000 g, 10 min, 4 °C) se transfieren 250 μl de sobrenadante a viales de vidrio de HPLC para análisis de HPLC-EM. Las condiciones para realizar HPLC son las siguientes: el volumen de inyección se ajusta a 20 μl . La temperatura se ajusta a 25 °C. Se aplica un gradiente lineal de agua:acetonitrilo 95:5 a 5:95 que contienen ambos ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 % (v/v) a un caudal de 0,3 ml/min durante 10 min. El detector de PDA se explora a partir de 210-400 nm. La trampa iónica se equipa con una fuente de ESI con temperatura a 280 °C, se realiza exploración de masa en modo de exploración completa a partir de 50-2000 una seguido de experimento de MS² de exclusión dinámica con energía de colisión de 1,5 V (105 como recuento min. de ion parental). Se calcula porcentaje de estabilidad a partir de la relación de área bajo la curva (ABC) que supervisa el ion de masa molecular protonado del compuesto diana en la corriente de ion total (tic) en modo de exploración completa a 60 min de tiempo de incubación (o tiempo de elección) frente a 0 min de tiempo de incubación.

30 Los resultados se muestran en la tabla posterior. Las reducciones en la concentración del compuesto a lo largo del tiempo podrían deberse a degradación proteolítica y/o modificación química.

Tabla 15: estabilidad en plasma de los compuestos

35

| Péptido | % restante en plasma humano (30 min) |
|---------|--------------------------------------|
| A01 | 58 |
| A19 | 99 |
| A07 | 117 |
| A20 | 95 |
| A06 | 98 |
| A02 | 84 |
| A03 | 92 |
| A08 | 70 |
| A09 | 67 |
| B07 | 89 |
| B06 | 93 |
| B05 | 112 |
| A05 | 93 |

3. Estabilidad microsómica

- 5 Se usaron ensayos para determinar la estabilidad de compuestos en preparaciones microsómicas de origen humano o animal. La estabilidad microsómica se mide en ensayos proporcionados por Cerep (Francia, catalogo ref. 900-8h) o mediante el protocolo descrito posteriormente. Se preparan soluciones de compuesto de 10 mM/5 mM (compuesto de ensayo, patrones verapamilo, imipramina y terfenadina) en DMSO 100%. Se diluyen mediante H₂O
- 10 DMSO (v/v) en la mezcla final. La mezcla maestra para el ensayo de estabilidad se prepara en un tubo Falcon de 10 ml (volumen total 4,4 ml); 3.414 µl de agua destilada, 440 µl de tampón de NaPO₄ 500 mM pH 7,4, 440 µl de NADP (10 mM), 22 µl de Glc-6-P (1 M), 17,6 µl de Glc-6-P-DH de una solución 1 U/ml, 66 µl de microsomas de hígado (rata o ratón, concentración final en el ensayo 300 µg/ml). La mezcla maestra se preincuba a 37 °C durante 10 minutos en el baño de agua. Se añaden 5 µl de solución del compuesto 60 µM por pocillo en una placa en U de 96 pocillos (PP-Nunc) junto con 300 µl de mezcla de reacción (mezcla maestra preincubada). Todos los pocillos deben mezclarse
- 15 cuidadosamente para asegurar una suspensión homogénea antes de las siguientes etapas. Se toman muestras de 75 µl (duplicados) a t = 0 minutos para cada compuesto. La placa se sella y se devuelve al baño de agua/termomezclador durante 30 minutos. Los compuestos de ensayo / patrones se extraen mediante la adición de 200 µl de metanol, incluyendo también un patrón interno. El patrón interno es "Pep770" (Jerini AG, Berlín, Alemania) y se usa a una concentración final de 6,25 ng/ml. Las muestras se centrifugan a 1.300 g durante 10 min a 4 °C. Se transfieren 200 µl de sobrenadante a una placa de 96 pocillos con 10 µl de DMSO por pocillo. La estabilidad del compuesto se mide por análisis de HPLC-EM (por triplicado). Se repite el mismo procedimiento después de 30 min. Se calcula la relación de la media "ABC t = 0 min" y "ABC t = 30 min" y se determina el porcentaje de la cantidad de compuesto restante después de 30 min. La relación de señal con respecto al ruido para todos los picos debe ser de
- 20 5:1 o mejor. Debe usarse la relación ABC_{analito} : ABC_{patrón} en los diferentes puntos temporales. La estabilidad calculada para el compuesto de control debe quedar en un cierto intervalo para validar el ensayo.

Los resultados se muestran en la tabla posterior.

- 30 Tabla 16: estabilidad de compuestos en microsomas de ratón

| Péptido | Estabilidad después de 30 min [%], duplicados |
|----------------|---|
| A01 | 27 / 32 |
| A02 | 44 / 45 |
| A06 | 51 / 47 |
| A07 | 39 / 28 |
| A09 | 22 / 23 |
| Terfenadina | 63 / 68 |

Solubilidad

5 La solubilidad acuosa se mide en PBS a pH 7,4 en un ensayo proporcionado por Cerep (Francia, catálogo ref. 900-11a) o de acuerdo con el siguiente protocolo. El objetivo de este procedimiento es determinar la solubilidad de un candidato farmacológico (analito) en un tampón, estimando la concentración de saturación del candidato en el tampón usando HPLC. Se usa una concentración conocida del candidato en un disolvente orgánico como patrón. Debe prepararse como la etapa inicial una solución de reserva del compuesto de ensayo en DMSO. Dependiendo de la solubilidad máxima del compuesto, debería alcanzarse una concentración de 50 mM en DMSO. Se diluyen soluciones de reserva de DMSO hasta una concentración final de 50 μ M con DMSO (solución de referencia 100 %) y tampón (solución de ensayo) para proporcionar un volumen mínimo de 500 μ l de cada uno. Ambas soluciones se agitan a 25 °C a 950 r.p.m. en un “termomezclador confort” Eppendorf durante al menos 60 min. La suspensión se centrifuga a 22.330 g durante al menos dos min y se transfieren 100 μ l de sobrenadante a insertos de polipropileno colocados en viales de vidrio y cerrados por tapones de anillo de retención. Como alternativa las soluciones pueden prepararse en placas de microtitulación con la mitad del volumen de disolvente de partida previamente descrito. Para la determinación de la solubilidad todas las muestras se analizan mediante HPLC por triplicado. El volumen de inyección es de al menos 10 μ l. Los datos obtenidos se analizan mediante “Chemstation-software” (Agilent, Waldbronn, Alemania). Los picos de los análisis de las soluciones orgánicas se integran y la media aritmética se indica como “ABC 1” (área de referencia de cantidad conocida inyectada en el HPLC). El mismo procedimiento se aplica a los espectros obtenidos de los análisis de la solución de tampón para proporcionar “ABC 2” (área de la cantidad desconocida de compuesto disuelto en tampón). En general la ABC debe ser mayor de 20 unidades de área y la relación se señal con respecto a ruido (altura del pico) debe ser mayor de 3. Se calcula la relación de la media “ABC 2” y “ABC 1” y de este modo se obtiene el porcentaje de la cantidad disuelta de compuesto en tampón y la solubilidad puede indicarse en μ M.

Los resultados se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 17: solubilidad de compuestos en PBS

| Compuestos | Solubilidad en PBS [μM] |
|-------------------|---|
| A09 | 63 |
| B03 | 114 |
| B07 | 195 |
| B06 | 48 |

| | |
|-----|-------|
| B05 | 174 |
| A01 | 9 |
| A08 | 11 |
| A05 | 6 |
| A19 | 14 |
| A07 | 165 |
| A20 | 166 |
| A06 | 164 |
| A02 | 35 |
| A03 | 110 |
| A16 | > 200 |

Inhibición de HERG

- 5 La prolongación de QT se evalúa por inhibición de HERG medida por técnicas de pinzamiento zonal o salida de Rb⁺.

El procedimiento de salida de Rb⁺ (Cerep, Francia, catálogo Ref. 900-RGB) se usa para exploración inicial. Para el ensayo de salida de Rb⁺, el compuesto de referencia (Astemizol) se ensayó simultáneamente con los compuestos de ensayo para evaluar la conveniencia del ensayo. Se ensayó a 10 μM y los datos se compararon con valores históricos determinados en Cerep.

10 Para caracterización rigurosa de la inhibición de HERG se aplica el ensayo de pinzamiento zonal (Cerep, Francia, catálogo ref. 900-36). El sistema de clasificación de potencias general se adopta de Roche y col., 2002, Chem Bio Chem 3: 455-459. Para asegurar que no se ha producido ningún cambio en la sensibilidad del ensayo, los experimentos separados realizados en el mismo lote (clon) de células usando E-4031 10 nM (Wako, cat. n.º 05206523) produjeron resultados (56,7 ± 1,8 % de inhibición, media ± ETM, n = 3) comparables con los datos obtenidos históricamente (inhibición de 58,4 ± 2,0 %, media ± ETM, n = 3) en Cerep. Los compuestos de ensayo (soluciones de reserva 10 μM) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Las soluciones a 1 μM contenían DMSO 0,01 %. Las soluciones de baño que contienen hasta DMSO 1 % no tienen efecto significativo en las corrientes de cola codificadas por HERG.

15 La exploración de varios compuestos por el método de salida de Rb⁺ a 10 μM no indicó ninguna inhibición de la actividad del canal de HERG. Los compuestos de ensayo de pinzamiento zonal más sensibles A01, A05 y A16 pueden clasificarse como bloqueadores del canal de HERG de baja potencia mientras que B03 se identificó como un bloqueador del canal de HERG de alta potencia. Se proporcionan resultados en la tabla posterior.

25 Tabla 18: resultados de inhibición de HERG

| Compuesto | Pinzamiento zonal de inhibición de HERG (% de inhibición de corriente de cola a 1 μM) | Salida de Rb ⁺ por inhibición de HERG (% de inhibición a 10 μM) |
|-----------|---|--|
| A01 | 16,5 | |
| A02 | | -3,3 |
| A05 | 14,5 | |
| B03 | 84,5 | -2,1 |
| A06 | | -6,4 |
| A07 | | -3,4 |
| A09 | | -1,6 |
| A16 | 22,2 | |
| Astemizol | | 73,5 |

30 Peso molecular

El peso molecular se define como la masa teórica de la molécula monomérica exclusiva de cualquier contraión o aducto. Los pesos moleculares de los compuestos se indican en la tabla a continuación.

35 Tabla 19: pesos moleculares de los compuestos

| Compuesto | Peso molecular (g/mol) |
|-----------|------------------------|
| A09 | 2175 |
| B03 | 1439 |
| B07 | 1423 |
| B06 | 1849 |
| B05 | 1763 |
| A01 | 2087 |
| A08 | 2175 |
| A05 | 1311 |
| A19 | 1410 |
| A07 | 1743 |
| A20 | 1742 |
| A06 | 1741 |
| A02 | 2028 |
| A03 | 2074 |
| A16 | 2087 |

Ejemplo 6: ADME-Tox

5 Se realizaron diversos análisis de ADME-Tox de diversos compuestos como se ha descrito en el ejemplo 5. Se muestra el sumario de resultados en la tabla a continuación.

Tabla 20: sumario de datos de ADME-Tox

| | A01 | A02 | A05 | B03 | A06 | A07 | A09 | A16 | A17 |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Solubilidad acuosa | 9 | 35 | 6 | 114 | 164 | 165 | 63 | 220 | 2000 |
| Estabilidad proteolítica (humana) | 58 | 84 | 94 | | 98 | 117 | 67 | | |
| Estabilidad microsómica | 30 | 45 | | | 49 | 34 | 23 | | |
| Canal de HERG | 17 | | 15 | 85 | | | | 22 | |

15 Brevemente, se ensayó la solubilidad acuosa en PBS pH 7,4. Los resultados se proporcionan en μM . La estabilidad proteolítica se ensayó en plasma humano durante 30 minutos. Los resultados para cada uno se proporcionan como un % de estabilidad. Se ensayó la estabilidad microsómica en una preparación microsómica de ratón durante 30 minutos. Los resultados se proporcionan como un % de estabilidad. Se ensayó la inhibición del canal de HERG usando el método de pinzamiento zonal en el que el péptido o derivado peptídico a $1 \mu\text{M}$ se proporciona como % de inhibición.

20 Ejemplo 7: modelos animales

Los siguientes ensayos se realizan en animales.

25 1. Toxicología aguda

Los estudios toxicológicos implicaban supervisión de cambios en la actitud debido a efectos tóxicos inmediatamente después de la aplicación y dos veces al día; supervisión del peso corporal; histopatología del cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón. Se realizaron experimentos en ratones C57Bl/6.

30 2. Farmacocinética

Se ensayó la farmacocinética de los compuestos en ratones C57Bl/6 o ratas Wistar a 1 - 30 mg/kg. Se supervisaron las concentraciones de compuesto en el torrente sanguíneo a intervalos apropiados usando CL-EM.

5 3. Análisis de circulación

Se supervisó la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca y se tomó un electrocardiograma en

10 4. Modelo de enfermedad animal

Se usó un modelo de corte de la cola en ratones FVIII -/- (E17), ratones FIX -/- y ratones de 5 parámetros cuantificados fueron pérdida de sangre total, tiempo de hemorragia, velocidad supervivencia.

15 Ejemplo 8: toxicología aguda

15 Se administraron a ratones C57Bl/6 que pesaban 18-20 g compuestos en un vehículo adecuado i.v. en la vena de la cola o i.p. o s.c. a 10 ml/kg. Las cantidades de los compuestos administrados estuvieron en el intervalo de 0,075 a 125 mg/kg (i.v.), 15-125 mg/kg (i.p.) y 125 mg/kg (s.c.). Hubo cuatro ratones por grupo. Se supervisaron los cambios de actitud debido a efectos tóxicos inmediatamente después de la administración del compuesto y durante 60 minutos a continuación. Se supervisó el peso corporal durante cinco días después de la administración. El día 5 después de la administración, los ratones se sacrificaron y se realizó una autopsia. Se tomaron biopsias del cerebro, corazón, riñón, pulmón, hígado y bazo. Los resultados se describen a continuación.

20 Tabla 21: cambios de actitud debido a efectos tóxicos en diferentes dosis de compuesto

25

| Compuesto | Vía | Dosis máxima (mg/kg) dentro de la categoría de toxicidad | | |
|-----------|------|--|-------------------|-----------------|
| | | Sin toxicidad detectada | Algo de toxicidad | Toxicidad grave |
| A01 | i.v. | 20 | | |
| | i.p. | 20 | | |
| A02 | i.v. | 25 | | |
| | i.p. | 25 | | |
| A05 | i.v. | | 1,5 | 15 |
| | i.p. | 15 | | |
| B03 | i.v. | 1,5 | | 15 |
| | i.p. | 15 | | |
| A06 | i.v. | 1 | 5 | 25 |
| | i.p. | 25 | | |
| A07 | i.v. | 1 | 5 | 25 |
| | i.p. | 25 | | |
| A09 | i.v. | 15 | | |
| | i.p. | 15 | | |
| A16 | i.v. | 82 | | |
| | i.p. | 82 | | |
| A17 | i.v. | 125 | | |
| | i.p. | 125 | | |
| | s.c. | 125 | | |

5 En la tabla anterior, se indica la dosis máxima ensayada que da lugar a ausencia de toxicidad detectada, alguna toxicidad o toxicidad grave durante el periodo de 60 minutos después de la administración. La “ausencia de toxicidad detectada” indica que no hay observaciones tóxicas agudas. “Algo de toxicidad” indica que se ha registrado ataxia o catalepsia, pero no murió ningún animal. La “toxicidad grave” indica que uno de los animales murió en un periodo de una hora desde la aplicación del compuesto.

10 En resumen, la mayoría de los compuestos se toleraron bien. Las dosis de compuestos que dieron como resultado toxicidad grave cuando se administraron por una vía particular no se ensayaron en farmacocinética, análisis de circulación o modelos de enfermedad animal por esa vía.

15 Para la mayoría de los compuestos, incluso a la mayor dosis, no se observó ningún hallazgo patológico macroscópico en muestras de biopsia recogidas a los cinco días de ratones supervivientes, lo que indica que los compuestos se toleraron bien. Los únicos cambios patológicos identificados en cualquier animal fueron anomalías menores en el hígado, riñón, pulmón o corazón. Estas fueron observaciones espontáneas en animales individuales probablemente debido a infecciones menores no relacionadas con el compuesto o debido al sacrificio.

20 Para cada compuesto ensayado, no se observó ningún efecto en el peso corporal promedio de ratones supervivientes, lo que indica una respuesta negativa.

Ejemplo 9: Farmacocinética de compuestos

Se analizaron estudios farmacocinéticos para supervisar las concentraciones de compuesto en plasma después de

administración i.v., i.p. o s.c. Se realizaron estudios en ratones C57Bl/6 que pesaban aproximadamente 20 g.

5 Para cada péptido, se usaron las mismas formulaciones para todas las vías de administración y fueron las siguientes: A01 se formuló en DMSO 5 %, Cremophor EL 5 % (Sigma-Aldrich), Tween 80 0,5 %; A02 y A09 se formularon cada uno en DMSO 5 %, PEG 400 (polietilenglicol) 30 %, fosfato sódico 50 mM pH 7,4; A05 se formuló en DMSO 5 %, glicina 20 nM pH 9,0; A06 y A07 se formularon cada uno en DMSO 5 %, NaCl 0,9 %, fosfato sódico 50 mM pH 7,4.

10 Se analizaron las concentraciones de péptidos en el plasma mediante HPLC-EM en una HPLC Surveyor combinada con espectrómetro de masas LCQ clásico o Advantage (todos de Thermo Electron, Estados Unidos) equipado con una fuente de ESI. Todos los experimentos de HPLC se llevaron a cabo en una columna Phenomenex C-18 Luna (50 mm x 2,0 mm, 5 µl de volumen de inyección) usando un gradiente lineal: eluyente A ácido trifluoroacético (TFA) 0,05% en agua; eluyente B TFA 0,05% en acetonitrilo; caudal 0,3 ml/min en 10min. Los espectros UV se registraron mediante el PDA de 220 a 400 nm. El patrón interno se prepara como una solución de 0,1 µg/ml en metanol 100 %.

15 Se mezclan 50 µl de plasma y 50 µl de patrón interno. Se añaden 100 µl de metanol y se mezclan exhaustivamente. Después de 30 min de incubación en hielo el vial se centrifuga durante 15 min a 4 °C (20.820 g). Se transfieren 150 µl del sobrenadante al vial de HPLC.

20 Se muestran resultados después de la administración i.v. o i.p. en la tabla posterior. Brevemente, la eliminación de péptido del plasma después de administración i.v. siguió un ciclo aproximadamente logarítmico. Después de la administración i.p., se alcanzó C_{máx} a entre 40 y 60 minutos. Después se continuó con una reducción en la concentración de compuesto. Este perfil es típico para administración i.p. o s.c.

25 Tabla 22: datos obtenidos en análisis farmacocinéticos

| | Concentración del péptido en plasma (µg/ml) a intervalos temporales después de la administración | | | | | |
|------------|---|--------|--------|--------|--------|-------|
| [min] i.v. | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
| A01 | 0,673 | 0,352 | 0,454 | 0,145 | 0,282 | 0,115 |
| A02 | 11,625 | 7,260 | 3,182 | 2,738 | 1,436 | 1,308 |
| A05 | 2,605 | 2,039 | 0,173 | 0,101 | 0,023 | - |
| A06 | 49,963 | 32,610 | 20,981 | 15,593 | 11,267 | 7,787 |
| A07 | 12,512 | 7,796 | 5,482 | 2,132 | 3,309 | 2,218 |
| A09 | 0,350 | 0,184 | 0,109 | 0,119 | 0,064 | 0,080 |
| [min] i.p. | 5 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| A02 | 0,273 | 0,315 | 0,289 | 0,612 | 0,099 | 0,176 |
| A05 | 0,119 | 0,165 | 0,185 | 0,130 | 0,049 | 0,050 |
| A06 | 6,442 | 7,773 | 0,547 | 5,800 | 4,057 | 3,024 |
| A07 | 2,444 | 2,627 | 3,180 | 3,869 | 2,202 | 1,678 |
| A09 | 0,034 | 0,067 | 0,060 | 0,129 | 0,074 | 0,068 |

Ejemplo 10: análisis de circulación después de la administración de A01

30 Se supervisó la presión sanguínea arterial media y la frecuencia cardiaca y se tomó un electrocardiograma en tres grupos de tres ratones macho y tres ratones hembra C57Bl/6, que pesaban cada uno aproximadamente 20 g. los grupos se asignaron a "control" que recibía NaCl 10 ml/kg i.v.; "vehículo" que recibía 10ml/kg i.v.; o "compuesto" que recibía A01 en vehículo a 20 mg/kg i.v. "Vehículo" fue DMSO 5 %, Cremophor EL (Sigma-Aldrich) 5 %, Tween 80 0,05 % en agua para inyección.

Para cada ratón, se fijó un catéter cargado con solución salina / heparina a la aorta carótida. El catéter se unió mediante un transductor a un módulo de presión sanguínea Plugsys (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, Alemania (HSE)). Se implantaron electrodos de ECG s.c. y se unieron mediante un módulo de ECG Plugsys (HSE) a un PC. La frecuencia cardíaca se calculó a partir del ECG. Después de un periodo de al menos diez minutos para estabilizar los parámetros en circulación, se administró solución salina, vehículo o compuesto según fue apropiado mediante un catéter conectado a la vena yugular. Los parámetros de circulación se supervisaron y registraron durante 60 minutos después de la administración. Para cada animal, el ciclo temporal en presión sanguínea arterial media y frecuencia cardíaca dentro del periodo de observación después de la administración del fármaco del estudio se estimó usando el área bajo la curva (ABC) usando la regla trapezoidal lineal. Las ABC individuales (A01 20 mg/kg i.v.) se compararon con las de vehículo (10 ml/kg i.v.) y solución salina (10 ml/kg i.v.). La hipótesis nula (sin diferencias entre el compuesto y el vehículo o solución salina) se evaluaron usando el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon exacto. Se calcularon p-valores de dos lados no ajustados y ajustados para múltiples comparaciones. Se realizó ajuste con respecto a multiplicidad usando el procedimiento de Bonferroni-Holm. El nivel de significación se ajustó a 5 %. Todos los análisis estadísticos se realizaron con R versión 2.4.0. La hipótesis nula de ausencia de diferencia se ensayó frente a la alternativa de dos lados. Los resultados se muestran en la tabla posterior.

Tabla 23: resultados estadísticos de análisis de circulación

| Parámetro | Comparación | P-valor de dos lados no ajustado | P-valor de dos lados ajustado |
|---------------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| PS arterial media | A01 frente a solución salina | 0,5887 | 1,0000 |
| | A01 frente a vehículo | 1,0000 | 1,0000 |
| Frecuencia cardíaca | A01 frente a solución salina | 0,6991 | 0,6991 |
| | A01 frente a vehículo | 0,2403 | 0,4805 |

No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa (al nivel de 5 %) en ABC de presión sanguínea arterial media en un periodo de 60 min después de la administración de fármaco del estudio entre A01 20 mg/kg i.v. y solución salina 10 ml/kg i.v. así como entre A01 20 mg/kg i.v. y vehículo 10 ml/kg i.v. No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa (al nivel de 5 %) en ABC en frecuencia cardíaca en un periodo de 60 min después de la administración de fármaco del estudio entre A01 20 mg/kg i.v. y solución salina 10 ml/kg i.v. así como entre A01 20 mg/kg i.v. y vehículo 10 ml/kg i.v.

Ejemplo 11: modelo de enfermedad animal - experimentos de control

Se realizaron experimentos para desarrollar un ensayo de corte de la cola de ratón para caracterizar los parámetros de hemorragia en ratones C57Bl/6 FVIII (E17)-/-, FIX-/- (Lin HF Blood 1997; 90: 3962-6) y de tipo silvestre y su respuesta a preparaciones de factores de coagulación.

Las preparaciones de factores de coagulación ensayadas fueron Advate® e Immunine®. Advate® es una preparación de rFVIII (Baxter AG, Austria). Immunine es una preparación de FIX en plasma purificada (Baxter AG, Austria).

Se supervisó la pérdida de sangre en el ensayo de corte de la cola como se describe en la descripción específica durante 62 minutos después del corte de la cola. Se administró a ratones FVIII -/- rFVIII (Advate®) a 25, 50 o 100 U/kg i.v. o solamente vehículo. El vehículo fue tampón de formulación de Advate que es manitol 38 mg/ml, trehalosa 10 mg/ml, sodio 108mEq./l, histidina 12 mM, Tris 12 mM, calcio 1,9 mM, polisorbato 80 0,17 mg/ml, glutatión 0,1 mg/ml. Como control, se administró a ratones C57Bl/6 solamente vehículo. La administración de rFVIII dio como resultado una reducción dependiente de la dosis de pérdida de sangre durante los 62 minutos. Se muestran datos de supervivencia para el experimento en la tabla posterior.

Tabla 24: supervivencia de ratones FVIII -/- tratados con Advate® FVIII en el experimento de corte de la cola

| | Dosis (U/kg) | Animales (n) | Supervivencia (%) 2 horas | Supervivencia (%) 4 horas | Supervivencia (%) 24 horas | Supervivencia (%) 48 horas |
|----------|---------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Advate | 100 | 10 | 100 | 90 | 90 | 90 |
| Advate | 50 | 10 | 100 | 100 | 90 | 90 |
| Advate | 25 | 10 | 100 | 100 | 90 | 90 |
| Vehículo | - | 10 | 70 | 50 | 50 | 50 |
| C57Bl/6 | - | 16 | 100 | 100 | 100 | 100 |

5 Se supervisó la pérdida de sangre durante 62 minutos después del corte de la cola de ratones FIX -/- a los que se administró Immunine® FIX a 50, 100 o 200 U/kg i.v. o solamente vehículo. Como control, se administró a ratones C57Bl/6 solamente vehículo. La administración de FIX dio como resultado una reducción dependiente de la dosis de pérdida de sangre durante los 62 minutos. Se muestran datos de supervivencia para el experimento en la tabla posterior.

Tabla 25: supervivencia de ratones FIX -/- con Immunine® FIX en experimento de corte de la cola

| | Dosis (U/kg) | Animales (n) | Supervivencia (%) 2 horas | Supervivencia (%) 4 horas | Supervivencia (%) 24 horas | Supervivencia (%) 48 horas |
|----------|---------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Immunine | 200 | 16 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Immunine | 100 | 16 | 100 | 100 | 94 | 94 |
| Immunine | 50 | 16 | 94 | 69 | 63 | 63 |
| Vehículo | - | 16 | 44 | 19 | 6 | 0 |
| C57Bl/6 | - | 16 | 100 | 100 | 100 | 100 |

10 Los datos muestran que en el modelo FVIII -/-, FVIII Advate® a 25-100 U/kg mejora de forma dependiente de la dosis los parámetros de hemorragia y la supervivencia. En el modelo de FIX -/-, FIX Immunine® a 50-200 U/kg mejora de forma dependiente de la dosis los parámetros de hemorragia y la supervivencia. Por lo tanto, el modelo de FVIII -/- es un modelo apropiado para ensayar la actividad de coagulación de FVIII de los compuestos candidatos. El modelo de FIX -/- es un modelo apropiado para ensayar la actividad de coagulación de FIX de los compuestos.

Ejemplo 12: modelos de enfermedad animal - eficacia de A01

20 El efecto de A01 administrado en los parámetros de hemorragia y supervivencia de ratones FVIII -/- se ensayó en el modelo de corte de la cola descrito en la descripción específica. Se realizaron experimentos similares en ratones FIX -/-.

25 El volumen medio de pérdida de sangre después de corte de la cola en un grupo de 8 ratones macho y 8 ratones hembra FVIII -/- a los que se administraron 20 mg/kg de A01 i.v. cinco minutos antes del corte de la cola fue significativamente diferente ($p < 0,05$) en la mayoría de puntos temporales en comparación con el volumen medio de pérdida de sangre por un grupo de control de ratones a los que se administró solamente vehículo. El vehículo fue DMSO 5 %, Cremophor EL 5 %, Tween 80 0,05 % en agua para inyección. A los 52 y 62 minutos después del corte de la cola, la diferencia fue significativa a $p < 0,01$. Los datos se muestran en la Figura 2 y la tabla posterior. Un ensayo de rangos logarítmicos usado para comparar las curvas de supervivencia de ratones en este experimento muestra una supervivencia más larga estadísticamente significativa con A01 20 mg/kg i.v. que con el control de vehículo (p -valor = 0,0028).

35 Tabla 26: supervivencia de ratones FVIII -/- tratados con A01 en el experimento de corte de la cola

| Tratamiento | Animales (n) | Supervivencia (%) 2 horas | Supervivencia (%) 4 horas | Supervivencia (%) 24 horas | Supervivencia (%) 48 horas |
|-------------|--------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| A01 | 16 | 56 | 25 | 6 | 0 |
| Vehículo | 16 | 6 | 6 | 0 | 0 |

5 El experimento anterior se repitió para proporcionar una indicación de su reproducibilidad. Los resultados se muestran en la tabla posterior. Aunque se observa variabilidad dentro de estos dos experimentos realizados de 5 forma independiente los animales tratados con A01 sangran menos y sobreviven más tiempo.

Tabla 27: supervivencia de ratones FVIII -/- tratados con A01 en el experimento de corte de la cola

| Exp | Animales (n) | Supervivencia (%) 2 horas | Supervivencia (%) 4 horas | Supervivencia (%) 24 horas |
|------------|--------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| A01 1 | 16 | 56 | 44 | 6 |
| Vehículo 1 | 16 | 6 | 6 | 0 |
| A01 2 | 16 | 63 | 38 | 13 |
| Vehículo 2 | 16 | 44 | 25 | 0 |

10 Se obtuvieron datos adicionales usando el mismo modelo, aunque el corte de la cola fue de 1 cm en lugar de 0,5 cm, y los ratones se agruparon según el sexo. Los agentes se administraron i.v. En este experimento, parecía que A01 era más eficaz en ratones hembra que macho. Los resultados se muestran en la tabla posterior.

15 Tabla 28: efectos de sexo de A01 en experimento de corte de la cola de ratón FVIII -/-

| Compuesto | n.º de animales (n) | Supervivencia a las 2 horas (%) | Supervivencia a las 24 horas (%) |
|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Tampón de formulación A01 | 20 | 30 | 0 |
| Tampón de formulación A01 | 10 hembra | 50 | 0 |
| Tampón de formulación A01 | 10 macho | 10 | 0 |
| A01 20 mg/kg | 10 hembra | 80 | 10 |
| A01 20 mg/kg | 10 macho | 20 | 0 |
| Tampón de formulación de Advate | 10 | 10 | 0 |
| Advate 200 I U/kg | 10 | 90 | 90 |
| Advate 100 I U/kg | 10 | 70 | 50 |

Los grupos contenían números iguales de ratones machos y hembras, a no ser que se indique de otro modo.

20 El volumen medio de la pérdida de sangre después del corte de la cola en un grupo de 16 ratones FIX -/- a los que se administraron 20 mg/kg de A01 i.v. cinco minutos antes del corte de la cola no fue significativamente diferente ($p < 0,05$) en cualquier punto temporal en comparación con el volumen medio de pérdida de sangre por un grupo de control de ratones a los que se administró solamente vehículo. No hubo ninguna diferencia significativa en la supervivencia de ratones a los que se administró A01 y ratones a los que se administró solamente vehículo.

25 Estos resultados demuestran que A01 pueden compensar al menos parcialmente la falta de FVIII -/- reduciendo la pérdida de sangre y aumentando la supervivencia después del corte de la cola, pero no tiene ningún efecto en ratones FIX -/-. A01 se considera el péptido más preferido debido a que tiene eficacia demostrada en un modelo de hemofilia.

30

Ejemplo 13: resultados de ensayos de compuesto en modelo de corte de la cola de ratón FVIII, -/-

A01 se ensayó adicionalmente mediante administración i.p. en el modelo de corte de la cola de FVIII -/- usando un corte de cola de 0,5 cm. Los datos se resumen en la tabla posterior.

5

Tabla 29: supervivencia de ratones FVIII -/- tratados con A01 en el experimento de corte de la cola

| Compuesto | Dosis de tratamiento | Animales (n) | Pérdida de sangre total (% de vehículo) | Supervivencia a las 2 horas (%) | Supervivencia a las 4 horas (%) | Supervivencia a las 24 horas (%) |
|---------------------|----------------------|--------------|---|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| A01 | 20 mg/kg i.p. hembra | 8 | 72 | 75 | 25 | 25 |
| A01 | 20 mg/kg i.p. macho | 8 | 83 | 38 | 25 | 25 |
| Control de vehículo | 10 ml/kg i.p. hembra | 8 | | 13 | 0 | 0 |
| Control de vehículo | 10 ml/kg i.p. macho | 8 | | 13 | 13 | 13 |

10 Los ratones hembra a los que se administró A01 20 mg/kg tuvieron una supervivencia más larga estadísticamente significativa (al nivel del 5 %) que los ratones hembra a los que se administró vehículo 10 ml/kg i.p. (p-valor de dos
15 lados $p = 0,0073$; ensayo de rangos logarítmicos). No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa (al nivel del 5 %) en curvas de supervivencia entre ratones macho a los que se administró A01 20 mg/kg i.p. y ratones macho a los que se administró vehículo 10 ml/kg i.p. En este experimento, los machos en el grupo de control parecían sobrevivir mejor que las hembras en el grupo de control.

Ejemplo 14: resumen de experimentos para caracterización de compuestos candidatos

20 Los siguientes compuestos poseen actividad en el ensayo de generación de trombina intrínseco definido: A01, A03, A05, A19, B01, A02, B03, B05, B06, A06, A20, A07, A08, A09 y B07. De estos, A03, A02, B03, A08 y A09 tienen una actividad de generación de trombina a 100 μM de al menos 1.200 mU/ml de FEIBA.

25 Los siguientes compuestos poseen actividad en el ensayo de generación de trombina de ruta doble definido: A02, A03, A08, A09, A18, B03, B04, A07, A15, A06 y A17. De estos, A09 tuvieron una actividad pico IIa a 50 μM de al menos 10 mU/ml de FEIBA. B03, B04 y A15 tuvieron una actividad pico IIa a 50 o 100 μM de al menos 10 mU/ml de FEIBA.

30 Los siguientes compuestos poseen actividad en el ensayo de deposición de fibrina definido: A01, B01, A05, B03, A06 y A07.

Los siguientes compuestos tienen una estabilidad de al menos 50 % después de incubación durante 30 minutos en plasma humano: A01, A19, A07, A20, A06, A02, A03, A08, A09, B07, B06, B05 y A05.

35 Los siguientes compuestos tienen solubilidad en PBS pH 7,4 de al menos 25 μM : A09, B03, B07, B06, B05, A07, A20, A06, A02, A03 y A16. De estos, B03, B07, B05, A07, A20, A06, A03 y A16 tienen una solubilidad en PBS pH 7,4 de al menos 100 μM .

A01, A05 y A16 se identificaron como bloqueadores de canal de HERG de baja potencia.

40 A01 se identificó como poseedor de actividad en el ensayo de corte de la cola en ratones FVIII -/-.

Ejemplo 15: tratamiento de la hemofilia A en un sujeto humano adulto

45 Es típico para los pacientes con hemofilia A desarrollar inhibidores de aloanticuerpos a FVIII después de terapia de FVIII de alta dosis. En un escenario típico, la presencia de dichos anticuerpos en el suero preparado a partir del plasma de sangre del paciente se supervisa por un especialista clínico. Cuando el título de la respuesta de anticuerpo se hace inaceptablemente alto, tal como aproximadamente 5 UB, el especialista clínico puede decidir detener la infusión del paciente con FVIII, y comenzar a administrar un péptido de la invención.

50 El péptido puede formularse como una micropartícula de aproximadamente 10 μm de diámetro en una cubierta de albúmina, suspendida en un medio acuoso, como se describe en el documento US 5.439.686. El paciente puede

autoadministrarse la formulación por inhalación usando un nebulizador. Puede inhalarse una dosis diaria o dos veces al día de 5 o 10 mg. El especialista clínico puede ensayar el tiempo de tromboplastina parcial poco después del comienzo de la terapia peptídica, para confirmar la eficacia. Dependiendo del resultado, la dosis podría variarse en consecuencia. Si es necesario aumentar sustancialmente la dosis, podrían usarse micropartículas más pequeñas, típicamente de aproximadamente 5 µm de diámetro, y podrían administrarse por vía intravenosa.

Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas, debe entenderse que la invención no está limitada a tales realizaciones específicas, sino que es tal como se define en las siguientes reivindicaciones.

10 **Lista de secuencias**

<110> Baxalta GmbH
<110> Baxalta Incorporated

15 <120> Péptidos biológicamente activos

<130> BAXBM/P47288EPdiv1

20 <150> 61/009.326
<151> 17-04-2008

<150> 61/113.055
<151> 10-11-2008

25 <160> 321

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> VARIANTE
<222> 1

40 <223> /reemplazar = Leu

<220>
<221> VARIANTE
<222> 1

45 <223> /reemplazar = Pro

<220>
<221> VARIANTE
<222> 2

50 <223> /reemplazar = Ser

<220>
<221> VARIANTE
<222> 3

55 <223> /reemplazar = Phe

<220>
<221> VARIANTE
<222> 5

60 <223> /reemplazar = Leu

<220>
<221> VARIANTE
<222> 7

65 <223> /reemplazar = Phe

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> /reemplazar = Ser
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> /reemplazar = Gly
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> /reemplazar = Leu
 15
 <400> 1
 Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5
 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Péptido sintético
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> /reemplazar = Pro
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> /reemplazar = Nva
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> /reemplazar = Asn
 40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> /reemplazar = Nle
 45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> /reemplazar = Gln
 50
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> /reemplazar = Lys
 55
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> /reemplazar = Asp
 60
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> /reemplazar = Leu
 65

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 5 <223> /reemplazar = Pro

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 10 <223> /reemplazar = Ser

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 15 <223> /reemplazar = Phe

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 20 <223> /reemplazar = Leu

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 13
 25 <223> /reemplazar = Phe

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 14
 30 <223> /reemplazar = Ser

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 14
 35 <223> /reemplazar = Gly

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 15
 40 <223> /reemplazar = Leu

<400> 2
 Arg Met Glu Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

45 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido sintético A06

<400> 3
 Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp Glu
 1 5 10

55 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Péptido sintético A09

<400> 4

ES 2 739 676 T3

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético A30

 10 <400> 10
 Arg Met Glu Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp Lys
 1 5 10 15

 <210> 11
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético A33

 20 <400> 11
 Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Ser Trp Glu
 1 5 10

 <210> 12
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Péptido sintético A34

 <400> 12
 Trp Asp Leu Tyr Leu Glu Ile Val Trp Glu
 1 5 10

 35 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Péptido sintético A35

 <400> 13
 Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Leu Glu
 1 5 10

 45 <210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Péptido sintético A52

 <400> 14
 Lys Arg Met Glu Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 55 1 5 10 15

 <210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético A57

<400> 15
 Glu Arg Met Glu Phe Asp Val Leu Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 5 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético A58

15 <400> 16
 Glu Arg Met Glu Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Leu
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético A84

25 <400> 17
 Trp Asp Phe Tyr Phe Glu Ile Val Trp Glu
 1 5 10

<210> 18
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético A85

35 <400> 18
 Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Phe Val Trp Glu
 1 5 10

40 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético A86

<400> 19
 Leu Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp Glu
 50 1 5 10

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético A87

<400> 20
 Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Gly Trp Glu
 60 1 5 10

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético A89
 <400> 21
 Trp Asp Leu Tyr Leu Glu Ile Ser Leu Glu
 10 1 5 10
 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético A92
 20 <400> 22
 Leu Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Leu Glu
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <220>
 <223> Péptido sintético A93
 30 <400> 23
 Leu Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Ser Leu Glu
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético A95
 40 <400> 24
 Leu Ser Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp Glu
 1 5 10
 45 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Péptido sintético A96
 <400> 25
 Leu Ser Leu Tyr Phe Glu Ile Val Leu Glu
 55 1 5 10
 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Péptido sintético A97

ES 2 739 676 T3

<400> 26
 Leu Ser Leu Tyr Phe Glu Ile Ser Leu Glu
 1 5 10

5 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético A22

<400> 27
 Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10

15 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético A45

<400> 28
 Lys Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10

25 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético A47

35 <400> 29
 Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp Lys
 1 5 10

40 <210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético A73

<400> 30
 Glu Arg Asn Glu Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético A88

<400> 31
 Pro Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp Glu
 1 5 10

60 <210> 32
 <211> 10

ES 2 739 676 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Péptido sintético A98

<400> 32
 Leu Ser Leu Tyr Leu Glu Ile Val Leu Glu
 1 5 10

10 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético A99

<400> 33
 Leu Ser Leu Tyr Leu Glu Ile Ser Leu Glu
 1 5 10

20 <210> 34
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético A10

<400> 34
 Glu Pro Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

30 <210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético A60

40 <400> 35
 Glu Arg Met Asp Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

45 <210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético A75

50 <400> 36
 Glu Arg Gly Glu Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

55 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 739 676 T3

<400> 37
 Ala Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

5 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 38
 Cys Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

15 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 39
 Asp Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

25 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 40
 Glu Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

35 <210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 41
 Phe Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 42
 Gly Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

60 <210> 43
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 739 676 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 43
 His Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido sintético

15

<400> 44
 Ile Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

20

<210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido sintético

30

<400> 45
 Lys Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido sintético

40

<400> 46
 Leu Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Péptido sintético

50

<400> 47
 Met Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Péptido sintético

60

<400> 48

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

5 <400> 54
 Tyr Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 55
 Arg Ala Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 56
 Arg Cys Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

30 <210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 57
 Arg Asp Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 58
 Arg Glu Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

60 <400> 59
 Arg Phe Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

ES 2 739 676 T3

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético
 10
 <400> 60
 Arg Gly Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético
 20
 <400> 61
 Arg His Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético
 30
 <400> 62
 Arg Ile Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 63
 Arg Lys Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 45 1 5 10 15

 <210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 64
 Arg Leu Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 55 1 5 10 15

 <210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

5 <400> 65
 Arg Asn Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 66
 Arg Pro Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 67
 Arg Gln Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

25 <210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 68
 Arg Arg Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

35 <210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 69
 Arg Ser Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

45 <210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 70
 Arg Thr Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

55

60

ES 2 739 676 T3

<210> 71
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 10 <400> 71
 Arg Val Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 72
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 20 <400> 72
 Arg Trp Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 73
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Péptido sintético

 <400> 73
 Arg Tyr Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 35 <210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 74
 Arg Met Ala Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 45 <210> 75
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 75
 Arg Met Cys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 55 1 5 10 15

 <210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 76
 Arg Met Phe Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 5 1 5 10 15

 <210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 15 <400> 77
 Arg Met Gly Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 78
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 25 <400> 7
 Arg Met His Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 30 <210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 79
 Arg Met Ile Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 40 1 5 10 15

 <210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 80
 Arg Met Leu Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 50 1 5 10 15

 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 60 <400> 81

ES 2 739 676 T3

Arg Met Met Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 82
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 10 <400> 82
 Arg Met Asn Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 83
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Péptido sintético
 <400> 83
 Arg Met Pro Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 25 <210> 84
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 84
 Arg Met Gln Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 35 <210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 85
 Arg Met Arg Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 45 1 5 10 15
 <210> 86
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 55 <400> 86
 Arg Met Ser Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 87
 <211> 15
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

5 <400> 87
 Arg Met Thr Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 88
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 88
 Arg Met Val Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 89
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 89
 Arg Met Trp Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

30 <210> 90
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 90
 Arg Met Tyr Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 91
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 91
 Arg Met Lys Ala Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 92
 <211> 15
 <212> PRT

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 92
 Arg Met Lys Cys Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

60

ES 2 739 676 T3

<210> 93
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 93 --
 Arg Met Lys Asp Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 10 1 5 10 15
 <210> 94
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 20 <400> 94
 Arg Met Lys Glu Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 95
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30 <400> 95
 Arg Met Lys Gly Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 96
 35 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido sintético
 <400> 96
 Arg Met Lys His Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 45 <210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 97
 Arg Met Lys Ile Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 55 1 5 10 15
 <210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

ES 2 739 676 T3

<223> Péptido sintético

<400> 98
 Arg Met Lys Lys Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

5 <210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 99
 Arg Met Lys Leu Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

15 <210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 100
 Arg Met Lys Met Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

30 <210> 101
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 101
 Arg Met Lys Asn Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 102
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 102
 Arg Met Lys Pro Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 103
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 103
 Arg Met Lys Gln Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

60 <210> 104

ES 2 739 676 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 104
 Arg Met Lys Arg Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 10 <210> 105
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 105
 Arg Met Lys Ser Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 20 1 5 10 15
 <210> 106
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30 <400> 106
 Arg Met Lys Thr Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 107
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 40 <400> 107
 Arg Met Lys Val Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 108
 <211> 15
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Péptido sintético
 <400> 108
 Arg Met Lys Trp Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 55 1 5 10 15
 <210> 109
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

ES 2 739 676 T3

<223> Péptido sintético

<400> 109
 Arg Met Lys Tyr Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 5 1 5 10 15

<210> 110
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

15 <400> 110
 Arg Met Lys Phe Ala Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 111
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 111
 Arg Met Lys Phe Cys Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 112
 <211> 15
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Péptido sintético

<400> 112
 Arg Met Lys Phe Glu Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 113
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 113
 Arg Met Lys Phe Phe Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 50 1 5 10 15

<210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 114 ___
 Arg Met Lys Phe Gly Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 60 1 5 10 15

ES 2 739 676 T3

<210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 10 <400> 115
 Arg Met Lys Phe His Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 116
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 20 <400> 116
 Arg Met Lys Phe Ile Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 117
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Péptido sintético

 <400> 117
 Arg Met Lys Phe Lys Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 35 <210> 118
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Péptido sintético

 <400> 118
 Arg Met Lys Phe Leu Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 45 <210> 119
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 119
 Arg Met Lys Phe Met Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 55 1 5 10 15

 <210> 120
 <211> 15
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 120
 Arg Met Lys Phe Asn Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 5 1 5 10 15

<210> 121
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

15 <400> 121
 Arg Met Lys Phe Pro Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 122
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 122
 Arg Met Lys Phe Gln Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 123
 <211> 15
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

35 <400> 123
 Arg Met Lys Phe Arg Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 124
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 124
 Arg Met Lys Phe Ser Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 50 1 5 10 15

<210> 125
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 125
 Arg Met Lys Phe Thr Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 60 1 5 10 15

ES 2 739 676 T3

<210> 126
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 126
 Arg Met Lys Phe Val Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 10 1 5 10 15
 <210> 127
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 20 <400> 127
 Arg Met Lys Phe Trp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 128
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30 <400> 128
 Arg Met Lys Phe Tyr Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 129
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido sintético
 <400> 129
 Arg Met Lys Phe Asp Ala Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 45 <210> 130
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 130
 Arg Met Lys Phe Asp Cys Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 55 1 5 10 15
 <210> 131
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

ES 2 739 676 T3

<223> Péptido sintético

<400> 131
 Arg Met Lys Phe Asp Asp Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

5 <210> 132
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 132
 Arg Met Lys Phe Asp Glu Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

15 <210> 133
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 133
 Arg Met Lys Phe Asp Phe Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

30 <210> 134
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 134
 Arg Met Lys Phe Asp Gly Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 135
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 135
 Arg Met Lys Phe Asp His Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 136
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 136
 Arg Met Lys Phe Asp Ile Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

60 <210> 137

ES 2 739 676 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 137
Arg Met Lys Phe Asp Lys Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

10 <210> 138
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 138
Arg Met Lys Phe Asp Leu Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 20 1 5 10 15

<210> 139
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 139
Arg Met Lys Phe Asp Met Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 30 1 5 10 15

<210> 140
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 140
Arg Met Lys Phe Asp Asn Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 40 1 5 10 15

<210> 141
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 141
Arg Met Lys Phe Asp Pro Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 50 1 5 10 15

<210> 142
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

60 <220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 739 676 T3

<400> 142
 Arg Met Lys Phe Asp Gln Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

5 <210> 143
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 143
 Arg Met Lys Phe Asp Arg Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

15 <210> 144
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 144
 Arg Met Lys Phe Asp Ser Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 25 1 5 10 15

<210> 145
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

35 <400> 145
 Arg Met Lys Phe Asp Thr Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 146
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 146
 Arg Met Lys Phe Asp Trp Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 147
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Péptido sintético

<400> 147
 Arg Met Lys Phe Asp Tyr Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

60 <210> 148
 <211> 15

ES 2 739 676 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Péptido sintético

 <400> 148
 Arg Met Lys Phe Asp Val Ala Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 10 <210> 149
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 149
 Arg Met Lys Phe Asp Val Cys Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 20 <210> 150
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 150
 Arg Met Lys Phe Asp Val Asp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 30 1 5 10 15

 <210> 151
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 40 <400> 151
 Arg Met Lys Phe Asp Val Glu Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 152
 <211> 15
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 50 <400> 152
 Arg Met Lys Phe Asp Val Phe Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 153
 <211> 15
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Péptido sintético

ES 2 739 676 T3

<400> 153
 Arg Met Lys Phe Asp Val Gly Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

5 <210> 154
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 154
 Arg Met Lys Phe Asp Val His Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

15 <210> 155
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 155
 Arg Met Lys Phe Asp Val Ile Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

25 <210> 156
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 156
 Arg Met Lys Phe Asp Val Lys Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

35 <210> 157
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 157
 Arg Met Lys Phe Asp Val Leu Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 158
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 158
 Arg Met Lys Phe Asp Val Met Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

60 <210> 159
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 739 676 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 159

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Met | Lys | Phe | Asp | Val | Asn | Asp | Leu | Tyr | Phe | Glu | Ile | Val | Trp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |

<210> 160

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Péptido sintético

<400> 160

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Met | Lys | Phe | Asp | Val | Pro | Asp | Leu | Tyr | Phe | Glu | Ile | Val | Trp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |

<210> 161

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Péptido sintético

<400> 161

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Met | Lys | Phe | Asp | Val | Gln | Asp | Leu | Tyr | Phe | Glu | Ile | Val | Trp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |

<210> 162

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 162

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Met | Lys | Phe | Asp | Val | Arg | Asp | Leu | Tyr | Phe | Glu | Ile | Val | Trp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |

<210> 163

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 163

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Met | Lys | Phe | Asp | Val | Ser | Asp | Leu | Tyr | Phe | Glu | Ile | Val | Trp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |

<210> 164

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Péptido sintético

60

<400> 164

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

5 <400> 170
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Phe Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 171
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 171
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Gly Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

20 <210> 172
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 172
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp His Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

30 <210> 173
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 173
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Ile Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 174
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 174
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Lys Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 175
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

60 <400> 175
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Leu Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

ES 2 739 676 T3

<210> 176
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 10 <400> 176
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Met Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 177
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 20 <400> 177
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asn Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 178
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Péptido sintético

 <400> 178
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Pro Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 35 <210> 179
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 179
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Gln Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 45
 <210> 180
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 180
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Arg Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 55 1 5 10 15

 <210> 181
 <211> 15
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 181
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Ser Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 5 1 5 10 15

<210> 182
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

15 <400> 182
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Thr Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 183
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 183
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Val Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 184
 <211> 15
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

35 <400> 184 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Trp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 185
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 185
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Tyr Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 186
 <211> 15
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

55 <400> 186
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Ala Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

60

ES 2 739 676 T3

<210> 187
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 187
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Cys Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 10 1 5 10 15
 <210> 188
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 20 <400> 188
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Asp Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 189
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30 <400> 189
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Glu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 190
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido sintético
 <400> 190
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Phe Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 45 <210> 191
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 191
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Gly Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 55 1 5 10 15
 <210> 192
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

ES 2 739 676 T3

<223> Péptido sintético

<400> 192
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp His Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

5 <210> 193
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 193
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Ile Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

15 <210> 194
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 194
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Lys Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

30 <210> 195
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 195
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Met Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 196
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 196
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Asn Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 197
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 197
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Pro Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

60 <210> 198

ES 2 739 676 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 198
Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Gln Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

10 <210> 199
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 199
Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Arg Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 20 1 5 10 15

<210> 200
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 200
Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Ser Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 30 1 5 10 15

<210> 201
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 201
Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Thr Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 40 1 5 10 15

<210> 202
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 202
Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Val Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 50 1 5 10 15

<210> 203
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

60 <220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 739 676 T3

<400> 203
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Trp Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

5 <210> 204
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 204
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Tyr Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

15 <210> 205
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 205
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Ala Phe Glu Ile Val Trp
 25 1 5 10 15

<210> 206
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

35 <400> 206
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Cys Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 207
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 207
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Asp Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 208
 50 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Péptido sintético

<400> 208
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Glu Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

60 <210> 209
 <211> 15

ES 2 739 676 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Péptido sintético

 <400> 209
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Phe Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 10 <210> 210
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 210
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Gly Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 20 <210> 211
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 211
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu His Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 30 <210> 212
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Péptido sintético

 40 <400> 212
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Ile Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 45 <210> 213
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 50 <400> 213
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Lys Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 55 <210> 214
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 739 676 T3

<400> 214
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

5 <210> 215
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 215
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Met Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

15 <210> 216
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 216
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Asn Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

25 <210> 217
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 217
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Pro Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

35 <210> 218
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 218
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Gln Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 219
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 219
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Arg Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

60 <210> 220
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 739 676 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 220
Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Ser Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 221

10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético

<400> 221
Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Thr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

20 <210> 222
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 222
Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Val Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

30 <210> 223
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 223
Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Trp Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 224
 <211> 15
 <212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

50 <400> 224
Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Ala Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 225
 <211> 15
 <212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

60 <400> 225

ES 2 739 676 T3

Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Cys Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 226
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 10 <400> 226
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Asp Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 227
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Péptido sintético
 <400> 227
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Glu Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 25 <210> 228
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Péptido sintético
 <400> 228
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Gly Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 35 <210> 229
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 229
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr His Glu Ile Val Trp
 45 1 5 10 15
 <210> 230
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 55 <400> 230
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Ile Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 231
 <211> 15
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

5 <400> 231
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Lys Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 232
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 232
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Leu Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 233
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 233
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Met Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

30 <210> 234
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 234
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Asn Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 235
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 235
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Pro Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 236
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 236
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Gln Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

60

ES 2 739 676 T3

<210> 237
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 10 <400> 237
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Arg Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 238
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 20 <400> 238
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Ser Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 239
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Péptido sintético

 <400> 239
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Thr Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 35 <210> 240
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 240
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Val Glu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 45 <210> 241
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 241
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Trp Glu Ile Val Trp
 55 1 5 10 15

 <210> 242
 <211> 15
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 242
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Tyr Glu Ile Val Trp
 5 1 5 10 15

<210> 243
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

15 <400> 243
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Ala Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 244
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 244
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Cys Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 245
 30 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Péptido sintético

<400> 245
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Asp Ile Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 246
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 246
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Phe Ile Val Trp
 50 1 5 10 15

<210> 247
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 247
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Gly Ile Val Trp
 60 1 5 10 15

ES 2 739 676 T3

<210> 248
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 10 <400> 248
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe His Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 249
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 20 <400> 249
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Ile Ile Val Trp
 1 5 10 15

 <210> 250
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Péptido sintético

 <400> 250
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Lys Ile Val Trp
 1 5 10 15

 35 <210> 251
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 251
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Leu Ile Val Trp
 1 5 10 15

 45 <210> 252
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 252
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Met Ile Val Trp
 55 1 5 10 15

 <210> 253
 <211> 15
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 253
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Asn Ile Val Trp
 5 1 5 10 15

<210> 254
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

15 <400> 254
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Pro Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 255
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 255
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Gln Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 256
 <211> 15
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

35 <400> 256
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Arg Ile Val Trp
 1 5 10 15

<210> 257
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 257
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Ser Ile Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 258
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 258
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Thr Ile Val Trp
 60 1 5 10 15

ES 2 739 676 T3

<210> 259
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 259
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Val Ile Val Trp
 10 1 5 10 15
 <210> 260
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 20 <400> 260
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Trp Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 261
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30 <400> 261
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Tyr Ile Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 262
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 40 <400> 262
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ala Val Trp
 1 5 10 15
 45 <210> 263
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 263
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Cys Val Trp
 55 1 5 10 15
 <210> 264
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

ES 2 739 676 T3

<223> Péptido sintético

<400> 264
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Asp Val Trp
 1 5 10 15

5 <210> 265
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 265
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Glu Val Trp
 1 5 10 15

15 <210> 266
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 266
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Phe Val Trp
 1 5 10 15

30 <210> 267
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 267
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Gly Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 268
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 268
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu His Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 269
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 269
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Lys Val Trp
 1 5 10 15

60

ES 2 739 676 T3

<210> 270
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 270
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Leu Val Trp
 10 1 5 10 15
 <210> 271
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 20 <400> 271
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Met Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 272
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30 <400> 272
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Asn Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 273
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 40 <400> 273
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Pro Val Trp
 1 5 10 15
 <210> 274
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 274
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Gln Val Trp
 55 1 5 10 15
 <210> 275
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

ES 2 739 676 T3

<223> Péptido sintético

<400> 275
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Arg Val Trp
 1 5 10 15

5 <210> 276
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 276
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ser Val Trp
 1 5 10 15

15 <210> 277
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 277
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Thr Val Trp
 1 5 10 15

30 <210> 278
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 278
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Val Val Trp
 1 5 10 15

40 <210> 279
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 279
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Trp Val Trp
 1 5 10 15

50 <210> 280
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 280
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Tyr Val Trp
 1 5 10 15

60 <210> 281

ES 2 739 676 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 281
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Ala Trp
 1 5 10 15

10 <210> 282
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 282
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Cys Trp
 20 1 5 10 15

<210> 283
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

30 <400> 283
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Asp Trp
 1 5 10 15

<210> 284
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

40 <400> 284
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Glu Trp
 1 5 10 15

<210> 285
 45 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Péptido sintético

<400> 285
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Phe Trp
 1 5 10 15

55 <210> 286
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 739 676 T3

<400> 286
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Gly Trp
 1 5 10 15

5 <210> 287
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 287
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile His Trp
 1 5 10 15

15 <210> 288
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 288
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Ile Trp
 25 1 5 10 15

<210> 289
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

35 <400> 289
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Lys Trp
 1 5 10 15

<210> 290
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 290
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Leu Trp
 1 5 10 15

<210> 291
 <211> 15
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Péptido sintético

<400> 291
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Met Trp
 1 5 10 15

60 <210> 292
 <211> 15

ES 2 739 676 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Péptido sintético

<400> 292
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Asn Trp
 1 5 10 15

10 <210> 293
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 293
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Pro Trp
 1 5 10 15

20 <210> 294
 <211> 15
 <212> **PRT**
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 294
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Gln Trp
 1 5 10 15

30 <210> 295
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

40 <400> 295
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Arg Trp
 1 5 10 15

45 <210> 296
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 296
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Ser Trp
 1 5 10 15

55 <210> 297
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 739 676 T3

<400> 297
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

5 <210> 298
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 298
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Trp Trp
 1 5 10 15

15 <210> 299
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 299
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Tyr Trp
 1 5 10 15

25 <210> 300
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 300
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Ala
 1 5 10 15

35 <210> 301
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 301
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Cys
 1 5 10 15

50 <210> 302
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 302
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Asp
 1 5 10 15

60 <210> 303
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 739 676 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 303
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Glu
 1 5 10 15

<210> 304

10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético

<400> 304
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Phe
 1 5 10 15

20 <210> 305
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido sintético

<400> 305
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Gly
 1 5 10 15

30 <210> 306
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 306
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val His
 1 5 10 15

40 <210> 307
 <211> 15
 <212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

50 <400> 307
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Ile
 1 5 10 15

<210> 308
 <211> 15
 <212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

60 <400> 308

ES 2 739 676 T3

Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Lys
 1 5 10 15
 <210> 309
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 10 <400> 309
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Leu
 1 5 10 15
 <210> 310
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Péptido sintético
 <400> 310
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Met
 1 5 10 15
 25 <210> 311
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 311
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Asn
 1 5 10 15
 35 <210> 312
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 312
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Pro
 45 1 5 10 15
 <210> 313
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 55 <400> 313
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Gln
 1 5 10 15
 <210> 314
 <211> 15
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 739 676 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

5 <400> 314
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Arg
 1 5 10 15

<210> 315
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 315
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Ser
 1 5 10 15

20 <210> 316
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 316
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Thr
 1 5 10 15

30 <210> 317
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 317
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Val
 1 5 10 15

40 <210> 318
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 318
 Arg Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Tyr
 1 5 10 15

50 <210> 319
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

60 <400> 319
 Met Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
 1 5 10

ES 2 739 676 T3

<210> 320
<211> 13
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10 <400> 320
Lys Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
1 5 10

<210> 321
<211> 16
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético A72

20 <220>
<221> misc_feature
<222> 3
<223> Xaa es Nle

25 <400> 321
Glu Arg Xaa Glu Phe Asp Val Trp Asp Leu Tyr Phe Glu Ile Val Trp
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Péptido o derivado peptídico que comprende:
 - 5 (i) una secuencia de aminoácidos que comprende imfwydcye; o
 - (ii) una secuencia de aminoácidos variante que comprende una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos en imfwydcye, en la que la secuencia de aminoácidos variante comprende una secuencia de aminoácidos que comprende $X_1X_2mX_4wydX_8ye$, en la que X_1 , cuando está presente, es c, C, o D-Pen; X_2 es i o y; X_4 es f, t o v; y X_8 es c o e;

10 en el que dicho péptido o derivado peptídico tiene actividad procoagulante, y

en el que el péptido o derivado peptídico tiene un peso molecular de entre 0,5 y 3,5 kD.
- 15 2. Péptido o derivado peptídico según la reivindicación 1, que comprende:
 - (i) una secuencia de aminoácidos que comprende cimfwydcye.
- 20 3. Derivado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que está acetilado en el extremo N-terminal, amidado en el extremo C-terminal y/o pegilado en cualquier extremo.
4. Péptido o derivado peptídico según la reivindicación 1, que es cíclico.
- 25 5. Péptido o derivado peptídico según la reivindicación 1, que comprende o consiste en: Ac-cimfwydeye-NH₂, disulfuro-dímero(Ac-cimfwydeye-NH₂)₂, Ac-TTDS-(cymfwydc)-ye-NH₂, K-TTDS-(cymfwydc)-ye-NH₂, Ac-cimtwydcye-NH₂, Ac-cimvwycye-NH₂, cymfwydcye, Ac-(cymfwydc)-yeG-NH₂, Ac-(D-Pen)imfwydeye-NH₂, O(CH₂-CH₂-O-CH₂-CO-imfwydeye-NH₂)₂, piridina-3,5-(CO-imfwydeye-NH₂)₂, H₂N-E-TTDS-(cymfwydc)-ye-NH₂, Ac-(cymfwydc)-yeK, Ac-(cymfwydc)-ye-TTDS-K, Ac-simfwydeye-NH₂, Ac-simfwydeye-NH₂, Ac-ydmcwcefyi-NH₂, Ac-idmccyfywe-NH₂, Ac-cimfwyddye-NH₂, Ac-(cymfwydc)-ye, Ac-(cymfwydc)-ye-TTDS-NH₂, Ac-TTDS-(cymfwydc)-ye-TTDS-NH₂, K-(cymfwydc)-ye-NH₂, Ac-K-(cymfwydc)-ye-NH₂, E-(cymfwydc)-ye-NH₂, Ac-K-TTDS-(cymfwydc)-ye-NH₂, Ac-(cymfwydc)-yeK-NH₂, Ac-(cymfwydc)-ye-TTDS-K-NH₂, Ac-(cymfwydc)-ye-TTDS-E-NH₂, Ac-timfwydeye-NH₂, Ac-(cymfwydc)-ye-NH₂, Ac-(cymfwydc)-ye-NH₂, Ac-(cwmfwydc)-ye-NH₂, Ac-cicfwydcye-NH₂, Ac-(D-Nva)imfwydeye-NH₂, Ac-(D-Nle)imfwydeye-NH₂, Ac-(Cys)imfwydeye-NH₂, (cymfwydc)-ye-NH₂, TTDS-(cymfwydc)-ye-TTDS-NH₂, Ackimfwydeye-NH₂,

30 en el que -TTDS- es 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina, (D-Pen) es D-penicilamina, (D-Nva) es D-norvalina, (D-Nle) es D-norleucina.
- 40 6. Péptido o derivado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado por una de las siguientes características:
 - 45 (i) actividad procoagulante es un tiempo de generación de trombina de 25, 50 o 100 μ M de péptido o derivado peptídico equivalente al de al menos 100 mU/ml de actividad de evitación de inhibidor de factor ocho (FEIBA), preferentemente al menos 300 mU/ml de FEIBA, más preferentemente al menos 900 mU/ml de FEIBA, lo más preferentemente al menos 1200 mU/ml de FEIBA en el ensayo de generación de trombina intrínseco definido;
 - 50 (ii) la actividad procoagulante es un tiempo de generación de trombina de 25, 50 o 100 μ M de péptido o derivado peptídico en un ensayo de generación de trombina intrínseco definido que alcanza un pico en un periodo de 30 minutos, preferentemente en un periodo 15 minutos y lo más preferentemente en un periodo de 10 minutos;
 - 55 (iii) el péptido o derivado peptídico puede compensar al menos parcialmente la ausencia de FVIII biológicamente activo cuando se administra en un modelo animal de hemofilia A humana grave;
 - (iv) el péptido o derivado peptídico tiene una estabilidad en plasma humano a los 30 minutos de al menos 50%, preferentemente al menos el 70%, más preferentemente al menos el 80% y lo más preferentemente al menos el 90%; o
 - 60 (v) el péptido o derivado peptídico tiene una solubilidad acuosa en solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 de al menos 25 μ M, preferentemente al menos 60 μ M y lo más preferentemente al menos 100 μ M.
- 65 7. Péptido doble que comprende un primer péptido o primer derivado peptídico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, conjugado con un segundo péptido o segundo derivado peptídico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el primer péptido o primer derivado

peptídico puede ser el mismo o diferente del segundo péptido o segundo derivado peptídico, y en el que el péptido dual tiene actividad procoagulante.

- 5 8. Composición farmacéutica que comprende el péptido o derivado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y uno o más excipientes, portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
9. Péptido o derivado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en medicina.
- 10 10. Péptido o derivado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en un método de tratamiento de un paciente que tiene una deficiencia en FV, FVII, FVIII, FX y/o FXI.
11. Método de preparación del péptido o derivado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, mediante síntesis de fase sólida.

Figura 1

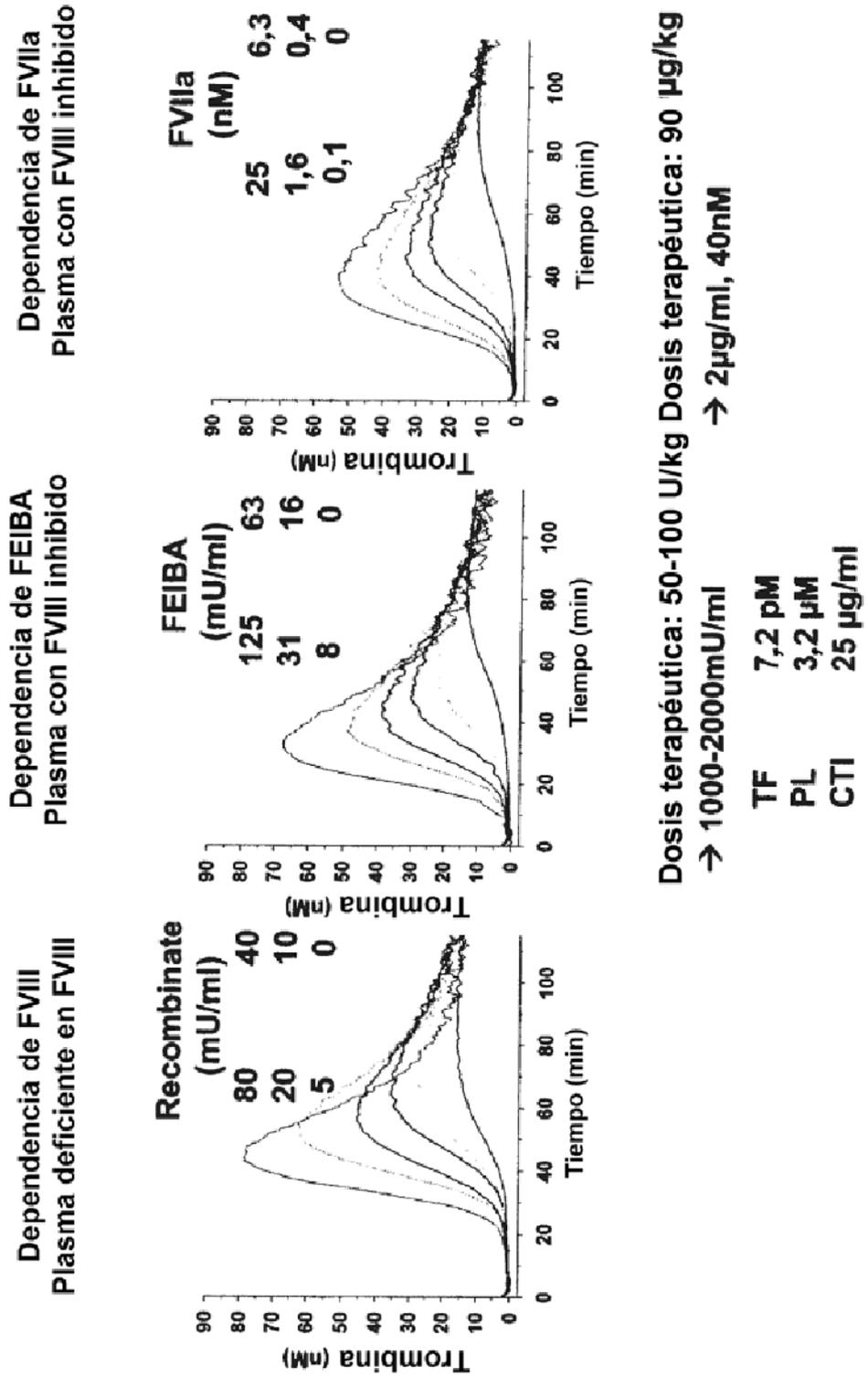
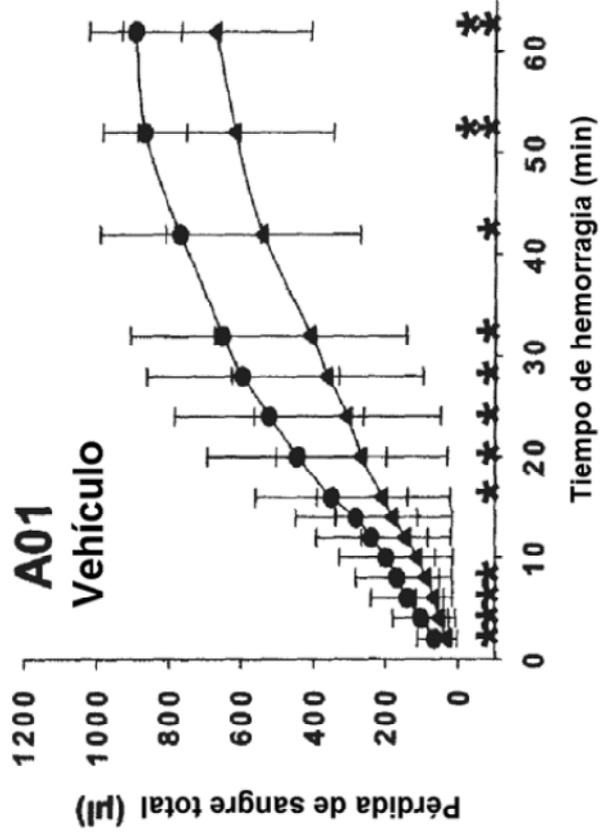


Figura 2

Modelo de enfermedad animal - A01



Dosis: 20 mg/kg i.v. n, 16
Administración: 5 min antes del corte de la cola
Corte de la cola: 0,5 cm
Animales: ratones con desactivación de FVIII