



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

BT

Delegatura de Propiedad Industrial
Division de Nuevas Creaciones

PC1

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

04-94999

21 EXPEDIENTE No

54 TITULO

METODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR TOXICIDAD GASTROINTESTINAL

INDUCIDA POR TERAPIA CITOABLATIVA

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K38/04

71 SOLICITANTE

SANGSTAT MEDICAL CORPORATION

DOMICILIO

Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos de América

74 APODERADO

EMILIO FERRERO

C C 438,019 de Usaquén

22 BOGOTA, D C ,

202099



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 04794999 00000000

Folios: 195
3m

Fecha (ADM): 2004-09-23 17 26 13

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NAC1 411 PRESENT

Dependencia: 2029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE

Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I



Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre SANGSTAT MEDICAL CORPORATION
sociedad constituida y existente bajo las leyes del
estado de California Estados Unidos de América
Dirección 500 Kendall Street
Cambridge Massachussets 02142
Estados Unidos de América
Domicilio Cambridge Massachussets
Estados unidos de América

IDENTIFICACION

C C



NIT



C E



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre EMILIO FERRERO
Dirección Carrera 4ª No 72-35
Teléfono 347 36 11
Fax 217 92 11
E-mail clientes@camyp.com
Domicilio Bogotá Colombia

IDENTIFICACION

C C



NIT



C E



Otro



Cual

Número 438.018 T P 31 929

4

INVENTOR (ES)
(72)

Roland BUELOW
2747 Ross Road,
Palo Alto California 94303
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No PCT/US03/008333Fecha 26 de febrero de 2003Publicación Internacional No WO 03/072061 A3Fecha 04 de septiembre de 2003

6

Título (54)

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR TOXICIDAD GASTROINTESTINAL
INDUCIDA POR TERAPIA CITOABLATIVA

7

Clasificación Internacional (51) A61K 38/04

8

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

US

(32) Fecha

28 de febrero de 2002

(31) Número de Solicitud

60/360.211

9

Comprobante de pago No 04 74.335Fecha 20 de septiembre de 2004

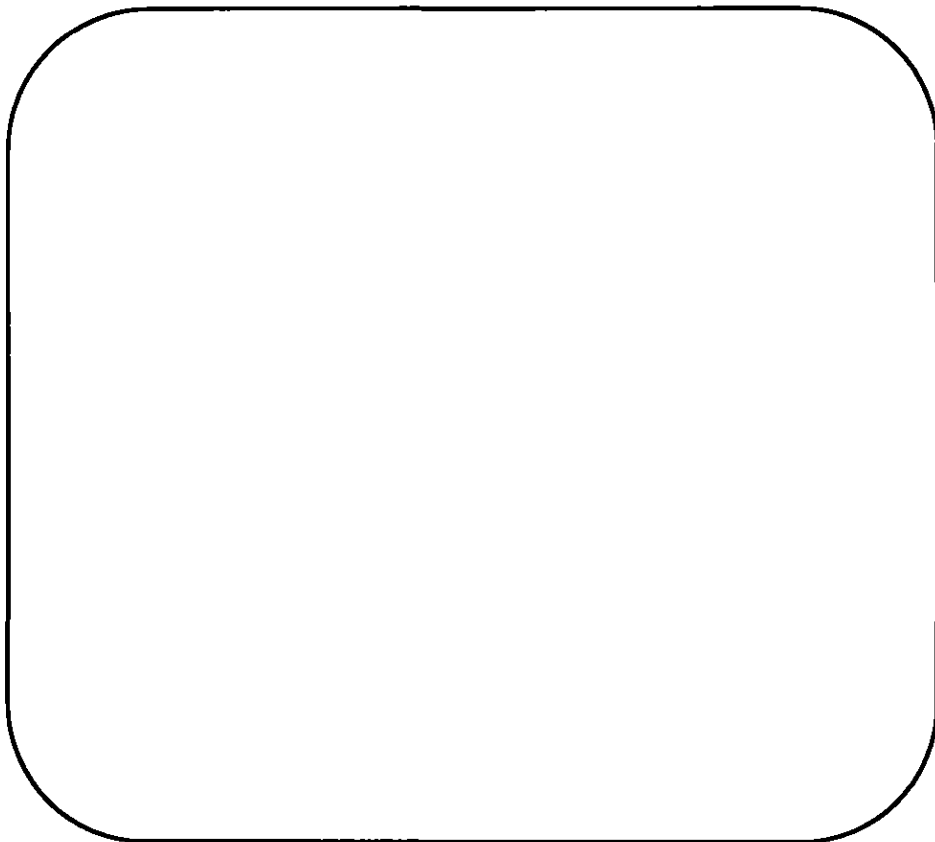
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 422 000 oo
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes al fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Declaraciones de acuerdo a la regla 4 17 (II) del PCT sobre la autorización del solicitante para solicitar una patente y que la misma le sea concedida
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☒ Otros Copia del Formato PCT/IB/306 en el cual la Oficina Internacional notifica el cambio de dirección del solicitante

11

FIGURA CARACTERISTICA.



12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE

EMILIO FERRERO

FIRMA

C C 438 019 de Usaquén T P 31 929

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 September 2003 (04.09.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/072061 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61K 38/04

SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(21) International Application Number
PCT/US2003/006333

(22) International Filing Date: 26 February 2003 (26.02.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60360,211 26 February 2002 (26.02.2002) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 60360,211 (CIP)
Filed on 26 February 2002 (26.02.2002)

(71) Applicant (for all designated States except US): SANG-
STAT MEDICAL CORPORATION [US/US] 6300
Dumbarton Circle, Fremont, CA 94555 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): BUKLOW, Roland
[US/US] 2747 Ross Road, Palo Alto, CA 94303 (US).

(74) Agents: LORENZ, Todd, A. et al., DORSEY & WHIT-
NEY LLP 4 Embarcadero Center, Suite 3400, San Fran-
cisco, CA 94111 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SI,
SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI,
GB, GD, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patents (GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI
patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
8 July 2004

For two-letter codes and other abbreviations refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING GASTROINTESTINAL TOXICITY INDUCED BY CYTOAB-
LATIVE THERAPY

(57) Abstract: The present invention relates to pharmaceutical preparations and methods for alleviating and reducing the gastroin-
testinal toxicity and dysfunction induced by cytoreductive therapy wherein immunomodulatory peptides are employed either alone or
in combination with additional therapeutic agents. Also provided are improvements to cytoreductive cancer therapy, wherein admin-
istration of the subject peptides in combination with cytoreductive therapy as disclosed herein.

PATENT COOPERATION TREATY

2

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis 1 and
Administrative Instructions Section 422)

To

LORENZ, Todd A.
DORSEY & WHITNEY LLP
4 Embarcadero Center
Suite 3400
San Francisco CA 94111
United States of America

Date of mailing (day/month/year)

31 August 2004 (31 08 2004)

Applicant's or agent's file reference

FP71358/TAL (cyb) (add)

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US2003/006333

International filing date (day/month/year)

28 February 2003 (28 02 2003)

1 The following indications appeared on record concerning

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

SANGSTAT MEDICAL CORPORATION
6300 Dumbarton Circle
Fremont, CA 94555
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

510-789-4300

Facsimile No.

510-789-4493

Teleprinter No.

2 The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

SANGSTAT MEDICAL CORPORATION
500 Kendall Street
Cambridge MA 02142
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

510-789-4300

Facsimile No.

510-789-4493

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary

4. A copy of this notification has been sent to

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ otherThe International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

D CABOT

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 September 2003 (04.09.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/072061 A2

- (51) International Patent Classification⁷ A61K MX, MZ, NO, NZ, OM PH PL, PT RO, RU SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ TM, TN TR, TT TZ, UA UG US, UZ, VC, VN YU ZA, ZM, ZW
- (21) International Application Number PCT/US03/06333
- (22) International Filing Date: 26 February 2003 (26.02.2003)
- (25) Filing Language. English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data.
60/360,311 26 February 2002 (26.02.2002) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application
US 60/360,211 (CIP)
Filed on 26 February 2002 (26.02.2002)
- (71) Applicant (for all designated States except US) SANG-STAT MEDICAL CORPORATION [US/US] 6300 Dumbarton Circle, Fremont, CA 94555 (US).
- (72) Inventor: *not*
- (73) Inventor/Applicant (for US only) BUELOW Roland [US/US] 2747 Ross Road, Palo Alto, CA 94303 (US)
- (74) Agents LORENZ, Todd, A. et al. DORSEY & WHITNEY LLP 4 Embarcadero Center, Suite 3400, San Francisco, CA 94111 (US).
- (81) Designated States (national) AE, AG, AL, AM AT AU AZ, BA, BB BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN CO, CR, CU CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB GD, GE, GH, GM HR, HU ID, IL, IN IS, JP KE, KG KP KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT LU, LV MA, MD, MG, MK, MN MW
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:
— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(iv)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW) Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING GASTROINTESTINAL TOXICITY INDUCED BY CYTOABLATIVE THERAPY

(57) Abstract: The present invention relates to pharmaceutical preparations and methods for alleviating and reducing the gastrointestinal toxicity and dysfunction induced by cytoreductive therapy wherein immunomodulatory peptides are employed either alone or in combination with additional therapeutic agents. Also provided are improvements to cytoreductive cancer therapy wherein admin-

WO 03/072061 A2

6

**METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING
GASTROINTESTINAL TOXICITY INDUCED BY CYTOABLATIVE THERAPY**

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims benefit of U.S. Provisional Patent Application No. 60/360 211 filed February 26, 2002 the entire contents of which is incorporated herein by reference

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The field of this invention relates to novel treatments for individuals suffering from gastrointestinal complications of chemotherapy and radiotherapy, including diarrhea, mucositis, stomatitis and proctitis

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Over the past several decades, potentially curative chemotherapy and radiotherapy techniques have been developed for the treatment of almost all human tumors. Although they have measurably improved survival time and decreased cancer mortality, major toxicities induced by these therapies still represent the rate-limiting step in achieving a cure. Wilmore, *Cancer* 79:1794-1803 (1997).

[0004] Chemotherapeutics and radiation exert their cytoablative effects on rapidly-proliferating cells by several different mechanisms. Alkylating agents, such as nitrogen mustard, cross-link DNA and RNA, thereby interfering with the ability of the cell to replicate and transcribe its genetic material. Radiation, on the other hand, causes DNA damage by the formation of free radicals, which in turn cause DNA damage. The damage to DNA is usually double-strand breaks, which are the most lethal form of DNA damage. The damage to RNA is usually single-strand breaks, which are less lethal. The damage to proteins is usually oxidation of the amino acid side chains, which can lead to protein denaturation and loss of function.

cytotoxic actions of these therapies are not tumor specific, however and normal tissues that typically exhibit rapid cell turnover are the most sensitive to the toxic effect of chemotherapy. In particular injury to normal cells in the bone marrow and gastrointestinal mucosa often complicates patient treatment. Although significant advances have been made in combating the myelosuppression and neutropenia brought on by bone marrow toxicity, e.g. through the use of recombinant colony-stimulating factors such as Neupogen® and Epogen® no agents are currently available that can selectively prevent cytotoxic gastrointestinal injury. Boushey *et al.* *Cancer Res.* 61:687-93 (2001). As a result, gastrointestinal toxicity characterized by severe mucositis and diarrhea often limits both the dose and duration of cytotoxic therapy leading to reduced effectiveness in susceptible patients. *Id* The gastrointestinal tract therefore represents the next rate-limiting organ preventing further dose escalation in many patients with cancer. *Id* Wilmore, *supra*

[0005] The epithelial lining of the intestinal mucosa is maintained by continuous proliferation of cells in crypts which are ultimately dependent on crypt stem cells. This proliferation is followed by cellular differentiation and migration up the villi where the mature enterocytes are replaced and shed from the tips. Cytotoxic doses of chemotherapy or radiotherapy compromise the absorptive and barrier action of the mucosa by killing the crypt stem cells, thereby impairing normal regeneration. Farrell *et al.* *Cancer Res.* 58:933-39 (1998). As the damaged cells slough the mucosa becomes thin and denuded accompanied by delayed cellular renewal, mucosal atrophy, inflammation and often ulceration. Balsari *et al.*, *Br J Cancer* 85:1984-87 (2001).

[0006] Hence patients undergoing cytotoxic therapies frequently develop enteric mucositis and diarrhea which can be lethal. Cascinu *Curr Opin Oncol.* 7:325-29 (1995). Moreover the gastrointestinal effects of these cytotoxic therapies can be aggravated and prolonged by the lack of enteral intake that frequently occurs. Anorexia, mucositis, abdominal cramps, explosive diarrhea with food intake and the reliance on intravenous therapy (which suppresses appetite) all compromise the exposure of the gut to enteral nutrients thus limiting the body's ability to stimulate normal intestinal epithelial proliferation. Wilmore, *supra*. Moreover, in patients with severe granulocytopenia the ulcerations caused by mucositis can lead to widespread hematogenous bacterial dissemination, since the lesions serve as entry for bacteria into the bloodstream. Balsari *et al.* *supra*. Hospitalization is often necessary to maintain body hydration, to control pain and to prevent or manage infection.

[0007] With combination cytotoxic therapy in particular gastrointestinal symptoms may become so severe that the treatment must be modified or discontinued altogether thus compromising the efficacy of the therapy on the neoplastic disease. In adjunctive therapy the ability to minimize or attenuate severe gastrointestinal symptoms may greatly influence both quality of life during therapy as well as overall patient survival. This is particularly true with dose escalation therapies used in patients with gastrointestinal cancers or those undergoing bone marrow transplantation associated with high dose combination cytotoxic therapy. Wilmore, *supra*

[0008] Unfortunately however, there are no universally recognized agents available for prophylaxis or therapy of the gastrointestinal toxicities induced by chemotherapy and/or radiotherapy Boushey *et al. supra* Agents which are commonly employed for treatment of one gastrointestinal complication e.g. high-dose loperamide for diarrhea, typically have little or no effect on other serious toxicities e.g. mucositis Moreover the therapeutic effects obtained with existing agents directed to specific symptoms such as diarrhea and mucositis are insufficient. What is needed therefore is an agent that is capable of alleviating the gastrointestinal toxicities induced by cytotoxic therapy

[0009] Relevant Literature

Wilmore *supra* reviews the effects of cytotoxic therapy on the gastrointestinal tract and describes metabolic means of support. Protection against the gastrointestinal toxicity caused by Irinotecan has been attempted using thalidomide (Govindarajan *et al. Lancet* 358 588-7 (2000)), Interleukin 15 (Cao *et al., Cancer Res.* 58:3270-74 (1998)), a synthetic bacterial lipopeptide (Shinozaki *et al. Clin. Cancer Res.* 5:2148-56 (1999)) and glucagon-like peptide (GLP)-2 (Boushey *et al. supra*) Use of keratinocyte growth factor to protect against gastrointestinal injury caused by combined chemotherapy and radiation regimens is described in Farrell *et al., supra*, while Orazi *et al.* disclose the use of Interleukin-11 *Lab. Invest.* 75:33-42 (1996). Protection against adverse gastrointestinal effects of doxorubicin using chitosan is described by Kimura *et al. J. Pharm. Pharmacol.* 53 1373-78 (2001), while Balsari *et al., Br J Cancer* 85 1984-7 (2001) disclose the use of a doxorubicin-specific monoclonal antibody Woo *et al. infra* describe the use of clarithromycin to attenuate cyclophosphamide-induced mucositis in mice

[0010] Buelow *et al. Transplantation* 59:849-854 (1995) and references cited therein Manolagas *et al. Nature Medicine* 3:84-88 (1997) describes oligopeptides derived by rational design which modulate T cell activity WO 95/13288 by Clayberger *et al.* which describes peptides capable of modulating T cell activity References describing methods for designing compounds by computer using structure activity relationships include Grassie *et al., J. of Molecular Graphics* 13:356-367 (1995), Halech *et al. J. of Molecular Graphics* 13:46-48 (1995); Yasri *et al. Protein Engineering* 11 959-976 (1998); Ashton *et al. Drug Discovery Today* 1 71 78 (1996); and Iyer *et al. Curr. Pharm. Des.* 8:2217-2229 (2002)

SUMMARY OF THE INVENTION

[0011] The present invention relates to pharmaceutical preparations and methods for treating and alleviating gastrointestinal toxicity and dysfunction resulting from intensive cytotoxic therapies In particular the methods and compositions disclosed herein provide effective prophylaxis and therapy of the gastrointestinal complications induced by chemotherapy and radiotherapy including diarrhea, mucositis (e.g., oral and esophageal), stomatitis and proctitis The methods and compositions provided herein significantly improve quality of life during ongoing cancer therapies and enable

increased dosages of chemotherapeutic agents and radiotherapy exposures to maximize killing of metastatic cells for improved long-term survival

[0012] In one embodiment, a method for reducing the gastrointestinal toxicity and dysfunction induced by cytoreductive therapy is provided comprising the administration of immunomodulatory peptides either alone or in combination with additional therapeutic agents, e.g. anti-inflammatory agents, anti-diarrheal agents, analgesics and the like. When used in combination with additional therapeutic agents the immunomodulatory peptides and additional agents may be administered either simultaneously or sequentially. In a particularly preferred embodiment, the immunomodulatory peptides are administered in combination with anti-diarrheal agents such as loperamide.

[0013] In a further embodiment, pharmaceutical preparations and kits are provided comprising a novel combination of the immunomodulatory peptides described herein together with at least one additional therapeutic agent including e.g. anti-inflammatory agents, anti-diarrheal agents, analgesics, and the like.

[0014] In another embodiment, the invention provides methods for increasing the maximum tolerated dosage of cytoreductive therapies e.g. chemotherapy and radiotherapy, comprising the administration of immunomodulatory peptides to reduce dose-limiting gastrointestinal toxicities. The dose of immunomodulatory peptide is preferably effective to increase the maximum tolerated dosage (MTD) of cytoreductive therapy by at least a quarter (1.25x) or a third (1.33x) more preferably by a half (1.5x) most preferably by 1.5x to 2x or more. In a further embodiment, improved methods of treating cancer are provided employing these increased dosages of chemotherapy and radiotherapy, along with novel combination therapies for alleviation of associated toxicities.

[0015] Suitable immunomodulatory peptides for use in the subject compositions and methods are capable of modulating the activity of various immune system cells, particularly T cells, and/or inhibiting the production of inflammatory cytokines. In a preferred embodiment, the subject peptides comprise one or more of the cytomodulating peptides disclosed in co-pending U.S. Patent Applications U.S.S.N. 08/028,083 & U.S.S.N. 08/838,918 as well as corresponding International Publication WO 98/48833 the disclosures of which are expressly incorporated herein by reference. In a particularly preferred embodiment, the immunomodulating peptide comprises the sequence Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr where nL is norleucine and all amino acids are the D-stereoisomer (also referred to herein as bc 1nL and/or RDP58).

[0016] In one aspect, the peptides have amino acid extensions at the N- or C- terminus to provide additional functionality such as targeting the peptide to the affected tissue, increasing half-life, or for attachment of various compounds. In another aspect, the cytomodulating peptides are oligomers, particularly dimers of the active sequence, or are in the form of cyclic peptides. The peptides may

comprise naturally-occurring amino acids or, more preferably one or more D-stereoisomers.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0017] Figure 1 is a depiction of the conformational space clustering of the bc 1nL peptide also referred to herein as RDP58. The conformations drawn are obtained from cluster analysis of bc 1nL trajectory.

[0018] Figure 2 is a depiction of a projection of peptide trajectories into the principal plane of D2 peptide reference trajectory.

[0019] Figure 3 is a graph showing the dose-dependent effect of RDP58 peptide administration on mortality in a murine tumor model utilizing CPT-11.

[0020] Figure 4 is a graph showing the effect of RDP58 peptide administration in reducing mortality in a murine tumor model utilizing 5-FU.

[0021] Figure 5 is a graph demonstrating the preservation of anti-tumor efficacy when RDP58 peptide is administered in combination with CPT 11 in a murine tumor model.

[0022] Figure 6 is a graph showing the effect of RDP58 peptide administration in reducing mortality in a murine tumor model utilizing CPT-11.

[0023] Figure 7 is a graph illustrating the significant increase in the maximum tolerated dose of CPT-11 enabled by RDP58 peptide administration in a murine tumor model.

[0024] Figure 8 is a graph showing the improved survival of tumor-bearing mice administered an increased dose of CPT-11 in combination with RDP58 peptide.

[0025] Figure 9 is a bar graph illustrating the improved tumor response obtained with the combination of CPT 11 dose escalation and RDP58 peptide treatment.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0026] Methods and compositions are provided for treating major gastrointestinal complications induced by chemotherapy and/or radiotherapy including diarrhea, mucositis, stomatitis and proctitis. The methods involve the oral administration of members of a new class of synthetic peptides developed by computer-aided rational design from known HLA-derived molecules. See e.g. U.S. Patent Application No. 09/028,083 and International Publication No. WO 98/46833, the disclosures of



which are expressly incorporated by reference herein. These new peptides have been shown to have distinct immunomodulatory activities including, e.g., effective inhibition of TNF- α production at the translational level (Iyer *et al.* *J Biol Chem* 275:17051-57 (2000)) and upregulation of cellular expression of heme oxygenase-1 (HO-1) (Iyer *et al.* 1998; Cuturi *et al.* *Mol Med.* 5:820-32 (1999)). The lead compound identified herein as RDP58 is a ten-amino acid peptide consisting of D-amino acids with the following sequence: Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr (SEQ ID NO), where nL indicates D-norleucine.

[0027] As demonstrated herein, oral administration of these new peptide compounds can be efficacious in alleviating a variety of gastrointestinal toxicities induced by cytoreductive therapy. Thus, the subject peptides will find use in prophylaxis and therapy of gastrointestinal complications such as diarrhea and mucositis resulting from cytoreductive therapies, as well as the cramping, discomfort, dehydration, electrolyte imbalance and secondary infections typically attendant to the primary complication. In a further embodiment, use of the subject peptides advantageously enables dose escalation of the cytoreductive agent or combination cytoreductive therapies to increase tumor cell kill and thereby improve overall patient survival.

[0028] The methods of the present invention will find advantageous use with virtually any cytoreductive regimen inducing gastrointestinal toxicity, including radiotherapy and chemotherapeutics. Acute mucositis is common after radiotherapy for head and neck cancers, for example, and this mucosal toxicity is recognized as the principal limiting factor to further treatment intensification. See e.g., Bensadoun *et al.* *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 258:481-7 (2001). The subject peptides will find use in alleviating the mucositis induced with radiotherapy regimens directed to head and neck cancers, as well as for radiotherapy treatments impinging elsewhere upon the gastrointestinal tract, such as irradiation in prostate cancer, which can cause proctitis in the colorectal portion of the gastrointestinal tract, and whole-body irradiation protocols utilized in bone marrow transplantation.

[0029] The subject peptides will also find use in alleviating the gastrointestinal toxicities induced by chemotherapeutic agents, either alone or in combination with radiotherapy. For example, the major dose-limiting toxicity associated with the camptothecin analog irinotecan (CPT-11) is delayed or late-onset diarrhea, which can be extremely severe when associated with neutropenia. Rougier *et al.*, *J Clin Oncol* 15:251-60 (1997). In up to 30% of patients the diarrhea does not respond to conventional agents such as loperamide, and hospital admission, dose modification and/or interruption of chemotherapy is required. Cunningham *et al.*, *Lancet* 352:1413-18 (1998). As demonstrated herein, oral administration of the subject peptides is effective in alleviating this toxicity.

[0030] The subject peptides will also find use in treating mucositis induced by other commonly-used chemotherapeutic agents, including e.g., methotrexate, 5-fluorouracil, cyclophosphamide, and doxorubicin, as well as taxanes and vinca alkaloids. Severe gastrointestinal mucositis in patients undergoing cytoreductive therapy causes significant morbidity and mortality due to the mucositis itself.

as well as secondary local and systemic infections predisposed by it. Woo *et al* *Pharm Res.* 41 527-32 (2000) Despite years of study the mucositis treatments developed thus far have not had sufficient beneficial effects *Id.* As a result, mucositis also remains a primary dose-limiting toxicity associated with many types of chemotherapeutic agents including doxorubicin which is widely used in treating many types of solid tumors. See Marina *et al.* *Clin. Cancer Res.* 8:413-8 (2002).

Prophylactic and/or therapeutic treatment of mucosal injury using the subject peptides allows for increased dosages of these agents as well as more effective dosing schedules which may be contraindicated due to gastrointestinal toxicity

[0031] As described herein, administration of the subject peptides alleviates the gastrointestinal toxicities and dysfunction resulting from these intensive cytoreductive therapies Reducing or alleviating gastrointestinal toxicity and dysfunction in the context of cytoreductive treatment includes as non-limiting examples, reduction in clinical manifestations such as diarrhea, mucositis, stomatitis, proctitis, rectal bleeding malabsorption abdominal pain weight loss, fever anemia fecal occult blood fecal leukocytes, and histological indications such as crypt abscesses, leukocyte infiltration cell apoptosis transmural granulomatous inflammation superficial mucosal and submucosal inflammation etc. Furthermore, included within the definition of symptoms as used herein are changes in levels of biochemical and molecular markers associated with intestinal dysfunction and inflammation arising from cytoreductive therapy including but not limited to increase in pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF- α , interferon- γ IL-1 IL-6, IL-12, etc.), changes in enzyme markers of leukocyte activation (e.g. myeloperoxidase, COX-2 expression iNOS expression, etc.) cellular apoptosis (e.g. DNA fragmentation caspase activation, etc.) and others known in the art Although one marker may be used as an indication of reduction in gastrointestinal dysfunction, preferably more than one is used and more preferably a combination of markers is used, including combinations of clinical manifestations, histological indications and molecular/biochemical markers

[0032] For use in alleviating and/or reducing the gastrointestinal toxicities and dysfunction of patients undergoing cytoreductive treatment, the immunomodulatory peptides may be used alone or in combination with other therapeutic agents such as e.g. oxygen radical scavenging agents such as superoxide dismutase or anti-inflammatory agents such as corticosteroids hydrocortisone prednisone and the like; anti-diarrheal agents such as loperamide and the like antibacterial agents such as penicillin, cephalosporins, bacitracin and the like; antiparasitic agents such as quinacrine chloroquine and the like; antifungal agents such as nystatin, gentamicin and the like antiviral agents such as acyclovir gancyclovir, ribavirin interferons and the like; analgesic agents such as salicylic acid, acetaminophen ibuprofen, flurbiprofen, morphine and the like local anesthetics such as lidocaine, bupivacaine, benzocaine and the like; growth factors such as colony stimulating factor granulocyte-macrophage colony stimulating factor and the like; antihistamines such as diphenhydramine chlorpheniramine and the like, anti-nausea medications nutritional additives such as leukovorin and other like substances

[0033] Thus a plurality of therapeutic agents may be used in the present invention. These multi-drug combinations, include but are not limited to combinations of the subject peptides with anti-diarrheal agents, anti-inflammatory agents and/or analgesics. For example, one embodiment may comprise a combination containing the immunomodulatory peptides disclosed herein, particularly the D-stereo isomer of sequence Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr, loperamide, and an analgesic. Other combinations may be made by those skilled in the art (e.g., different anti-inflammatory agents and analgesic combinations). In this context, the peptides used are either a single peptide sequence, or an admixture of different peptide sequences of the present invention, or an admixture that includes natural analogs of the peptides of the present invention (e.g., B2702.75-84).

[0034] The methods and compositions described herein may find advantageous use in reducing or alleviating the gastrointestinal toxicity and/or dysfunction caused by any form of cytotoxic therapy, and in particular, those therapies targeting rapidly-dividing cells including both tumor cells and epithelial cells. Non-limiting examples of potential antineoplastic agents that may benefit from the subject invention include platinum compounds (e.g., spiroplatin, cisplatin, and carboplatin), camptothecin and related analogs such as irinotecan (CPT-11), taxanes such as taxol, mitotic inhibitors such as etoposide and the vinca alkaloids including e.g., vincristine, vinblastine, and vinorelbine, methotrexate, fluorouracil (5-FU), adriamycin, mitomycin, ansamitocin, bleomycin, cytosine arabinoside, arabinosyl adenine, mercaptopolythysine, busulfan, chlorambucil, melphalan (e.g., PAM, L-PAM, or phenylalanine mustard), mercaptopurine, mitotane, procarbazine hydrochloride, dactinomycin (actinomycin D), daunorubicin hydrochloride, doxorubicin hydrochloride, plicamycin (mithramycin), aminoglutethimide, estramustine phosphate sodium, flutamide, leuprolide acetate, megestrol acetate, tamoxifen citrate, testosterone, trilostane, amesacrine (m-AMSA), asparaginase (L-asparaginase), Erwinia asparaginase, etoposide (VP-16), interferon alpha-2a, interferon alpha-2b, teniposide (VM-26), vinblastine sulfate (VLB), vincristine sulfate, bleomycin sulfate, arabinosyl, hydroxyurea, procarbazine, and decarbazine, as well as radiopharmaceuticals such as radioactive iodine and phosphorus products and the like.

Immunomodulatory Peptides

[0035] Immunomodulatory peptides suitable for use in the compositions and methods of the present invention are capable of inhibiting the cellular production of inflammatory cytokines including, e.g., tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (INF- γ), interleukin (IL)-1, IL-8, IL-12, as well as other cytokines, chemokines, hematopoietic growth factors, and the like. Preferred immunomodulatory peptides include or comprise one or more of the cytomodulating oligopeptides described in co-pending U.S. Patent Applications U.S.S.N. 08/838,916 and U.S.S.N. 08/028,083, the disclosures of which are incorporated by reference herein. Particularly preferred for use in the instant methods and compositions is an immunomodulatory peptide comprising the sequence Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr, where nL is norleucine and all amino acids are the D-stereoisomer.

14

[0036] In addition previously-known active compounds which may also find use in the subject invention include HLA-B α_1 -domain particularly the amino acids from 75 to 84 and variations of this sequence where not more than 2 amino acids are replaced and in which amino acids do not include R and Y (see, e.g. WO 95/13288 and Buelow et al, *supra*). Also known are sequences based on the human TCR- α transmembrane region consisting of that sequence and sequences having not more than 2 mutations from that sequence (see Australian Application Nos. PN 0589 and PN 0590 filed January 16, 1995). These sequences include 2 basic amino acids where the 2 basic amino acids are separated by 4 aliphatic hydrophobic amino acids although the application indicates that from 3 to 5 hydrophobic amino acids may be present. By mutation is intended each substitution of one amino acid for another or an insertion or deletion, each being counted as one mutation. In certain embodiments the immunostimulatory peptides preferred for use herein may exclude such previously-known active compounds.

[0037] Generally the phrase "immunomodulatory peptides" or "immunomodulating peptides" as used herein is meant to encompass all of the foregoing peptide compounds, as well as analogs, derivatives, fusion proteins and the like. In the preferred embodiment, the core sequence of the immunomodulatory peptide desirably comprises two basic amino acids separated by from three to four hydrophobic amino acids particularly three hydrophobic amino acids and particularly where the N-terminus is a basic amino acid. More desirably, the C-terminal amino acid is an aromatic amino acid particularly tyrosine. Of particular interest is where at least one of the oligopeptide core terminal amino acids is an oligopeptide terminal amino acid which may be in the monomeric or oligomeric form of the compound.

[0038] More particularly the preferred immunomodulatory peptides for use in the compositions and methods of the present invention comprise oligopeptides having the sequence B-X-X-X-B-X-X-J-Tyr where B is a basic amino acid preferably Lys or Arg particularly Arg on at least one position preferably at both positions, J is Gly, B or an aliphatic hydrophobic amino acid of from 5 to 6 carbon atoms particularly Gly or B and X is an aliphatic or aromatic amino acid. In one embodiment, at least three X amino acid residues are the same non-polar aliphatic amino acid preferably at least four are the same non-polar aliphatic amino acid more preferably at least five are the same non-polar aliphatic amino acid and most preferably all are the same non-polar aliphatic amino acid. In a preferred embodiment, the non-polar aliphatic amino acids are of from 5 to 6 carbon atoms particularly 6 carbon atoms, particularly the non-polar aliphatic amino acids Val, Ile, Leu, and nL. Thus, in some embodiments, X is any amino acid other than a charged aliphatic amino acid and preferably any amino acid other than a polar aliphatic amino acid.

[0039] Of the six amino acids indicated by X in the B-X-X-X-B-X-X-J-Tyr peptide sequence preferably at least 3 are aliphatic amino acids of from 5 to 6 carbon atoms more preferably at least 4 are aliphatic amino acids of from 5 to 6 carbon atoms, most preferably at least 5 are aliphatic amino acids of 5-6 carbon atoms more particularly 6 carbon atoms. In a preferred embodiment, the aliphatic

amino acids are non-polar aliphatic amino acids of from 5 to 6 carbon atoms, particularly Val, Ile, Leu and nL. The other amino acids may be other uncharged aliphatic amino acids particularly non-polar aliphatic amino acids or aromatic amino acids

[0040] Compositions of particular interest will have the following formula



wherein all of the symbols have been defined previously except U, which comprises an uncharged aliphatic amino acid or aromatic amino acid particularly a non-polar aliphatic amino acid or aromatic amino acid

[0041] The amino acids may be naturally occurring amino acids or D-isomers thereof. The peptides may have one or more D-stereoisomer amino acids up to all of the amino acids. Additionally the immunomodulatory peptides may comprise oligomers of the subject peptides particularly dimers thereof or comprise a cyclic peptide, that is a ring structure, as further described below

[0042] For the purposes of this invention the amino acids (for the most part natural amino acids or their D-stereoisomers) will be broken down into the following categories

- 1 Aliphatic
 - (a) non-polar aliphatic:
Gly, Ala, Val, nL, Ile, Leu
 - (b) polar aliphatic:
 - (1) uncharged.
Cys, Met, Ser, Thr, Asn, Gln
 - (2) charged
Asp, Glu, Lys, Arg
- 2 Aromatic
Phe, His, Trp, Tyr

wherein Pro may be included in the non-polar aliphatic amino acids but will normally not be included "nL" represents norleucine where the non-polar aliphatic amino acids may be substituted with other isomers

[0043] Either or both the N- and C-terminus of the peptide may be extended by not more than a total of about 100, usually not more than a total of about 30, more usually not more than about 20 amino acids, often not more than about 9 amino acids, where the amino acids will have fewer than 25% more usually fewer than 20% polar amino acids more particularly fewer than 20% which are charged

amino acids. Thus, extensions of the above sequences in either direction are mainly done with lipophilic, uncharged amino acids particularly non-polar aliphatic amino acids and aromatic amino acids. The peptides may comprise L-amino acids, D-amino acids, or mixtures of D and L amino acids. Exceptions to the number of amino acid extensions are contemplated when the oligopeptides are expressed as fusion or chimeric proteins as described below.

[0044] The peptides may be in the form of oligomers particularly dimers of the peptides, which may be head to head, tail to tail, or head to tail, there being not more than about 6 repeats of the peptide. The oligomer may contain one or more D-stereoisomer amino acids, up to all of the amino acids. The oligomers may or may not include linker sequences between the peptides. When linker sequences are used, suitable linkers include those comprising uncharged amino acids and (Gly)_n where n is 1-7. Gly-Ser (e.g. (GS)_n, (GSGGS)_n, and (GGGS)_n where n is at least 1), Gly-Ala, Ala-Ser, or other flexible linkers, as known in the art. Linkers of Gly or Gly-Ser may be used since these amino acids are relatively unstructured which allows interaction of individual peptides with cellular target molecules and limits structural perturbations between peptides of the oligomer.

[0045] Immunomodulatory peptides may be in a structurally constrained form such as cyclic peptides of from about 9-50, usually 12 to 36 amino acids, where amino acids other than the specified amino acids may be present as a bridge. Thus, for example, addition of terminal cysteines allows formation of disulfide bridges to form a ring peptide. In some instances, one may use other than amino acids to cyclize the peptide. Bifunctional crosslinking agents are useful in linking two or more amino acids of the peptide. Other methods for ring formation are described in Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5872-5876 (1992); Wu et al., *Protein Engineering* 6:471-478 (1993); Anwer et al., *Int. J. Pep. Protein Res.* 36:392-399 (1990), and Rivera-Baeza, et al., *Neuropeptides* 30: 327-333 (1996); all references incorporated by reference. Alternatively, structurally constrained peptides are made by addition of dimerization sequences to the N- and C- terminal ends of the peptide, where interaction between dimerization sequences lead to formation of a cyclic type structure (see WO/0168585 incorporated by reference). In other instances, the subject peptides are expressed as fusions to other proteins which provide a scaffold for constrained display on a surface exposed structure, such as a loop of a coiled-coil or β -turn structure.

[0046] One or both, usually one terminus of the immunomodulatory peptide may be substituted with a lipophilic group, usually aliphatic or aralkyl, of from 8 to 36, usually 8 to 24 carbon atoms and fewer than two heteroatoms in the aliphatic chain, the heteroatoms usually being oxygen, nitrogen and sulfur. As further described below, the chain may be saturated or unsaturated, desirably having not more than 3 sites, usually not more than 2 sites of aliphatic unsaturation. Conveniently, commercially available aliphatic fatty acids, alcohols and amines may be used, such as caprylic acid, capric acid, lauric acid, myristic acid and myristyl alcohol, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid and stearyl amine, oleic acid, linoleic acid, docosahexaenoic acid, etc. (see U.S. Patent No. 6,225,444 hereby

carbon atoms in length. Other lipophilic molecules include glyceryl lipids and sterols such as cholesterol. The lipophilic groups may be reacted with the appropriate functional group on the oligopeptide in accordance with conventional methods frequently during the synthesis on a support depending on the site of attachment of the oligopeptide to the support. Lipid attachment is useful where oligopeptides may be introduced into the lumen of the liposome, along with other therapeutic agents (e.g. immunosuppressive agents) for administering the peptides and agents into a host. Increasing lipophilicity is also known to increase transport of compounds across endothelial cells and therefore useful in promoting uptake of such compounds from the intestine or blood stream into surrounding tissues.

[0047] The terminal amino group or carboxyl group of the immunomodulatory peptide may be modified by alkylation, amidation, or acylation to provide esters, amides or substituted amino groups where the alkyl or acyl group may be of from about 1 to 30, usually 1 to 24, preferably either 1 to 3 or 8 to 24, particularly 12 to 18 carbon atoms. The peptide or derivatives thereof may also be modified by acetylation or methylation to alter the chemical properties, for example lipophilicity. Other modifications include deamination of glutamyl and asparaginyl residues to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively; hydroxylation of proline and lysine; phosphorylation of hydroxyl groups of serine or threonine; and methylation of amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains (see T. E. Creighton, *Proteins. Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co. San Francisco, CA, 1983).

[0048] Depending upon their intended use, particularly for administration to mammalian hosts, the subject peptides may be modified or attached to other compounds for the purposes of incorporation into carrier molecules, changing peptide bioavailability, extend or shorten half-life, control distribution to various tissues or the blood stream, diminish or enhance binding to blood components, and the like. The subject peptides may be bound to these other components by linkers which are cleavable or non-cleavable in the physiological environment such as blood, cerebrospinal fluid, digestive fluids, etc. The peptides may be joined at any point of the peptide where a functional group is present, such as hydroxyl, thiol, carboxyl, amino, or the like. Desirably, modification will be at either the N-terminus or the C-terminus. For these purposes, the subject peptides may be modified by covalently attaching polymers such as polyethylene glycol, polypropylene glycol, carboxymethyl cellulose, dextran, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, polyproline, poly(divinyl-ether-co-maleic anhydride), poly(styrene-co-maleic anhydride), etc. Water soluble polymers, such as polyethylene glycol and polyvinylpyrrolidone are known to decrease clearance of attached compounds from the blood stream as compared to unmodified compounds. The modifications can also increase solubility in aqueous media and reduce aggregation of the peptides.

[0049] In another aspect, the peptide is preferably conjugated to small molecules for detection and isolation of the peptides, and to target or transport the immunomodulatory peptide into specific cells.

Initiate an immune response when introduced by themselves into an animal. Generally haptens are small molecules of molecular weight less than about 2 kD and more preferably less than about 1 kD. Haptens include small organic molecules (e.g. p-nitrophenol, digoxin, heroin, cocaine, morphine, mescaline, lysergic acid, tetrahydrocannabinol, cannabinol, steroids, pentamidine, biotin, etc.) Binding to the hapten, for example for purposes of detection or purification, are done with hapten specific antibodies or specific binding partners such as avidin which binds biotin.

[0050] Small molecules that target the conjugate to specific cells or tissues may also be used. It is known that presence of a biotin-avidin complex increases uptake of such modified peptides across endothelial cells. Linkage of peptides to carbohydrate moieties, for example to a β -glycoside through a serine residue on the peptide to form a β -O linked glycoside, enhances transport of the glycoside derivative via glucose transporters (Polt, R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7144-7148 (1994); Oh et al. *Drug Transport and Targeting* In: Membrane Transporters as Drug Targets, Amkdon, G. L. and Sadee, W. eds., pg 59-88, Plenum Press, New York, 1999). Both of these types of modifications are encompassed within the scope of the present invention.

[0051] The immunomodulatory peptides may have attached various label moieties such as radioactive labels and fluorescent labels for detection and tracing. Fluorescent labels include, but are not limited to, fluorescein, eosin, Alexa Fluor, Oregon Green, rhodamine Green, tetramethylrhodamine, rhodamine Red, Texas Red, coumarin and NBD fluorophores, the QSY 7, dabcyi and dabeyi chromophores, BIODIPY, Cy⁵, etc.

[0052] In one aspect, the peptides are joined to a wide variety of other peptides or proteins for a variety of purposes. The peptides may be linked to peptides or proteins to provide convenient functionalities for bonding, such as amino groups for amide or substituted amine formation, e.g. reductive amination, thiol groups for thioether or disulfide formation, carboxyl groups for amide formation, and the like. Of particular interest are peptides of at least 2, more usually 3, and not more than about 60 lysine groups, particularly polylysines of from about 4 to 20, usually 6 to 18 lysine units, referred to as multiple antigenic peptide system (MAPS), where the subject peptides are bonded to the lysine amino groups, generally at least about 20%, more usually at least about 50%, of available amino groups, to provide a multipolypeptide product (Butz, S. et al. *Pept. Res.* 7: 20-23 (1994)). In this way, molecules having a plurality of the subject peptides are obtained where the orientation of the subject peptides is in the same direction. In effect, one has a linking group to provide for tail to tail di- or oligomerization.

[0053] In another aspect, other naturally occurring or synthetic peptides and proteins may be used to provide a carrier immunogen for generating antibodies to the subject peptides, where the antibodies serve as reagents for detecting the immunomodulatory peptides or for identifying other peptides having a comparable conformation. Suitable carriers for generating antibodies include, among others,

hemocyanins (e.g. Keyhole Limpet hemocyanin - KLH); albumins (e.g. bovine serum albumin, ovalbumin, human serum albumin, etc.), immunoglobulins, thyroglobulins (e.g. bovine thyroglobulin), toxins (e.g., diphtheria toxin, tetanus toxin); and polypeptides such as polylysine as described above or polyalanine-lysine. Although proteins are preferred carriers, other carriers, preferably high molecular weight compounds, may be used, including carbohydrates, polysaccharides, lipopolysaccharides, nucleic acids, and the like of sufficient size and immunogenicity. In addition, the resulting antibodies may be used to prepare anti-idiotypic antibodies which may compete with the subject peptides for binding to a target site. These anti-idiotypic antibodies are useful for identifying proteins to which the subject peptides bind.

[0054] In another aspect, the peptides are conjugated to other peptides or proteins for targeting the immunomodulatory peptide to cells and tissues, or adding additional functionalities to the peptides. For targeting, the protein or peptide used for conjugation will be selected based on the cell or tissue being targeted for therapy (Lee, R. et al. *Arthritis. Rheum.* 46, 2109-2120 (2002), Pasqualini, R. *Q. J. Nucl. Med.* 43, 159-62 (1999); Pasqualini, R. *Nature* 380, 364-366 (1996); hereby incorporated by reference). The proteins may also comprise poly-amino acids including, but not limited to, polyarginine and polylysine, polyaspartic acid, etc., which may be incorporated into other polymers such as polyethylene glycol for preparation of vesicles or particles containing the conjugated peptides.

[0055] In another aspect, the subject peptides may be expressed in conjunction with other peptides or proteins so as to be a portion of the polypeptide chain, either internal or at the N- or C-terminus to form chimeric proteins or fusion proteins. By "fusion polypeptide" or "fusion protein" or "chimeric protein" herein is meant a protein composed of a plurality of protein components that, while typically joined in the native state, are joined by the respective amino and carboxy termini through a peptide linkage to form a continuous polypeptide. Plurality in this context means at least two, and preferred embodiments generally utilize three to twelve components, although more may be used. It will be appreciated that the protein components can be joined directly or joined through a peptide linker/spacer as outlined below.

[0056] Fusion polypeptides may be made to a variety of peptides or proteins to display the subject peptides in a conformationally restricted form, for targeting to cells and tissues, for targeting to intracellular compartments, tracking the fusion protein in a cell or an organism, and screening for other molecules that bind the peptides. Proteins useful for generating fusion proteins include various reporter proteins, structural proteins, cell surface receptors, receptor ligands, toxins, and enzymes. Exemplary proteins include fluorescent proteins (e.g., *Aequoria victoria* GFP, *Renilla reniformis* GFP, *Renilla muelleri* GFP, luciferases, etc., and variants thereof); β -galactosidase; alkaline phosphatase; *E. coli* maltose binding protein, coat proteins of filamentous bacteriophage (e.g., minor coat protein pIII, or the major coat protein, pVIII, for purposes of phage display); T cell receptor; charybotoxin;

[0057] Fusion proteins also encompass fusions with fragments of proteins or other peptides either alone or as part of a larger protein sequence. Thus the fusion polypeptides may comprise fusion partners. By "fusion partners" herein is meant a sequence that is associated with the peptide that confers all members of the proteins in that class a common function or ability. Fusion partners can be heterologous (i.e. not native to the host cell) or synthetic (i.e. not native to any cell). The fusion partners include, but are not limited to: a) presentation structures which provide the subject peptides in a conformationally restricted or stable form; b) targeting sequences which allow localization of the peptide to a subcellular or extracellular compartment; c) stability sequences which affects stability or protection from degradation to the peptide or the nucleic acid encoding it; d) linker sequences which conformationally decouples the oligopeptide from the fusion partner; and e) any combination of the above.

[0058] In one aspect, the fusion partner is a presentation structure. By "presentation structure" as used herein is meant a sequence that when fused to the subject peptides presents the peptides in a conformationally restricted form. Preferred presentation structures enhance binding interactions with other binding partners by presenting a peptide on a solvent exposed exterior surface, such as a loop. Generally such presentation structures comprise a first portion joined to the N-terminus of the immunomodulatory peptide and a second portion joined to the C-terminal end of the subject peptide. That is, the peptide of the present invention is inserted into the presentation structures. Preferably the presentation structures are selected or designed to have minimal biological activity when expressed in the target cells.

[0059] Preferably the presentation structures maximize accessibility to the peptides by displaying or presenting the peptide or an exterior loop. Suitable presentation structures include, but are not limited to, coiled coil stem structures, minibody structures, loops on β -turns, dimerization sequences, cysteine linked structures, transglutaminase linked structures, cyclic peptides, helical barrels, leucine zipper motifs, etc.

[0060] In one embodiment, the presentation structure is a coiled-coil structure which allows presentation of the subject peptide on an exterior loop (see Myszka et al. *Biochemistry* 33: 2362-2373 (1994)), such as a coiled-coil leucine zipper domain (see Martin et al. *EMBO J* 13: 5303-5309 (1994)). The presentation structure may also comprise minibody structures, which is essentially comprised of a minimal antibody complementarity region. The minibody structure generally provides two peptide regions that are presented along a single face of the tertiary structure in the folded protein (see Bianchi et al. *J. Mol. Biol.* 236: 649-659 (1994); Tramontano et al. *J. Mol. Recognit.* 7: 9-24 (1994)).

[0061] In another aspect, the presentation structure comprises two dimerization sequences. The dimerization sequences which can be same or different, associate non-covalently with sufficient affinity under physiological conditions to structurally constrain the displayed peptide; that is, if a dimerization sequence is used at each terminus of the subject oligopeptide, the resulting structure can display the subject peptide in a structurally limited form. A variety of sequences are suitable as dimerization sequences (see for example WO 99/51625, incorporated by reference). Any number of protein-protein interaction sequences known in the art are useful.

[0062] In a further aspect, the presentation sequence confers the ability to bind metal ions to generate a conformationally restricted secondary structure. Thus, for example, C2H2 zinc finger sequences are used. C2H2 sequences have two cysteines and two histidines placed such that a zinc ion is chelated. Zinc finger domains are known to occur independently in multiple zinc-finger peptides to form structurally independent, flexibly linked domains (see Nakaseko, Y. et al. *J. Mol. Biol.* 228:619-638 (1992)). A general consensus sequence is (5 amino acids)-C-(2 to 3 amino acids)-C-(4 to 12 amino acids)-H-(3 amino acids)-H-(5 amino acids). A preferred example would be -FQCEEC-random peptide of 3 to 20 amino acids-HIRSHTG. Similarly, CCHC boxes having a consensus sequence -C-(2 amino acids)-C-(4 to 20 random peptide)-H-(4 amino acids)-C- can be used (see Bavoso, A. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242:385-389 (1998)). Other examples include (1) -VKCFNC-4 to 20 random amino acids-HTARNCR-, based on the nucleocapsid protein P2; (2) a sequence modified from that of the naturally occurring zinc-binding peptide of the Laap-1 LIM domain (Hammarstrom A. et al. *Biochemistry* 35:12723-32 (1996)); and (3) -MNPNCARCG-4 to 20 random amino acids-HKACF-, based on the NMR structural ensemble 1ZFP (Hammarstrom et al., *supra*).

[0063] In yet another aspect, the presentation structure is a sequence that comprises two or more cysteine residues such that a disulfide bond may be formed, resulting in a conformationally constrained structure. That is, use of cysteine containing peptide sequences at each terminus of the subject immunomodulatory peptides results in cyclic peptide structures, as described above. A cyclic structure reduces susceptibility of the presented peptide to proteolysis and increases accessibility to its target molecules. As will be appreciated by those skilled in the art, this particular embodiment is particularly suited when secretory targeting sequences are used to direct the peptide to the extracellular space.

[0064] In another embodiment, the fusion partner is a targeting sequence. Targeting sequences comprise binding sequences capable of causing binding of the expressed product to a predetermined molecule or class of molecules while retaining bioactivity of the expression product; sequences signaling selective degradation of the fusion protein or binding partners; and sequences capable of constitutively localizing peptides to a predetermined cellular locale. Typical cellular locations include subcellular locations (e.g., Golgi, endoplasmic reticulum, nucleus, nucleoli, nuclear membrane, mitochondria, secretory vesicles, lysosomes) and extracellular locations by use of secretory signals.

[0065] Various targeting sequences are known in the art. Targeting to nucleus is achieved by use of nuclear localization signals (NLS). NLSs are generally short, positively charged domains that directs the proteins in which the NLS is present to the cell's nucleus. Typical NLS sequences include the single basic NLSs of SV40 large T antigen (Kalderson et al. *Cell* 39: 499-509 (1984)); human retinoic acid receptor- β nuclear localization signal (NF- κ B p50 and p65 (Ghosh et al. *Cell* 62: 1019-1029 (1990)); Nolan et al. *Cell* 64: 981-999 (1991)), and the double basic NLSs as exemplified by nucleoplasmin (Dingwall et al. *J. Cell Biol.* 107: 641-649 (1988)).

[0066] In another aspect the targeting sequences are membrane anchoring sequences. Peptides are directed to the membrane via signal sequences and stably incorporated in the membrane through a hydrophobic transmembrane domain (designated as TM). The TM segment is positioned appropriately on the expressed fusion protein to display the subject peptide either intracellularly or extracellularly as is known in the art. Membrane anchoring sequences and signal sequences include, but are not limited to those derived from (a) class I integral membrane proteins such as IL-2 receptor β -chain; Hatakeyama et al. *Science* 244: 551-556 (1989)) and insulin receptor β -chain (Hatakeyama et al. *supra*); (b) class II integral membrane proteins such as neutral endopeptidase (Malfroy et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 59-66 (1987)); and (c) type III proteins such as human cytochrome P450 NF25 (Hatakeyama et al. *supra*); and those from CD8, ICAM-2, IL-8R, and LFA-1.

[0067] Membrane anchoring sequences also include the GPI anchor which results in covalent bond formation between the GPI anchor sequence and the lipid bilayer via a glycosyl-phosphatidylinositol. GPI anchor sequences are found in various proteins, including Thy-1 and DAF (see Homans et al. *Nature* 333: 269-272 (1988)). Similarly, acylation sequences allow for attachment of lipid moieties, e.g. isoprenylation (i.e., farnesyl and geranyl-geranyl; see Farnsworth et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11863-11867 (1994) and Aronheim et al. *Cell* 78: 949-951 (1994)), myristoylation (Stickney J.T. *Methods Enzymol.* 332: 64-77 (2001)), or palmitoylation. In one aspect, the subject peptide will be bound to a lipid group at a terminus so as to be able to be bound to a lipid membrane such as a liposome.

[0068] Other intracellular targeting sequences are lysosomal targeting sequences (e.g., sequences in LAMP-1 and LAMP-2, Uthayakumar et al. *Cell Mol. Biol. Res.* 41: 405-420 (1995) and Konecki et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205: 1-5 (1994)); mitochondrial localization sequences (e.g. mitochondrial matrix sequences, mitochondrial inner membrane sequences, mitochondrial intermembrane sequences or mitochondrial outer membrane sequences see Shatz, G. *Eur. J. Biochem.* 165: 1-6 (1987)); endoplasmic reticulum localization sequences (e.g. calreticulin Pelham H. R. *Royal Soc. London Transactions B.* 1-10 (1992); adenovirus E3/19K protein, Jackson et al. *EMBO J.* 9: 3153-3162 (1990)); and peroxisome localization sequences (e.g., luciferase peroxisome matrix sequence, Keller et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 4: 3264-3268 (1987)).

[0069] In another aspect, the targeting sequences is a secretory signal sequence which effects secretion of the peptide. A large number of secretory sequences are known to direct secretion of a peptide into the extracellular space when placed at the amino end relative to the peptide of interest, particularly for secretion of a peptide by cells, including transplanted cells. Suitable secretory signals included those found in IL-2 (Villinger et al *J Immuno.* 155 3948-3954 (1995)) growth hormone (Roskam et al *Nucleic Acids Res.* 7 305-320 (1979)) preproinsulin and Influenza HA protein

[0070] The fusion partner may further comprise a stability sequence, which confers stability to the fusion protein or the nucleic acid encoding it. Thus, for example, incorporation of glycines after the initiating methionine (e.g., MG or MGG) can stabilize or protect the fused peptide from degradation via ubiquitination as per the N-End rule of Varshavsky thus conferring increased half-life in a cell.

[0071] Additional amino acids may be added for tagging the peptide for purposes of detection or purification. These sequences may comprise epitopes recognized by antibodies (e.g., flag tags) or sequences that bind ligands such as metal ions. Various tag sequences and ligand binding sequences are well known in the art. These include, but is not limited to poly-histidine (e.g., 6xHis tags, which are recognized by antibodies but also bind divalent metal ions); poly-histidine-glycine (poly-his-gly) tags, flu HA tag polypeptide; c-myc tag. Flag peptide (Hopp et al *BioTechnology* 6 1204-1210 (1988)); KT3 epitope peptide; tubulin epitope peptide (Skinner et al *J. Biol. Chem.* 266 15163-12166 (1991)); and T7 gene 10 protein peptide tag (Lutz-Freyermuth et al *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 6363-6397 (1990))

[0072] Fusion partners includes linker or tethering sequences for linking the peptides and for presenting the peptides in an unhindered structure. As discussed above, useful linkers include glycine polymers (G)_n where n is 1 to about 7; glycine-serine polymers (e.g., (GS)_n, (SGGS)_n and (GGGS)_n where n is at least 1), glycine-alanine polymers, alanine-serine polymers and other flexible linkers known in the art. Preferably the linkers are glycine or glycine-serine polymers since these amino acids are relatively unstructured, hydrophilic, and are effective for joining segments of proteins and peptides.

[0073] In the present invention, combinations of fusion partners may be used. Any number of combinations of presentation structures, targeting sequences, rescue sequences, tag sequences and stability sequences may be used with or without linker sequences.

[0074] The immunomodulatory peptides utilized in the methods and compositions of the present invention may be prepared in a number of ways. Chemical synthesis of peptides are well known in the art. Solid phase synthesis is commonly used and various commercial synthetic apparatuses are available, for example automated synthesizers by Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, Beckman etc. Solution phase synthetic methods may also be used, although it is less convenient. Amino

these standard techniques, naturally occurring amino acids may be substituted with unnatural amino acids particularly D-stereoisomers, and also with amino acids with side chains having different lengths or functionalities. Functional groups for conjugating to small molecules, label moieties, peptides or proteins, or for purposes of forming cyclized peptides may be introduced into the molecule during chemical synthesis. In addition, small molecules and label moieties may be attached during the synthetic process. Preferably, introduction of the functional groups and conjugation to other molecules minimally affects the structure and function of the subject peptide.

[0075] The N- and C- terminus may be derivatized using conventional chemical synthetic methods. The immunomodulatory peptides of the invention may contain an acyl group such as an acetyl group. Methods for acylating and specifically for acetylating the free amino group at the N-terminus are well known in the art. For the C-terminus, the carboxyl group may be modified by esterification with alcohols or amidated to form $-CONH_2$, $CONHR$, or $CONR$, wherein each R is a hydroxycarbyl (1-8 carbons). Methods of esterification and amidation are done using well known techniques.

[0076] The subject immunomodulatory peptides utilized herein may also be present in the form of a salt, generally in a salt form which is pharmaceutically acceptable. These include inorganic salts of sodium, potassium, lithium, ammonium, calcium, magnesium, iron, zinc, copper, manganese and the like. Various organic salts of the peptide may also be made with, including but not limited to, acetic acid, propionic acid, pyruvic acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, cinnamic acid, salicylic acid, etc.

[0077] Synthesis of the immunomodulatory peptides and derivatives thereof may also be carried out by using recombinant techniques. For recombinant production, one may prepare a nucleic acid sequence which encodes a single oligopeptide or preferably a plurality of the subject peptides in tandem with an intervening amino acid or sequence, which allows for cleavage to the single peptide or head to tail dimers. Where methionine or tryptophan is absent, an intervening methionine or tryptophan may be incorporated which allows for single amino acid cleavage using CNBr or BNPS-Skatole (2-(2-nitrophenylsulfanyl)-3-methyl-3-bromoindolenine), respectively. Alternatively, cleavage is accomplished by use of sequences that are recognized by particular proteases for enzymatic cleavage or sequences that act as self-cleaving sites (e.g., 2A sequences of aphoviruses and cardioviruses, Donnelly M. L. J. *Gen. Virol.* 78: 13-21 (1997); Donnelly M. L. J. *Gen. Virol.* 82: 1027-41 (2001), hereby incorporated by reference). The subject peptide may also be made as part of a larger peptide which can be isolated and the oligopeptide obtained by proteolytic cleavage or chemical cleavage. The particular sequence and the manner of preparation will be determined by convenience, economics, purity required, and the like. To prepare these compositions, a gene encoding a particular peptide, protein or fusion protein is joined to a DNA sequence encoding the immunomodulatory peptides of the present invention to form a fusion nucleic acid, which is introduced into an expression vector. Expression of the fusion nucleic acid is under the control of a suitable

25

organism (see, Sambrook et al. *Molecular Biology: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratories: Cold Spring Harbor, NY 2001; Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons: New York, NY 1988, updates up to 2002; incorporated by reference)

[0076] When the synthesis or delivery of the immunomodulatory peptides are via nucleic acids encoding the subject peptides, the nucleic acids are cloned into expression vectors and introduced into cells or a host. The expression vectors are either self-replicating extrachromosomal vectors or vectors that integrate into the host chromosome, for example vectors based on retroviruses, vectors with site specific recombination sequences, or by homologous recombination. Generally these vectors include control sequences operably linked to the nucleic acids encoding the peptides. By "control sequences" is meant nucleic acid sequences necessary for expression of the subject peptides in a particular host organism. Thus, control sequences include sequences required for transcription and translation of the nucleic acids, including, but not limited to, promoter sequences, enhancer or transcriptional activator sequences, ribosomal binding sites, transcriptional start and stop sequences, polyadenylation signals, etc.

[0078] A variety of promoters are useful in expressing the peptides of the present invention. The promoters may be constitutive, inducible, and/or cell specific and may comprise natural promoters, synthetic promoters (e.g., tTA tetracycline inducible promoters), or hybrids of various promoters. Promoters are chosen based on, among others, the cell or organism in which the proteins are to be expressed, the level of desired expression, and regulation of expression. Suitable promoters are bacterial promoters (e.g., pL1 phage promoter, tac promoter, lac promoter, etc.); yeast based promoters (e.g., GAL4 promoter, alcohol dehydrogenase promoter, tryptophane synthase promoter, copper inducible CUP1 promoter, etc.); plant promoters (e.g., CaMV 35S, nopoline synthase promoter, tobacco mosaic virus promoter, etc.); insect promoters (e.g., Autographa nuclear polyhedrosis virus, Aedes DNV, viral p8 and p81, hsp70, etc.) and promoters for expression in mammalian cells (e.g., ubiquitin gene promoter, ribosomal gene promoter, β -globin promoter, thymidine kinase promoter, heat shock protein promoters, and ribosomal gene promoters, etc.), and particularly viral promoters such as cytomegalovirus (CMV) promoter, simian virus (SV40) promoter, and retroviral promoters.

[0080] By "operably linked" herein is meant that a nucleic acid is placed into a functional relationship with another nucleic acid. In the present context, operably linked means that the control sequences are positioned relative to the nucleic acid sequence encoding the subject peptides in such a manner that expression of the encoded peptide occurs. The vectors may comprise plasmids or comprise viral vectors, for example retroviral vectors, which are useful delivery systems if the cells are dividing cells, or lentiviral and adenoviral vectors if the cells are non-dividing cells. Particularly preferred are self-inactivating retroviral vectors (SIN vectors), which have inactivated viral promoters at the 3'-LTR, thereby permitting control of expression of heterologous genes by use of non-viral promoters inserted into the viral vector (see for example, Hoffman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5185 (1996)). As

retroviral vectors for all eukaryotic cells particularly for higher eukaryotes (Morgan R.A. et al *J. Virol* 67 4712-21 (1993) Yang Y et al *Hum. Gene Ther* 6 1203-13 (1995)).

[0081] In addition the expression vectors also contain a selectable marker gene to allow selection of transformed host cells. Generally, the selection will confer a detectable phenotype that enriches for cells containing the expression vector and further permits differentiation between cells that express and do not express the selection gene. Selection genes are well known in the art and will vary with the host cell used. Suitable selection genes included genes that render the cell resistant to a drug, genes that permit growth in nutritionally deficient media, and reporter genes (e.g. β -galactosidase, fluorescent proteins, glucuronidase, etc.), all of which are well known in the art and available to the skilled artisan.

[0082] There are a variety of techniques available for introducing nucleic acids into viable cells. By "introduced" into herein is meant that the nucleic acid enters the cells in a manner suitable for subsequent expression of the nucleic acid. Techniques for introducing the nucleic acids will vary depending on whether the nucleic acid is transferred *in vitro* into cultured cells or *in vivo* into the cells of the intended host organism and the type of host organism. Exemplary for introducing the nucleic acids *in vitro* include the use of liposomes (Lipofectin®), electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, and biolistic particle bombardment. Techniques for transfer *in vivo* include direct introduction of the nucleic acid, use of viral vectors (typically retroviral vectors) and liposome mediated transfection such as viral coated liposome mediated transfection. The nucleic acids expressing the peptides of the present invention may exist transiently or stably in the cytoplasm or stably integrate into the chromosome of the host (i.e. through use of standard regulatory sequences, selection markers, etc.). Suitable selection genes and marker genes are used in the expression vectors of the present invention.

[0083] In some situations it is desirable to include an agent that targets the target cells or tissues, such as an antibody specific for a cell surface protein on the target cell, a ligand for a receptor on the target cell, a lipid component on the cell membrane, or a carbohydrate on the cell surface. If liposomes are employed, proteins that bind a cell surface protein which is endocytosed may be used for targeting and/or facilitating uptake. These include as non-limiting examples, capsid proteins or fragments thereof tropic for a particular cell type, antibodies for proteins which undergo internalization (see Wu et al *J. Biol. Chem* 262 4429-4432 (1987); Wagner et al *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 3410-3414 (1990)), and proteins that direct localization (e.g. antibody to transferrin receptor for targeting to brain) or enhance *in vivo* half-life.

[0084] Expression is done in a wide range of host cells that span prokaryotes and eukaryotes including bacteria, yeast, plants, insects, and animals. The immunomodulatory peptides of the present invention may be expressed in among others *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*

such as COS, CHO HeLa and the like either intracellularly or in a secreted form by fusing the peptides to an appropriate signal peptide. Secretion from the host cell may be done by fusing the DNA encoding the peptide and a DNA encoding a signal peptide. Secretory signals are well known in the art for bacteria, yeast, insects, plants and mammalian systems. Nucleic acids expressing the peptides may be inserted into cells for example stem cells for tissue expression or bacteria for gut expression and the cells transplanted into the host to provide an *in vivo* source of the peptides.

[0085] If desired, various groups are introduced into the peptide during synthesis or during expression which allows for linking to other molecules or to a surface. Thus, cysteines can be used to make thioethers or cyclic peptides; histidines for linking to a metal ion complex; carboxyl groups for forming amides or esters; amino groups for forming amides, and the like. When cysteine residues are introduced for cyclizing the peptide, formation of disulfide bonds are conducted in the presence of mild oxidizing agents. Chemical oxidants may be used or the cysteine bearing peptides are exposed to oxygen to form the linkages, typically in a suitable solution such as an aqueous buffer containing DMSO. As described above, lipids may be attached either chemically or by use of appropriate lipidation sequences in the expressed peptide.

[0086] For conjugating various molecules to the peptides of the present invention, functional groups on the peptides and the other molecule are reacted in presence of an appropriate conjugating (e.g. crosslinking) agent. The type of conjugating or crosslinking agent used will depend on the functional groups, such as primary amines, sulfhydryls, carbonyls, carbohydrates and carboxylic acids being used. Agents may be fixatives and crosslinking agents, which may be homobifunctional, heterobifunctional or trifunctional crosslinking agents (Pierce Endogen, Chicago, IL). Commonly used fixatives and crosslinking agents include formaldehyde, glutaraldehyde, 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane, N-hydroxysuccinimide esters, disuccinimide esters, maleimides (e.g. bis-N-maleimido-1,8-octane), and carbodilimides (e.g., N-ethyl-N-(3-dimethylaminopropyl)-carbodilimide; dicyclohexylcarbodilimide). Spacer molecules comprising alkyl or substituted alkyl chains with lengths of 2 - 20 carbons may be used to separate conjugates. Preferably, reactive functional groups on the peptide not selected for modification are protected prior to coupling of the peptide to other reactive molecules to limit undesired side reactions. By "protecting group" as used herein is a molecule bound to a specific functional group which is selectively removable to reexpose the functional group (see Greene, T.W. and Wuts, P.G.M. Protective Groups in Organic Synthesis (3rd ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999). The peptides may be synthesized with protected amino acid precursors or reacted with protecting groups following synthesis but before reacting with crosslinking agent. Conjugations may also be indirect, for example by attaching a biotin moiety which can be contacted with a compound or molecule which is coupled to streptavidin or avidin.

[0087] For peptides that have reduced activity in the conjugated form, the linkage between the peptides and the conjugated compound is chosen to be sufficiently labile to result in cleavage under

bonds, e.g. imino bonds and esters, are well known in the art (see U.S. Patent No. 5,108,921 hereby incorporated by reference). These modifications permit administration of the peptides in potentially a less active form which is then activated by cleavage of the labile bond.

[0088] In a preferred embodiment, the immunomodulatory peptides of the present invention may be purified or isolated after synthesis or expression. By "purified" or "isolated" is meant free from the environment in which the peptide is synthesized or expressed and in a form where it can be practically used. Thus purified or isolated is meant that the peptide or its derivative is substantially pure, i.e. more than 90% pure, preferably more than 95% pure, and preferably more than 99% pure. The peptides and derivatives thereof may be purified and isolated by way known to those skilled in the art, depending on other components present in the sample. Standard purification methods include electrophoretic, immunological, and chromatographic techniques including ion exchange, hydrophobic, affinity, size exclusion, reverse phase HPLC, and chromatofocusing. The proteins may also be purified by selective solubility for instance in the presence of salts or organic solvents. The degree of purification necessary will vary depending on use of the subject peptides. Thus in some instances no purification will be necessary.

[0089] For the most part, the compositions used will comprise at least 20% by weight of the desired product, more usually at least about 75% by weight, preferably at least about 95% by weight, and usually at least about 99.5% by weight, relative to contaminants related to the method of product preparation, the purification procedure, and its intended use, for example with a pharmaceutical carrier for the purposes of therapeutic treatment. Usually the percentages will be based upon total protein.

[0090] The subject peptides find use in treating gastrointestinal toxicity and dysfunction in patients undergoing cytotoxic therapy e.g. chemotherapy and radiation therapy. In addition these peptides enable the clinical oncologist to administer an increased maximum tolerated dose of the cytotoxic agent, thereby providing significant improvements in tumor response and life expectancy.

Additional Therapeutic Agents

[0091] Additional therapeutic or pharmaceutically active agents may also be advantageously used in combination with the above compositions, including corticosteroids (e.g., prednisone,

b1a, interferon-b1a), immune suppressants (e.g. azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporin); anti-inflammatory compounds including but not limited to, non-steroidal anti-inflammatory compounds (e.g. sulfasalazine, aminosalicylates, celecoxib, lipoxins, etc.); anti-diarrheal agents such as loperamide, hydroxyurea and thalidomide, which is known to increase IL-2 and IL-12 levels

[0082] As will be appreciated by those skilled in the art, in certain circumstances where the gastrointestinal toxicity and dysfunction is further complicated by pathogen infection the peptides of the present invention may be used with drugs directed against eliminating or killing the pathogen. These include antibiotics, anti-fungal agents, anti-protozoan agents, and anti-viral agents as is well known in the art. These drugs may be used prior to, concomitantly with or subsequent to treatment with the peptides described herein.

[0083] The present invention may also be used in combination of anti-inflammatory cytokines, growth factors, or leukocyte migration inhibitory compounds. Useful cytokines include but are not limited to, IL-4, IL-10, IL-11 and IL-13, particularly IL-4 and IL-10 which are known to suppress production of inflammatory cytokines and to be involved in restoring the immune system. Growth factors include transforming growth factor- β (TGF- β) and GM-CSF. These cytokines and growth factors may be administered as purified proteins - obtained naturally or from recombinant sources - or administered in the form of nucleic acids that express these peptides, particularly as fusion proteins. Leukocyte migration inhibitory compounds, include, among others, antibodies directed against adhesion molecules and their cognate receptors involved in cell adhesion, particularly leukocyte adhesion to endothelial cells, such as for E-, L- and P-selectins, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), mucosal addressin cell adhesion molecule, (MAdCAM-1); and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and their cognate receptors, such as $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_4\beta_7$.

[0084] In another preferred embodiment, the immunomodulatory peptides are further combined with other inhibitors of pro-inflammatory cytokine activity or agents that reduce synthesis of these cytokines. These include agents that block cytokine function such as antibodies to IL-5, IL-6, IL-8, IL-18, IL-23, TNF- α , and IFN- γ , and antibodies to their cognate receptors and cytokine receptor antagonists (see for example, U.S. Patent No. 6,436,927). In addition, blocking agents include soluble receptors/proteins, for instance receptors fused to IgG domains that bind to cytokines to reduce activation of CD4⁺ T-cells, macrophages, and granulocytes involved in progression of the inflammatory reaction.

Pharmaceutical Formulations

[0085] The subject compositions, either alone or in combination, may be used *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* depending on the particular application. In accordance, the present invention provides for administering a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a therapeutically effective amount of one or more of the subject peptides or suitable salts thereof.

The pharmaceutical composition may be formulated as powders, granules, solutions, suspensions, aerosols, solids, pills, tablets, capsules, gels, topical crèmes, suppositories, transdermal patches, etc.

[096] As indicated above, pharmaceutically acceptable salts of the peptides is intended to include any art recognized pharmaceutically acceptable salts including organic and inorganic acids and/or bases. Examples of salts include sodium, potassium, lithium, ammonium, calcium, as well as primary, secondary, and tertiary amines, esters of lower hydrocarbons, such as methyl, ethyl, and propyl. Other salts include organic acids such as acetic acid, propionic acid, pyruvic acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, cinnamic acid, salicylic acid, etc.

[097] As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" comprises any of standard pharmaceutically accepted carriers known to those of ordinary skill in the art in formulating pharmaceutical compositions. Thus, the subject peptides, by themselves, such as being present as pharmaceutically acceptable salts or as conjugates or nucleic acid vehicles encoding such peptides, may be prepared as formulations in pharmaceutically acceptable diluents, for example, saline, phosphate buffer saline (PBS), aqueous ethanol, or solutions of glucose, mannitol, dextran, propylene glycol, oils (e.g., vegetable oils, animal oils, synthetic oils, etc.), microcrystalline cellulose, carboxymethyl cellulose, hydroxypropyl methyl cellulose, magnesium stearate, calcium phosphate, gelatin, polysorbate 80 or the like, or as solid formulations in appropriate excipients. The pharmaceutical compositions also contain anti-retroviral agents when such agents are part of the compositions. Additionally, the formulations may include bactericidal agents, stabilizers, buffers, emulsifiers, preservatives, sweetening agents, lubricants, or the like. If administration is by oral route, the oligopeptides may be protected from degradation by using a suitable enteric coating or by other suitable protective means, for example, in a polymer matrix such as microparticles or pH sensitive hydrogels.

[098] Suitable formulations may be found in, among others, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, Mack Publishing Co., Philadelphia, PA, 1985 and Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed., Kibbe, A.H., ed., Washington DC, American Pharmaceutical Association, 2000, hereby incorporated by reference in their entirety. The pharmaceutical compositions described herein can be made in a manner well known to those skilled in the art (e.g., by means conventional in the art, including mixing, dissolving, granulating, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing processes).

[099] Additionally, the peptides, either alone or with other agents including chemotherapeutic agents, may also be introduced or encapsulated into the lumen of liposomes for delivery and for extending life time of the peptide formulations *ex vivo* or *in vivo*. As known in the art, liposomes can be categorized into various types: multilamellar (MLV), stable plurilamellar (SPLV), small unilamellar (SUV) or large unilamellar (LUV) vesicles. Liposomes can be prepared from various lipid compounds, which may be synthetic or naturally occurring, including phosphatidyl ethers and esters, such as

phosphatidylserine, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, dimyristoylphosphatidylcholine, sterols such as cholesterol, cerebrosides, sphingomyelin, glycerolipids and other lipids (see for example, U.S. Patent No. 5,833,948).

[0100] Cationic lipids are also suitable for forming liposomes. Generally, the cationic lipids have a net positive charge and have a lipophilic portion, such as a sterol or an acyl or dialcyl side chain. Preferably, the head group is positively charged. Typical cationic lipids include 1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylamino)propane, N-[1-(2,3-ditetradecyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammonium bromide, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammonium bromide; N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride; 3-[N-(N',N'-dimethylamino)ethane] carbamoyl] cholesterol, and dimethyldioctadecylammonium.

[0101] Of particular interest are fusogenic liposomes, which are characterized by their ability to fuse with a cell membrane upon appropriate change in physiological condition or by presence of fusogenic component, particularly a fusogenic peptide or protein. In one aspect, the fusogenic liposomes are pH and temperature sensitive in that fusion with a cell membrane is affected by change in temperature and/or pH (see for example, U.S. Patent No. 4,789,633 and 4,873,089). Generally, pH sensitive liposomes are acid sensitive. Thus, fusion is enhanced in physiological environments where the pH is mildly acidic, for example the environment of a lysosome, endosome and inflammatory tissues. This property allows direct release of the liposome contents into the intracellular environment following endocytosis of liposomes (see Mizoue, T. *Int. J. Pharm.* 237: 129-137 (2002)).

[0102] Another form of fusogenic liposomes comprise liposomes that contain a fusion enhancing agent. That is, when incorporated into the liposome or attached to the lipids, the agents enhance fusion of the liposome with other cellular membranes, thus resulting in delivery of the liposome contents into the cell. The agents may be fusion enhancing peptides or proteins including hemagglutinin HA2 of influenza virus (Schoen, P. *Gene Ther.* 6: 823-832 (1999)); Sendai virus envelope glycoproteins (Mizuguchi, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 402-407 (1996)); vesicular stomatitis virus envelope glycoproteins (VSV-G) glycoprotein (Abe, A. et al. *J. Virol.* 72: 6159-63 (1998)); peptide segments or mimics of fusion enhancing proteins, and synthetic fusion enhancing peptides (Kono, K. et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1164: 81-90 (1993); Pecher, E. *Biochemistry* 37: 2361-71 (1998); U.S. Patent No. 6,372,720).

[0103] Liposomes also include vesicles derivatized with a hydrophilic polymer, as provided in U.S. Patent No. 5,013,558 and 5,395,619 hereby incorporated by reference, (see also Kono, K. et al. *J. Controlled Release* 68: 225-35 (2000); Zalpeky, S. et al. *Bioconj. Chem.* 6: 705-708 (1995)) to extend the circulation lifetime *in vivo*. Hydrophilic polymers for coating or derivation of the liposomes include polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, polyvinylmethylether, polyaspartamide, hydroxymethyl cellulose, hydroxyethyl cellulose, and the like. In addition, as described above, attaching molecules that bind a cell surface protein which is endocytosed, e.g., capsid proteins or

fragments thereof tropic for a particular cell types and antibodies for cell surface proteins which undergo internalization (see Wu et al, *supra*; Wagner et al *supra*), may be used for targeting and/or facilitating uptake of the liposomes to specific cells or tissues

[0104] Liposomes are prepared by ways well known in the art (see for example Szoka, F et al *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9 467-508 (1980)) One typical method is the lipid film hydration technique in which lipid components are mixed in an organic solvent followed by evaporation of the solvent to generate a lipid film Hydration of the film in aqueous buffer solution preferably containing the subject peptide or nucleic acid, results in an emulsion which is sonicated or extruded to reduce the size and polydispersity Other methods include reverse-phase evaporation (see Pidgeon C et al *Biochemistry* 26 17-29 (1987); Duzgunes, N et al *Biochim. Biophys. Acta.* 732 289-99 (1983)), freezing and thawing of phospholipid mixtures, and ether infusion.

[0105] In another preferred embodiment, the carriers are in the form of microparticles microcapsules microspheres and nanoparticles, which may be biodegradable or non-biodegradable (see for example, *Microencapsulates. Methods and Industrial Applications* Drugs and Pharmaceutical Sciences, Vol 73, Benita, S ed Marcel Dekker Inc. New York, 1998 incorporated by reference) As used herein microparticles microspheres microcapsules and nanoparticles mean a particle, which is typically a solid containing the substance to be delivered The substance is within the core of the particle or attached to the particle's polymer network. Generally the difference between microparticles (or microcapsules or microspheres) and nanoparticles is one of size As used herein microparticles have a particle size range of about 1 to about >1000 microns Nanoparticles have a particle size range of about 10 to about 1000 nm

[0106] A variety of materials are useful for making microparticles Non-biodegradable microcapsules and microparticles include but not limited to those made of polysulfones, poly(acrylonitrile-co-vinyl chloride), ethylene-vinyl acetate, hydroxyethylmethacrylate-methyl-methacrylate copolymers. These are useful for implantation purposes where the encapsulated peptide diffuses out from the capsules In another aspect, the microcapsules and microparticles are based on biodegradable polymers preferably those that display low toxicity and are well tolerated by the immune system These include protein based microcapsules and microparticles made from fibrin casein, serum albumin, collagen gelatin lecithin chitosan alginate or poly-amino acids such as poly-lysine Biodegradable synthetic polymers for encapsulating may comprise polymers such as polylactide (PLA), polyglycolide (PGA), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) poly(ϵ -caprolactone), polydioxanone trimethylene carbonate, polyhydroxyalkonates (e.g. poly(β -hydroxybutyrate)), poly(γ -ethyl glutamate), poly(DTH iminocarbonyl (bisphenol A iminocarbonate), poly (ortho ester), and polycyanoacrylate. Various methods for making microparticles containing the subject compositions are well known in the art, including solvent removal process (see for example U.S. Patent No. 4,399,330); emulsification and evaporation (Maysinger, D et al *Exp. Neuro.* 141 47-56 (1998); Jeffrey, H et al *Pharm. Res.* 10 362-68 (1993)) spray drying,

and extrusion methods

[0107] Another type of carrier is nanoparticles which are generally suitable for intravenous administrations. Submicron and nanoparticles are generally made from amphiphilic diblock, triblock, or multiblock copolymers as is known in the art. Polymers useful in forming nanoparticles include but are limited to poly(lactic acid) (PLA, see Zambaux et al. *J Control Release* 80 179-188 (1999)) poly(lactide-co-glycolide) blends of poly(lactide-co-glycolide) and polycaprolactone, diblock polymer poly(L-histidine-block-L-glutamate), diblock and triblock poly(lactic acid) (PLA) and poly(ethylene oxide) (PEO) (see De Jaeghere F et al. *Pharm. Dev Technol* 5 473-83 (2000)) acrylates, arylamides, polystyrene, and the like. As described for microparticles, nanoparticles may be non-biodegradable or biodegradable. Nanoparticles may also be made from poly(alkylcyanoacrylate), for example poly(butylcyanoacrylate) in which the peptide is absorbed onto the nanoparticles and coated with surfactants (e.g. polysorbate 80). Methods for making nanoparticles are similar to those for making microparticles and include among others, emulsion polymerization in continuous aqueous phase, emulsification-evaporation solvent displacement, and emulsification-diffusion techniques (see Kreuter J. *Nano-particle Preparation and Applications*, in *Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy* (M. Donbrow ed.), pg 125-148 CRC Press Boca Raton FL, 1991 incorporated by reference).

[0108] Hydrogels are also useful in delivering the subject agents into a host. Generally hydrogels are crosslinked hydrophilic polymer networks permeable to a wide variety of drug compounds including peptides. Hydrogels have the advantage of selective trigger of polymer swelling which results in controlled release of the entrapped drug compound. Depending on the composition of the polymer network, swelling and subsequent release may be triggered by a variety of stimuli including pH, ionic strength, thermal, electrical, ultrasound, and enzyme activities. Non-limiting examples of polymers useful in hydrogel compositions include, among others, those formed from polymers of poly(lactide-co-glycolide), poly(N-isopropylacrylamide), poly(methacrylic acid-g-polyethylene glycol); polyacrylic acid and poly(oxypropylene-co-oxyethylene) glycol; and natural compounds such as chondroitin sulfate, chitosan, gelatin, or mixtures of synthetic and natural polymers, for example chitosan-poly(ethylene oxide). The polymers are crosslinked reversibly or irreversibly to form gels embedded with the oligopeptides of the present invention (see for example, U.S. Patent No 6,451,346; 6,410,645; 6,432,440; 6,395,299; 6,361,797; 6,333,194; 6,297,337; Johnson O et al. *Nature Med* 2 795 (1996), incorporated by reference in their entirety).

[0109] In one preferred embodiment, the gel polymers are acrylic acid polymers, preferably carbomers (e.g., carboxypolymethylene), such as Carbopol (e.g., Carbopol 420-430, 475, 488, 493, 910, 934P, 974P, and the like; Brock et al., *Pharmacotherapy* 14 430-437 (1994)) which are non-linear polymers of acrylic acid crosslinked with polyalkenyl polyether. Other types of carbomers include acrylic acids crosslinked with polyfunctional compounds such as polyallylsucrose. In addition to the advantage of hydrating and swelling to a gel which entraps the subject compounds and limits

their release, carbomer gels are mucoadhesive. The polymers adhere to the intestinal mucosal membrane thus resulting in local delivery of the peptides (see Hutton et al. *Clin. Sci.* 78: 285-271 (1990); Pullan et al. *Gut* 34: 676-679 (1993) hereby incorporated by reference). In addition, these polymers have the added advantage of limiting intestinal protease activity.

[0110] The concentrations of the peptides or nucleic acid encoding therefore and the anti-retroviral agents will be determined empirically in accordance with conventional procedures for the particular purpose. Generally for administering the peptides *ex vivo* or *in vivo* for therapeutic purposes, the subject formulations are given at a pharmacologically effective dose. By "pharmacologically effective amount" or "pharmacologically effective dose" is an amount sufficient to produce the desired physiological effect or amount capable of achieving the desired result, particularly for treating the disorder or disease condition including reducing or eliminating one or more symptoms of the disorder or disease, in this case the gastrointestinal toxicities and dysfunction outlined herein.

[0111] The amount administered to the host will vary depending upon what is being administered, the purpose of the administration, such as prophylaxis or therapy, the state of the host, the manner of administration, the number of administrations, interval between administrations, and the like. These can be determined empirically by those skilled in the art and may be adjusted for the extent of the therapeutic response. Factors to consider in determining an appropriate dose include, but is not limited to, size and weight of the subject, the age and sex of the subject, the severity of the symptom, the stage of the disease, method of delivery of the agent, half-life of the agents, and efficacy of the agents. Stage of the disease to consider include whether the disease is acute or chronic, relapsing or remitting phase, and the progressiveness of the disease. Determining the dosages and times of administration for a therapeutically effective amount are well within the skill of the ordinary person in the art. In the context of the present invention, the gastrointestinal toxicities associated with cytotoxic therapies often present themselves in a regular and recurring fashion after administration of each round of the cytotoxic therapy, and thus prophylactic administration of the subject peptides is also possible in view of the predictable nature of the associated toxicities.

[0112] For any compounds used in the present invention, the therapeutically effective dose and the maximum tolerated dose are readily determined by methods well known in the art. For example, an initial effective dose can be estimated initially from cell culture assays. An indicator of inflammatory response may be used, such as expression levels of pro-inflammatory cytokines, or inhibition of CTL activity. From this, the LC_{50} (i.e., dose lethal to about 50% of cells in the cell culture) and the IC_{50} (i.e., inhibitory dose) can be determined by the cell culture assays. A dose can then be formulated in animal models to generate a circulating concentration or tissue concentration, and the maximum tolerated dose determined as exemplified in the examples provided herein.

[0113] As noted, the toxicity and therapeutic efficacy are generally determined by cell culture assays and/or experimental animals, typically by determining a LD_{50} (lethal dose to 50% of the test

population) and ED₅₀ (therapeutically effectiveness in 50% of the test population) The dose ratio of toxicity and therapeutic effectiveness is the therapeutic index. Preferred are compositions, individually or in combination exhibiting high therapeutic indices. Determination of the effective amount is well within the skill of those in the art, particularly given the detailed disclosure provided herein. One skilled in the art knows how to calculate dosage amounts for a subject, particularly a mammal and more particularly a human, based on dosage amounts determined in other animal models. Specific conversion factors for converting dosage amounts from one animal to another (e.g. from mouse to human) are well known in the art and are fully described e.g. on the Food and Drug Administration web site at www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm (in the oncology tools section) the disclosure of incorporated by reference.

[0114] Generally in the case where formulations are administered directly to a host, the present invention provides for a bolus or infusion of the subject composition that will administered in the range of about 0.1-50 more usually from about 1-25 mg/kg body weight of host. The amount will generally be adjusted depending upon the half-life of the peptide and anti-retroviral agent, where the half life will generally be at least one minute, more usually at least about 10 min. desirably in the range of about 10 min to 12 h. Short half-lives are acceptable, so long as efficacy can be achieved with individual dosages continuous infusion, or repetitive dosages. Formulations for administration may be presented in unit a dosage form e.g., in ampules, capsules, pills or in multidose containers or injectables.

[0115] Dosages in the lower portion of the range and even lower dosages may be employed where the peptide has an enhanced half-life or is provided as a depot, such as a slow release composition comprising particles a polymer matrix which maintains the peptide over an extended period of time (e.g. a collagen matrix, carbomer etc.), use of a pump which continuously infuses the peptide over an extended period of time with a substantially continuous rate or the like. The host or subject may be any mammal including domestic animals, pets, laboratory animals, primates, particularly humans subjects.

[0116] In addition to administering the subject peptide compositions directly to a cell culture *in vitro* to particular cells *ex vivo* or to a mammalian host *in vivo*, nucleic acid molecules (DNA or RNA) encoding the subject peptides may also be administered thereto, thereby providing an effective source of the subject peptides for the application desired. As described above nucleic acid molecules encoding the subject peptides may be cloned into any of a number of well known expression plasmids (see Sambrook et al. *supra*) and/or viral vectors, preferably adenoviral or retroviral vectors (see for example Jacobs et al. *J Virol.* 66:2088-2095 (1992) Lowenstein, *Bio/Technology* 12: 1075-1079 (1994) and Berkner, *Biotechniques* 6:616-624 (1988)), under the transcriptional regulation of control sequences which function to promote expression of the nucleic acid in the appropriate environment. Such nucleic acid-based vehicles may be administered directly to the cells or tissues *ex vivo* (e.g. *ex vivo* viral infection of cells for transplant of peptide producing

cells) or to a desired site *in vivo*, e.g. by injection, catheter orally (e.g., hydrogels) and the like, or in the case of viral-based vectors, by systemic administration. Tissue specific promoters may optionally be employed assuring that the peptide of interest is expressed only in a particular tissue or cell type of choice. Methods for recombinantly preparing such nucleic acid-based vehicles are well known in the art, as are techniques for administering nucleic acid-based vehicles for peptide production.

[0117] For the purposes of this invention, the methods of administration is chosen depending on the condition being treated, the form of the subject compositions, and the pharmaceutical composition. Administration of the subject peptides can be done in a variety of ways including, but not limited to, cutaneously, subcutaneously, intravenously, orally, topically, transdermally, intraperitoneally, intramuscularly, nasally, and rectally (e.g., colonic administration). For example, microparticle, microsphere, and microencapsulate formulations are useful for oral, intramuscular or subcutaneous administrations. Liposomes and nanoparticles are additionally suitable for intravenous administrations. Administration of the pharmaceutical compositions may be through a single route or concurrently by several routes. For instance, oral administration can be accompanied by rectal or topical administration to the affected area. Alternatively, oral administration is used in conjunction with intravenous or parenteral injections.

[0118] In one preferred embodiment, the method of administration is by oral delivery in the form of a powder, tablet, pill or capsule. Pharmaceutical formulations for oral administration may be made by combining one or more peptide and anti-retroviral agent with suitable excipients, such as sugars (e.g. lactose, sucrose, mannitol or sorbitol), cellulose (e.g. starch, methyl cellulose, hydroxymethyl cellulose, carboxymethyl cellulose, etc.), gelatin, glycine, saccharin, magnesium carbonate, calcium carbonate, polymers such as polyethylene glycol or polyvinylpyrrolidone and the like. The pills, tablets or capsules may have an enteric coating, which remains intact in the stomach but dissolves in the intestine. Various enteric coatings are known in the art, a number of which are commercially available, including, but not limited to, methacrylic acid-methacrylic acid ester copolymers, polymer cellulose ether, cellulose acetate phthalate, polyvinyl acetate phthalate, hydroxypropyl methyl cellulose phthalate, and the like. Alternatively, oral formulations of the peptides are prepared in a suitable diluent. Suitable diluents include various liquid forms (e.g. syrups, slurries, suspensions, etc.) in aqueous diluents such as water, saline, phosphate buffered saline, aqueous ethanol, solutions of sugars (e.g. sucrose, mannitol, or sorbitol), glycerol, aqueous suspensions of gelatin, methyl cellulose, hydroxymethyl cellulose, cyclodextrins, and the like. As used herein, diluent or aqueous solutions also include infant formula, given that cytotoxic therapies may also be necessitated in infants and children. In some embodiments, lipophilic solvents are used including oils, for instance vegetable oils, peanut oil, sesame oil, olive oil, corn oil, safflower oil, soybean oil, etc.; fatty acid esters such as oleates, triglycerides, etc.; cholesterol derivatives, including cholesterol oleate, cholesterol linoleate, cholesterol myristate, etc., liposomes and the like.

[0119] In another preferred embodiment, administration is done rectally. This may use formulations suitable for topical application in the form of salves, tinctures, crèmes or for application into the lumen of the intestine by use of compositions in the form of suppositories, enemas, foams, etc. Suppositories may contain conventional suppository bases such as cocoa butter, carbowaxes, polyethylene glycols, or glycerides, which are solid or semi-solid at room temperature but liquid at body temperature.

[0120] In yet another preferred embodiment, the administration is carried out cutaneously, subcutaneously, intraperitoneally, intramuscularly and intravenously. As discussed above, these are in the form of peptides dissolved or suspended in suitable aqueous medium as discussed above. Additionally, the pharmaceutical compositions for injection may be prepared in lipophilic solvents which include, but is not limited to, oils such as vegetable oils, olive oil, peanut oil, palm oil, soybean oil, safflower oil, etc; synthetic fatty acid esters such as ethyl oleate or triglycerides, cholesterol derivatives, including cholesterol oleate, cholesterol linoleate, cholesterol myristate, etc., or liposomes as described above. The compositions may be prepared directly in the lipophilic solvent or preferably, as oil/water emulsions (see for example, Liu, F. et al. *Pharm. Res.* 12: 1080-1084 (1995); Prankerd, R.J. *J. Parent. Sci. Tech.* 44: 139-49 (1990); U.S. Patent No. 5,651,991).

[0121] The delivery systems also include sustained release or long term delivery methods, which are well known to those skilled in the art. By "sustained release" or "long term release" as used herein is meant that the delivery system administers a pharmaceutically effective amount of subject compounds for more than a day, preferably more than a week, and most preferable at least about 30 days to 60 days, or longer. Long term release systems may comprise implantable solids or gels containing the subject peptide, such as biodegradable polymers described above; pumps, including peristaltic pumps and fluorocarbon propellant pumps, osmotic and mini-osmotic pumps, and the like. Peristaltic pumps deliver a set amount of drug with each activation of the pump and the reservoir can be refilled, preferably percutaneously through a port. A controller sets the dosage and can also provides a readout on dosage delivered, dosage remaining, and frequency of delivery. Fluorocarbon propellant pumps utilize a fluorocarbon liquid to operate the pump. The fluorocarbon liquid exerts a vapor pressure above atmospheric pressure and compresses a chamber containing the drug to release the drug. Osmotic pumps (and mini-osmotic pumps) utilize osmotic pressure to release the drug at a constant rate. The drug is contained in an impermeable diaphragm, which is surrounded by the osmotic agent. A semipermeable membrane contains the osmotic agent, and the entire pump is housed in a casing. Diffusion of water through the semipermeable membrane squeezes the diaphragm holding the drug, forcing the drug into bloodstream, organ, or tissue. These and other such implants are particularly useful in treating an inflammatory disease condition, especially those manifesting recurring episodes or which are progressive in nature, by delivering the oligopeptides of the invention via systemic (e.g., intravenous or subcutaneous) or localized doses in a sustained, long term manner.

[0122] The present invention also encompasses the therapeutic combinations disclosed herein in the form of a kit or packaged formulation. A kit or packaged formulation as used herein includes one or more dosages of an immunomodulating peptide, and salts thereof and optionally at least one additional therapeutic agent for combination therapy such as an anti-inflammatory or anti-diarrheal agent, in a container holding the dosages together with instructions for simultaneous or sequential administration to a patient. For example, the package may contain the peptides along with a pharmaceutical carrier combined in the form of a powder for mixing in an aqueous solution which can be ingested by the afflicted subject. Another example of packaged drug is a preloaded pressure syringe, so that the compositions may be delivered colonically. The package or kit includes appropriate instructions, which encompasses diagrams, recordings (e.g., audio, video, compact disc), and computer programs providing directions for use of the combination therapy.

[0123] The foregoing descriptions of specific embodiments of the present invention have been presented for purposes of illustration and description. They are not intended to be exhaustive or to limit the invention to the precise forms disclosed, and obviously many modifications and variations are possible in light of the above teaching.

[0124] All publications and patent applications mentioned in this specification are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

EXPERIMENTAL

[0125] As disclosed in U.S. Patent Applications U.S.S.N. 08/838 916 and U.S.S.N. 09/028 083 and in the relevant literature, including Grassy et al., parameters were defined based on known oligopeptides that had previously been found to have properties of inhibiting T cell activity (see, e.g., Buelow et al., *supra*). The conformational space necessary for immunosuppressive activity was computed according to the procedure described by Yaeli et al., *supra*. Using these parameters (see Table I), which define compounds having known T cell inhibitory activity, new cytomodulating peptides were devised and tested and were found to have activity equal to or surpassing known active compounds. The computer program used to predict and to devise the immunosuppressive activity of peptides and pseudopeptides was developed as follows:

1 Methodology

[0126] On the basis of an initial experimental data set made of peptides showing or not showing immunosuppressive activity, there was deduced:

- I. A consensus sequence containing the amino acids required for the activity and allowing the development of new peptides or pseudopeptide libraries;
- II. A set of physicochemical and topological properties involved in the activity and converted into a set of constraints by the variable mapping technique (Grassy et al., *J. of Molecular Graphics* 13

358-367 (1995))

2. Variable Mapping

[0127] The method is based on physicochemical and conformational constraints as deduced from the results of a training set of data

Physicochemical constraints

[0128] The method requires the determination of physicochemical constraints defined as ranges of properties for said biological activity. The computational method used for the determination of the set of constraints is named Variable Mapping and is described below

The Variable Mapping approach

[0129] This qualitative technique consists of an evaluation of the distribution (global or percent wise) of the active and inactive molecules as a function of the values of given parameters. The superposition of all graphs (activity-property) exhibits, for certain parameters, the limiting values (low and/or higher) which are necessary for leading to an active compound. This graphical method gives a diagnosis of the qualitative non-linear dependences between the activity and a molecular property. Regarding those properties involved in receptor ligand interactions, it has been clearly established that the existence of strict contingencies determining the adaptability to the receptor imply an embedding of certain structural and physicochemical properties. This method results in simple rules which can be used to predict the activity of unknown products. A graphical representation showing the number of successes relative to the number of violations of the rules allows one to compare the distributions with the activities for the whole set of molecules under study

3. Physicochemical and topological parameters used in the definition of the constraints involved in the immunosuppressive activity of peptides and pseudopeptides**Lipophilicity**

[0130] Lipophilicity of peptides expressed as logP (where P is the partition coefficient of a named peptide between water and n-octanol). Molecular logP values can be computed by TSAR 2.31 using the atomic incremental logP values determined by Ghose et al. *J Chem Inf Comput.* 29:163 (1989). As demonstrated by the analysis of the initial data set, the lipophilicity of an immunosuppressive peptide must be ≥ -0.85 .

Topological indices

[0131] *Balaban Index* (Balaban *Chem Phys* 89:399 (1982)):

The Balaban Index computed for a connected molecular graph (H suppressed) is calculated as follows

$$\frac{M}{2} \sum_i (D_i D_i)^{-1/2}$$

2/0

where M is the number of edges in the graph, μ is the cyclomatic number of the graph, L_e the minimum number of edges which must be removed before G becomes acyclic, and $D_{ij} = \sum D_j$ (with $j=1$) is a distance matrix of the shortest path between the two vertices.

[0132] Molecular volume

The molecular volume is computed assuming standard Van der Waals radii for each element. This calculation is done on the extended conformation of the peptide

[0133] Ellipsoidal volume

This volume is computed after determination of the three components of the inertia momentum of the molecule assuming mean atomic masses for constituent atoms. This calculation is done on the extended conformation of the peptide.

[0134] Molar refractivity

Molar refractivity is computed using the atomic molar refractivity values determined by Ghose et al *supra*

[0135] Dipole moment:

This parameter is computed on the extended conformation of the peptides. The total dipole moment for a molecule is expressed in Debye units.

$$\mu = e \sum r_l q_l$$

where r_l is the distance of an atom l to the origin, q_l is the charge of the atom l . The charges on the atoms are computed using the Charge-2 method (Abraham and Smith *J Comput. Aided Mol Design* 3: 175-187 (1989))

[0136] Kier Chir V 4

This index is one of the connectivity indexes developed by L. B. Kier. The Kier Chi V 4 computes in several steps (H included)

- a. Determination and numbering of all the paths of length 4 on the molecular graph of the peptide
- b. Computation of each path of length 4 of the following quantities

$$c_i^j = \prod [\delta_j^i]^{a_j}$$

for $j = 1, 4$, where $\delta_j^i = Z_i - h_i$ is defined for an atom as the difference between the total number of valence electrons Z_i and the number h_i of hydrogen atoms bonded to the atom i

the graph

$$\chi = \sum (c_i)$$

[0137] Kier Kappa Alpha

Kier Kappa alpha 1 ($K\alpha^1$)

If A is the total number of atoms of the molecule (H included) $K\alpha^1$ is equal to

$$\frac{(A + \alpha)(A + \alpha - 1)^2}{(P_1 + \alpha)^2}$$

with

$$\alpha_i = \frac{r_i}{rC_{sp^3}} - 1$$

r_i is the covalent radius of the atom i and rC_{sp^3} the covalent radius of a carbon sp^3 P_1 is the total number of paths of length=1 along the molecular graph of the peptide under study

Kier Kappa alpha 2 ($K\alpha^2$)

If A is the total number of atoms of the molecule (H included) $K\alpha^2$ is equal to

$$\frac{(A + \alpha - 1)(A + \alpha - 2)^2}{(P_2 + \alpha)^2}$$

with

$$\alpha_i = \frac{r_i}{rC_{sp^3}} - 1$$

r_i is the covalent radius of the atom i and rC_{sp^3} the covalent radius of a carbon sp^3 P_2 is the total number of paths of length=2 along the molecular graph of the peptide under study

[0138] Flexibility Phi

Based upon the above formulas the flexibility of a molecule can be defined as

$$\Phi = (K\alpha^1)(K\alpha^2)/A$$

where A is the total number of atoms (H included).

[0139] Atoms and groups counts

The number of the following atom types was also used as a constraint:

- Total number of oxygen atoms of the peptide
- Total number of nitrogen atoms of the peptide

The number of the following groups was also used as a constraint:

- Total number of ethyl groups
- Total number of hydroxyl groups

4. Values of the constraints

Generation of peptide or pseudopeptide libraries

[0140] Starting from the consensus sequence Arg-X-X-X-Arg-X-X-X-Tyr where X is an amino acid which is as defined above and in the earlier analogous formula the physicochemical and topological parameters previously described were computed and whether these parameters were within the constraints defined by the initial training set. For example starting from X=Leu nLeu Trp Tyr Gly or Val a library of 279,936 molecules was generated and only 28 of them satisfied the required constraints

[0141] The ranges of properties necessary to obtain a biological activity are summarized in the following Table I

Table 1
Value ranges of physicochemical and structural parameters

Property	Minimum	Maximum
LogP	-6.849	-0.004
Ellipsoidal Volume (Å ³)	5785.5	29480.00
Molecular Volume (Å ³)	660.9	1050.4
Molar refractivity	221.30	359.3
Kier Chi V4	3.325	5.342
Kappa α_2	26.120	44.31
Flexibility	22.50	40.3
Balaban Index	2.846	6.701
Total Dipole	3.423	60.79
Number of oxygen atoms	10	15
Number of nitrogen atoms	8	20
Number of ethyl groups	0	1
Number of hydroxyl groups	1	2

5. Characterization of the conformational space involved in the immunosuppressive activity of peptides and pseudopeptides.

Spatial autocorrelation vector of a 3D structure

[0142] The concept of autocorrelation description of a molecular structure was first introduced by Broto et al. *Eur J Med Chem.* 19:66-70 (1984). This vector basically represents the discretized distance distribution derived from the interatomic distance matrix of a molecule. The first component of this vector (A_0) is equal to the number of atoms of the structure; the other components $A_1, A_2, \dots$ are defined by the number of atom pairs which are separated by a distance within the range defined by a lower limit $(n-1)D_1$, where n is the order of the bin of the vector and D_1 the distance increment. Similarly, it is possible to calculate the distribution of an atomic property P . In this case, the weighted autocorrelation component AP_n is obtained by the sum of the products of property values P on atoms i, j having an interdistance belonging to the distance interval $[(n-1)D_1, nD_1]$. The number of components of the vector is then defined by $n_{max} = (D_{max}/D_1) + 1$, where D_{max} is the greatest interatomic distance in the structure.

The autocorrelation vector exhibits some useful features

This vector achieves a substantial reduction of conformational data. An entire conformation is described by a limited set of n numerical values.

- The vector is very easy to calculate on the basis of 3D coordinate data. Therefore, it is possible to compute and store this vector during molecular dynamics simulations; the reduction of the size of the storage involved in such a process, in comparison to the classical storage of a set of complete distance matrices, allows much longer simulations than usual. The autocorrelation vector of a conformation is translationally and rotationally invariant and is also independent of the atomic numbering of the molecule.
- This vector is sensitive both to minor and major changes in conformation: the more the conformation is changed, the more the components of the vector are modified. The sensitivity depends on the distance increment chosen for calculations, but an increment from 0.5 Å or 1 Å (small molecules) to 5 Å (macromolecules) is a good choice for the usual simulations (Yezeri et al., *Protein Engineering* 11:959-976 (1998)).

[0143] It is possible to analyze only a part of a structure or only a specific subset of atoms of this structure, e.g. C_α in proteins, N atoms, heavy atoms, etc. The vector is entirely defined by the knowledge of a structure, so that the comparison of different structures can be performed, using this vector without any reference.

Molecular dynamics analysis using 3-D autocorrelation vectors

[0144] Applied to HLA-B2702.75-84 peptide (amino acid sequence Arg-Glu-Asn-Leu-Arg-Ile-Ala-Leu-Arg-Tyr) and on various active and inactive derivative peptides thereof, molecular dynamics simulations were performed using AMBER 4.1. The simulation of one nanosecond of dynamics

27

generate a set of 10^3 conformations (one conformation per picosecond) For each conformation the 3D autocorrelation vector was calculated using TSAR with a distance increment of 1 Å and the entire set of conformations was stored as 3D autocorrelation vectors versus time matrix ($10^3 \times n$)

[0145] The aim of the work was to define the conformational space responsible for immunosuppressive activity by comparison of the conformational spaces of active and inactive peptides using the methodology explained in the references cited in the Relevant Literature

6. Statistical Analysis

Cluster analysis

[0146] In order to compare different conformations, the distance matrix between all of these conformations in the hyperspace defined by the components of their unweighted 3D autocorrelation vectors was determined. The more the structure of two compounds are analogous the shorter their distance. This method provides a quantification of the rigid molecular fit. Using the starting conformation as a reference, the numerical value of this distance is analogous to a root-mean-square deviation

Principal component analysis (PCA)

[0147] PCA is a multidimensional statistical method for data analysis suited for representing molecules in the hyperspace of their properties (molecular descriptors). PCA can be used to reduce a large number of descriptors to a smaller number of synthetic orthogonal variables issued from a linear combination of the original descriptors. This method retains the largest part of the total initial information. The original variables were normalized and the diagonalization of the covariance matrix was calculated using the classical Jacobi transform routine. The components of the 3K autocorrelation vector provide a good description of the 3K structure of different conformations, but are awkward to handle because they contain too many data to get an easy visualization. PCA can reduce the dimensionality of the data to a 2D or 3D representation that contains as much of the original information as possible. Using PCA, the immunosuppressive peptides exhibit a well defined common conformational space. All the peptides able to reach these conformational specifications can exhibit an immunosuppressive activity.

Conformational space coordinates of peptide bc 1nL bioactive conformation

[0148] Figure 1 shows the two-dimensional conformational space and related conformations of peptide bc 1nL (RDP58) wherein the bc 1nL peptide has the amino acid sequence Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr and wherein "nL" is norleucine (see below). The structures drawn were obtained by applying cluster analysis method on the whole trajectory of peptide bc 1nL.

Main conformations of peptide bc 1nL

[0149] Structural properties of the main visited conformations of bc 1nL (Figure 1 (1), (2), (3), (4) and (5)) in its conformational space are summarized in Table II. These properties concern the

coordinates in the three dimensional space defined by the three first principal components (PCA coordinates), and the radius of gyration (Rg)

Table 2

Spatial coordinates (PCA coordinates) and radius of gyration (Rg) of dynamic conformations of peptide bc 1nL

Conformations	PCA Coordinates			Rg
	PC1	PC2	PC3	
(1)	0.785	-2.818	-0.531	9.82
(2)	0.382	-0.899	-0.164	7.99
(3)	-0.811	0.345	-0.481	6.93
(4)	0.741	0.850	-1.092	6.76
(5)	-2.098	-0.298	0.770	6.67

Conformational space of active peptides

[0150] The trajectory of the D2 (amino acid sequence Arg-Val-Asn-Leu-Arg-Ile-Ala-Leu-Arg-Tyr) peptide has been described by the 3-D autocorrelation method and the data analyzed by principal component analysis. This provided a principal plan defined by the 2 first principal components which contain all the conformations visited during the trajectory. The D2 peptide trajectory was used as a trajectory reference and all the trajectories calculated were projected into its principal plan (Figure 2)

[0151] The immunosuppressive peptides exhibit a well defined common conformational space featuring the following points

PCA dimensions

PC1 minimum = -2.0 maximum = 2.0

PC2: minimum = -2.0 maximum = 1.0

PC3: minimum = -1.0 maximum = 1.0

[0152] The following peptides defined as bc peptides were devised

Table 3

bc #										
1	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
2	Arg	Val	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
3	Arg	Ile	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
4	Arg	Leu	Val	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
5	Arg	Leu	Ile	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr

6	Arg	Leu	Leu	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
7	Arg	Leu	Leu	Ile	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
8	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Tyr
9	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Ile	Leu	Leu	Gly	Tyr
10	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr
11	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Tyr
12	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Val	Gly	Tyr
13	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Ile	Gly	Tyr
14	Arg	Trp	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
15	Arg	Leu	Trp	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
16	Arg	Leu	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
17	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Trp	Leu	Leu	Gly	Tyr
18	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Trp	Leu	Gly	Tyr
19	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Trp	Gly	Tyr
20	Arg	Tyr	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
21	Arg	Leu	Tyr	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
22	Arg	Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
23	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Gly	Tyr
24	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Tyr	Leu	Gly	Tyr
25	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Tyr	Gly	Tyr
1nL	Arg	nL	nL	nL	Arg	nL	nL	nL	Gly	Tyr

nL = norleucine

EXAMPLE 2

RDP58 Treatment Reduces Gastrointestinal Toxicity Induced by CPT-11

[0153] In cancer patients receiving CPT-11 therapy the development of diarrhea limits the administration of maximally effective chemotherapy. This study evaluated RDP58 as a potential protective agent to attenuate CPT-11-induced gastrointestinal toxicity and subsequent mortality in a murine tumor model. In a dose finding study, normal, non-tumor bearing mice were injected intraperitoneally with 200mg/kg CPT-11 once a day for three consecutive days and concurrently given 0, 2.5, 5.0 or 10 mg/kg RDP58 orally. As shown in Figure 3 and below in Table 4, RDP58 showed a dose dependent increase in survival twelve days after the first injection of CPT-11.

47

Table 4

CPT-11 (mg/kg/dose)	RDP58 (mg/kg/day)	Maximum weight loss	Toxicity (%)	
			Diarrhea	Mortality
200	None	29.4 ± 4.3	97 (29/30) ^b	73 (22/30)
200	2.5	27.8 ± 3.7	67 (10/15) ^b	60 (9/15)
200	5	25.6 ± 4.4 ^a	40 (12/30) ^b	23 (7/30)
200	10	24.6 ± 1.9 ^a	33 (5/15) ^b	7 (1/15)

a. p<0.05, ANOVA b. p=0.001, Cochran-Armitage trend test

[0184] Only one of fifteen mice died from CPT-11 treatment compared to 22 of 30 mice in the control group. A dose dependent decrease in appearance of diarrhea was also observed in mice receiving RDP58. Additionally mice given 5.0 and 10.0mg/kg RDP58 showed a reduction in the maximum total body weight lost compared to RDP58 untreated mice.

EXAMPLE 3

RDP58 Treatment Reduces Gastrointestinal Toxicity Induced by 5-FU

[0185] A second study was performed to determine whether RDP58 also limits 5-FU induced diarrhea. Normal, non-tumor bearing mice were treated with 100mg/kg 5-FU daily for two consecutive days and were concurrently given 10mg/kg RDP58 orally or water only. As shown in Figure 4 and in Table 5 below, twelve days after 5-FU administration, RDP58 treated animals had a survival rate of 90% compared to 10% for untreated animals. All ten animals in the control group had diarrhea compared to only three of ten RDP58 treated animals. Additionally a significant reduction in total body weight loss was observed in the group receiving RDP58.

Table 5

5-FU (mg/kg/dose)	RDP58 (mg/kg/day)	Maximum weight loss	Toxicity (%)	
			Diarrhea	Mortality
100	None	34.7 ± 4.6	100(10/10)	90(9/10)
100	10	13.9 ± 3.8 ^b	30(3/10)	10(1/10)

[0186] b. p<0.05 ANOVA

EXAMPLE 4

RDP58 Reduces Treatment Related Mortality and Gastrointestinal Toxicity Without Decreasing CPT-11 Efficacy

[0157] To determine whether RDP58 altered the efficacy of CPT-11 therapy mice bearing CT-26 tumors were treated with three regimens of CPT-11 at 100mg/kg qdx3 and given 5.0mg/kg RDP58 orally. Both groups showed a similar reduction in tumor weight (Figure 5, 55% decrease in RDP58 treated and 61% in RDP58 untreated). However, survival was significantly increased in groups given RDP58 (Figure 6). No treatment related deaths were observed in the RDP58 group compared to 40% mortality in the control group.

EXAMPLE 5

RDP58 Treatment Increases the Maximum Dose of CPT-11

[0158] To determine whether concurrent oral RDP58 treatment can increase the maximum dose of CPT-11 without a concomitant increase in mortality, normal non-tumor bearing mice were injected qdx3 with 0, 100, 200, 300, or 400 mg/kg CPT-11. Injected Lp qdx3 on Days 0, 1 and 2. RDP58 was given orally at 10 mg/kg in the drinking water starting on Day 3. Mice were monitored for body weight loss, incidence of diarrhea and mortality until end of study on Day 12. The LD50 in the CPT-11 group was approximately 450mg/kg/total dose. As shown in Figure 7, administration of RDP58 increased the LD50 to approximately 725 mg/kg/total dose, or by a factor of about 1.6x.

EXAMPLE 6

RDP58 Treatment Enables an Increased Maximum Dose of CPT-11 With Lower Mortality and Improved Tumor Response

[0159] To determine if a reduction in GI toxicity and mortality with RDP58 treatment allows an increase in CPT-11 dosing, we compared treatment mortality and tumor response in tumor bearing mice treated with the maximum tolerated dose (MTD) of Irinotecan (CPT-11), 2 X MTD CPT-11, or 2 X MTD plus 10mg/ml RDP58. With our treatment schedule, we found the MTD to be 600mg/kg CPT-11 (66.7mg/kg/injection x 9 injections over 12 days total). No animals in this treatment group died from the CPT-11, and tumor volumes decreased by about 40% compared to untreated controls (Figure 9). Animals treated with 1200mg/kg CPT-11 or 1200mg/kg CPT-11 + 10mg/ml RDP58 showed a decrease of greater than 80% in tumor volume. However, only 50% (6/12) of the animals in the 2 X MTD CPT-11 group survived the complete treatment regimen, whereas the CPT-11 + RDP58 group had 83% (10/12) survive, as shown in Figure 8. Although the mortality data is not statistically significant at the 95% confidence level ($p=0.067$, Log-Rank test), this data strongly supports the conclusion that escalating doses of RDP58 will enable an increase in MTD and thereby improve the anticancer response.

EXAMPLE 7

RDP58 Treatment Reduces Proctitis Induced by Radiation Therapy

[0160] These studies evaluate RDP58 peptide administration in preventing or reducing radiation therapy-associated gastrointestinal distress. Study 1 finds the optimal dose and schedule of radiation

29

to be used in subsequent efficacy studies. Study 2 assesses the protective effects of RDP58 in non-tumor bearing animals given an escalating dose of radiation. Study 3 assesses whether an increase in radiation dose to affect better tumor response can be achieved without a concomitant increase in toxicity. These studies determine whether oral RDP58 administration prevents or reduces treatment associated gastrointestinal toxicity and allows increased dosing for greater tumor responses in treatments for e.g. metastatic colo-rectal, prostate and ovarian cancers.

[0181] Study 1 – Radiation dose optimization. Normal healthy mice are given escalating doses of radiation to determine the dose of radiation that results in diarrhea in 90% of control animals. Animals are monitored daily for body weight loss, diarrhea, and morbidity. Animals losing >25% body weight or showing signs of severe distress are humanely sacrificed. The optimal dose and schedule that result in approximately 90% of treated animals having diarrhea is selected for the next studies. Alternatively, histological analysis of the intestine may be used to determine tissue damage.

[0182] Study 2 – Assessment of RDP58 activity in normal non-tumor bearing animals given escalating doses of radiation. The initial study uses 10mg/kg RDP58 gavaged daily. This dose has been shown to reduce Irinotecan (CPT-11) and 5-Fluorouracil (5-FU) treatment associated mortality and diarrhea in mice and increases the LD50 of CPT 11 from about 485mg/kg to 720mg/kg total dose. Mice are monitored for body weight loss, incidence of diarrhea, and morbidity. If protection is demonstrated at the starting dose of radiation, a radiation dose escalating study will be performed to determine whether 10mg/kg RDP58 allows increased radiation exposure while preventing or reducing GI toxicity and mortality. Histological analysis of intestinal epithelium is also performed of selected control and RDP58 treated animals to confirm clinical observations.

[0183] Study 3 – Radiation dose escalation in tumor bearing animals. A syngeneic tumor model of ascites tumor is used. C57 BL/6 mice are injected intraperitoneally (i.p.) with EL-4 mouse thymoma or BALB/c mice are injected with CT-26 colo-rectal carcinoma cells and ascites tumors will be allowed to form. Alternatively, the lung metastatic 4T1 model may be used for studies using whole body irradiation. Mice start with oral 10mg/kg RDP58 as described for Study 2. Mice with ascites are treated with 30Gy; the dose of radiation and schedule is optimized to induce diarrhea in at least 90% of animals receiving without concurrent RDP58 administration. Mice are monitored for body weight loss, incidence of diarrhea, and morbidity. Thirty days after completion of radiation therapy, the mice are sacrificed and the tumor burden is determined by weight, histology or assessed macroscopically for the volume of aspirated ascites. Histological analysis of gut tissue is also performed of selected control and RDP58 treated animals.

[0184] The foregoing data demonstrate that immunomodulatory peptides can significantly ameliorate body weight loss, reduce diarrheal symptoms and improve survival in CPT-11 and 5-FU administration. These data further suggest that RDP58 enables dose escalation of CPT-11 by limiting diarrhea – the major dose-limiting toxicity – and thereby improves long-term survival.

[0165] All publications and patent applications mentioned in this specification are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference. The invention now being fully described it will be apparent to one of ordinary skill in the art that many changes and modifications can be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims

CLAIMS

What is claimed

1 A method for reducing the gastrointestinal toxicities induced by cytoreductive therapy comprising administering to a patient undergoing cytoreductive therapy a pharmaceutically effective amount of an immunomodulatory peptide wherein said immunomodulatory peptide comprises an oligopeptide comprising the amino acid sequence



wherein

B is Lys or Arg,

X is an aliphatic or aromatic amino acid,

J is Gly Lys or Arg

wherein said amino acids are the naturally occurring L-isomers, their D-isomers and norleucine.

2 A method according to claim 1 wherein for said oligopeptide

B is Arg,

X is an aliphatic non-polar amino acid of from 5 to 6 carbon atoms including norleucine, aromatic amino acid or the D-isomer thereof there being at least 3 of the same aliphatic non-polar amino acid in said oligopeptide; and

J is Gly or Arg

3 A method according to claim 2, wherein for said oligopeptide at least 5 amino acids defined by X are valine leucine or norleucine and any remaining amino acid defined by X is Trp or Tyr

4 A method according to claim 3 wherein for said oligopeptide at least 5 amino acids defined by X are the same.

5 A method according to claim 1 wherein said oligopeptide is selected from the group consisting of

- (a) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr
- (b) Arg-Val-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr;
- (c) Arg-Ile-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr
- (d) Arg-Leu-Val-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr
- (e) Arg-Leu-Ile-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr;
- (f) Arg-Leu-Leu-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr;
- (g) Arg-Leu-Leu-Ile-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr;
- (h) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Val-Leu-Leu-Gly-Tyr;
- (i) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Ile-Leu-Leu-Gly-Tyr
- (j) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Val-Leu-Gly-Tyr;
- (k) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Ile-Leu-Gly-Tyr;
- (l) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Val-Gly-Tyr
- (m) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Ile-Gly-Tyr;
- (n) Arg-Trp-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr;
- (o) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr

52

- (p) Arg-Leu-Leu-Trp-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr;
- (q) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Trp-Leu-Leu-Gly-Tyr
- (r) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Trp-Leu-Gly-Tyr
- (s) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Trp-Gly-Tyr;
- (t) Arg-Tyr-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr
- (u) Arg-Leu-Tyr-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr
- (v) Arg-Leu-Leu-Tyr-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr;
- (w) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Gly-Tyr
- (x) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Tyr-Leu-Gly-Tyr
- (y) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Tyr-Gly-Tyr; and
- (z) Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr

6 A method according to claim 1 wherein said method further comprises administering at least one additional therapeutic agent selected from the group consisting of anti-diarrheal agents anti-inflammatory agents and analgesics

7 A method according to claim 6 wherein said at least one additional therapeutic agent is an anti-diarrheal agent.

8. A method according to claim 6 wherein said immunomodulatory peptide and said at least one additional therapeutic agent are administered simultaneously or sequentially

9 A pharmaceutical preparation for reducing gastrointestinal toxicity induced by cytotoxic therapy comprising

a) an oligopeptide comprising the sequence

Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr

wherein nL is norleucine and all amino acids are the D-stereoisomers and

b) at least one additional therapeutic agent selected from the group consisting of anti-diarrheal agents anti-inflammatory agents and analgesics

10 A pharmaceutical preparation according to Claim 9 wherein said at least one additional therapeutic agent is an anti-diarrheal agent.

11 A method for improving cytotoxic cancer therapy comprising the administration of an increased maximum tolerated dose of a cytotoxic agent in combination with a pharmaceutically effective amount of an immunomodulatory peptide wherein said immunomodulatory peptide comprises an oligopeptide comprising the amino acid sequence

B-X-X-X-B-X-X-X-J-Tyr

wherein

B is Lys or Arg,

X is an aliphatic or aromatic amino acid

J is Gly, Lys or Arg

wherein said amino acids are the naturally occurring L-isomers their D-isomers and norleucine

12 A method according to claim 11 wherein for said oligopeptide

B is Arg;

X is an aliphatic non-polar amino acid of from 5 to 6 carbon atoms including norleucine aromatic amino acid or the D-isomer thereof there being at least 3 of the same aliphatic non-polar amino acid in said oligopeptide, and

J is Gly or Arg

13 A method according to claim 10 wherein said maximum tolerated dose of said cytotoxic agent is increased by at least 1.5x in comparison with the maximum tolerated dose of said cytotoxic agent in the absence of said immunomodulatory peptide

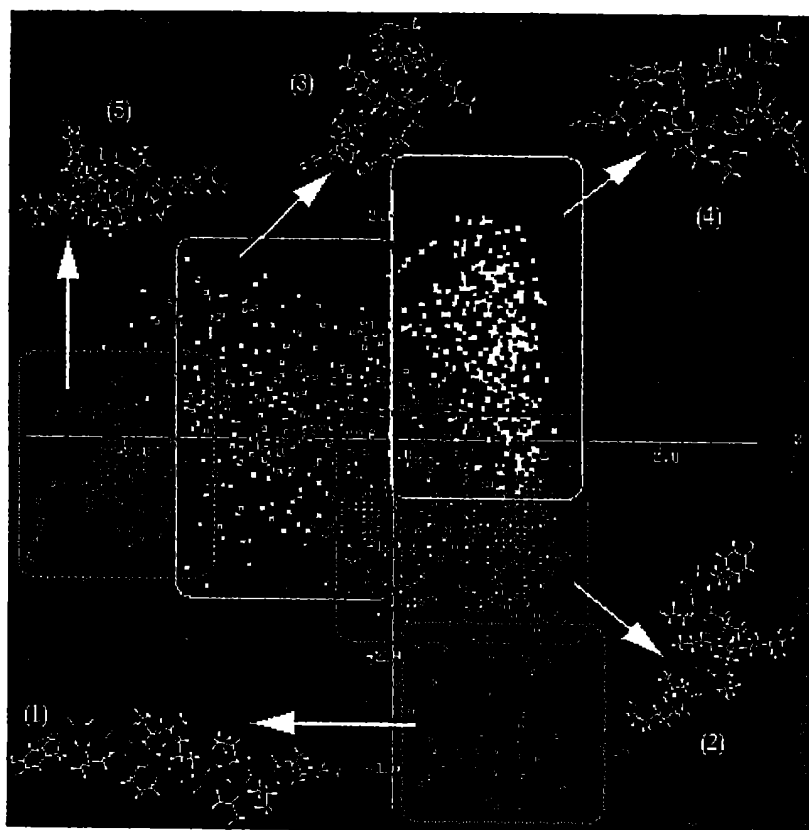
14 A method according to claim 10 wherein said maximum tolerated dose of said cytotoxic agent is increased by at least 2x in comparison with the maximum tolerated dose of said cytotoxic agent in the absence of said immunomodulatory peptide.

15 A method according to claim 10 wherein for said oligopeptide at least 5 amino acids defined by X are valine leucine or norleucine and any remaining amino acid defined by X is Trp or Tyr

16 A method according to claim 10 wherein for said oligopeptide at least 5 amino acids defined by X are the same

17 A method according to claim 10 wherein said immunomodulatory peptide and said cytotoxic agent are administered simultaneously or sequentially

18 A method according to claim 17 wherein said immunomodulatory peptide is administered prior to the administration of said cytotoxic agent.



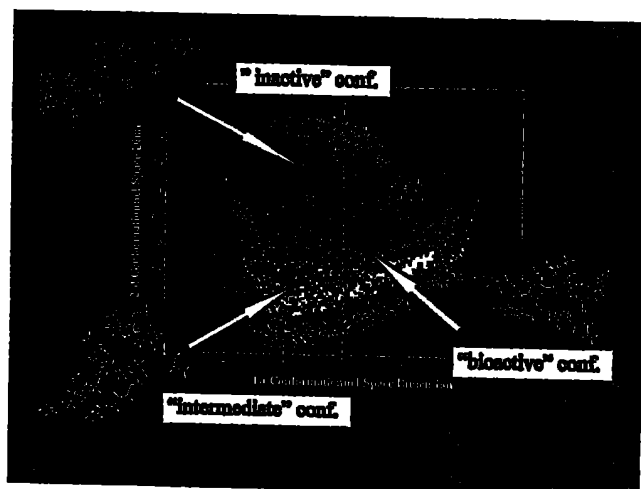


FIG 2

2

RDP58 Prevents CPT-11 Treatment Related Mortality

W 03/07/2061

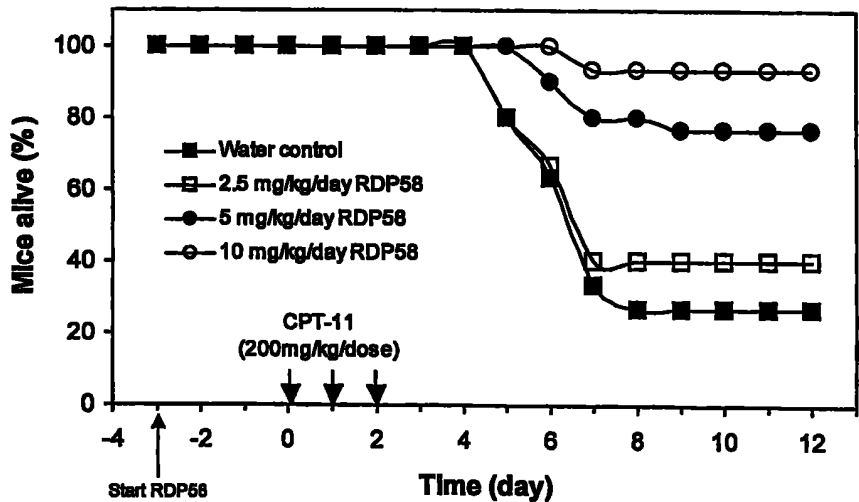


FIG 3

PCT/US03/0633

57

57

RDP58 Prev nts 5-FU Treatm nt R lat d Mortality

W 03/072061

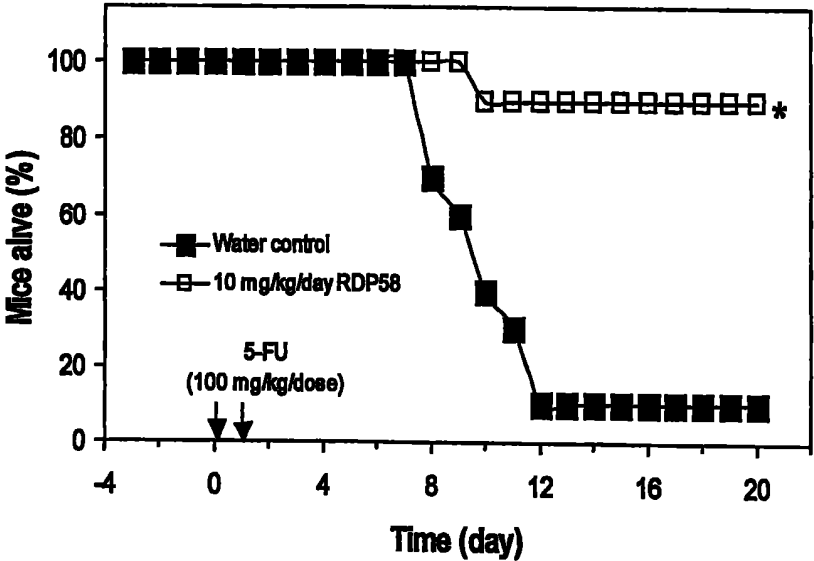


FIG. 4

PCT/US03/06333

57

RDP58 does not impair chemotherapy effectiveness in tumor-bearing mice treated with CPT-11

W/O 03/07/2061

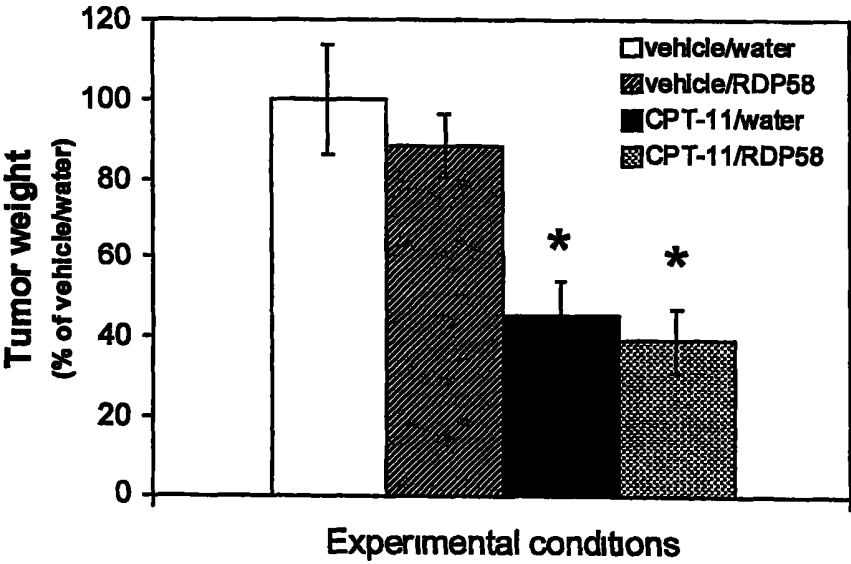


FIG. 5

PCT/US03/06333

58

RDP58 reduces CPT-11-induced mortality in tumor-bearing mice

59

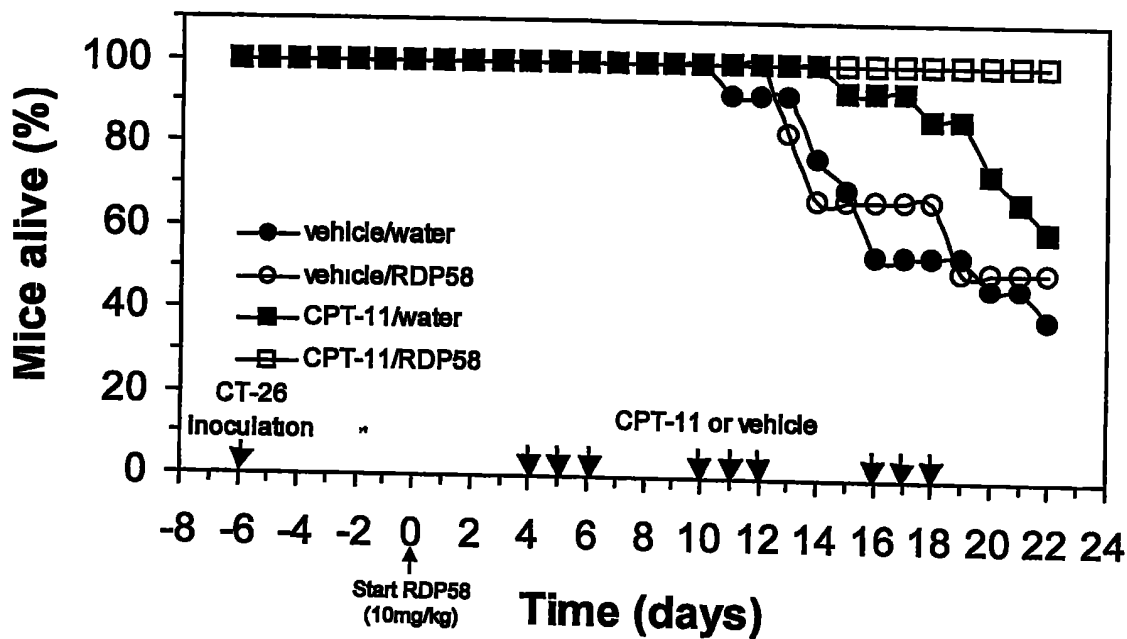


FIG 6

83

RDP58 increases the LD₅₀ in CPT-11-treated normal mice

W/O 03/07/2061

PCT/US03/06333

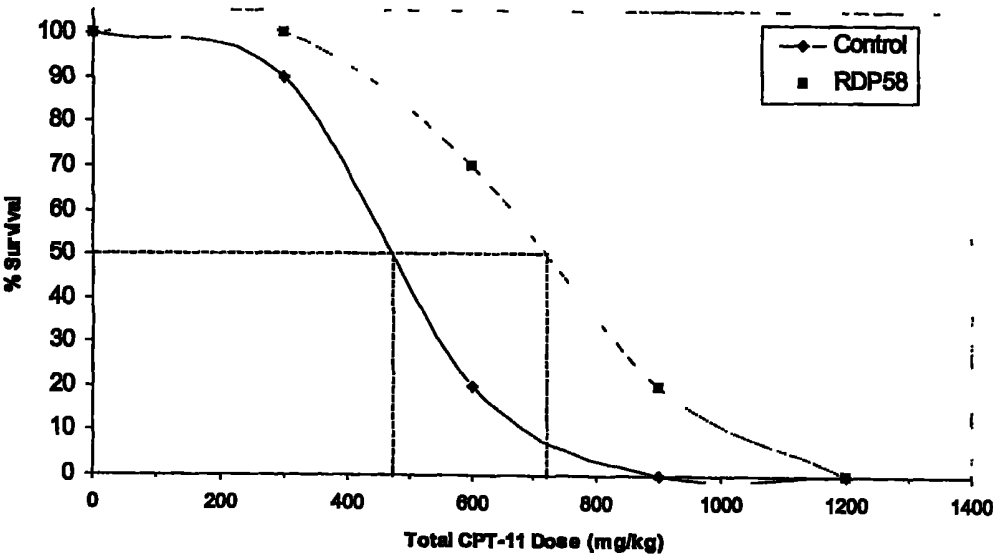


FIG 7

Concurrent RDP58 Treatment Allows CPT-11 Dos Escalation with Improved Survival in Tumor-bearing Mice

61

W 03/07/2061

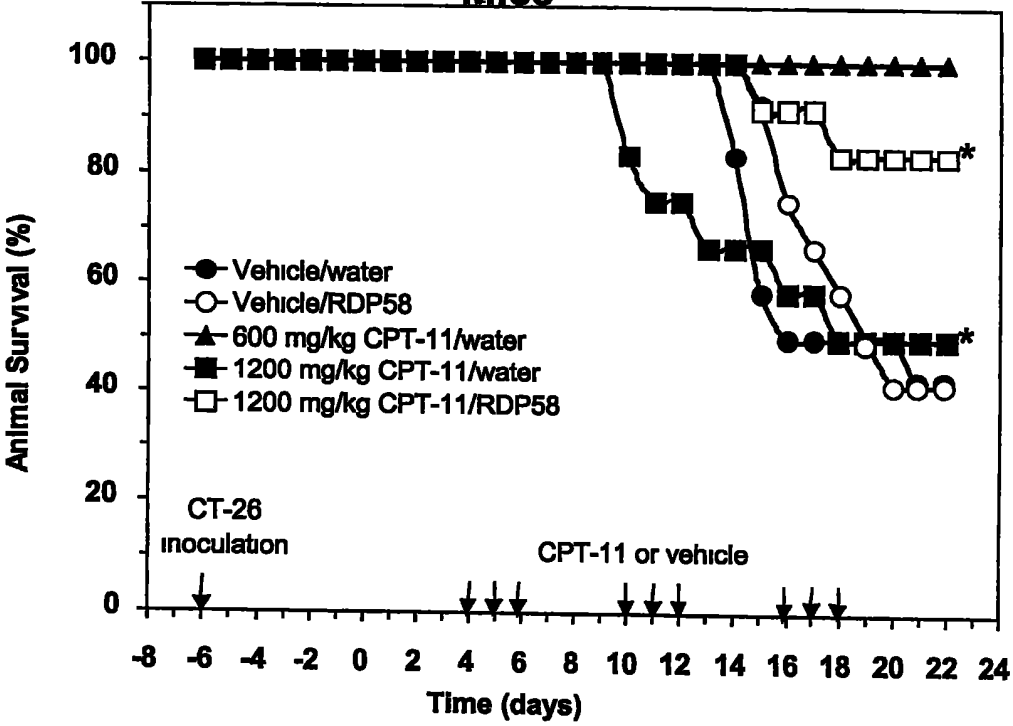


FIG 8

PCT/US03/06333

61

Tumor Response with CPT-11 Dose Escalation and RDP58 Treatment

62

W 03072061

ICT/US960633

62

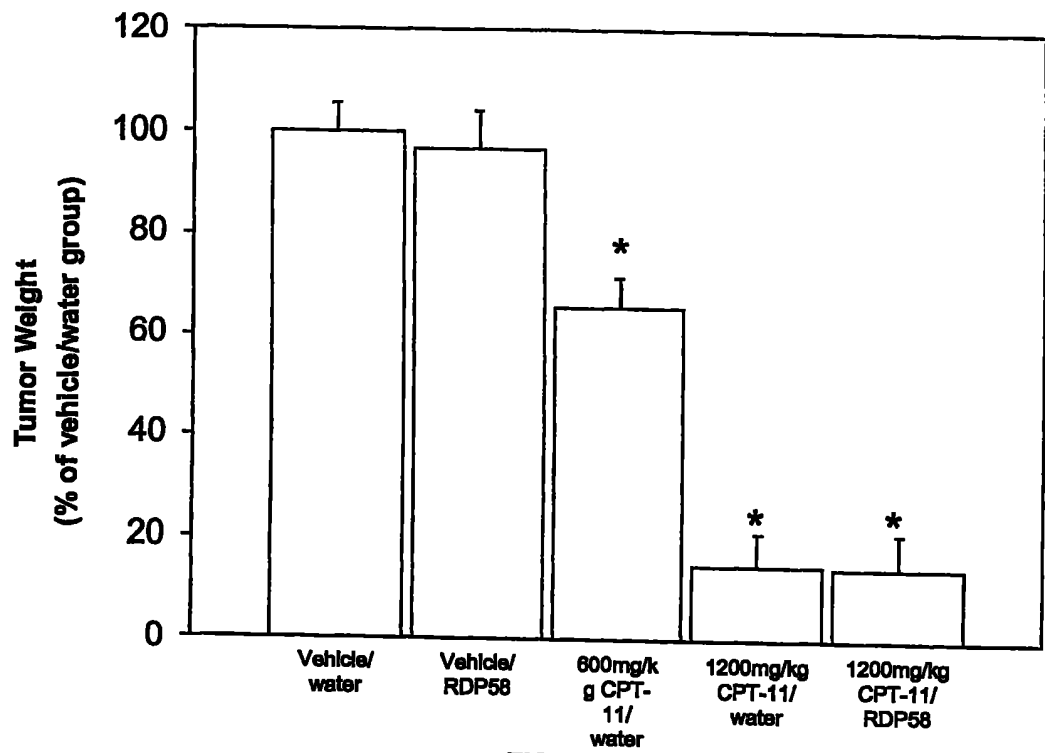


FIG 9

63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US03/06393

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) A61K 38/04

US CL 514 15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. 514/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Registry Capas, Medline, Biosis Search, Cancerlit, Litmed, Bioschds on STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Database Scisearch on STN Thomson ISI (Columbus, OH USA) No.97:622373 KILLION et al Maintenance of intestinal epithelium structural integrity and mucosal leukocytes during chemotherapy by oral administration of mixed tripeptide phosphatidylethanolamine, abstract, Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, December 1996 Vol. 11 No. 6, pages 363-371	1 18
Y	Database Medline on STN, US National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), No. 94026938, CAPPELL et al, Colonic toxicity of administered medications and chemicals, abstract, American Journal of Gastroenterology October 1993 Vol. 88, No. 10, pages 1684-1699	1 12, 15-18
Y	WO 98/46633 A1 (SANGSTAT MEDICAL CORPORATION) 22 October 1998 (22.10.1998) page 5, lines 1-22, page 9 line 17 page 27 lines 1-13	1 12, 15-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"W" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to substantiate the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 2003 (20.12.2003)

Date of mailing of the international search report

03 MAY 2004

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Fusahills No. (703)305-3230

Authorized officer

Anthony Caputo
Telephone No. 703-306-0196

J Roberts for

-File- 64

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47 1(c) first sentence)

To

LORENZ Todd, A.
DORSEY & WHITNEY LLP
4 Embarcadero Center
Suite 3400
San Francisco, CA 94111
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

FL

SEP 17 2003

Date of mailing(day/month/year)

04 September 2003 (04 09 03)

Applicant's or agent's file reference

FP71358/TAL 1070 32

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US03/06333 ✓

International filing date(day/month/year) ✓

26 February 2003 (26 02 03)

Priority date(day/month/year) ✓

26 February 2002 (26.02.02)

Applicant

SANGSTAT MEDICAL CORPORATION

- 1 Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice.

AU AZ, BY CH CN CO, DE DZ, HU JP KG KP KR, MD MK, MZ, RU TM US

In accordance with Rule 47 1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s)

- 2 The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM AP AT BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CR, CU CZ, DK DM EA, EC, EE EP ES, FI, GB, GD GE, GH
GM HR, ID IL, IN IS, KE, KZ, LC LK LR, LS, LT LU LV MA, MG, MN MW MX, NO NZ, OA, OM PH PL, PT RO
SC, SD SE SG, SK, SL, TJ TN TR, TT TZ, UA, UG, UZ, VC, VN YU ZA, ZM ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49 1(a-bis))

- 3 Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 04 September 2003 (04.09.03) under No. 03/072061

4. TIME LIMITS for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No 44/2001 of 1 November 2001 pages 19936, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter* October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide* Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes

Authorized officer

I dith Zehner

65

**MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR TOXICIDAD
GASTROINTESTINAL INDUCIDA POR TERAPIA CITOABLATIVA**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 [0001] Esta solicitud reclama el beneficio de
la solicitud de patente provisional de los E U A No
60/360,211 presentada en Febrero 26, 2002, todos los
contenidos de la cual aquí se incorporan por referencia

CAMPO DE LA INVENCION

10 [0002] El campo de esta invención se refiere a
tratamientos novedosos para individuos que sufren de
complicaciones gastrointestinales de quimioterapia y
radioterapia, incluyendo diarrea, mucositis, estomatitis
y proctitis

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

 [0003] En las últimas décadas, se han
desarrollado técnicas de quimioterapia y radioterapia
potencialmente curativas para el tratamiento de casi
todos los tumores humanos Aunque han mejorado en forma
20 medurable el tiempo de supervivencia y se ha disminuido
la mortalidad por cáncer, las toxicidades principales
inducidas por estas terapias aún representan la etapa
limitante de la tasa o proporción para lograr una cura
Wilmore, Cancer 79 1794-1803(1997)

[0004] La quimi terapéutica y radiación ej rcen
sus efectos citoablativos en acciones citotóxicas en
células que proliferan rápidamente mediante varios
mecanismos diferentes, finalmente llevando al freno del
5 ciclo celular y/o apoptosis celular Las acciones
citotóxicas de estas terapias no son específicas de
tumor, sin embargo y tejidos normales que exhiben
típicamente rápida rotación celular, son más sensibles al
efecto tóxico de la quimioterapia En particular, la
10 lesión a células normales en la médula ósea y mucosa
gastrointestinal, a menudo complica el tratamiento al
paciente Aunque avances significantes se han realizado
en combinación con mielosupresión y neutropenia que se
logran por toxicidad de médula ósea, por ejemplo a través
15 del uso de factores de estímulo de colonia recombinante
tales como Neupogen^{MR}, y Epogen^{MR}, no hay disponibles
actualmente agentes que puedan evitar selectivamente la
lesión gastrointestinal citoablativa Bousheyet y
colaboradores, Cancer Res 61 687-93 (2001) Como
20 resultado, la toxicidad gastrointestinal caracterizada
por severa mucositis y diarrea a menudo limitan tanto la
dosis como la duración de la terapia citoablativa,
conduciendo a efectividad reducida en pacientes
susceptibles Id El tracto gastrointestinal por lo
25 tanto representa el siguiente órgano limitante de la tasa

evitando mayor escala en dosis en muchos pacientes con
cáncer Id , Wilmore, arriba

[0005] El forro epitelial de la mucosa
intestinal se mantiene por proliferación continua de
5 células en criptas, que finalmente dependen de las
células madre cripta Esta proliferación es seguida por
diferenciación celular y migración hasta los vellos, en
donde los enterocitos maduros se reemplazan y mudan
desprenden de las puntas Dosis citoablativas de
10 quimioterapia o radioterapia comprometen la acción
absorbente y barrera de la mucosa al exterminar las
células madre cripta, de esta manera deteriorando la
regeneración normal Farrell y colaboradores, Cancer
Res 58 933-39(1998) Conforme las células dañadas se
15 desprenden, la mucosa se adelgaza y desnuda, acompañado
por una renovación celular retardada, atrofia mucosal,
inflamación y a menudo ulceración Balsari y
colaboradores, Br J Cancer 85 1964-67 (2001)

[0006] Por lo tanto pacientes que se someten a
20 terapias citoablativas, frecuentemente desarrollan
mucositis entérica y diarrea, que pueden ser letales
Cascinu, Curr Opin Oncol 7 325-29 (1995) Aún más,
los efectos gastrointestinales de estas terapias
citoablativas pueden ser agravados y prolongados por la
25 carencia de absorción enteral que frecuentemente ocurre

Anorexia, mucositis, calambres abdominales, diarrea explosiva con admisión de alimentos y recurrir a terapia intravenosa (que suprime el apetito) todos comprometen la exposición del intestino a nutrientes enterales, de esta manera limitando la capacidad del cuerpo para estimular proliferación epitelial intestinal normal Wilmore, arriba Aún más, en pacientes con severa granulocitopenia, las ulceraciones provocadas por mucositis pueden llevar a diseminación bacterial hematogena extensa, ya que las lesiones sirven como entrada para bacterias en la corriente sanguínea Balsari y colaboradores, arriba Hospitalización a menudo es necesaria, para mantener la hidratación del cuerpo, para controlar el dolor y evitar o manejar la infección

[0007] Con terapia citoablativa en combinación en particular, síntomas gastrointestinales pueden volverse tan severos que el tratamiento deba modificarse o interrumpirse totalmente, de esta manera comprometiendo la eficacia de la terapia en la enfermedad neoplásica En terapia adjuntiva o auxiliar, la capacidad en minimizar atenuar severos síntomas gastrointestinales puede influenciar enormemente tanto la calidad de la vida durante la terapia como la supervivencia del paciente total Esto es particularmente cierto con terapias de

escala de dosis utilizadas en pacientes con cánceres
gastrointestinales o aquellos que se someten a
transplante de médula ósea asociado con una terapia de
citoablación en combinación con altas dosis Wilmore,
5 arriba

[0008] Desafortunadamente, sin embargo, no hay
agentes universalmente reconocidos disponibles para
profilaxis o terapia de las toxicidades
gastrointestinales inducidas por quimioterapia y/
10 radioterapia Boushey y colaboradores, arriba Agentes
que se emplean comúnmente para el tratamiento de una
complicación gastrointestinal, por ejemplo altas dosis de
loperamida para diarrea, típicamente tiene poco o ningún
efecto en otras toxicidades serias, por ejemplo
15 mucositis Aún más, los efectos terapéuticos obtenidos
con agentes existentes dirigidos en síntomas específicos
tales como diarrea y mucositis, son insuficientes Lo
que se requiere por lo tanto es un agente que sea capaz
de aliviar las toxicidades gastrointestinales inducidas
20 por terapia citoablativa

[0009] Literatura Relevante

Wilmore, arriba, revisa los efectos de la terapia
citotóxica en el tracto gastrointestinal y describe
medios de soporte metabólico La protección contra la
25 toxicidad gastrointestinal provocada por irinotecan se ha

intent utilizar talidomida (Govindarajan y
 colaboradores, Lancet 356 566-7 (2000), interleucina 15
 (Cao y colaboradores, Cancer Res 58 3270-74 (1998), una
 lipopéptido bacteriano sintético (Shinohara y
 5 colaboradores, Clin Cancer Res , 5 2148-56 (1999) y
 péptido tipo glucagon (GLP)-2 (Boushey y colaboradores,
 arriba) El uso de factor de crecimiento queratinocit
 para proteger contra lesión gastrointestinal provocada
 por regímenes combinados de quimioterapia y radiación, se
 10 describen por Farrell y colaboradores, arriba, mientras
 que Orazi y colaboradores describe el uso de
 interleucina-11 Lab Invest 75 33-42 (1996) La
 protección contra efectos gastrointestinales adversos de
 doxorubicina utilizando quitosana se describe por Kimura
 15 y colaboradores, J Pharm Pharmacol 53 1373-78 (2001),
 mientras que Balsari y colaboradores, Br J Cancer 85
 1964-7 (2001) describe el uso de un anticuerpo monoclonal
 específico de doxorubicina Woo y colaboradores, arriba,
 describe el uso de claritromicina para atenuar mucositis
 20 inducida por ciclofosfamida en ratones

[0010] Buelow y colaboradores, Transplantation
 (Transplante) 59 649-654 (1995) y las referencias ahí
 citadas Manolios y colaboradores, Nature Medicine 3
 84-88 (1997) describe oligopéptidos derivados por diseño
 25 racional que modulan actividad de células T WO 95/13288

por Clayberger y colaboradores, que describe péptidos capaces de modular la actividad de célula T Referencias que describen métodos para diseñar compuestos por computadora utilizando relaciones de actividad estructural, incluyen Grassy y colaboradores, J of Molecular Graphics 13 356-367 (1995), Halech y colaboradores, J de Molecular Graphics 13 46-48 (1995), Yasri y colaboradores, Protein Engineering 11 959-976 (1996), Ashton y colaboradores, Drug Discovery Today 1 71-78 (1996), y Lyer y colaboradores, Curr Pharm Des 8 2217-2229 (2002)

COMPENDIO DE LA INVENCION

[0011] La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas y métodos para tratar y aliviar toxicidades gastrointestinal y disfunción resultantes por terapias citoablativa intensas En particular, los métodos y composiciones aquí descritos proporcionan efectiva profilaxis y terapia de las complicaciones gastrointestinal inducidas por quimioterapia y radioterapia incluyendo diarrea, mucositis (por ejemplo, oral y esofágica), estomatitis y proctitis Los métodos y composiciones aquí suministrados mejoran significativamente la calidad de vida durante terapias de cáncer en curso, y permiten dosis incrementadas de agentes quimioterapéuticos y

exposiciones de radioterapia para llevar al máximo el exterminio de células metastáticas para mejorar la supervivencia a largo plazo

[0012] En una modalidad, se proporciona un
5 método para reducir la toxicidad y disfunción
gastrointestinal inducidas por terapia citoablativa, que
comprende la administración de péptidos
inmunomodulatorios ya sea solos o en combinación con
agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo agentes
10 anti-inflamatorios, agentes anti-diarreicos, analgésicos
y semejantes. Cuando se utilizan en combinación con
agentes terapéuticos adicionales, los péptidos
inmunomodulatorios y agentes adicionales pueden
administrarse ya sea en forma simultánea o secuencial.
15 En una modalidad particularmente preferida, los péptidos
inmunomodulatorios se administran en combinación con
agentes anti-diarreicos tales como loperamida.

[0013] En una modalidad adicional, se
proporcionan preparaciones farmacéuticas y paquetes o
20 equipos que comprenden una combinación novedosa de los
péptidos inmunomodulatorios aquí descritos junto con al
menos un agente terapéutico adicional incluyendo por
ejemplo agentes anti-inflamatorios, agentes
anti-diarreicos, analgésicos, y semejantes.

[0014] En una modalidad, la invención proporciona métodos para incrementar la dosis tolerada máxima de terapias citoablativas, por ejemplo quimioterapia y radioterapia, que comprende la administración de péptidos inmunomodulatorios para reducir toxicidades gastrointestinales limitantes de dosis. La dosis de péptido inmunomodulatorio de preferencia es efectiva para incrementar la dosis máxima tolerada (MTD = maximum tolerated dosage) de terapia citoablativa por al menos un cuarto (1/25x) o un tercio (1/33x), más preferible por la mitad (1/5x), y en particular por 1/5x a 2x o más. En una modalidad adicional, métodos mejorados para tratar cáncer se proporcionan que emplean estas dosis incrementadas de quimioterapia y radioterapia, junto con terapias de combinación novedosas para aliviar toxicidades asociadas.

[0015] Péptidos inmunomodulares convenientes para utilizar en las presentes composiciones y métodos, son capaces de modular la actividad de diversas células de sistema inmune, particularmente células T, y/o inhibir la producción de citocinas inflamatorias. En una modalidad preferida, los presentes péptidos comprenden uno o más de los péptidos citomodulares descritos en las solicitudes de patente de los E U A copendientes No de Serie 09/028,083 y No de Serie 08/838,918 así como la

Publicación Internacional correspondiente WO 98/46633, las descripciones de las cuales aquí se incorporan expresamente por referencia. En una modalidad particularmente preferida, el péptido inmunomodulador
5 comprende la secuencia Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr, en donde nL es norleucina y todos los amino ácidos son el D-estereoisómero (también referido aquí como bcl nL y/o RDP58)

[0016] En un aspecto, los péptidos tienen
10 extensiones de amino ácido en el extremo N o C, para proporcionar funcionalidad adicional, tales como hacer blanco al péptido al tejido afectado, incrementar la vida media o para conectar diversos compuestos. En otro aspecto, los péptidos citomoduladores son oligómeros,
15 particularmente dímeros de la secuencia activa, o están en la forma de péptidos cíclicos. Los péptidos pueden comprender amino ácidos de origen natural, o más preferiblemente uno o más D-estereoisómeros

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 [0017] La Figura 1 es una ilustración de un enjambre de espacio de conformación del péptido bc 1nL, también referido aquí como RDP58. Las conformaciones trazadas se obtienen del análisis de enjambre de la trayectoria bcl nL.

25

[0018] La Figura 2 es una ilustración de una proyección de trayectorias de péptido en el plano principal de la trayectoria de referencia de péptido D2

5 [0019] La Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto dependiente de dosis de administración de péptido RDP58 en la mortalidad, en un modelo de tumor murino que utiliza CPT-11

[0020] La Figura 4 es una gráfica que ilustra el efecto de administración de péptido RDP58 para reducir mortalidad en un modelo de tumor murino que utiliza 5-FU

10

[0021] La Figura 5 es una gráfica que demuestra la conservación de eficacia anti-tumor, cuando el péptido RDP58 se administra en combinación con CPT-11 en un modelo de tumor murino

15 [0022] La Figura 6 es una gráfica que muestra el efecto de administración de péptido RDP58 para reducir mortalidad en un modelo de tumor murino, que utiliza CPT-11

[0023] La Figura 7 es una gráfica que ilustra el incremento significativo en la dosis máxima tolerada de CPT- 11 permitida por administración de péptido RDP58 en un modelo de tumor murino

20

[0024] La Figura 8 es una gráfica que muestra la supervivencia mejorada de ratones que tienen tumor a

l s que se administra una dosis incrementada de CPT-11 en combinación con péptido RDP58

[0025] La Figura 9 es una gráfica de barras que ilustra la respuesta mejorada a tumor obtenida con la combinación del incremento en dosis de CPT-11 y tratamiento de péptido RDP58

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0026] Métodos y composiciones se proporcionan para tratar complicaciones gastrointestinales mayores inducidas por quimioterapia y/o radioterapia, incluyendo diarrea, mucositis, estomatitis y proctitis. Los métodos involucran la administración oral de miembros de una nueva clase de péptidos sintéticos desarrollados por diseño racional auxiliado por computadora a partir de moléculas derivadas de HLA conocidas. Ver por ejemplo, la solicitud de patente de los E U A No 09/028,083 y la Publicación Internacional No WO 98/46633, las descripciones de las cuales aquí se incorporan expresamente por referencia. Se han mostrado que estos nuevos péptidos tienen actividades inmunomoduladores distintas incluyendo por ejemplo, inhibición efectiva de producciones de TNF-alfa a nivel de traducción (Lyer y colaboradores, J Biol Chem 275 17051-57 (2000)) y regulación ascendente de la expresión celular de heme oxigenasa-1 (HO-1) (Lyer y colaboradores 1998, Cuturi y

colaboradores, Mol Med 5 820-32 (1999)) El compuest
principal, identificado aquí como RDP58, es un péptido de
diez amino ácidos que consiste de D-amino ácidos con las
siguiente secuencia Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr
5 (SEQ ID NO), en donde nL indica D-norleucina

[0027] Como se demuestra aquí, la
administración oral de estos nuevos compuestos péptido
puede ser eficaz para aliviar una variedad de toxicidades
gastrointestinales inducidos por terapia citoablativa
10 De esta manera, los péptidos objetivo encontrarán uso en
profilaxis y terapia de complicaciones gastrointestinales
tales como diarrea y mucositis que resultan de terapias
citoablativas, así como calambres, incomodidad,
deshidratación, desequilibrio de electrolitos e
15 infecciones secundarias, típicamente acompañantes a la
complicación primaria En una modalidad adicional, el
uso de péptidos presentes permite ventajosamente un
aumento en escala de dosis del agente citoablativo
terapias citoablativas en combinación para aumentar el
20 exterminio de células de tumor y de esta manera mejorar
la supervivencia total del paciente

[0028] Los métodos de la presente invención
encontrarán uso ventajoso virtualmente con cualquier
régimen citoablativo que induce toxicidad
25 gastrointestinal, incluyendo radioterapias y

quimioterapéuticas Mucositis aguda es común después de radioterapia para cánceres de cabeza y cuello, por ejemplo, y esta toxicidad mucosal se reconoce como el factor limitante principal para mayor intensificación de tratamiento Ver por ejemplo, Bensadoun y colaboradores, Eur Arch Otorhinolaryngol 258 481-7 (2001) Los péptidos presentes encontrarán uso para aliviar la mucositis inducida con regímenes de radioterapia dirigidos a cánceres de cabeza y cuello, así como para tratamientos de radioterapia que inciden por otra parte ante el tracto gastrointestinal tales como irradiación en cáncer de próstata, que puede provocar proctitis en la porción colorectal del tracto gastrointestinal, y protocolos de irradiación de cuerpo entero utilizados en transplante de médula ósea

[0029] Los presentes péptidos también encontrarán uso para aliviar las toxicidades gastrointestinales inducidas por agentes quimioterapéuticos, ya sea solos o en combinación con radioterapia Por ejemplo, la mayor toxicidad limitante de dosis asociada con el análogo camptotecano irinotecano (CPT-11) es la diarrea retardada o de inicio tardío, que puede ser extremadamente severa cuando se asocia con neutropenia Rougier y colaboradores, J Clin Oncol 15 251-60 (1997) Hasta en 30% de los pacientes la

79

diarrea no responde a agentes convencionales tales como loperamida, y se requieren admisión en hospital, modificación de dosis y/o interrupción de la quimioterapia Cunningham y colaboradores, Lancet 352
5 1413-18 (1998) Como se demuestra aquí, la administración oral de los presentes péptidos es efectiva para aliviar esta toxicidad

[0030] Los presentes péptidos también encontrarán uso para tratar mucositis inducida por otros
10 agents quimioterapéuticos comúnmente empleados, incluyendo metotrexato, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida, y doxorubicina, así como taxanos y vinca alcaloide Severa mucositis gastrointestinal en pacientes que se someten a terapia citoablativa provoca significativa
15 morbilidad y mortalidad, debido a la propia mucositis así como infecciones locales y sistémicas secundarias predispuestas por la misma Woo y colaboradores, Pharm Res 41 527-32 (2000) A pesar de años de estudio, los
20 tratamientos de mucositis desarrollados hasta la fecha no han tenido suficientes efectos benéficos Id Como resultado, la mucositis también permanece como una toxicidad limitante de dosis primaria asociada con muchos tipos de agentes quimioterapéuticos, incluyendo doxorubicina, que se emplea ampliamente para tratar
25 muchos tipos de tumores sólidos Ver Marina y

c laboradores, Clin Cancer Res 8 413-8 (2002)
Tratamiento profilático y/o terapéutico de lesión mucosal
utilizando los péptidos presentes permiten dosis
incrementada de estos agentes así como programas de
5 dosificación más efectivos que pueden ser contra-
indicados debido a la toxicidad gastrointestinal

[0031] Como se describe aquí, la administración
de los péptidos presentes alivia las toxicidades y
disfunciones gastrointestinales que resultan de estas
10 terapias citoablativas intensas El reducir o aliviar la
toxicidad y disfunción gastrointestinal en el contexto de
tratamiento citoablativo incluye como ejemplos no
limitantes reducción de manifestaciones clínicas tales
como diarrea, mucositis, estomatitis, proctitis, sangrado
15 rectal, mala absorción, dolor abdominal, pérdida de
peso, fiebre, anemia, sangre fecal oculta, leucocitos
fecales, e indicaciones histológicas tales como cripto
abcesos, infiltración de leucocitos, apoptosis celular,
inflamación granulomatosa transmural, inflamación mucosal
20 y submucosal de superficie, etc Además, incluidos
dentro de la definición de síntomas como se emplea aquí,
están cambios en niveles de marcadores bioquímicos y
moleculares asociados con disfunción e inflamación
intestinal que surge de terapia citoablativa, incluyendo
25 pero no limitados a, incremento en citocinas

pro-inflamatorias (por ejemplo, TNF-alfa, interferona-gamma ,11-1, IL-6, IL-12, etc), cambios en marcadores enzimáticos de activación de leucocitos (por ejemplo, mieloperoxidasa, expresión de COX-2, expresión

5 iNOS, etc), apoptosis celular (por ejemplo, fragmentación de ADN, activación de caspasa, etc), y otros conocidos en la especialidad Aunque un marcador puede emplearse como una indicación de reducción en disfunción gastrointestinal, de preferencia más de uno

10 se emplea, y más preferiblemente se emplean combinación de marcadores, incluyendo combinaciones de manifestaciones clínicas, indicaciones histológicas, y marcadores moleculares/bioquímicos

[0032] Para utilizar en aliviar y/o reducir las

15 toxicidades y disfunciones gastrointestinales de pacientes que se someten a tratamiento citoablativo, los péptidos inmunomoduladores pueden emplearse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como por ejemplo, agentes depuradores de radicales de oxígeno

20 tales como superóxido dismutasa o agentes anti-inflamatorios tales como corticoesteroides, hidrocortisona, prednisona y semejantes, agentes anti-diarreicos tales como loperamida y semejantes, agentes antibacterianos tales como penicilina,

25 cefalosporinas, bacitracina y semejantes, agentes

antiparasitarios tales como quinacrina, cloroquina y semejantes, agentes antifungales tales como nistatina, gentamicina, y semejantes, agentes antivirales tales como aciclovir, ganciclovir, ribavirin, interferonas y semejantes, agentes analgésicos tales como ácido salicílico, acetaminofen, ibuprofen, flurbiprofen, morfina y semejantes, anestésicos locales tales como lidocaína, bupivacaína, benzocaína y semejantes, factores de crecimiento tales como factor estimulante de colonia, factor estimulante de colonia macrófago-granulocito y semejantes, antihistaminas tales como difenhidramina, clorfencramina y semejantes, medicamentos anti-náusea, aditivos nutricionales tales como leucovorin, y otras sustancias semejantes

[0033] De esta manera, una pluralidad de agentes terapéuticos pueden emplearse en la presente invención. Estas combinaciones de múltiples drogas, incluyen pero no están limitadas a, combinaciones de los péptidos presentes con agentes anti-diarréicos, agentes anti-inflamatorios y/o analgésicos. Por ejemplo, una modalidad puede comprender una combinación que contiene los péptidos inmunomoduladores descritos aquí, particularmente el D-estereo isómero de la secuencia Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr, loperamida, y un analgésico. Otras combinaciones pueden realizarse por

aquellos con destreza en la especialidad (por ejemplo, diferentes agentes anti-inflamatorios y combinaciones analgésicas) En este contexto, los péptidos empleados ya son una sola secuencia de péptido, o una mezcla de
5 diferentes secuencias de péptido de la presente invención, o una mezcla que incluye análogos naturales de los péptidos de la presente invención (por ejemplo, B2702 75-84)

[0034] Los métodos y composiciones aquí
10 descritos pueden encontrar uso ventajoso para reducir o aliviar la toxicidad y/o disfunción gastrointestinal provocadas en cualquier forma de terapia citoablativa, y en particular, aquellas terapias dirigidas a células de rápida división incluyendo tanto células de tumor como
15 células epiteliales Ejemplos no limitantes de agentes antineoplásicos potenciales que pueden beneficiarse de la presente invención incluyen compuestos de platino (por ejemplo, espiroplatina, cisplatina, y carboplatina), camptotecano y análogos relacionados tales como
20 irinotecan(CPT-11), taxanos tales como taxol, inhibidores mitóticos tales como etopósido y los vinca alcaloides incluyendo por ejemplo, vincristina, vinblastina y vinorelbina, metotrexato, fluorouracil (5-FU), adriamicina, mitomicina, ansamitocina, bleomicina,
25 citosina arabinosida, arabinosil adenina,

mercaptop lisina, busulfan, cl rambucil, melfalan (por
 ejemplo, PAM, L-PAM o fenilalanina mostaza),
 mercaptopurina, mitotano, hidrocioruro procarbazona
 dactinomicina (actinomicina D), hidrocioruro de
 5 daunorubicina, hidrocioruro de doxorubicina, plicamicina
 (mitramicina), aminoglutetimida, estramustina fosfato
 sodio, flutamida, leuprolida acetato, megestrol acetato,
 tamoxifen citrato, testolactona, trilostano, amsacrina
 (m-AMSA), asparaginasa (L-asparaginasa) Erwina
 10 asparaginasa, etopósido (VP-16), interferona alfa-2a,
 interferona alfa-2b, tenipósido (VM-26), vinblastina
 sulfato (VLB), vincristina sulfato, bleomicina sulfato,
 arabinosilo, hidroxiaurea, procarbazona, y dacarbazina,
 así como radiofarmacéuticos tales yodo radioactivo y
 15 productos de fósforo y semejantes

Péptidos Inmunomoduladores

[0035] Los péptidos inmunomoduladores adecuados
 para utilizar en las composiciones y métodos de la
 presente invención son capaces de inhibir la producción
 20 celular de citocinas inflamatorias, incluyendo p r
 ejemplo, factor de necrosis de tumor-alfa (TNF-alfa),
 interferona-gamma (INF-gamma), interleucina (IL)-1, IL-8,
 IL-12 así como otras citocinas, quimocinas, factores de
 crecimiento hematopoyético, y semejantes Péptidos
 25 inmunomoduladores preferidos incluyen o comprenden uno o

más de los oligopéptidos citomoduladores descritos en las solicitudes de patente de los E U A co-pendientes No de Serie 08/838,916 y No de Serie 09/028,083, la descripción de las cuales aquí se incorporan por referencia. Particularmente se prefiere para uso en los presentes métodos y composiciones un péptido inmunomodulador que comprende la secuencia Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr, en donde nL es norleucina y todos los amino ácidos son D-estereoisómero.

[0036] Además, compuestos activos previamente conocidos que también pueden encontrar uso en la presente invención incluyen alfa₁-dominio HLA-B, particularmente los amino ácidos de 75 a 84 y variaciones de esta secuencia, en donde no más de 2 amino ácidos se reemplazan y en donde los amino ácidos no incluyen R e Y (ver, por ejemplo, WO95/13288 y Buelow y colaboradores, arriba). También se conocen secuencias con base en la región transmembrana TCR-alfa humana que consiste de esta secuencia y secuencias que no tienen más de 2 mutaciones de esa secuencia (ver solicitudes Australianas Nos PN 0589 y PN 0590, presentadas en Enero 16, 1995). Estas secuencias incluyen 2 amino ácidos básicos, en donde los 2 amino ácidos básicos se separan por 4 amino ácidos hidrofóbicos alifáticos, aunque la solicitud indica que de 3 a 5 amino ácidos hidrofóbicos pueden estar

presentes Por mutación se entiende cada substitución de un amino ácido por otro o una inserción o eliminación, cada uno se cuenta como una mutación En ciertas modalidades, los péptidos inmunoestimuladores preferidos para utilizar aquí, pueden excluir estos compuestos activos previamente conocidos

[0037] En general, la frase "péptidos inmunomoduladores" o "péptidos inmunomodulantes" como se emplea aquí, se entiende que abarque todos los compuestos péptido anteriores, así como análogos, derivados, proteínas de fusión y semejantes En una modalidad preferida, la secuencia núcleo del péptido inmunomodulador convenientemente comprende dos amino ácidos básicos separados de tres a cuatro amino ácidos hidrofóbicos, particularmente tres amino ácidos hidrofóbicos, y en particular en donde el extremo N es un amino ácido básico Más convenientemente, el amino ácido C-terminal es un amino ácido aromático, particularmente tirosina De interés particular es cuando al menos uno de los amino ácidos terminales núcleo oligopéptido es un amino ácido terminal oligopéptido que puede estar en la forma monomérica u oligomérica del compuesto

[0038] Más particularmente, los péptidos inmunomoduladores preferidos para utilizar en las composiciones y métodos de la presente invención

82

comprenden oligopéptidos que tienen la secuencia B-X-X-X-B-X-X-X-J-Tyr, en donde B es un amino ácido básico, de preferencia Lys o Arg, particularmente Arg en al menos una posición, de preferencia en ambas

5 posiciones, J es Gly, B o un amino ácido hidrofóbico alifático de 5 a 6 átomos de carbono, particularmente Gly o B, y X es un amino ácido alifático o aromático. En una modalidad, al menos tres residuos amino ácido X son el mismo amino ácido alifático no polar, de preferencia al

10 menos cuatro son el mismo amino ácido alifático no polar, más preferiblemente cuando menos cinco con el mismo amino ácido alifático no polar y en particular, todos son el mismo amino ácido alifático no polar. En una modalidad preferida, los amino ácidos alifáticos no polares son de

15 5 a 6 átomos de carbono, particularmente 6 átomos de carbono, en particular los amino ácidos alifáticos no polares Val, Ile, Leu, y nL. De esta manera, en algunas modalidades, X es cualquier amino ácido diferente a un amino ácido alifático cargado y de preferencia cualquier

20 amino ácido diferente a un amino ácido alifático polar

[0039] De los seis amino ácidos indicados por X en la secuencia de péptidos B-X-X-X-B-X-X-X-J-Tyr, de preferencia son amino ácidos alifáticos de 5 a 6 átomos de carbono, más preferiblemente cuando menos 4 son amino

25 ácidos alifáticos de 5 a 6 átomos de carbono, más

preferiblemente cuando menos 5 son amino ácidos alifáticos de 5 a 6 átomos de carbono, más particularmente 6 átomos de carbono. En una modalidad preferida, los amino ácidos alifáticos son amino ácidos alifáticos no polares de 5 a 6 átomos de carbono, particularmente Val, Ile, Leu, y L. Los otros amino ácidos pueden ser otros amino ácidos alifáticos sin carga, particularmente amino ácidos alifáticos no polares o amino ácidos aromáticos.

10 [0040] Composiciones de interés particular tendrán la siguiente fórmula

Arg-U-X-X-Arg-X-X-X-J-Tyr

en donde todos los símbolos se han definido previamente excepto U, que comprende un amino ácido alifático sin carga o amino ácido aromático, particularmente un amino ácido alifático no polar o amino ácido aromático.

[0041] Los amino ácidos pueden ser amino ácidos de origen natural o sus D-isómeros. Los péptidos pueden tener uno o más amino ácidos D-estereoisómeros hasta todos los amino ácidos. Adicionalmente, los péptidos inmunomodulatorios pueden comprender oligómeros de 1 a 5 péptidos presentes, particularmente sus dímeros, comprender un péptido cíclico, esto es una estructura de anillo como se describe más a continuación.

[0042] Para los propósitos de esta invención, los amino ácidos (en su mayoría amino ácidos naturales o sus D-estereoisómeros) se descompondrán en las siguientes categorías

5 1 Alifáticos

(a) alifáticos no-polares

Gly, Ala, Val, nL, Ile, Leu

(b) alifáticos polares

(1) sin carga

10 Cys, Met, Ser, Thr, Asn, Gln

(2) con carga

Asp, Glu, Lys, Arg

2 Aromáticos

Phe, His, Trp, Tyr

15 en donde Pro puede incluirse en los amino ácidos alifáticos no polares, pero normalmente no se incluirá "nL" representa norleucina, en donde los amino ácidos alifáticos no polares pueden estar sustituidos con otros isómeros

20 [0043] Cualquiera o ambos de los extremos N y C del péptido, pueden extenderse en no más de un total de aproximadamente 100, usualmente no más de un total aproximado de 30, más usualmente no mayor a aproximadamente 20 amino ácidos, a menudo no mayor a

aproximadamente 9 amino ácidos, en donde los amino ácidos tendrán menos de 25%, más usualmente menos de 20% de amino ácidos polares, más particularmente, menos de 20% que son amino ácidos cargados. De esta manera, extensiones de las secuencias anteriores en cualquier dirección se hacen primordialmente con amino ácidos lipofílicos, sin carga, particularmente amino ácidos alifáticos no polares y amino ácidos aromáticos. Los péptidos pueden comprender L-amino ácidos, D-amino ácidos, o mezclas de D y L-amino ácidos. Excepciones al número de extensiones de amino ácido se contemplan cuando se expresan los oligopéptidos como proteínas de fusión o quiméricas como se describe a continuación.

[0044] Los péptidos pueden estar en la forma de oligómeros, particularmente dímeros de los péptidos, que pueden ser cabeza a cabeza, cola a cola, o cabeza a cola, habiendo no más de aproximadamente 6 repeticiones del péptido. El oligómero puede contener uno o más amino ácidos D-estereoisómeros, hasta todos los amino ácidos. Los oligómeros, pueden o no incluir secuencias enlazadoras entre los péptidos. Cuando las secuencias enlazadoras se emplean, enlazadores convenientes incluyen aquellos que comprenden amino ácidos sin carga y (Gly) n , en donde n es 1 a 7, Gly-Ser (por ejemplo, (GS) n ,

(GSGGS) n y (GGGS) n , en donde n es al menos 1), Gly-Ala, Ala-Ser, u otros enlazadores flexibles como se conoce en la técnica. Los enlazadores de Gly o Gly-Ser pueden emplearse ya que estos amino ácidos están relativamente sin estructurar, lo que permite interacción de péptidos individuales con moléculas objetivo celulares y limita las perturbaciones estructurales entre los péptidos del oligómero.

[0045] Péptidos inmunomodulatorios pueden estar en una forma estructuralmente restringida tales como péptidos cíclicos de aproximadamente 9-50, usualmente 12 a 36 amino ácidos, en donde amino ácidos diferentes a los amino ácidos especificados pueden estar presentes como puente. De esta manera, por ejemplo la adición de cisteínas terminales permite formación de puentes disulfuro para formar un péptido de anillo. En algunos casos, se pueden utilizar diferentes amino ácidos para ciclizar el péptido. Agentes de entrelazamiento bifuncionales son útiles para enlazar dos o más amino ácidos del péptido. Otros métodos para formación de anillo se describen en Chen y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 89 5872-5876 (1992), Wu y colaboradores, Protein Engineering (Ingeniería de proteínas) 6 471-478 (1993), Anwer, y colaboradores, Int J Pep Protein Res

36 392-399 (1990), y Rivera-Baeza, y c colaboradores
Neuropeptides (Neuropéptidos) 30 327-333 (1996), todas
las referencias se incorporan aquí por referencia En
forma alterna, péptidos estructuralmente restringidos se
5 elaboran por adición de secuencias de dimerización a l s
extremos terminales N y C del péptido en donde la
interacción entre secuencias de dimerización lleva a la
formación de una estructura de tipo cíclica (ver
WO/0166565, incorporada por referencia) En otros casos,
10 los péptidos presentes se expresan como fusiones a otras
proteínas, que proporcionan un andamio para exhibición
restringida en una estructura expuesta de superficie
tales como un bucle de una estructura de bobina
embobinada o de giro beta

15 [0046] Uno o ambos, usualmente un extremo del
péptido inmunomodulatorio, pueden estar sustituidos c n
un grupo lipofílico, usualmente alifático o aralquilo, de
8 a 36, usualmente 8 a 24 átomos de carbono y menos de
dos heteroátomos en la cadena alifática, los heteroátomos
20 usualmente son oxígeno, nitrógeno y azufre Como se
describe más a continuación, la cadena puede estar
saturada o insaturada, convenientemente con no más de
tres sitios, usualmente no más de dos sitios de
insaturación alifática Convenientemente, ácidos gras s

alifáticos comercialmente disponibles, alcoholes y
aminas, pueden emplearse tales como ácido caprílico,
ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, y alcohol
miristílico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido
5 esteárico, y estearil amina, ácido oleico, ácido
linoleico, ácido docosahexaenoico, etc (ver Patente de
los E U A No 6,225,444, aquí incorporada por
referencia) Se prefieren ácidos grasos de origen
natural, no ramificados entre 14-22 átomos de carbono de
10 longitud Otras moléculas lipofílicas incluyen gliceril
lípidos y esteroides, tales como colesterol Los grupos
lipofílicos pueden reaccionarse con el grupo funcional
apropiado en el oligopéptido de acuerdo con métodos
convencionales, frecuentemente durante la síntesis en un
15 soporte, dependiendo del sitio de conexión del
oligopéptido al soporte Conexión de lípido es útil en
donde los oligopéptidos pueden introducirse en el lumen
del liposoma, junto con otros agentes terapéuticos (por
ejemplo agentes inmunosupresores) para administrar los
20 péptidos y agentes en un huésped o anfitrión También se
conoce que incrementar la lipofiliidad aumenta el
transporte de compuestos a través de células endoteliales
y por lo tanto útil para promover absorción de estos

94

compuestos del intestino la corriente sanguínea en tejidos circundantes

[0047] El grupo amino terminal o grupo carboxilo del péptido inmunomodulatorio pueden
 5 modificarse por alquilación, amidación, o acilación para proporcionar ésteres, amidas o grupos amino sustituidos, en donde el grupo alquilo o acilo puede ser de aproximadamente 1 a 30, usualmente 1 a 24, de preferencia cualquiera de 1 a 3 u 8 a 24, particularmente 12 a 18
 10 átomos de carbono. El péptido o sus derivados también pueden ser modificado por acetilación o metilación para alterar las propiedades químicas, por ejemplo lipofilicidad. Otras modificaciones incluyen desaminación de residuos glutámico y asparagínico a los
 15 residuos correspondientes glutámico y aspártico, respectivamente hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de serina o treonina, y metilación de grupos amino de cadenas laterales lisina, arginina, e histidina (ver T E Creighton, Proteins
 20 Structure and Molecular Properties (Proteínas Estructura y Propiedades Moleculares), W H Freeman & Co San Francisco, CA, 1983)

[0048] Dependiendo de su uso pretendido, particularmente para administración a hospederos

95

mamíferos, los presentes péptidos pueden ser modificados o conectados a otros compuestos para los propósitos de incorporar en moléculas portadoras, cambiando la bi-disponibilidad de péptido, extender o acortar vida media, controlar la distribución de diversos tejidos de la corriente sanguínea, disminuir o mejorar la unión a componentes de sangre, y semejantes. Los presentes péptidos pueden ligarse a estos otros componentes, por enlazadores que se escinden en el ambiente fisiológico tal como sangre, fluido cerebro espinal, fluidos digestivos, etc. Los péptidos pueden unirse en cualquier punto del péptido en donde un grupo funcional está presente tal como hidroxilo, tio, carboxilo, amino, o semejantes. De manera conveniente, modificación será en cualquiera del extremo N o extremo C. Para estos propósitos, los presentes péptidos pueden ser modificados por polímeros de conexión covalente, tales como polietilen glicol, polipropilen glicol, carboximetil celulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidina, poliprolina, poli (divinil-éter-co-anhídrido maleico), poli (estireno-co-anhídrido maleico), etc. Polímeros solubles en agua tales como polietilen glicol y polivinilpirrolidina se conoce que disminuyen la liberación de compuestos conectados de la

corriente sanguínea en comparación con compuestos no modificados. Las modificaciones también pueden incrementar la solubilidad en medios acuosos y reducir la agregación de los péptidos.

5 [0049] En otro aspecto, el péptido de preferencia se conjuga en pequeñas moléculas para detección y aislamiento de los péptidos y para hacer blanco o transportar el péptido inmunomodulatorio en específicas células, tejidos y órganos. Conjugados de
10 pequeñas moléculas incluyen haptenos, que son sustancias que no inician una respuesta inmune cuando se introducen por sí mismos en un animal. En general, los haptenos son pequeñas moléculas de peso molecular inferior a aproximadamente 2 kD, y más preferiblemente menor a
15 aproximadamente 1 kD. Los haptenos incluyen pequeñas moléculas orgánicas (por ejemplo, p-nitrofenol, digoxina, heroína, cocaína, morfina, mescalina, ácido lisérgico, tetrahydrocannabinol, cannabinol, esteroides, pentamidina, biotina, etc.). Ligar al hapteno, por
20 ejemplo para propósitos de detección o purificación, se realiza con anticuerpos específicos de hapteno o socios de enlace específicos tales como avidina que liga biotina.

[0050] Pequeñas moléculas dirigidas al conjugado a células específicas o tejidos también pueden emplearse. Se conoce que la presencia de complejo de biotina-avidina incrementa la absorción de estos péptidos modificados a través de células endoteliales. El enlace de péptidos con porciones carbohidrato, por ejemplo a un beta-glicósido a través de un residuo serina en el péptido para formar un glicósido beta-O enlazado, mejores transportes del derivado glicósido mediante transportadores glucosa (Polt, R y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 91 7144-7118 (1994), Oh y colaboradores en Drug Transport and targeting, In Membrane Transporters as Drug Targets (Transporte y objetivo de droga, en transportadores de membrana como objetivos de droga) Amidon, G L and Sadee, W eds , pg 59-88 Plenum Press, New York, 1999) Ambos de est s tipos de modificaciones se abarcan dentro del alcance de la presente invención.

[0051] Los péptidos inmunomodulatorios pueden tener diversas porciones de etiqueta conectadas tales como etiquetas radioactivas y etiquetas fluorescentes para detección y seguimiento. Las etiquetas fluorescentes incluyen, pero no están limitadas a fluoresceína, eosina, Alexa Flúor, verde Oregón, verde

rodamina, tetrametilrodamina, rojo rodamina, Roj Texas, cumarina y NBD fluoróforos, los QSY 7, dabcil y dabsil cromóforos, BIODIPY, Cy⁵, etc

[0052] En un aspecto, los péptidos se unen a
5 una amplia variedad de otros péptidos o proteínas, para una variedad de propósitos. Los péptidos pueden estar enlazados a péptidos o proteínas para proporcionar funcionalidades convenientes para unión, tales como grupos amino para formación de amida o amina sustituida,
10 por ejemplo por aminación reductiva, grupos tiol para formación de tioéter o disulfuro, grupos carboxilo para formación de amida y semejantes. De interés particular son péptidos de al menos dos, usualmente 3 y no más de aproximadamente 60 grupos lisina, particularmente
15 polilisininas de aproximadamente 4 a 20, usualmente 6 a 18 de unidades lisina, referidas como sistema péptido antigénico múltiple (MAPS = multiple antigenic péptido system), en donde los péptidos presentes se unen a 1 s grupos amino lisina, generalmente cuando menos
20 aproximadamente 20%, más usualmente cuando menos aproximadamente 50%, de grupos amino disponibles para proporcionar un producto multipéptido (Butz, S y colaboradores Pept Res 7 20-23 (1994)). De esta manera, se obtienen moléculas que tienen una pluralidad

de los péptidos presentes, en donde la orientación de los péptidos presentes es en la misma dirección, en efecto se tiene un grupo de enlace para proporcionar di- u oligomerización cola a cola

5 [0053] En otro aspecto, otros péptidos y proteínas de origen natural o sintético, pueden emplearse para proporcionar un inmunogeno portador para generar anticuerpos a los péptidos presentes, en donde los anticuerpos sirven como reactivos para detectar los

10 péptidos inmunomoduladores o para identificar otros péptidos que tienen una conformación comparable Portadores convenientes para generar anticuerpos incluyen, entre otros, hemocianinas (por ejemplo, hemocianina de erizo de mar (KLH = Keyhole Limpet

15 hemocyanin), albúminas (por ejemplo, albúmina de suero bovino, ovalbúmina, albúmina de suero humano, etc), inmunoglobulinas, tiroglobulinas (por ejemplo, tiroglobulina bobina); toxinas (por ejemplo, difteria toxoide, tétanos toxoide), y polipéptidos tales como

20 polilisina, como se describió anteriormente polialanina-lisina Aunque las proteínas son portadores preferidos, otros portadores, de preferencia compuestos de alto peso molecular pueden ser empleados, incluyendo carbohidratos, polisacáridos, lipopolisacáridos, ácidos

nucleic s y semejantes con suficiente tamañ e
 inmunogenicidad Además, los anticuerpos resultantes
 pueden emplearse para preparar anticuerpos anti-
 idiotípicos que pueden competir con los presentes
 5 péptidos para ligar a un sitio objetivo Est s
 anticuerpos anti-idiotípicos, son útiles para identificar
 proteínas a las cuales se ligan los péptidos presentes

[0054] En otro aspecto, los péptidos se
 conjugan con otros péptidos o proteínas para hacer blanc
 10 al péptido inmunomodulatorio a células y tejidos
 agregar adicionales funcionalidades a los péptidos Para
 hacer blanco o ser dirigida, la proteína o péptid
 empleado para conjugación se elegirá con base en la
 célula o tejido objetivo para terapia (Lee, R y
 15 colaboradores Arthritis Rheum 46 2109-2120 (2002),
 Pasqualini, R Q J Nucl Med 43 159-62 (1999),
 Pasqualini, R Nature 380 364-366 (1996), aquí
 incorporadas por referencia) Las proteínas también
 pueden comprometer poli-amino ácidos, incluyendo, pero no
 20 limitados a poliarginina, y polilisina, ácido
 poliaspártico, etc , que pueden incorporarse en otros
 polímeros, tales como polietilen glicol, para preparación
 de vesículas o partículas que contienen los péptidos
 conjugados

[0055] En otr aspecto, l s presentes péptidos pueden expresarse en conjunto con otros péptidos o proteínas, para hacer una porción de la cadena de polipéptido, ya sea interna o en el extremo N o C, para
5 formar proteínas quiméricas o proteínas de fusión Por "polipéptido de fusión" o "proteína de fusión" o "proteína quimérica", aquí se entiende una proteína compuesta por una pluralidad de componentes de proteína, que, mientras que se unen típicamente en el estado
10 nativo, se unen por extremos carboxi y amino respectivos a través de un enlace péptido para formar un polipéptido continuo La pluralidad en este contexto significa cuando menos dos y modalidades preferidas en general utilizan 3 a 12 componentes, aunque más pueden emplearse
15 Se apreciará que los componentes de proteína pueden unirse directamente o unirse a través de un enlazador/espaciador péptido como se establece a continuación

[0056] Polipéptidos de fusion pueden elaborarse
20 de una variedad de péptidos o proteínas para exhibir l s péptidos presentes en una forma conformacionalmente restringida, para hacer blanco en células y tejidos para hacer blanco o dirigidos a compartimientos intracelulares, dar seguimiento a la proteína de fusión

en una célula un organismo, y monitorizar otras moléculas que ligan los péptidos. Proteínas útiles para generar proteínas de fusión incluyen diversas proteínas reporteras, proteínas estructurales, receptores de superficie celular, ligandos de receptor, toxinas y enzimas. Proteínas ejemplares incluyen proteínas fluorescentes (por ejemplo *Aequoria victoria* GFP, *Renilla reniformis* GFP, *Renillamuellieri* GFP, luciferasas, etc., y sus variantes), beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina, proteína de enlace *E. coli*, proteína de enlace maltosa, proteínas de revestimiento de bacteriófago filamentoso (por ejemplo, proteína de revestimiento menor, pIII, o la proteína de revestimiento mayor, pVIII, para propósitos de exhibición fago), receptor de células T, caribdotoxina, y semejantes.

[0057] Proteínas de fusión también abarcan fusiones con fragmentos de proteínas, u otros péptidos, ya sea solos o como parte de una mayor secuencia de proteínas. De esta manera, los polipéptidos de fusión pueden comprender socios de fusión. Por "Socios de fusión" aquí se entiende una secuencia que está asociada con el péptido que confiere a todos los miembros de las proteínas en esta clase una función o habilidad común. Socios de fusión pueden ser heterólogos (es decir, no

nativos a la célula huésped) o sintéticos (es decir, no
nativos a ninguna célula) Los socios de fusión
incluyen, pero no están limitados a, a) estructuras de
presentación, que proporcionan los presentes péptidos en
5 una forma estable o conformacionalmente restringida, b)
secuencias blanco u objetivo, que permiten localización
del péptido a un compartimiento subcelular o
extracelular, c) secuencia de estabilidad, que afectan
estabilidad o protegen contra degradación al péptido o el
10 ácido nucleico que lo codifica, d) secuencias
enlazadoras, que desacoplan conformacionalmente el
oligopéptido del socio de fusión, y e) cualquier
combinación de las anteriores

[0058] En un aspecto, el socio de fusión es una
15 estructura de presentación Por "estructura de
presentación" como se emplea aquí, se entiende una
secuencia que cuando se fusiona con los péptidos
presentes muestra los péptidos en una forma
conformacionalmente restringida Estructuras de
20 presentación preferidas mejoran las interacciones de
enlace con otros socios de enlace al presentar un péptido
en una superficie exterior expuesta a solvente, tal como
un bucle En general, estas estructuras de presentación
comprenden una primer porción unida al extremo N del

péptido inmunomodulador y una segunda porción unida al extremo C-terminal del presente péptido. Esto es, el péptido de la presente invención se inserta en las estructuras de presentación. De preferencia, las estructuras de presentación se eligen o diseñan para tener mínima actividad biológica cuando se expresan en las células objetivo.

[0059] De preferencia, las estructuras de presentación llevan al máximo la capacidad de acceso a los péptidos al exhibir o presentar el péptido o un bucle exterior. Estructuras de presentación convenientes incluyen pero no están limitadas a estructuras madre de bobina embobinada o enrollada una alrededor de la otra, estructuras de mini cuerpo, bucles de giro beta, secuencias de dimerización, estructuras enlazadas con cisteína, estructuras enlazadas con transglutaminasa, péptidos cíclicos, barriles helicoidales, motivos de cremallera leucina, etc.

[0060] En una modalidad, la estructura de presentación es una estructura de bobina embobinada, que permite presentación del péptido presente en un bucle exterior (ver Myszka y colaboradores, en Biochemistry 33 2362-2373 (1994)), tal como un dominio de cremallera leucina bobina embobinada (ver Martin y colaboradores

105

EMBO J 13 5303-5309 (1994)) La estructura de presentación también puede comprender estructuras de mini cuerpo, que esencialmente comprenden una región de complementareidad de anticuerpo mínimo La estructura de mini cuerpo generalmente proporciona dos regiones péptido que se presentan sobre una sola cara de una estructura terciaria en la proteína doblada (ver Bianchi y colaboradores, en J Mol Biol 236 649-659 (1994), Tramontano y colaboradores J Mol Recognit 7 9-24 (1994))

[0061] En otro aspecto, la estructura de presentación comprende dos secuencias de dimerización Las secuencias de dimerización, que pueden ser iguales o diferentes, se asocian en forma no covalente con suficiente afinidad bajo condiciones fisiológicas para restringir estructuralmente el péptido exhibido, esto es, si se utiliza una secuencia de dimerización en cada extremo del péptido presente, la estructura resultante puede exhibir el péptido presente en una forma estructuralmente limitada Una variedad de secuencias son adecuadas como secuencias de dimerización (ver por ejemplo, WO 99/51625, incorporada por referencia) Cualquier cantidad de secuencias de interacción proteína-proteína conocidas en la técnica son útiles

JDB

[0062] En un aspecto adicional, la secuencia de presentación contiene la habilidad para ligar iones metal para generar una estructura secundaria restringida conformacionalmente. De esta manera, por ejemplo se

5 utilizan secuencias de dedo de zinc, C₂H₂. La secuencia C₂H₂ tienen dos cisteínas y dos histidinas colocadas tal que es que el lado ión zinc. Los dominios de dedo zinc se conocen que ocurren independientemente en múltiples péptidos de dedo zinc para formar dominios enlazados

10 flexiblemente, estructuralmente independientes (ver Nakaseko, Y y colaboradores, en J Mol Biol 228 619-636 (1992)). Una secuencia de consenso general es (5 amino ácidos)-C-(2 a 3 amino ácidos)-C-(4 a 12 amino ácidos)-H-(3 amino ácidos)-H-(5 amino ácidos). Un

15 ejemplo preferido sería el péptido aleatorio-FQCFEC de 3 a 20 amino ácidos-HIRSHTG. Similarmente, las cajas bloques CCHC que tienen una secuencia de consenso-C-(2 amino ácido)-C-(4 a 20 péptidos aleatorios)-H-(4 amino ácidos)-C- puede emplearse, (ver Bavoso, A y

20 colaboradores, en Biochem Biophys Res Commun 242 385-389 (1998)). Otros ejemplos incluyen (1)-VKCFNC-4 a 20 amino ácidos aleatorios-HTARNCR-, con base en la proteína nucleocápsido P2, (2) una secuencia modificada de la de un péptido de enlace zinc de origen natural del

107

domini Lasp-1 LIM domain (Hammarstrom, A y colaboradores, en Biochemistry 35 12723-32 (1996)), y (3) -MNPNCARCG-4 a 20 amino ácidos aleatorios- HKACF-, con base en ensamble estructural RMN 1ZFP (Hammarstrom y colaboradores, supra)

[0063] Todavía en otro aspecto, la estructura de presentación es una secuencia que comprende dos o más residuos cisteína tal que pueda formarse un enlace disulfuro, resultando en una estructura conformacionalmente restringida. Esto es, el uso de cisteína que contiene secuencias péptido en cada extremo de los péptidos inmunomodulatorios presentes, resulta en estructuras de péptido cíclico como se describió anteriormente. Una estructura cíclica reduce la susceptibilidad del péptido presentado a proteólisis e incrementa la capacidad de acceso a sus moléculas objetivo. Como se apreciará por aquellos con destreza en la especialidad, esta modalidad particular es particularmente adecuada, cuando la secuencia de objetivo secretorios se utilizan para dirigir el péptido al espacio extracelular.

[0064] En otra modalidad, el socio de fusión es una secuencia de objetivo. Las secuencias de objetivo comprenden secuencias de enlace capaces de provocar el

108

enlace de product expresado a una molécula clase de
molécula predeterminada, mientras que retienen
bioactividad del producto de expresión, secuencias que
señalizan degradación selectiva de la proteína de fusión
5 o socios de enlace y secuencias capaces de localizar
constitutivamente péptidos a un local celular
predeterminado Ubicaciones celulares típicas incluyen
ubicaciones subcelulares (por ejemplo Golgi, retícul
endoplásmico, núcleo, nucleólos, membrana nuclear,
10 mitocondrios, vesículas secretorias, lisosomas) y
ubicaciones extracelulares por el uso de señales
secretorias

[0065] Diversas secuencias de objetivo se
conocen en la técnica El hacer objetivo o blanco en
15 núcleos se logra por el uso de señales de localización
nucleares (NLS = nuclear localization signal) NLSs en
general son dominios cargados positivamente cortos que
dirigen las proteínas en donde los NLSs se presentan al
núcleo de las células Típicas secuencias NLSs incluyen
20 los NLSs básicos sencillos de antígeno T grande SV40
(Kalderon y colaboradores, Cell 39 499-509 (1984)), señal
de localización beta-nuclear-receptor de ácido retinoic
humano (NF-kB p50 and p65 (Ghosh y colaboradores Cell
62 1019-1029 (1990))), Nolan y colaboradores Cell

109

64 961-999 (1991)), y los NLSs' doble básicos como se ejemplifica por nucleoplasmina (Dingwall y colaboradores, J Cell Biol 107 641-649 (1988))

[0066] En otro aspecto, las secuencias dirigidas
5 de blanco, son secuencias de anclado de membrana. Se dirigen péptidos a la membrana por secuencias de señal e incorporan en forma estable en la membrana a través de un dominio de transmembrana hidrofóbico (designado como TM). El segmento TM se coloca apropiadamente en una
10 proteína de fusión expresada para exhibir el péptido presente ya sea intracelularmente o extracelularmente, como se conoce en la técnica. Secuencias que anclan membrana y secuencias de señal incluyen, pero no están limitadas a aquellas derivadas de (a) proteínas de
15 membrana integrales clase I tales como cadena recta receptor IL-2,, Hatakeyama y colaboradores, Science 244 551-556 (1989)) y cadena recta receptor de insulina (Hatakeyama y colaboradores arriba), (b) proteínas de membrana integrales clase II tales como endopeptidasa
20 neutral (Malfroy y colaboradores, Biochem Biophys Res Commun 144 59-66 (1987)), y (c) proteínas tipo III tales como citócromo humano P450 NF25 (Hatakeyama y colaboradores, arriba), y aquellos de CD8, ICAM-2, IL-8R, y LFA-1

[0067] Secuencias de anclad de membrana también incluyen ancla GPI, que resulta en formación de enlace covalente entre la secuencia de ancla GPI y la bicapa lípida mediante un glicosilo-fosfatidilinositol

5 Secuencias de ancla GPI se encuentran en diversas proteínas, incluyendo Thy-1 y DAF (ver Homans y colaboradores, Nature 333 269-272 (1988)) Similarmente, secuencias de acilación permiten conexión de porciones lípidas, por ejemplo isoprenilación (es decir, farnesil

10 y geranilo-geranilo, ver Farnsworth y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 91 11963-11967 (1994) y Aronheim y colaboradores, Cell 78 949-61 (1994)), miristoilación (Stickney, J T Methods Enzymol 332 64-77 (2001)), o palmitoilación En un aspecto, el

15 presente péptido estará ligado a un grupo lípido en un extremo, para poder ligar a una membrana lípida tal como un liposoma

[0068] Otras secuencias de blanco intracelular son secuencias de blanco lisozomales (por ejemplo

20 secuencias en LAMP-1 y LAMP-2, Uthayakumar y colaboradores, Cell Mol Biol Res 41 405-420 (1995) y Konecki y colaboradores, Biochem Biophys Res Comm 205 1-5 (1994)), secuencias de localización mitocondriales (por ejemplo, secuencias de matriz

25 mitocondrial, secuencias de membrana interior

mitocondrial, secuencias de intermembrana mitocondrial, o
 secuencias de membrana exterior mitocondrial, ver Shatz,
 G Eur J Biochem 165 1-6 (1987)), secuencias de
 localización de retículo (por ejemplo, calreticulina,
 5 Pelham, H R Royal Soc London Transactions B 1-10
 (1992), proteína E3/19K adenovirus, Jackson y
 colaboradores, EMBO J 9 3153-3162 (1990)), y
 secuencias de localización de peroxisoma (por ejemplo,
 secuencia de matriz luciferasa peroxisoma, ver Keller y
 10 colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 4 3264-3268
 (1987))

[0069] En otro aspecto, las secuencias
 dirigidas comprenden una secuencia de señal secretoria
 que efectuó la secreción del péptido Una gran cantidad
 15 de secuencias secretorias se conoce que dirigen la
 secreción de un péptido en el espacio extracelular,
 cuando se colocan en el amino ácido respecto al péptido
 de interés, particularmente para secreción de un péptid
 por células, incluyendo células transplantadas Señales
 20 secretorias convenientes incluyen aquellas encontradas en
 IL-2 (Villinger y colaboradores, J Immuno 155
 3946-3954 (1995)), hormona de crecimiento (Roskam y
 colaboradores, Nucleic Acids Res 7 305-320 (1979))
 preproinsulina, y proteína HA de influenza

112

[0070] El s cio de fusión además puede comprender una secuencia de estabilidad que confiere estabilidad a la proteína de fusión o el ácido nucleico que la codifica De esta manera, por ejemplo la
5 incorporación de glicinas después de la metionina de inicio (por ejemplo, MG o MGG) puede estabilizar proteger el péptido fusionado contra degradación mediante ubiquitinación de acuerdo con la regla de extremo N de Varshavsky, de esta manera confiriendo vida media
10 incrementada en una célula

[0071] Amino ácidos adicionales pueden agregarse para etiquetar el péptido para propósitos de detección o purificación Estas secuencias pueden comprender epítopes reconocidos por anticuerpos (por
15 ejemplo, etiquetas bandera) o secuencias que unen ligandos, tales como iones de metal Diversas secuencias de etiqueta y secuencias de unión de ligando son bien conocidas en la especialidad Estas incluyen pero no están limitadas a poli-histidina (por ejemplo, etiquetas
20 6xHis que se reconocen por anticuerpos pero también ligan iones de metal divalentes), etiquetas poli-histidina-glicina (poly-his-gly), polipéptido de etiqueta catarro HA, etiqueta c-myc, péptido de etiqueta (Hopp y colaboradores, BioTechnology 6 1204-1210 (1988)),
25 péptido epítope KT3, péptido tubulina epítope (Skinner y

1/3

colaboradores, J Biol Chem 266 15163-15166 (1991)), y
etiqueta de péptido de proteína 10 de gen T7
(Lutz-Freyermuth y colaboradores, Proc Natl Acad Sci
USA 87 6363-6397 (1990))

5 [0072] Socios de fusion incluyen secuencias
enlazadoras o de correa para enlazar los péptidos y para
presentar los péptidos en una estructura no impedida
Como se discutió anteriormente, enlazadores útiles
incluyen polímeros glicina (G)_n en donde n es 1 a
10 aproximadamente 7, polímeros glicina-serina (por ejemplo,
(GS)_n, (GSGGS)_n y (GGGS)_n, en donde n es al menos 1),
polímeros glicina-alanina, polímeros alanina-serina y
otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica De
preferencia, los enlazadores son polímeros glicina
15 glicina-serina, ya que estos amino ácidos son
relativamente no estructurados, hidrofílicos y son
efectivos para unir segmentos de proteínas y péptidos

 [0073] En la presente invención, puede
emplearse combinaciones de socios de fusión Cualquier
20 cantidad de combinaciones de estructuras de presentación,
secuencias dirigidas, secuencias de rescate, secuencias
de etiqueta y secuencias de estabilidad, pueden emplearse
con o sin secuencias enlazadoras

 [0074] Los péptidos inmunomodulatorios
25 utilizados en los métodos y composiciones de la presente



invención pueden prepararse en una cantidad de formas
Síntesis químicas de péptidos son bien conocidas en la
especialidad Síntesis de fases sólida se emplea
comúnmente y están disponibles diversos aparatos
5 sintéticos comerciales, por ejemplo sintetizadores
automatizados de Applied Biosystems Inc , Foster City,
CA, Beckman, etc Métodos sintéticos de fase en solución
también pueden emplearse, aunque son menos convenientes
Al utilizar estas técnicas estándar, amino ácidos de
10 origen natural pueden ser substituidos con amino ácidos
no naturales, particularmente D-estereoisómeros, y
también con amino ácidos con cadenas laterales que tienen
diferentes longitudes o funcionalidades Grupos
funcionales para conjugar en moléculas pequeñas,
15 porciones de etiqueta, péptidos o proteínas o para
propósitos de formar péptidos ciclizados, pueden ser
introducidos en la molécula durante síntesis química
Además, pequeñas moléculas y porciones de etiqueta pueden
conectarse durante el proceso sintético De preferencia,
20 introducción de los grupos funcionales y conjugación a
otras moléculas, afectan en forma mínima la estructura y
función del péptido presente

[0075] Los extremos N y C pueden derivatizarse
utilizando métodos sintéticos químicos convencionales
25 Los péptidos inmunomodulatorios de la invención pueden

115

contener un grupo acil, tal como un grupo acetilo. Métodos para acilar, y específicamente para acetilar el grupo amino libre en el extremo N, son bien conocidos en la técnica. Para el extremo C, el grupo carboxilo puede ser modificado por esterificación con alcoholes
5 amidación para formar $-\text{CONH}_2$, CONHR , o CONR , en donde cada R es un hidroxicarbilo (1 a 6 átomos de carbono). Métodos para esterificación y amidación se realizan utilizando técnicas bien conocidas.

10 [0076] Los presentes péptidos inmunomodulatorios empleados aquí, también pueden estar presentes en la forma de una sal, en general en una forma de sal que es farmacéuticamente aceptable. Estos incluyen sales inorgánicas, de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso
15 y semejantes. Diversas sales orgánicas del péptido también pueden elaborarse incluyendo pero no limitadas a ácido acético, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido salicílico, etc.
20

 [0077] Síntesis de los péptidos inmunomodulatorios y sus derivados también puede llevarse a cabo al utilizar técnicas recombinantes. Para producción recombinante, se puede preparar una secuencia
25 de ácido nucleico que codifica un solo oligopéptido o de

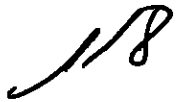
116

preferencia una pluralidad de los presentes péptidos en
tándem con un amino ácido intercalado o secuencia, que
permite escisión al péptido sencillos o dímeros cabeza a
cola Cuando está ausente metionina o triptofano puede
5 incorporarse una metionina o triptofano intermedio que
permite escisión de un solo amino ácido utilizando CNBr
BNPS- escatol (2-(2-nitrofenilsulfenil)-3-metil-3-
bromoindolenina), respectivamente En forma alterna, se
logra la escisión por uso de secuencias que se reconocen
10 por proteasas particulares para escisión enzimática
secuencias que actúan como sitios de auto escisión (por
ejemplo, secuencias 2A de aptovirus y cardiovirus,
Donnelly, M L , J Gen Virol 78 13-21 (1997),
Donnelly, M L , J Gen Virol 82 1027- 41 (2001), aquí
15 incorporados por referencia) El presente péptido
también puede hacerse parte de un péptido más grande, que
puede aislarse y el oligopéptido obtenerse por escisión
proteolítica o escisión química La secuencia particular
y la forma de preparación se determinaron por
20 conveniencia, economía, pureza requerida y semejantes
Para preparar estas composiciones, un gen que codifica un
péptido, proteína, o proteína de fusión particular, se
une a una secuencia de ADN que codifica los péptidos
inmunomoduladores de la presente invención para formar un
25 ácido nucleico de fusión, que se introduce en un vector

117

de expresión La expresión del ácido nucleico de fusión
está bajo el control de un promotor conveniente y otras
secuencias de control, como se define a continuación,
para expresión en una célula u organismo huésped
5 particular (ver Sambrook y colaboradores, Molecular
Biology A Laboratory Manual (Biología Molecular un
Manual de Laboratorio), 3rd Ed , Cold Spring Harbor
Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 2001, Ausubel y
col , Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos
10 Atuales en Biología Molecular), JohnWiley & Sons, New
York, NY, 1988, actualizado hasta 2002, aquí incorporado
por referencia)

[0078] Cuando la síntesis o suministro de los
péptidos inmunomoduladores es mediante ácidos nucleicos
15 que codifican los péptidos presentes, los ácidos
nucleicos se clonan en vectores de expresión e introducen
en células o un anfitrión u hospedero Los vectores de
expresión ya son vectores extracromosomales
autoreplicantes o vectores que integran en el cromosoma
20 hospedero por ejemplo vectores basados en retrovirus,
vectores con secuencias recombinantes específicas de
sitio o por recombinación homóloga En general, estos
vectores incluyen secuencias de control enlazadas
operativamente con los ácidos nucleicos que codifican l s
25 péptidos Por "secuencias de control" se entienden



secuencias de ácido nucleico necesarias para expresión de los presentes péptidos en un organismo hospedero particular. De esta manera, secuencias de control incluyen secuencias requeridas para transcripción y traducción de los ácidos nucleicos, incluyendo pero no limitadas a secuencias promotoras, secuencias activadoras de transcripción o mejoradoras, sitios de enlace ribosomales, secuencias de arranque y parada de transcripción, señales de poliadenilación, etc.

[0079] Una variedad de promotores son útiles para expresar los péptidos de la presente invención. Los promotores pueden ser constitutivos, inducibles, y/ o específicos de células y pueden comprender promotores naturales, promotores sintéticos, (por ejemplo promotores inducibles por tetraciclina tTA), o híbridos de diversos promotores. Se eligen promotores con base entre otros, la célula u organismo en donde las proteínas se van a expresar, el nivel de expresión deseada, y regulaciones de expresión. Promotores convenientes son promotores bacterianos (por ejemplo promotor de fago pL I, promotor tac, promotor lac lac, etc), promotores basados en levadura (por ejemplo promotor GAL4, promotor de alcohol dehidrogenasa, promotor de triptofano sintasa, promotor CUP1 inducible por cobre, etc), promotores de plantas (por ejemplo, CaMV 35S, promotor de nopalina sintasa,

119

promotor de virus de mosaico del tabaco, etc), promotores de insectos (por ejemplo, virus de polihedrosis Autografta nuclear, Aedes de DNV viral p & y p61, hsp70, etc), y promotores para expresión de células de mamífero (por ejemplo promotor de gen ubiquitina, promotor de gen ribosomal, promotor de beta-globina, promotor de timidina cinasa, promotores de proteína de choque térmico, promotores de gen ribosomal, etc), y particularmente promotores virales tales como promotor citomegalovirus (CMV), promotor de virus de simio (SV40) y promotores retrovirales

[0080] Por "enlazado operativamente" aquí se entiende que un ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otro ácido nucleico. En el presente contexto, medio enlazado operativamente significa que las secuencias de control se ubican respecto a la secuencia de ácido nucleico que codifica a los péptidos presentes de manera tal que ocurra la expresión del péptido codificado. Los vectores pueden comprender plásmidos, comprender vectores virales, por ejemplo vectores retrovirales, que son sistemas de suministro útiles, si las células son células divisoras, o vectores lentivirales o adenovirales, si las células son células no divisoras. Se prefieren en particular vectores retrovirales autoinactivantes (vectores SIN), que tienen

120

promotores virales inactivados en 3'-LTR, de esta manera
permitiendo control de expresión de genes heterólogos por
el uso de promotores no virales insertados en el vector
viral (ver por ejemplo, Hoffman y colaboradores, Proc
5 Natl Acad Sci USA 93 5185 (1996) Como se apreciará
por aquellos con destreza en la especialidad,
modificaciones en el sistema por pseudotipado permiten el
uso de vectores retrovirales para todas las células
eucarióticas, particularmente para eucariotas superiores
10 (Morgan, R A y colaboradores, J Virol 67 4712-21
(1993), Yang, Y y colaboradores, Hum Gene Ther 6
1203-13 (1995))

[0081] Además, los vectores de expresión
también contienen un gel marcador seleccionable, para
15 permitir selección de células hospederas transformadas
En general, la selección conferirá fenotipos detectables
que enriquecen las células que contienen el vector de
expresión y además permiten diferenciación entre células
que expresan y no expresan el gen de selección Genes
20 de selección son bien conocidos en la técnica y variarán
con la célula hospedera usada Genes de selección
convenientemente incluyen genes que hacen a la célula
resistente a una droga, genes que permiten crecimiento en
medio deficiente nutritionalmente y genes reporteros (por
25 ejemplo beta-galactosidasa, proteínas fluorescentes,

121

glucuronidasa, etc), todos los cuales son bien conocidos en la técnica y disponibles a la persona con destreza

[0082] Hay una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Por "introducir", aquí se entiende que el ácido nucleico entra a las células en una forma adecuada para expresión subsecuente del ácido nucleico. Técnicas para introducir los ácidos nucleicos variarán dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere *in vitro* en células cultivadas *in vivo* en las células del organismo hospedero pretendido y el tipo de organismo hospedero. Ejemplos para introducir los ácidos nucleicos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, Lipofectin^{MR}, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio y bombardeo de partículas biolístico. Técnicas para transferir *in vivo* incluyen introducción directa del ácido nucleico, uso de vectores virales, típicamente vectores retrovirales y transfección mediada por liposomas tales como transfección mediada por liposoma revestido viral. Los ácidos nucleicos que expresan los péptidos de la presente invención pueden existir en forma transitoria o estable en el citoplasma u obtenerse en forma estable en el cromosoma del hospedero (es decir a través del uso de secuencias regulatorias estándar, marcadores de

122

selección, etc) Convenientes genes de selección y genes marcadores se utilizan en los vectores de expresión de la presente invención

[0083] En algunas situaciones, es conveniente
5 incluir un agente dirigido a las células o tejidos objetivo, tal como un anticuerpo específico para una proteína de superficie celular o la célula objetivo, un ligando para un receptor en la célula objetivo, un componente lípido en la membrana celular o un
10 carbohidrato en la superficie celular Si se emplean liposomas, proteínas que ligan una proteína de superficie celular que se endocitiza pueden emplearse para dirigir y/o facilitar la absorción Estas incluyen como ejemplos no limitantes, cápsido proteínas o sus fragmentos
15 trópicos para tipos de células particulares, anticuerpos para proteínas que se someten a internalización (ver Wu y colaboradores, J Biol Chem 262 4429-4432 (1987), Wagner y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 87 3410-3414 (1990)), y proteínas que dirigen la
20 localización (por ejemplo anticuerpo al receptor de transferina para ser dirigido al cerebro) o mejorar vida media *in vivo*

[0084] Se hace expresión en un amplio rango de células hospederas que se extienden de procariotas y
25 eucariotas, incluyendo bacterias, levaduras, plantas,

123

insectos, y animales Los péptidos inmunomoduladores de la presente invención puede expresarse entre otros en *E coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, plantas de tabaco o *arabidopsis*, células de insectos
5 *Schneider*, y células de mamíferos, tales como COS, CHO, HeLa, y semejantes, ya sea intracelularmente o en una forma secretada por fusión de los péptidos a un péptido de señal apropiado La secreción de la célula hospedera puede realizarse al fusionar el ADN que codifica el
10 péptido y un ADN que codifica un péptido de señal Señales secretorias son bien conocidas en la técnica para bacterias, levaduras, insectos, plantas y sistemas de mamíferos Ácidos nucleicos que expresan los péptidos pueden insertarse en células, por ejemplo células madre
15 para expresiones de tejido o bacterias para expresión de intestino, y las células transplantadas en el hospedero para proporcionar una fuente *in vivo* de los péptidos

[0085] Si se desea, se introducen diversos grupos en el péptido durante síntesis o durante
20 expresión, lo que permite enlace a otras moléculas o a una superficie De esta manera, se pueden emplear cisteínas para hacer tioéteres o péptidos cíclicos, histidinas para enlazar a un complejo ión de metal, grupos carboxilo para formar amidas o ésteres, grupos
25 amino para formar amidas y semejantes Cuando se

124

introducen residuo s cisteína para ciclizar el péptid ,
formación de enlace disulfuro se realiza en la presencia
de agentes oxidantes suaves o ligeramente fuertes
Oxidantes químicos pueden emplearse o los péptidos que
5 contienen cisteínas se exponen a oxígeno para formar los
enlaces, típicamente en una solución conveniente tal como
un amortiguador acuoso que contiene DMSO Como se
describió anteriormente, pueden conectarse lípidos ya sea
químicamente o por el uso de secuencias de lipidación
10 apropiadas en el péptido expresado

[0086] Para conjugar diversas moléculas a l s
péptidos de la presente invención, grupos funcionales en
donde los péptidos y las otras moléculas se reaccionan en
la presencia de un agente de conjugación apropiado (por
15 ejemplo, entrelazamiento) El tipo de agente de
conjugación de entrelazamiento empleado, dependerá de
grupos funcionales tales como las aminas primarias,
sulfhidrilos, carbonilos, carbohidratos y ácidos
carboxílicos empleados Agentes pueden ser fijadores y
20 agentes de entrelazamiento que pueden ser agentes
homobifuncionales, heterobifuncionales, o trifuncionales
(Pierce Endogen, Chicago, IL) Fijadores comúnmente
empleados y agentes de entrelazamiento incluyen
formaldehído, glutaraldehído, 1,1-bis (diazacetil)-2-
25 feniletano, N-hidroxisuccinimida ésteres, disuccinimidil

125

ésteres, maleimidas (por ejemplo, bis-N-maleimido-1-8-octano), y carbodiimidas (por ejemplo, N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, diciclohexilcarbodiimida Moléculas espaciadoras que

5 comprenden cadenas alquilo o alquilo sustituido con longitudes de 2 a 20 átomos de carbono, pueden emplearse para separar conjugados De preferencia, grupos funcionales reactivos en el péptido no seleccionados para modificación se protegen antes de acoplar el péptido a

10 otros moléculas reactivas para limitar reacciones secundarias indeseables Por "grupo protector" como se emplea aquí, se encuentra una molécula ligada a un grupo funcional específico que es removible selectivamente para re-exposición del grupo funcional (ver Greene, T W and

15 Wuts, P G M Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en Síntesis Orgánica) (3rd ed), JohnWiley & Sons, Inc , New York, 1999) Los péptidos pueden sintetizarse con precursores de amino ácidos protegidos o reaccionados con grupos protectores después

20 de síntesis pero antes de reaccionar con un agente de entrelazamiento Conjugaciones también pueden ser indirectas, por ejemplo al conectar una porción biotina, que puede ser contactada con un compuesto o molécula que se acopla a estreptavidina o avidina

[0087] Para péptidos que tienen actividad reducida en la forma conjugada, el enlace entre los péptidos de compuesto conjugado, se elige para ser suficientemente lábil para resultar en escisión bajo condiciones deseadas, por ejemplo después de transporte a células o tejidos deseados. Enlaces covalentes biológicamente lábiles, por ejemplo enlaces imino y ésteres, son bien conocidos en la técnica (ver la Patente de los E U A No 5,108,921, aquí incorporada por referencia). Estas modificaciones permiten administración de los péptidos en una forma potencialmente menos activa, que luego se activa por escisión del enlace lábil.

[0088] En una forma preferida, los péptidos inmunomoduladores de la presente invención pueden purificarse o aislarse después de síntesis o expresión. Por "purificado" o "aislado" se entiende libre del ambiente en donde el péptido se sintetiza o expresa y en una forma en donde puede ser utilizado prácticamente. De esta manera purificado o aislado se entiende que el péptido o su derivado es substancialmente puro, es decir más de 90% puro, de preferencia más de 95% puro, y de preferencia más de 99% puro. Los péptidos y sus derivados pueden purificarse y aislarse por medios conocidos por aquellos con destreza en la especialidad,

122

dependiendo de tres componentes presentes en la muestra. Métodos de purificación estándar incluyen técnicas electroforéticas, inmunológicas, y cromatográficas, incluyendo intercambio de iones, hidrofóbicas, de afinidad, exclusión de tamaño, HPLC de fase inversa y cromato enfoque. Las proteínas también pueden purificarse por solubilidad selectiva, por ejemplo en la presencia de sales o solventes orgánicos. El grado de purificación necesario variará dependiendo del uso de los péptidos presentes. De esta manera en algunos casos no será necesaria purificación.

[0089] En su mayoría, las composiciones utilizadas comprenderán cuando menos 20% en peso del producto deseado, más usualmente cuando menos aproximadamente 75% en peso, de preferencia cuando menos aproximadamente 95% en peso y usualmente cuando menos aproximadamente 99.5% en peso, respecto a contaminantes relacionados al método de preparación del producto, el procedimiento de purificación y su uso pretendido, por ejemplo con un portador farmacéutico para propósitos de tratamiento terapéutico. Usualmente, los porcentajes se basarán en proteína total.

[0090] Los péptidos presentes encuentran uso para tratar toxicidad y disfunción gastrointestinal en pacientes que se someten a terapias citoablativas, por

ejempl quimi terapias y terapias de radiación Además,
estos péptidos permiten al oncólogo clínico el
administrar una cantidad tolerada máxima incrementada del
agente citoablativo, de esta manera proporcionando
5 mejoras significantes en respuesta de tumor y esperanza
de vida

Agentes Terapéuticos Adicionales

[0091] Agentes farmacéuticamente activos
terapéuticos adicionales también pueden emplearse
10 ventajosamente, en combinación con las composiciones
anteriores, incluyendo corticoesteroides (por ejemplo
prednisona, metilprednisolona, dexametasona, etc),
inmunomoduladores (por ejemplo interferona, incluyendo
interferona- β , interferona- α), inmuno supresores (por
15 ejemplo, azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina),
compuestos anti-inflamatorios, incluyendo pero no
limitados a compuestos anti inflamatorios no esteroidales
(por ejemplo, sulfasalzina, aminosalicilatos, celecoxib,
lipoxinas, etc), agentes anti-diarreicos tales como
20 loperamida, hidroxiurea, y talidomida, que se conoce
incrementan niveles de IL-2 y IL-12

[0092] Como se apreciará por aquellos con
destreza en la especialidad, en ciertas circunstancias en
donde la toxicidad y disfunción gastrointestinal se
25 complican adicionalmente por infección patógena, los

péptidos de la presente invención pueden utilizarse con drogas dirigidas contra eliminación o exterminio patógeno. Estas incluyen antibióticos, agentes antifungales, agentes anti protozoarios, agentes anti-virales, como es bien conocido en la técnica. Estas drogas pueden emplearse antes de, de manera concomitante con, o subsecuentes a tratamiento con los péptidos aquí descritos.

[0093] La presente invención también puede emplearse en combinación con citocinas anti inflamatorias, factores de crecimiento o compuestos inhibidores de migración de leucocitos. Citocinas útiles incluyen pero no están limitadas a IL-4, IL-10, IL-11, y IL-13, particularmente IL-4 y IL-10, que se conoce suprime la producción de citocinas inflamatorias y están involucradas en restaurar el sistema inmune. Factores de crecimiento incluyen factor de crecimiento de transformación-beta (TGF-beta = Transforming Growth Factors) y GM-CSF. Estas citocinas y factor de crecimiento pueden administrarse como proteínas purificadas-obtenidas en forma natural o de fuentes recombinantes- o administrarse en la forma de ácidos nucleicos que expresan estos péptidos, particularmente como proteínas de fusión. Compuestos inhibidores de migración de leucocitos, incluyen entre otros,

anticuerpos dirigidos c ntra moléculas de adhesión y sus
receptores cognado involucrados en adhesión celular,
particularmente adhesión de leucocitos a células
endoteliales, tales como E-, L-, y P-selectinas, molécula
5 de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de
adhesión celular de adresina mucosal (MAdCAM-1), y
molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), y sus
receptores connatos tales como alfa₄, beta₁ alfa₄ beta₇

[094] En otra modalidad preferida, los péptidos
10 inmunomoduladores además se combinan con otros
inhibidores de actividad de citocina pro-inflamatoria
agentes que reducen la síntesis de estas citocinas
Estos incluyen agentes que bloquean la función citocina
tales como anticuerpos a IL-5, IL-6, IL-8, IL-18, IL-23,
15 TNF-alfa, y IFN-gamma, y anticuerpos a sus receptores
connato y antagonistas de receptores citosina (ver por
ejemplo Patente de los E U A No 6,436,927) Además,
agentes de bloqueo incluyen proteínas de receptores
solubles, por ejemplo receptores fusionados a dominios
20 IgC, que ligan a citocinas para reducir la activación de
células TCD4⁺ macrófagos y granulocitos involucrados en
el avance de reacción inflamatoria

Formulaciones Farmacéuticas

[095] Las presentes composiciones, ya sea
25 solas o en combinación, pueden emplearse in vitro, ex

131

vivo, e in vivo dependiendo de la aplicación particular
De acuerdo con esto, la presente invención permite
administrar una composición farmacéutica que comprende un
portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad
5 farmacológicamente efectiva de uno o más de los presentes
péptidos o sus sales convenientes La composición
farmacéutica puede formularse como polvos, gránulos,
soluciones, suspensiones, aerosoles, sólidos, píldoras,
tabletas, cápsulas, geles, cremas tópicas, supositorios,
10 parches transdérmicos, etc

[096] Como se indicó anteriormente sales
farmacéuticamente aceptables de los péptidos se pretende
que incluyan cualesquiera sales farmacéuticamente
aceptables reconocidas en la especialidad, incluyendo
15 bases y/o ácidos orgánicos e inorgánicos Ejemplos de
sales incluyen de sodio, potasio, litio, amonio, calci ,
así como aminas primarias, secundarias y terciarias,
ésteres de hidrocarburos inferiores, tales como metil ,
etilo y propilo Otras sales incluyen ácidos orgánicos,
20 tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido
pirúvico, ácido maleico, ácido succínico, ácido
tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico ,
ácido salicílico, etc

[097] Como se emplea aquí, "Portador
25 farmacéuticamente aceptable" comprende cualesquiera de

los portadores farmacéticamente aceptables estándar conocidos por aquellos con destreza en la especialidad para formular composiciones farmacéuticas. De esta manera, los presentes péptidos por sí mismos, tales como presentes como sales farmacéticamente aceptables o como 5 conjugados, o vehículos de ácido nucleico que codifican estos péptidos, pueden prepararse como formulaciones en diluyentes farmacéticamente aceptables, por ejemplo salino, salino amortiguado con fosfato (PBS = phosphate 10 buffer saline), etanol acuoso o soluciones de glucosa, manitol, dextrano, propilen glicol, aceites (por ejemplo, aceites vegetales, aceites animales, aceites sintéticos, etc), celulosa microcristalina, carboximetil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, esterato de magnesio, 15 fosfato de calcio, gelatina, polisorbato 80 o semejantes o como formulaciones sólidas en excipientes apropiados. Las composiciones farmacéuticas también contienen agentes anti-retrovirales cuando estos agentes son parte de las composiciones. Adicionalmente, las formulaciones pueden 20 incluir agentes bacterianos, estabilizantes, amortiguadores, emulsificantes, conservadores, agentes endulzantes, lubricantes o semejantes. Si la administración es por ruta oral, los oligopéptidos pueden ser protegidos contra degradación al utilizar un 25 revestimiento entérico conveniente o por otros medios.

protect res convenientes, por ejemplo internación en una matriz polimérica tal como micro partículas o hidrogeles sensibles a pH

[098] Formulaciones convenientes pueden encontrarse en, entre otros, Remington's Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas de Remington), 17^{ava} Edición, Mack Publishing Co , Philadelphia, PA, 1985 y Handbook of Pharmaceutical Excipients (Manual de Excipientes Farmacéuticos), 3a Edición, Kibbe, A H ed , Washington DC, American Pharmaceutical Association (Asociación Farmacéutica Americana), 2000, aquí incorporadas por referencia totalmente Las composiciones farmacéuticas aquí descritas pueden elaborarse en una forma bien conocida por aquellos con destreza en la especialidad (por ejemplo por medios convencionales en la especialidad, incluyendo procesos de mezclado, disolución, granulación, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento liofilización)

[099] Adicionalmente, los péptidos ya sea solos o con otros agentes incluyendo agentes quimioterapéuticos, también pueden incluirse encapsularse en el lumen de liposomas para suministro y para extender la vida útil de las formulaciones de péptido ex vivo o in vivo Como se conoce en la

134

especialidad, los liposomas pueden ser categorizados en varios tipos vesículas multilaminares (MLV = multilamellar), plurilaminares estables (SPLV = Stable plurilamellar), unilaminares pequeñas (SUV = small unilamellar) o unilaminares grandes (LUV = large unilamellar). Liposomas pueden prepararse a partir de diversos compuestos lípidos que pueden ser sintéticos de origen natural, incluyendo fosfatidil éteres y ésteres, tales como fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidil etanolamina, fosfatidilinositol, dimiristoilfosfatidilcolina, esteroides tales como colesterol, cerebrósidos, espingomielina, glicerolípidos, y otros lípidos (ver por ejemplo la Patente de los E U A No 5,833,948)

[0100] Lípidos catiónicos son también adecuados para formar liposomas. En general, los lípidos cationicos tienen una carga positiva neta y tienen una porción lipofílica tal como un esteroide o una cadena lateral acilo o diacilo. De preferencia, el grupo de cabeza está cargado positivamente. Lípidos catiónicos típicos incluyen 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamino)propano, bromuro de N-[1-2,3-ditetradecilo]propil]-N,N-dimetil-N,N-hidroxietilamonio, bromuro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio,

135

cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propyl]-N,N,N-trimetilamonio, 3-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoyl]colesterol, y dimetildioctadecilamonio

[0101] De interés particular son liposomas fusogénicos, que se caracterizan por su capacidad por fusionarse con una membrana celular ante cambio apropiado en condición fisiológica o por la presencia de un componente fusogénico, particularmente una proteína o péptido fusogénico. En un aspecto, los liposomas fusogénicos son sensibles a pH y temperatura ya que la fusión con una membrana celular se afecta por cambio a temperatura y/o pH (ver por ejemplo, las Patentes de los E U A Nos 4,789,633 y 4,873,089). En general liposomas sensibles a pH son sensibles a ácido. De esta manera, se mejora la fusión en ambientes fisiológicos en donde el pH es ligeramente ácido, por ejemplo el ambiente de un lisosoma, endosoma y tejido inflamatorio. Esta propiedad permite liberación directa de los contenidos de liposomas en el ambiente intracelular después de endocitosis de los liposomas (ver Mizoue, T Int J Pharm 237 129-137 (2002)).

[0102] Otra forma de liposomas fusogénicos comprende liposomas que contienen un agente mejorador de fusión. Esto es, cuando se incorpora en el liposoma o

conecta a l s lípidos, l s agentes mej ran la fusión del liposoma con otras membranas celulares, de esta manera resultando en suministro de los contenidos de liposoma en las células Los agentes pueden ser proteínas o péptidos

5 que mejoran la fusión, incluyendo hemaglutinina HA2 o virus de influenza (Schoen, P , Gene Ther 6 823-832 (1999)), glicoproteínas de envolverte de virus sendai (Mizuguchi, H Biochem Biophys Res Commun 218 402-407 (1996)), glicoproteínas de envolverte de virus de

10 estomatitis vesicular (VSV-G = vesicular stomatitis virus envelope glycoproteins) (Abe, A y colaboradores, J Virol 72 6159-63 (1998)), segmentos de péptido o mímicos de proteínas que mejoran la fusión, y péptidos que mejoran la fusión sintética (Kono, K y

15 colaboradores, Biochim Biophys Acta 1164 81-90 (1993), Pechaur, E I Biochemistry (Bioquímica) 37 23561-71 (1998), Patente de los E U A No 6,372,720)

[103] Liposomas también incluyen vesículas derivatizadas con un polímero hidrofílico, como se

20 dispone en las Patentes de los E U A No 5,013,556 y 5,395,619, aquí incorporadas por referencia (ver también Kono, K y colaboradores, J Controlled Release 68 225-35 (2000), Zalipsky, S y colaboradores Bioconj Chem 6 705-708 (1995) para extender o ampliar la vida útil en

137

circulación in vivo Polímeros hidrofílicos para
revestir o derivación de los liposomas incluyen
polietilen glicol, polivinil pirrolidona, polivinilmetil
éter, poliaspartamida, hidroximetil celulosa, hidroxietil
5 celulosa, y semejantes Además como se describió
anteriormente, el conectar proteínas que ligan a una
proteína de superficie celular que es endocitosada por
ejemplo cápsido proteínas o sus fragmentos trópicos para
tipos de células particulares y anticuerpos para
10 proteínas de superficie celular que se someten a
internaclización (ver Wu y colaboradores, arriba, Wagner
y colaboradores, arriba), pueden emplearse para dirigir
y/o facilitar la absorción de los liposomas a las células
o tejidos específicos

15 [0104] Los liposomas se preparan por medi s
bien conocidos en la especialidad (ver por ejemplo,
Szoka, F y colaboradores, Ann Rev Biophys Bioeng
9 467-508 (1980)) Un método típico es la técnica de
hidratación de película de lípidos en donde componentes
20 lípidos se mezclan en un solvente orgánico seguido por
evaporación de solvente para generar una película lípida
La hidratación de la película es solución amortiguadora
acuosa, de preferencia que contiene el presente péptido
ácido nucleico, resulta en una emulsión, que se sonica

extruye para reducir el tamaño y polidispersidad Otros métodos incluyen evaporación de fase inversa (ver Pidgeon, C y colaboradores, Biochemistry 26 17-29 (1987), Duzgunes, N y colaboradores, Biochim Biophys Acta 732 289-99(1983)), congelamiento y descongelado de mezclas de fosfolípidos e infusión de éter

[0105] En otra modalidad preferida, los portadores están en la forma de micropartículas, microcápsulas, o microesferas y nano partículas, que pueden ser biodegradables o no biodegradables (ver por ejemplo, Microencapsulates Methods and Industrial Applications (microencapsulados Métodos y Aplicaciones Industriales), Drugs and Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas y Drogas), Vol 73, Benita, S ed, Marcel Dekker Inc , New York, 1996, incorporada por referencia) Como se emplea aquí, micropartículas, microesferas, microcápsulas y nanopartículas significan una partícula, que típicamente es un sólido que contiene la sustancia a suministrar La sustancia está dentro del núcleo de la partícula o conectada a la red de polímero de las partículas En general, la diferencia entre micropartículas (o microcápsulas o microesferas) y nanopartículas es de tamaño Como se emplea aquí, las micropartículas que tienen un rango de tamaño de

partículas de aproximadamente 1 a aproximadamente mayor a mil micras Nanopartículas tienen un rango de tamaño de partículas de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 nm

5 [0106] Una variedad de materiales son útiles para producir micropartículas Microcápsulas y micropartículas no biodegradables incluyen pero no se limitan a aquellas elaboradas de polisulfonas, poli (acrilonitrilo-co-cloruro de vinilo), copolímeros de
10 etilen-vinil acetato, hidroxietil metacrilato-metil-metacrilato Estos son útiles para propósitos de implante en donde el péptido encapsulado se difunde de las cápsulas En otro aspecto, las microcápsulas y micropartículas se basan en polímeros biodegradables, de
15 preferencia aquellos que exhiben baja toxicidad y son bien tolerados por el sistema inmune Estos incluyen microcápsulas y micropartículas basadas en proteínas elaboradas a partir fibrina, caseína, albúmina de suero, colágeno, gelatina, lecitina, quitosana, alginato o
20 poli-amino ácidos tales como poli-lisina Polímeros sintéticos biodegradables para encapsular pueden comprender polímeros tales como polilactida (PLA), poliglicólido (PGA), poli (lactida-co-glicólido) (PLGA), poli (caprolactona), polidioxanona trimetileno carbonato,

140

polihidroxiálconatos (por ejemplo, poli(beta-hidroxi-butirato)), poli(gamma-etil glutamato), poli (DTH iminocarbonil (bisfenol A iminocarbonato), poli (ort éster), y policianoacrilato. Diversos métodos para producir micropartículas que contienen las presentes composiciones son bien conocidos en la especialidad, incluyendo un proceso de remoción con solvente (ver por ejemplo la Patente de los E U A No 4,389,330), métodos de emulsificación y evaporación (Maysinger, D y colaboradores, Exp Neuro 141 47-56 (1996), Jeffrey, H y colaboradores, Pharm Res 10 362-68 (1993)), métodos de secado por rocío y extrusión

[0107] Otro tipo de portador son nanopartículas, que en general son adecuadas para administraciones intravenosas. Sub-micras y nanopartículas en general se elaboran a partir de copolímeros anfifílicos dibloque, tribloque, o multibloques como se conoce en la especialidad. Son útiles polímeros para formar nanopartículas que incluyen, pero no están limitados a, poli(ácido láctico) (PLA, ver Zambaux y colaboradores, J Control Release 60 179-188 (1999)), poli (lactida-co-glicólida), mezclas de poli (lactido-co-glicólida) y policaprolactona, polímero dibloque poli(1-leucina-bloque-1-glutamato), dibloque y

tribloque poli (ácido láctico) (PLA) y poli (etilen
 óxido) (PEO) (ver De Jaeghere, F y colaboradores, Pharm
 Dev Technol ; 5 473-83 (2000)), acrilatos, arilamidas,
 poliestireno, y semejantes Como se describe para
 5 micropartículas, las nanopartículas pueden ser no
 biodegradables o biodegradables Nanopartíoculas
 también pueden elaborarse a partir poli
 (alquilcianoacrilato), por ejemplo poli
 (butilcianoacrilato), en donde el péptido se absorbe en
 10 las nanopartículas y reviste con surfactantes (por
 ejemplo polisorbato 80) Métodos para producir
 nanopartículas son similares a aquellos para producir
 micropartículas e incluyen entre otros, técnicas de
 polimerización en emulsión en fase acuosa continua,
 15 emulsificación-evaporación, desplazamiento con solvente y
 emulsificación-difusión (ver Kreuter, J Nano-particle
 Preparation and Applications, In Microcapsules and
 nanoparticles in medicine and pharmacy," (Preparación y
 aplicaciones de nanopartículas, en microcápsulas y
 20 nanopartículas en medicina y farmacia) (M Donbrow, ed),
 pg 125-148, CRC Press, Boca Rotan, FL, 1991, incorporado
 por referencia)

[0108] Hidrogeles también son útiles para
 suministrar los agentes presentes en un hospedero

112

anfitrión En general, los hidrogeles son redes de polímero hidrofílico entrelazadas permeables a una amplia variedad de compuestos de droga, incluyendo péptidos. Los hidrogeles tienen la ventaja de activar en forma selectiva el hinchado de polímero, que resulta en liberación controlada de los componentes de drogas atrapados. Dependiendo de la composición de la red de polímero, puede activarse el hinchado y subsecuente liberación por una variedad de estímulos, incluyendo actividad de pH, concentración iónica, térmica, eléctrica, ultrasonido y enzimática. Ejemplos no limitantes de polímeros útiles en composiciones de hidrogel incluyen entre otros, aquellos formados de polímeros de poli(lactida-co-glicólido), poli(N-isopropilacrilamida), ácido poli (metacrílico acid-g-poli(etilén glicol)), ácido poliacrílico y poli (oxipropilén-co-oxietilén) glicol, y compuestos naturales tales como sulfato de condroitina, quitosana, gelatina, o mezclas de polímeros sintéticos y naturales, por ejemplo quitosana-poli (etilén óxido). Los polímeros se entrelazan en forma reversible o irreversible para formar geles incrustados con los oligopéptidos de la presente invención (ver por ejemplo, las Patentes de los E U A Nos 6,451,346, 6,410,645, 6,432,440, 6,395,299,

143

6,361,797, 6,333,194, 6,297,337 de Johnson, O y colaboradores, Nature Med 2 795 (1996), incorporadas por referencia completamente

[0109] En una modalidad preferida, los
5 polímeros de gel son polímeros de ácido acrílico, de preferencia carbómeros (por ejemplo, carboxipolimetileno), tal como Carbopol (por ejemplo, Carbopol 420-430, 475, 488, 493, 910, 934P, 974P, y semejantes, Brock y colaboradores, Pharmacotherapy
10 (Farmacoterapia) 14 430-437 (1994)), que son polímeros no lineales de ácido acrílico entrelazado con polialquilen poliéter. Otros tipos de carbómeros incluyen ácidos acrílicos entrelazados con compuestos polifuncionales tales como polialil sacarosa. Además de la ventaja de
15 hidratar e hinchar en un gel, que atrapa los compuestos presentes y limita su liberación, geles de carbómero son mucoadhesivos. Los polímeros se adhieren a la membrana mucosal intestinal, de esta manera resultando en suministro local de los péptidos (Hutton y colaboradores
20 Clin Sci 78 265-271 (1990), Pullan y colaboradores, Gut 34 676-679 (1993), aquí incorporado por referencia). Además, estos polímeros tienen la ventaja agregada de limitar la actividad de proteasa intestinal.

24

[0110] Las concentraciones de los péptidos o ácido nucleico que los codifica y los agentes anti-retrovirales serán determinadas empíricamente de acuerdo con procedimientos convencionales para el propósito particular. En general, para administrar los péptidos ex vivo o in vivo para propósitos terapéuticos, las presentes formulaciones se suministran en una dosis farmacológicamente efectiva. Por "cantidad farmacológicamente efectiva" o "dosis farmacológicamente efectiva" se entiende una cantidad suficiente para producir el efecto fisiológico deseado o cantidad capaz de lograr el resultado deseado, particularmente para tratar el desorden o condición de enfermedad, incluyendo reducir o eliminar uno o más síntomas del desorden enfermedad, en este caso las toxicidades gastrointestinales y disfunciones aquí establecidas.

[0111] La cantidad administrada al hospedero variará dependiendo de lo que se administra, el propósito de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del hospedero, la forma de administración, el número de administraciones, intervalo entre administraciones y semejantes. Estos pueden determinarse empíricamente por aquellos con destreza en la especialidad y puede ajustarse por la proporción de

JTS

respuesta terapéutica Fact res a considerar en
determinar una dosis apropiada incluyen pero no están
limitados a tamaño y peso del sujeto, edad y sexo del
sujeto, la severidad del síntoma, la etapa de la
5 enfermedad, un método del suministro del agente, vida
media de los agentes y eficacia de los agentes La etapa
de la enfermedad a considerar incluye si la enfermedad es
aguda o crónica, en fase de relapso o remisión y el
avance de la enfermedad El determinar las dosis y
10 tiempos de administración para una cantidad
terapéuticamente efectiva está bien dentro de la
habilidad de la persona con destreza ordinaria en la
especialidad En el contexto de la presente invención,
las toxicidades gastrointestinales asociadas con
15 terapias citoablativas, a menudo se presentan en una
forma regular y recurrente después de administración de
cada ronda de terapias citoablativas, y de esta manera la
administración profiláctica de los presentes péptidos
también es posible en vista de la naturaleza
20 pronosticable de las toxicidades asociadas

[0112] Para cualesquiera compuestos empleados
en la presente invención, la dosis terapéuticamente
efectiva y la dosis máxima tolerada se determinan
fácilmente por métodos bien conocidos en la especialidad

116

P r ejempl , una dosis efectiva inicial puede estimarse inicialmente de ensayos de cultivo celular. Un indicador de respuesta inflamatoria puede emplearse, tal como niveles de expresion de citocinas preinflamatorias, o inhibición de actividad CTL. De estos, la LC_{50} (es decir la dosis letal para aproximadamente 50% de las células en el cultivo celular) y la IC_{50} (es decir la dosis inhibitoria) pueden determinarse por los ensayos en el cultivo celular. Una dosis luego puede formularse en modelos de animales para generar una concentración de trituración o concentración de tejido y la dosis tolerada máxima determinada como se ilustra en los ejemplos que aquí se disponen.

[0113] Como ha notado, la toxicidad y eficacia terapéutica en general se determinan por ensayos de control celular y/o animales experimentales, típicamente al determinar una LD_{50} (dosis letal al 50% de la población de prueba) y ED_{50} (efectividad terapéutica en 50% de la población de prueba). La proporción de dosis de toxicidad y efectividad terapéutica es del índice terapéutico. Se prefieren composiciones, individualmente o en combinación, que exhiben altos índices terapéuticos. La determinación de la cantidad efectiva está bien dentro de la destreza de aquellos en la especialidad,

182

particularmente dada la descripción detallada aquí
dispuesta La persona con destreza en la especialidad
sabe como calcular las cantidades de dosis para un
sujeto, particularmente un mamífero y más
5 particularmente un humano, con base en cantidades de
dosis determinadas en otros modelos de animales
Factores de conversión específicos para cantidades de
dosis de un animal a otro (por ejemplo de ratón a humano)
son bien conocidos en la especialidad y se describen
10 completamente por ejemplo en el sitio de la red de la
Food and Drug Administration (administración de aliment s
y drhogas) en web site at
www fda gov/cder/cancer/animalframe htm (en la sección de
herramientas de oncología), la descripción aquí se
15 incorpora por referencia

[0114] En general, en el caso en donde las
formulaciones se administran, directamente a un
hospedero, la presente invención proporciona un bolo o
infusión de la presente composición que será administrado
20 en el rango de aproximadamente 0.1 a 50, más usualmente
aproximadamente 1 a 25 mg/kg de peso corporal del
hospedero La cantidad en general se ajustará
dependiendo de la vida media del péptido y agente anti-
retroviral, en donde la vida media en general será al

✓8

menos un minut , más usualmente cuando menos
aproximadamente 10 minutos, convenientemente en el rang
de aproximadamente 10 minutos a 12 horas Son aceptables
vidas medias cortas siempre que la eficacia que pueda
5 lograrse con dosis individuales, infusion continua
dosis repetitivas Formulaciones para administración
pueden presentarse en formas de dosis unitarias, por
ejemplo en ampolletas, cápsulas, píldoras o recipientes
de múltiples dosis o inyectables

10 [0115] Dosis en la porción inferior del rango e
incluso a menores dosis pueden emplearse, en donde el
péptido tiene una vida media mejorada o se proporciona
como un depósito tal como una composición para liberación
lenta, que comprende partículas, una matriz de polímero
15 que mantiene el péptido sobre un periodo prolongado de
tiempo (por ejemplo una matriz de colágeno, carbómero,
etc) uso de una bomba que hace infusion continua del
péptido sobre un periodo prolongado de tiempo con una
velocidad substancialmente continua o semejante El
20 hospedero o sujeto puede ser cualquier mamífero que
incluye animales domésticos, mascotas, animales de
laboratorio, primates, particularmente sujetos humanos

[0116] Además de administrar las composiciones
de péptido presentes directamente a un cultivo celular in

JX9

vitro, a células particulares ex vivo, a un hospedero mamífero in vivo, moléculas de ácido nucleico (AND o ARN) que codifican los presentes péptidos también pueden administrarseles, de esta manera proporcionando una

5 fuente efectiva de los presentes péptidos para la aplicación deseada. Como se describió anteriormente, moléculas de ácido nucleico que codifican los presentes péptidos, pueden ser clonadas en cualquiera de una cantidad de plásmidos de expresión bien conocidos

10 (Sambrook y colaboradores, arriba) y/o vectores virales, de preferencia vectores adenovirales o retrovirales (ver por ejemplo, Jacobs y colaboradores, J Virol 66 2086-2095 (1992), Lowenstein, Bio/Technology (Bio/tecnología) 12 1075-1079 (1994) y Berkner,

15 Biotechniques (Biotécnicas) 6 616-624 (1988)), bajo la regulación de transcripción de secuencias de control que funcionan para promover la expresión del ácido nucleico en el ambiente apropiado. Estos vehículos basados en ácido nucleico pueden ser administrados directamente a

20 las células objetivo de tejido ex vivo (por ejemplo infección viral ex vivo para transplantes de células que producen el péptido) o a un sitio in vivo, por ejemplo por inyección, catéter, oralmente (por ejemplo, hidrogeles), y semejantes o en el caso de vectores de

JJO

base viral, por administración sistémica Promotores
específicos de tejido pueden ser empleados opcionalmente,
asegurando que el péptido de interés se expresa solo en
un tejido particular o tipo de célula selecto Métodos
5 para preparar en forma recombinante estos vehículos
basados en ácido nucleico son bien conocidos en la
especialidad, al igual que técnicas para administrar
vehículos basados en ácido nucleico para producción de
péptido

10 [0117] Para los propósitos de esta invención,
Los métodos de administración se eligen dependiendo de la
condición a tratar, la forma de las presentes
composiciones y la composición farmacéutica La
administración de los presentes péptidos puede realizarse
15 en una variedad de formas, incluyendo pero no limitada a
cutánea, subcutánea, intravenosa, oral, tóxica,
transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, nasal y
rectal (por ejemplo administración colónica) Por
ejemplo, formulaciones de micropartículas, microesferas y
20 microencapsulados son útiles para administraciones
orales, intramusculares o subcutáneas Liposomas y nano
partículas son adicionalmente convenientes para
administraciones intravenosas Administración de las
composiciones farmacéuticas puede ser a través de una sola

151

ruta concurrentemente por varias rutas Por ejemplo ,
administración oral puede acompañarse por administración
rectal o tópica al área afectada En forma alterna, la
administración oral se emplea en conjunto con inyecciones
5 intravenosas o parenterales

[0118] En una modalidad preferida, el método de
administración es por suministro oral en la forma de un
polvo, tableta, píldora o cápsula Formulaciones
farmacéuticas para administración oral pueden elaborarse
10 al combinar uno o más péptidos y agente anti-retroviral
con excipientes convenientes, tales como azúcares (por
ejemplo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol), celulosa
(por ejemplo, almidón, metil celulosa, hidroximetil
celulosa, carboximetil celulosa, etc), gelatina,
15 glicina, sacarina, carbonato de magnesio, carbonato de
calcio, polímeros tales como polietilen glicol
polivinilpirrolidona, y semejantes Las píldoras,
tabletas o cápsulas pueden tener un revestimiento
entérico, que permanece intacto en el estómago pero que
20 se disuelve en el intestino Diversos revestimientos
entéricos se conocen en la especialidad, una cantidad de
los cuales está comercialmente disponibles, incluyendo
pero no limitados a copolímeros de ácido metacrílico-
éster de ácido metacrílico, polímero de celulosa éter,

152

celulosa acetato, ftalato, polivinil acetato, ftalato, hidroxipropil metil celulosa ftalato, y semejantes. En forma alterna, formulaciones orales de los péptidos se preparan en un diluyente conveniente. Diluyentes convenientes incluyen diversas formas líquidas (por ejemplo jarabes, fangos, suspensiones, etc.) en diluyentes acuosos tales como agua, salino, salino amortiguado con fosfato, etanol acuoso, soluciones de azúcares (por ejemplo sacarosa, manitol, o sorbitol), glicerol, suspensiones acuosas de gelatina, metil celulosa, hidroximetil celulosa, ciclodextrinas, y semejantes. Como se emplea aquí, soluciones de diluyentes o acuosas también incluyen formula infantil, dado que también pueden requerirse terapias citoablativas en infantes y niños. En algunas modalidades, se emplean solventes lipofílicos, incluyendo aceites, por ejemplo aceites vegetales, aceite de cacahuete, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de azafrán, aceite de soya, etc.), ésteres de ácidos grasos tales como oleatos, triglicéridos, etc., derivados de colesterol, incluyendo oleato de colesterol, linoleato de colesterol, miristilato de colesterol, etc., liposomas y semejantes.

153

[0119] En otra modalidad preferida, la administración se hace en forma rectal. Esto puede emplear formulaciones adecuadas para aplicación tópica en la forma de ungüentos, tinturas, cremas o para aplicación en el lumen del intestino por el uso de composiciones en la forma de supositorios, enemas, espumas, etc. Los supositorios pueden contener bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao, carboceras, polietilen glicoles, o glicéridos, que son sólidos semisólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal.

[0120] Todavía en otra modalidad preferida, la administración se lleva a cabo en forma cutánea, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa. Como se discutió anteriormente, está en la forma de péptidos disueltos o suspendidos en medio acuoso conveniente como se discutió anteriormente. Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas para inyección pueden prepararse en solventes lipofílicos, que incluyen pero no están limitados a aceites, tales como aceites vegetales, aceite de oliva, aceite de cacahuate, aceite de palma, aceite de soya, aceite de azafrán, etc., ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como etiloleato, o triglicéridos, derivados de colesterol,

54

incluyendo c lesterol oleat , c lesterol linoleat ,
colesterol miristilato, etc , o liposomas, como se
describió anteriormente Las composiciones pueden ser
preparadas directamente em el solvente lipofílico o de
5 preferencia como emulsiones de aceite/agua (ver por
ejemplo, Liu, F y colaboradores, Pharm Res
12 1060-1064 (1995), Prankerd, R J J Parent Sci Tech
44 139-49 (1990); Patente de los E U A No 5,651,991)

[0121] Los sistemas de suministro también
10 incluyen métodos de suministro de liberación sostenida
de largo plazo, que son bien conocidos por aquellos con
destreza en la especialidad Por "liberación sostenida"
o "liberación de largo plazo" como se emplea aquí, se
entiende que el sistema de suministro administra una
15 cantidad farmacéuticamente efectiva de los presentes
compuestos por más de un día, de preferencia más de una
semana y en particular al menos aproximadamente 30 días a
60 días o más Sistemas de liberación a largo plaz
pueden comprender sólidos o geles implantables que
20 contienen el presente péptido tales como polímeros
biodegradables descritos anteriormente, bombas,
incluyendo bombas peristálticas, y bombas de propulsores
de fluorocarburo, bombas osmóticas y mini-osmóticas, y
semejantes Bombas peristálticas suministran una

NJS

cantidad determinada de droga, con cada activación de la bomba, el depósito puede ser rellenado, de preferencia en forma percutánea a través de una compuerta. Un controlador establece la dosis y también puede proporcionar una lectura en la dosis suministrada, dosis restante y frecuencia de suministro. Bombas de propulsor de fluorocarburo utilizan un líquido de fluorocarburo para operar la bomba. El líquido fluorocarburo ejerce una presión de vapor sobre la presión atmosférica y comprime una cámara que contiene la droga para liberarla. Las bombas osmóticas (y bombas mini osmóticas) utilizan la presión osmótica para liberar la droga a velocidad constante. La droga está contenida en un diafragma impermeable, que está circundado por el agente osmótico. Una membrana semi-permeable contiene el agente osmótico, y toda la bomba se aloja en una cubierta. La difusión de agua a través de la membrana semi-impermeable comprime el diafragma que sostiene la droga, fuerza la droga a la corriente sanguínea, órgano o tejido. Estos y otros de estos implantes son particularmente útiles para tratar una condición de enfermedad inflamatoria, especialmente aquellos que manifiestan episodios recurrentes o que son progresivos en naturaleza, al suministrar los oligopéptidos de la invención mediante dosis sistémicas.

156

(por ejemplo intravenosas o subcutáneas) y calizadas en una forma sostenida de largo plazo

[0122] La presente invención también abarca las combinaciones terapéuticas aquí descritas en la forma de un equipo o formulación empacada. Una formulación empacada o equipo como se emplea aquí incluye una o más dosis de un péptido inmuno modulador, y sus sales, y opcionalmente al menos un agente terapéutico adicional para terapia en combinación tal como un agente anti-inflamatorio o anti-diarreico, en un recipiente que contiene las dosis en conjunto con instrucciones para administración simultánea o secuencial a un paciente. Por ejemplo, el paquete puede contener los péptidos junto con un portador farmacéutico combinado en la forma de un polvo para mezclar en una solución acuosa, que puede ser ingerido por el sujeto afectado. Otro ejemplo de droga empacada es una jeringa de presión pre-cargada, de manera tal que las composiciones puedan suministrarse en forma colónica. El paquete o equipo incluye instrucciones apropiadas, que abarcan diagramas, grabaciones (por ejemplo audio, video, disco compacto), y programas de computadora que proporcionan instrucciones para uso de la terapia de combinación.

J+

[0123] Las descripciones anteriores de modalidades específicas de la presente invención se han presentado para propósitos de ilustración y descripción. No se pretenden exhaustivas o que limiten la invención a las formas precisas descritas, y evidentemente son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de la enseñanza anterior.

[0124] Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación, aquí se incorporan por referencia en la misma proporción como si cada publicación o solicitud de patente individual se indicara en forma específica e individual incorporada por referencia.

EXPERIMENTAL

[0125] Como se describe en las solicitudes de Patente de los E U A Nos 08/838,916 y 09/028,083 y en la literatura relevante, incluyendo Grassy y colaboradores, se definieron parámetros con base en oligopéptidos conocidos que previamente se encontró tienen propiedades para inhibir actividades en células T (ver por ejemplo Buelow y colaboradores, arriba). El espacio de conformación necesario para actividad inmunosupresiva se calculó de acuerdo con el procedimiento descrito por Yasri y colaboradores, arriba.

158

Utilizando estos parámetros (ver la Tabla I), que definen compuestos que tienen actividad inhibitoria de células T conocida, se diseñaron y probaron nuevos péptidos citomoduladores, y se encontró que tienen actividad igual o que sobrepasan compuestos activos conocidos. El programa de computadora empleado para pronosticar y diseñar la actividad inmuno supresora de péptidos y pseudo péptidos, se desarrolló como sigue

1 Metodología

[0126] En base a un juego de datos experimental inicial hecho de péptidos que muestran o no muestran actividad inmuno supresora, se deduce

i Una secuencia consenso que contiene 1 s amino ácidos requeridos para la actividad y que permite el desarrollo de nuevas bibliotecas de péptidos o pseudo-péptidos,

ii Un conjunto de propiedades físico químicas y topológicas involucradas en la actividad y convertidas en conjunto de restricciones por la técnica de trazo de mapa o mapeo variable (Grassy y colaboradores, J of Molecular Graphics 13 356-367 (1995))

2 Trazo de Mapa Variable

159

[0127] El método se basa en restricciones físico-químicas y de conformación como se deduce de los resultados de un juego de entrenamiento de datos

Restricciones Físico químicas

5 [0128] El método requiere la determinación de restricción físico-químicas definidas como rangos de propiedades para la actividad biológica El método computacional empleado para la determinación del juego de restricciones se denomina Trazo de Mapa Variable y se describe a continuación

10

El Enfoque de Trazo de Mapa Variable

[0129] Esta técnica cualitativa consiste de una evaluación de la distribución (global o en por ciento) de las moléculas activas e inactivas como una función de los valores de los parámetros determinados La superposición de todas las gráficas (actividad-propiedad) exhibe, para ciertos parámetros, a los valores limitantes (bajo y superior) que sean necesarios para llevar a un compuesto activo Este método gráfico da un diagnóstico de las dependencias no lineales cualitativas entre la actividad y una propiedad molecular Respecto a aquellas propiedades involucradas en interacciones de receptor ligando, se ha establecido claramente que la existencia de contingencias estrictas que determinan la

15

20

160

adaptabilidad al receptor, implica una incrustación de ciertas propiedades estructurales y físico-químicas

Este método resulta en reglas simples que pueden emplearse para pronosticar la actividad de productos

5 desconocidos Una representación gráfica que muestra el número de éxitos respecto al número de violaciones de las reglas nos permite comparar las distribuciones con las actividades para el juego completo de moléculas en estudio

10 3 Parámetros físico-químicos y topológicos empleados en la definición de las restricciones involucradas en la actividad inmunosupresora de péptidos y pseudopéptidos

Lipofilicidad

15 [0130] La lipofilicidad de péptidos expresada como logP (en donde P es el coeficiente de partición y un péptido nombrado entre agua y n-octanol) Valores logP moleculares pueden calcularse por TSAR 2 31 utilizando los valores logP incrementales atómicos determinados por
20 Ghose y colaboradores, J Chem Inf Comput 29 163 (1989) Como se demostró por el análisis del juego de datos inicial, la lipofilicidad de un péptido inmunosupresor debe ser ≥ -6.85

Índices Topológicos

161

[0131] Índice Balaban (Balaban, Chem Phys 89
399 (1982))

El índice Balaban calculado para una gráfica
molecular conectada (H suprimida) se calcula como sigue

$$5 \quad \frac{M}{\mu + 1} E(D_i D_j)^{0.5}$$

en donde M es el número de bordes en la gráfica, μ (μ)
es el número ciclomático de la gráfica, es decir el
número mínimo de bordes que deben ser retirados antes de
10 que G se vuelva acíclica, y $D_i = ED_{ij}$ (con $j=1$) es una
matriz de distancia de la ruta más corta entre los dos
vértices

[0132] Volumen Molecular

El volumen molecular se calcula considerando
15 radios de Van der Waals estándar para cada elemento
Este cálculo se efectúa en la conformación extendida del
péptido

[0133] Volumen Elipsoidal

Este volumen se calcula después de
20 determinación de los tres componentes del momento de
inercia de la molécula, considerando masas atómicas
promedio para átomos constituyentes El cálculo se
realiza en la conformación extendida del péptido

[0134] Refractividad Molecular

162

La refractividad molecular se calcula utilizando los valores de refractividad molar atómica determinada por Ghose y colaboradores, arriba

[0135] Momento Dipol

5 Este parámetro se calcula en la conformación extendida de los péptidos El momento dipolo total para una molécula se expresa en unidades Debye

$$\mu = e \sum r_i q_i$$

10 en donde r_i es la distancia de un átomo al origen, q_i es la carga del átomo i Las cargas en los átomos se calculan utilizando el método de Carga-2 (Abraham y Smith, J Comput Aided Mol Design 3 175-187 (1989))

[0136] Kier Chir V4

15 Este índice es aquel de los índices de conectividad desarrollados por L B Kier El Kier Chir V4 se calcula en varias etapas (H incluido)

a Determinación y numeración de todas las rutas de longitud 4 en la gráfica molecular del péptido

20 b Cálculo de cada ruta de longitud 4 de las siguientes cantidades

$$c_j^v = A[(M_j^v)]^{-0.5}$$

para $j = 1, 4$, en donde $*_j = Z_i - h_j$ se define para un átomo como la diferencia entre el número total de

electrones de valencia Z_i y el número h_i de átomos de hidrógeno ligados al átomo i

c Suma de todos estos valores referentes a todo el juego de subgráficas de longitud 4 en la gráfica

5
$$X = B (c_s^v)$$

[0137] Kier Kappa Alfa

Kier Kappa alfa 1 (K-alfa¹)

Si A es el número total de átomos de la molécula (H incluido, Kalfa¹ es igual a

10
$$\frac{(A+\alpha)(A+\alpha-1)^2}{(P_1+\alpha)^2}$$

con

$$\alpha_1 = \frac{r_1}{r_{Csp}^3} - 1$$

15 r_1 es el radio covalente del átomo i y r_{Csp} es el radi covalente de un carbono sp^3 , P_1 es el número total de rutas de longitud=1 sobre la gráfica molecular del péptido en estudio

Kier Kappa alfa 2 (Kalfa²)

20 Si A es el número total de átomos de la molécula (H incluido), Kalfa² es igual a

$$\frac{(A+\alpha)(A+\alpha-1)^2}{(P_1+\alpha)^2}$$

con

164

$$\alpha_i = \frac{r_i}{r_{Csp^3}} - 1$$

r_i es el radio covalente del átomo i y r_{Csp^3} el radi
 5 covalente de un carbono sp^3 , P_2 es el número total de
 rutas de longitud=2 sobre la gráfica molecular del
 péptido bajo estudio

[0138] F1 de Flexibilidad

Con base en las formulas anteriores, la
 10 flexibilidad de la molécula puede definirse como

$$\Phi = (K\alpha^1) (K\alpha^2) / A$$

en donde A es el número total de átomos (H incluido)

Conteo de átomos y grupos

El número de los siguientes tipos de átomos
 15 también se empleó como una restricción

- Número total de átomos de oxígeno del péptido
- Número total de átomos de nitrógeno del

péptido

El número de los siguientes grupos también se
 20 emplea como una restricción

- Número total de grupos etilo
- Número total de grupos hidroxilo

4 Valores de las restricciones

Generación de bibliotecas péptido o pseudopéptido

165

[0140] Partiendo de las secuencias de consenso Arg-X-X-X-Arg-X-X-X-X-Tyr en donde X es un amino ácid que es como se definió anteriormente y en la fórmula análoga previa, los parámetros fisicoquímicos y topológicos previamente descritos se calculan y si estos parámetros estuvieran dentro de las restricciones definidas por el juego de entrenamient inicial Por ejemplo, partiendo de X=Leu, nLeu, Trp, Tyr, Gly o Val, una biblioteca de 279,936 moléculas se genera y solo 26 de ellas satisfacen las restricciones requeridas

[0141] Los rangos de propiedades necesarias para obtener una actividad biológica se resumen en la siguiente Tabla 1

15

Tabla 1

Rangos de valores de parámetros físico-químicos y estructurales

Propiedad	Mínimo	Máximo
LogP	-6 849	-0 004
Volumen Elipsoidal (Δ^3)	5785 5	29460 00
Volumen Molecular (Δ^3)	660 9	1050 4
Refractividad Molecular	221 30	359 3

166

Propiedad	Mínimo	Máximo
Kier Chi V4	3 325	5 342
Kappa alfa ₂	26 120	44 31
Flexibilidad	22 50	40 3
Índice Balaban	2 846	6 701
Dipolo total	3 423	80 79
Número de átomos de oxígeno	10	15
Número de átomos de nitrógeno	8	20
Número de grupos etilo	0	1
Número de grupos hidroxilo	1	3

5 Caracterización del espacio conformacional involucrado en la actividad inmunosupresiva de péptidos y pseudopéptidos

5 Vector de autocorrelación espacial de una estructura 3D

[0142] El concepto de descripción de autocorrelación de una estructura molecular primero se introdujo por Broto y colaboradores, Eur J Med Chem 19 66-70 (1984) Este vector básicamente representa la distribución de distancia discretizada, que se deriva de la matriz de distancia interatómica de una molécula El

167

primer componente de este vector (A_0) es igual al número de átomos o estructuras, los otros componentes $A_1 \dots A_n$ se definen por el número de pares de átomos que se separan por una distancia entre el rango definido por el límite inferior $(n-1)D_1$, en donde n es el orden de la caja o tolva del vector y D_1 es el incremento en distancia. Similarmente, es posible calcular la distribución de una propiedad atómica P . En este caso, el componente de autocorrelación ponderado AP_n se obtiene por la suma de los productos de los valores de propiedad P en los átomos i, j que tienen una interdistancia que pertenece al intervalo de distancia $[(n-1)D_1, nD_1]$. El número de componentes del vector luego se define por $n_{\max} = (D_{\max}/D_1) + 1$, en donde $D_{\max}$ es la distancia interatómica mayor en la estructura.

El vector de autocorrelación exhibe algunas características útiles

- X Este vector alcanza una reducción substancial de datos de conformación. Una conformación completa se describe por un conjunto limitado de n valores numéricos.
- X El vector es muy fácil de calcular en base a los datos de coordenados 3D. Por lo tanto, es posible calcular y almacenar este vector.

168

5 durante estímulos de dinámica molecular, la
reducción del tamaño del almacenamiento
involucrado en este proceso, en comparación
con el almacenamiento clásico es un conjunto
de matrices de distancia completas, permite
estímulos más prolongadas que el usual

10 X El vector de autocorrelación de una
conformación es invariante transicional y
rotacionalmente y también es independiente
de la numeración atómica de la molécula

15 X Este vector es sensible tanto a cambios
menores como mayores en conformación entre
más se cambie la conformación, se modifican
más los componentes del vector La
sensibilidad depende del incremento en
distancia selecto para cálculos, pero un
incremento para $0.5 \text{ \AA}$ o $1 \text{ \AA}$ (pequeñas
moléculas) a $5 \text{ \AA}$ (macromoléculas) es una
buena selección para las simulaciones
20 usuales (Yasri y colaboradores, Protein
Engineering (Ingeniería de Proteínas)
11 959-976 (1996))

[0143] Es posible analizar solo una parte de
una estructura o solo un subconjunto específico de átomos

169

de esta estructura, por ejemplo C_α en proteínas, N átomos, átomos pesados, etc El vector se define totalmente por el conocimiento de una estructura, de manera tal que la comparación de estructuras diferentes
 5 puede realizarse utilizando este vector sin ninguna referencia

Análisis de dinámica molecular utilizando vectores de autocorrelación 3-D

[0144] Aplicado al péptido HLA-B2702 75-84 (la
 10 secuencia de amino ácidos Arg-Glu-Asn-Leu-Arg-Ile-Ala-Leu-Arg-Tyr) y de los diversos péptidos derivados activos e inactivos de los mismos, se realizaron simulaciones de dinámica molecular utilizando AMBER 4.1 La simulación de un nanosegundo de
 15 dinámica genera un conjunto de 10^3 conformaciones (una conformación por picosegundo) Por cada conformación el vector de autocorrelación 3D se calcula utilizando TSAR con un incremento en distancia de 1Å y solo un juego de conformaciones se almacenó como vectores de
 20 autocorrelación 3D contra matriz de tiempo ($10^3 \times n$)

[0145] El objetivo de trabajo fue definir el espacio de conformación responsable para actividad inmunosupresora, por comparación de los espacios de conformación de péptidos activos e inactivos utilizando

170

la metodología explicada en las referencias citadas en la
Literatura Relevante

6 Análisis Estadístico

Análisis de Conglomerados

5 [0146] A fin de comparar diferentes
conformaciones, fue determinada la matriz de distancia
entre todas estas conformaciones en el hiperespacio
definido por los componentes de sus vectores de
autocorrelación 3D no ponderados Entre más sea análoga
10 la estructura de los dos compuestos, más corta será su
distancia Este método proporciona una cuantificación
del ajuste molecular rígido Utilizando la conformación
estándar como referencia, el valor numérico de esta
distancia es análogo a una desviación raíz cuadrada
15 media

Análisis de Componente Principal (PCA = Principal component analysis)

 [0147] PCA es un método estadístico
multidimensional para análisis de datos, adecuado para
20 representar moléculas en el hiperespacio de sus
propiedades (descriptores moleculares) PCA puede
utilizarse para reducir una gran cantidad de descriptores
a un número más pequeño de variables ortogonales
sintéticas emitidas de una combinación lineal de

121

descriptores riginales Este método retiene la parte más grande de la información inicial total Las variables originales se normalizaron y la diagonalización de la matriz de covariancia se calcula utilizando la rutina de transformación de Jacobi clásica Los componentes del vector de autocorrelograma 3K proporcionan una buena descripción de la estructura 3K de diferentes conformaciones, pero son problemáticos para manejar debido a que contienen demasiados datos para obtener una visualización fácil PCA puede reducir la dimensionalidad de los datos y una representación 2D o 3D que contiene la mayor información original posible Utilizando PCA, los péptidos inmunosupresores exhiben un espacio de conformación común bien definido Todos los péptidos capaces de alcanzar estas especificaciones de conformación pueden exhibir una actividad inmunosupresora

Coordenadas de espacio de conformación de péptido bcl nL conformación bioactiva

[0148] La Figura 1 muestra el espacio de conformación bi-dimensional y conformación relacionada del péptido bcl nL (RDP58), en donde el péptido bcl nL tiene una secuencia de amino ácidos Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr y en donde "nL" es

172

norleucina (ver a c ntinuación) Las estructuras trazadas se obtuvieron al aplicar el método de análisis de conglomerado en toda la trayectoria del péptido bc 1nL

5 Conformaciones principales del péptido bc 1nL

[0149] Propiedades estructurales de las conformaciones visitadas principales de bc 1nL (Figura 1, (1), (2), (3), (4) y (5)) y su espacio de conformación se resumen en la Tabla II Estas propiedades se refieren a las coordenadas en el espacio tri-dimensional definidas por los tres primeros componentes principales (coordenadas PCA), y el radio de giro (Rg)

15 **Tabla 2**
Coordenadas espaciales (coordenadas PCA) y radio de giro (Rg) de conformación dinámica de péptido bc 1nL

Conformacio- nes	Coordenadas PCA			Rg
	PC1	PC2	PC3	
(1)	0 785	-2 816	-0 531	9 92
(2)	0 382	-0 899	-0 164	7 99
(3)	-0 811	0 345	-0 481	6 93
(4)	0 741	0 950	-1 092	6 76
(5)	-2 096	-0 296	0 770	6 67

Espacio de conformación de péptidos activos

[0150] La trayectoria del péptido D2 (secuencia de amino ácidos Arg-Val-Asn-Leu-Arg-Ile-Ala-Leu-Arg-Tyr) se ha descrito por el método de autocorrelación 3-D y los datos analizados por análisis de componentes principales. Esto proporciona un plan principal definido por los 2 primeros componentes principales que contienen todas las conformaciones visitadas durante la trayectoria. La trayectoria de péptido 2D se emplea como una referencia de trayectoria y todas las trayectorias calculadas se proyectaron en su plan principal (Figura 2)

[0151] Los péptidos inmunosupresores exhibieron un espacio de conformación común bien definido que caracteriza los siguientes puntos

Dimensiones PCA

PC1 Mínimo = -2.0, Máximo = 2.0

PC2 Mínimo = -2.0, Máximo = 1.0

PC3 Mínimo = -1.0, Máximo = 1.0

[0152] Los siguientes péptidos, definidos como péptidos bc, fueron diseñados

174

Tabla 3

bc#										
1	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
2	Arg	Val	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
3	Arg	Ile	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
4	Arg	Leu	Val	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
5	Arg	Leu	Ile	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
6	Arg	Leu	Leu	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
7	Arg	Leu	Leu	Ile	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
8	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Tyr
9	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Ile	Leu	Leu	Gly	Tyr
10	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr
11	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Tyr
12	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Val	Gly	Tyr
13	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Ile	Gly	Tyr
14	Arg	Trp	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
15	Arg	Leu	Trp	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
16	Arg	Leu	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
17	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Trp	Leu	Leu	Gly	Tyr
18	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Trp	Leu	Gly	Tyr
19	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Trp	Gly	Tyr
20	Arg	Tyr	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr

21	Arg	Leu	Tyr	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
22	Arg	Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Tyr
23	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Gly	Tyr
24	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Tyr	Leu	Gly	Tyr
25	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Tyr	Gly	Tyr
1nL	Arg	nL	nL	nL	Arg	nL	nL	nL	Gly	Tyr

nL = norleucina

EJEMPLO 2

Tratamiento RDP58 Reduce Toxicidad Gastrointestinal

Inducida por CPT-11

5 [0153] En pacientes de cáncer que reciben
 terapia CPT-11, el desarrollo de diarrea limita la
 administración de quimioterapia efectiva máxima Este
 estudio evaluó RDP58 como un agente protector potencial
 para atenuar toxicidad gastrointestinal inducida por
 10 CPT-11 y subsecuente mortalidad en un modelo de tumor
 murino En un estudio para hallar dosis, ratones que no
 contienen tumor normales fueron inyectados
 intraperitonealmente con 200 mg/kg de CPT-11 una vez al
 día por tres días consecutivos y concurrentemente se les
 15 dieron 0, 2 5, 5 0 o 10 mg/kg de RDP58 oralmente Como
 se ilustra en la Figura 3 y a continuación en la Tabla 4,
 RDP58 mostró un incremento dependiente de dosis en

176

supervivencia doce días después de la primer inyección de
CPT-11

Tabla 4

CPT-11 (mg/kg/día)	RDP58 (mg/kg/- dosis)	Pérdida máxima de peso	Toxicidad de (%) Diarrea	Mortalidad
200	Ninguno	29 4 _± 4 3	97 (29/30) ^b	73 (22/30)
200	2 5	27 8 _± 3 7	67 (10/15) ^b	60 (9/15)
200	5	25 6 _± 4 4 ^a	40 (12/30) ^b	23 (7/30)
200	10	24 6 _± 1 9 ^a	33 (5/15) ^b	7 (1/15)

5

a p<0 05, ANOVAb p=0 001, prueba de tendencia
Cochran-Armitage

[0154] Solo uno de quince ratones murió del
tratamiento CPT-11 comparado con 22 a 30 ratones en el
grupo de control Un decremento dependiente de dosis al
aparecer diarrea, también se observó en ratones que
reciben RDP58 Adicionalmente, a los ratones que se les
administró 5 0 y 10 0 mg/kg de RDP58 mostraron una
reducción en la pérdida de peso corporal total máximo en
comparación con ratones no tratados RDP58

10

15

EJEMPLO 3

177

**Tratamiento con RDP58 Reduce la Toxicidad
Gastrointestinal Inducida por 5-FU**

[0155] Un segundo estudio se realiza para determinar si RDP58 también limita la diarrea inducida por 5-FU. Normalmente, ratones que no contienen tumor fueron tratados con 100 mg/kg de 5-FU diariamente por dos días consecutivos y concurrentemente se les dió 10 mg/kg RDP58 oralmente o solo agua. Como se ilustra en la Figura 4 y en la Tabla 5 a continuación, doce días después de administración de 5-FU, animales tratados con RDP58 tuvieron la proporción de supervivencia de 90% en comparación con 10% para animales no tratados. Todos los diez animales en el grupo de control tuvieron diarrea en comparación con solo tres de diez animales tratados con RDP58. Adicionalmente, una reducción significativa en pérdida de peso corporal total se observa en el grupo que recibe RDP58.

Tabla 5

CPT-11 (mg/kg/día)	RDP58 (mg/kg/ dosis)	Pérdida de peso máximo	Toxicidad (%) Diarrea	Mortalidad
100	Ninguno	34 7 _± 4 6	100 (10/10)	90 (9/10)
100	10	13 9 _± 3 8b	30 (3/10)	10 (1/10)

128

[0156] b p < 0.05, ANOV

EJEMPLO 4

**RDP58 Reduce el Tratamiento Relacionado a Mortalidad y
5 Toxicidad Gastrointestinal Sin Disminuir la Eficacia de
CPT-11**

[0157] Para determinar si RDP58 alteró la
eficacia de terapia de CPT-11, ratones que tienen tumores
CT-26 fueron tratados con los tres regímenes de CPT-11 a
10 100 mg/kg de qdx3 y que les dio 50 mg/kg de RDP58
oralmente. Ambos grupos mostraron una reducción similar
en peso de tumor (Figura 5, decremento de 55% en tratado
con RDP58 y 61% en sin tratar RDP58). Sin embargo, la
supervivencia fue incrementada significativamente en
15 grupos a los que se les dió RDP58 (Figura 6). No se
observaron muertes relacionadas con tratamiento en el
grupo RDP58 en comparación con 40% de mortalidad en el
grupo de control.

EJEMPLO 5

**20 Tratamiento con RDP58 Incrementa la Dosis Máxima de
CPT-11**

[0158] Para determinar si el tratamiento con
RDP58 oral concurrente puede incrementar la dosis máxima
de CPT-11 sin un incremento concomitante en mortalidad,

129

rat nes que no contienen tumor normales, fueron
inyectados con qdx3 con 0, 100, 200, 300, o 400 mg/kg de
CPT-11 inyectado i p qdx3 en los días 0, 1 y 2 Se
administró oralmente RDP58 a 10 mg/kg en el agua a partir
5 del día 3 Se supervisaron ratones para pérdida de peso
corporal, incidencia de diarrea y mortalidad hasta el fin
del estudio el Día 12 La LD50 en el grupo CPT-11 fue de
aproximadamente 450 mg/kg/de dosis total Como se
ilustra en la Figura 7, la administración de RDP58
10 incrementa la LD₅₀ en aproximadamente 725 mg/kg/dosis
total, o por un factor de aproximadamente 1.6x

EJEMPLO 6

**Tratamiento con RDP58 Permite una Dosis Máxima
Incrementada de CPT-11 Con Menor Mortalidad y Respuesta a
15 Tumor Mejorada**

[0159] Para determinar si una reducción en
toxicidad GI y mortalidad con tratamiento de RDP58
permite un incremento en dosificación de CPT-11,
comparamos la mortalidad de tratamiento y respuesta de
20 tumor en ratones que tienen tumor tratados con dosis
máxima tolerada (MTD = maximum tolerated dose) de
Irinotecan(CPT-11), 2 X MTD CPT-11, o 2 X MTD más 10 mg/ml
RDP58 Con su programa de tratamiento, encontramos que
MTD es 600mg/kg de CPT-11 (66.7mg/kg/inyección x 9

inyecciones durante 12 días t tal) No murieron animales en este grupo de tratamiento de CPT-11, y los volúmenes de tumor disminuyeron en aproximadamente 40% en comparación con controles sin tratar (Figura 9)

5 Animales tratados con 1200 mg/kg de CPT-11 o 1200 mg/kg de CPT-11 + 10 mg/ml de RDP58 mostraron un decremento en más de 80% en volumen de tumor Sin embargo, solo 50% (6/12) de los animales en el grupo 2 X MTD de CPT-11 sobrevivieron el régimen de tratamiento completo mientras
10 que el grupo CPT-11 + RDP58 tuvo supervivencia de 83% (10/12), como se ilustra en la Figura 8 Aunque los datos de mortalidad no son estadísticamente significantes al nivel de confianza 95% ($p=0.067$, prueba de largo rango), estos datos soportan fuertemente la conclusión de
15 que al incrementar en escala la dosis de RDP58 permitirá un incremento en MTD y de esta manera mejorar la respuesta anticáncer

EJEMPLO 7

Tratamiento de RDP58 Reduce Proctitis Inducida por

20 Terapia de Radiación

[0160] Estos estudios evalúan administración de péptido RDP58 para evitar o reducir dolor gastrointestinal asociado con terapia de radiación El estudio 1 encuentra la dosis óptima y el programa de

181

radiación al emplear en estudios de eficacia subsecuente
El estudio 2 estima los efectos protectores de RDP58 en
animales que no contienen tumor dado un incremento en
escala en dosis de radiación El estudio 3 estima si un
5 incremento en dosis de radiación para efectuar mejor
respuesta a tumor, puede suministrarse sin un incremento
concomitante en toxicidad Estos estudios determinan si
la administración RDP58 oral evita o reduce tratamiento
asociado con toxicidad gastrointestinal y permite una
10 dosificación incrementada para mayor respuesta de tumor
en tratamiento, por ejemplo para cánceres colo-rectales,
de próstata y ováricos metastásicos

[0161] Estudio 1- Optimización de dosis de
radiación A ratones normalmente sanos se les
15 proporcionan dosis de incremento en escala de radiación
para determinar la dosis de radiación que resulta en
diarrea en 90% de los animales de control Se supervisan
los animales diariamente para pérdida de peso corporal,
diarrea y morbilidad Animales que pierden > 25% de pes
20 corporal o que muestran signos de severa tensión se
sacrifican humanitariamente La dosis y programa óptimos
que resultan en aproximadamente 90% de los animales
tratados que tienen diarrea se eligen para los siguientes

182

estudios En forma alterna, análisis histológico del intestino puede emplearse para determinar daño al tejido

[0162] Estudio 2 - Evaluación de actividad de RDP58 en animales que no contienen tumor normales, dadas
5 dosis de radiación incrementadas en escala El estudio inicial utiliza 10 mg/kg de RDP58 suministrados diariamente Esta dosis se ha mostrado que reduce la mortalidad asociada con tratamiento de Irinotecan (CPT-11) y 5-Fluorouracil (5-FU) y diarrea en ratones e
10 incrementa LD50 de CPT-11 de aproximadamente 465 mg/kg a 720 mg/kg de dosis total Se supervisan ratones para pérdida de peso corporal, incidencia de diarrea y morbilidad Si la protección se demuestra a la dosis de radiación de partida, un estudio en la escala de dosis de
15 radiación se realizará para determinar si 10 mg/kg de RDP58 permiten una exposición a radiación incrementada mientras que evita o reduce la toxicidad GI y la mortalidad Análisis histológico de epitelio intestinal también se realiza del control selecto y animales
20 tratados con RDP58 para confirmar observaciones clínicas

[0163] Estudio 3 - Escala en dosis de radiación en animales que tienen tumor Un modelo de tumor sinegénico de tumor de ascitos se utiliza Ratones C57 BL/6 se inyectan intraperitonealmente (i p) con timoma

184

limitar la diarrea-la toxicidad limitant de dosis mayor
y de esta manera mejorar la supervivencia a largo plazo

[0165] Todas las publicaciones y solicitudes de
patente mencionadas en esta especificación aquí se
5 incorporan por referencia en cierta proporción como si
cada publicación o solicitud de patente individual fuera
especificada e indicada individualmente como incorporada
por referencia Con la invención ahora descrita
completamente, para una persona con destreza ordinaria en
10 la especialidad será aparente que pueden realizarse
muchos cambios y modificaciones a la misma sin apartarse
del espíritu o alcance de las reivindicaciones anexas



REIVINDICACIONES

1 Método para reducir las toxicidades
gastrointestinal inducidas por terapia citoablativa,
caracterizado porque comprende administrar a un paciente
5 que se somete a terapia citoablativa, una cantidad
farmacéuticamente efectiva de un péptido inmunomodulador,
en donde el péptido inmunomodulador comprende un
oligopéptido que comprende la secuencia de amino ácidos

B-X-X-X-B-X-X-X-J-Tyr

10 en donde B es Lys o Arg, X es un amino ácido alifático o
aromático, J es Gly, Lys o Arg, en donde los amino ácidos
son los L-isómeros, los D-isómeros y norleucina de origen
natural

2 Método de conformidad con la reivindicación
15 1, caracterizado porque para el oligopéptido, B es Arg, X
es un amino ácido no polar alifático de 5 a 6 átomos de
carbono incluyendo norleucina, amino ácido aromático o su
D-isómero, habiendo al menos 3 del mismo amino ácido no
polar alifático en el oligopéptido, y J es Gly o Arg

20 3 Método de conformidad con la reivindicación
2, caracterizado porque para el oligopéptido al menos 5
amino ácidos definidos por X son valina, leucina
norleucina y cualquier amino ácido restante definido por
X es Trp o Tyr

186

4 Método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque para el oligopéptido, al menos 5 amino ácidos definidos por X son iguales

5 5 Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el oligopéptido se elige del grupo que consiste de

- (a) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- (b) Arg-Val-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- (c) Arg-Ile-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- 10 (d) Arg-Leu-Val-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- (e) Arg-Leu-Ile-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- (f) Arg-Leu-Leu-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- (g) Arg-Leu-Leu-Ile-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- (h) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Val-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- 15 (i) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Ile-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- (j) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Val-Leu-Gly-Tyr
- (k) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Ile-Leu-Gly-Tyr,
- (l) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Val-Gly-Tyr,
- (m) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Ile-Gly-Tyr,
- 20 (n) Arg-Trp-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- (o) Arg-Leu-Trp-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- (p) Arg-Leu-Leu-Trp-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- (q) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Trp-Leu-Leu-Gly-Tyr,
- (r) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Trp-Leu-Gly-Tyr,

187

- (s) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Trp-Gly-Tyr,
 (t) Arg-Tyr-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
 (u) Arg-Leu-Tyr-Leu-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
 (v) Arg-Leu-Leu-Tyr-Arg-Leu-Leu-Leu-Gly-Tyr,
 5 (w) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Gly-Tyr,
 (x) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Tyr-Leu-Gly-Tyr,
 (y) Arg-Leu-Leu-Leu-Arg-Leu-Leu-Tyr-Gly-Tyr, y
 (z) Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr

6 Método de conformidad con la reivindicación
 10 1, caracterizado porque el método además comprende
 administrar cuando menos un agente terapéutico adicional
 seleccionado del grupo que consiste de agentes
 anti-diarreicos, agentes anti-inflamatorios y
 analgésicos

15 7 Método de conformidad con la reivindicación
 6, caracterizado porque el agente terapéutico adicional
 como mínimo es un agente anti-diarreico

8 Método de conformidad con la reivindicación
 6, caracterizado porque el péptido inmunomodulador y el
 20 agente terapéutico adicional se administran simultánea
 secuencialmente

9 Una preparación farmacéutica para reducir
 toxicidad gastrointestinal inducida por terapia
 citoablativa, caracterizada porque comprende a) un

/88

ligopéptido que comprende una secuencia Arg-nL-nL-nL-Arg-nL-nL-nL-Gly-Tyr en donde nL es norleucina y todos los amino ácidos son D-estereoisómeros, y b) al menos un agente terapéutico adicional seleccionado del grupo que consiste de agentes anti-diarreicos, agentes anti-inflamatorios y analgésicos

10 Una preparación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque el agente terapéutico adicional como mínimo es un agente anti-diarreico

11 Método para mejorar la terapia de cáncer citoablativa, caracterizado porque comprende la administración de una dosis tolerada máxima incrementada de un agente citoablativa en combinación con una cantidad farmacéuticamente efectiva de un péptido inmunomodulador, en donde el péptido inmunomodulador comprende un oligopéptido que comprende la secuencia de amino ácidos

B-X-X-X-B-X-X-X-J-Tyr

20 en donde B es Lys o Arg, X es un amino ácido alifático o aromático, J es Gly, Lys o Arg, en donde los amino ácidos son los L-isómeros, sus D-isómeros y norleucina, de origen natural

/ 89

12 Método de conformidad con la
reivindicación 11, caracterizado porque para el
oligopéptido B es Arg, X es un amino ácido no polar
alifático de 5 a 6 átomos de carbono incluyend
5 norleucina, amino ácido aromático o su D-isómero,
habiendo al menos 3 del mismo amino ácido no polar
alifático en el oligopéptido, y J es Gly o Arg

13 Método de conformidad con la reivindicación
10, caracterizado porque la dosis tolerada máxima del
10 agente citotóxico se incrementa por al menos 1.5x en
comparación con la dosis máxima tolerada del agente
citotóxico en la ausencia del péptido inmunomodulador

14 Método de conformidad con la
reivindicación 10, caracterizado porque la dosis máxima
15 tolerada del agente citotóxico se incrementa por al
menos 2x en comparación con la dosis máxima tolerada del
agente citotóxico en la ausencia del péptido
inmunomodulador

15 Método de conformidad con la
20 reivindicación 10, caracterizado porque para el
oligopéptido al menos 5 amino ácidos definidos por X son
valina, leucina o norleucina y cualquier amino ácido
restante definido por X es Trp o Tyr

190

16 Método de conformidad con la
reivindicación 10, caracterizado porque para el
oligopéptido al menos 5 amino ácidos definidos por X son
los mismos

5 17 Método de conformidad con la
reivindicación 10, caracterizado porque para el péptido
inmunomodulador y el agente citotóxico se administran
simultánea o secuencialmente

10 18 Método de conformidad con la
reivindicación 17, caracterizado porque para el péptido
inmunomodulador se administra antes de la administración
del agente citotóxico

191

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas y a métodos para aliviar y reducir la toxicidad gastrointestinal y disfunción inducidas por terapia citoablativa, en donde los péptidos
5 inmunomoduladores se emplean ya sea solos o en combinación con agentes terapéuticos adicionales. También se proporcionan mejoras a terapia de cáncer citoablativa, en donde la administración de los péptidos
10 presentes en conjunto con la terapia citoablativa permite la administración de dosis toleradas máximas incrementadas de el o los agentes citoablativos para eficacia y respuesta de tumor mejoradas.

192

NIT : 800176089-2

SEPLKUNUSIKIR Y CURENCIU
Radicator 84894999 00000000 Folio 19
Fecha (MM) 2004-09-23 17:25:13
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTI
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 74,333
FECHA : SEPTIEMBRE 20 DE 2004

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	32758683	20/09/2004	22,533,000 00

C O N C E P T O

CANT	DETALLE	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	422 000 00
		TOTAL :	\$ 422,000

SOM CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

06 14505-841-001-3

50 193

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

USUARIO

RADICADOR

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.
- Descripción de la invención
- Dibujos de ser estos pertinentes.
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.

()

()

()

()

()

()

()

()

()

()

COMPLETA

()

INCOMPLETA ()

()

DISEÑO INDUSTRIAL

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño
- Comprobante de pago de las tasas establecidas

()

()

()

()

()

()

()

()

()

()

()

()

COMPLETA

()

INCOMPLETA

()

()

ESQUEMA DE TRAZADO

()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- Representación gráfica del esquema de trazado
- Comprobante de pago de las tasas establecidas

()

()

()

()

()

()

()

()

()

()

COMPLETA

()

INCOMPLETA

()

()

Firma Responsable



Fecha

1 Método para reducir las toxicidades gastrointestinal inducidas por terapia citoablativa caracterizado porque comprende administrar a un paciente que se somete a terapia citoablativa una cantidad farmacéuticamente efectiva de un péptido inmunomodulador en donde el péptido inmunomodulador comprende un oligopéptido que comprende la secuencia de amino ácidos

B-X-X-X-B-X-X-X J-Tyr

en donde B es Lys o Arg X es un amino ácido alifático o aromático J es Gly Lys o Arg en donde los amino ácidos son los L-isómeros los D isómeros y norleucina de origen natural

2 Método de conformidad con la reivindicación 1 caracterizado porque para el oligopéptido B es Arg X es un amino ácido no polar alifático de 5 a 6 átomos de carbono incluyendo norleucina amino ácido aromático o su D isómero habiendo al menos 3 del mismo amino ácido no polar alifático en el oligopéptido y J es Gly o Arg

3 Método de conformidad con la reivindicación 2 caracterizado porque para el oligopéptido al menos 5 amino ácidos definidos por X son valina leucina o norleucina y cualquier amino ácido restante definido por X es Trp o Tyr

PATENTE		MODELO DE UTILIDAD		DISEÑO INDUSTRIAL		195
SALICITANTE/S. RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES						
SANGSTAT MEDICAL CORPORATION						
DOMICILIO	EUA					
APODERADO	Emilio Ferrero					
TITULO	Métodos y Composiciones para tratar toxicidad gastrointestinal inducida por terapia citotóxica					
	CLASIFICACION					
	A61K38/04					
EXPEDIENTE No.	04-94999	FECHA DE SOLICITUD	23/09/04	ROLLO MICROFILM		
CERTIFICADO No.		FECHA DE CONCESION		VIGENCIA DESDE	HASTA	
PRORROGA	CAMBIO DE NOMBRE					
TRASPASO A						
INVENTOR	Roland Buelan					
OTROS						

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)
SANGSTAT MEDICAL CORPORATION

Oficio N° **6693**

ASUNTO

Radicación N°	04-94999
Solicitud internacional	PCT/US03/006333
Fecha inicio fase nacional	26/09/2004
Trámite	011
Evento	379
Actuación	430
Folios	001

Como resultado del examen de forma realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT) regla 51 bis del Reglamento y Circular Unica de la Superintendencia de Industria y Comercio se le comunica que

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k Decisión 486)
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredite la existencia y representación legal de la sociedad solicitante cuando éste fuere una persona jurídica
- El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud ya que el relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente (Regla 4.3 PCT Art 27 Decisión 486 Circular Unica 5.2.9)

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486 se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2 literal e) del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica N° 10 de 2001.



ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha

202044

U I I 2020