OF

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 05-79328

54. **TÍTULO** Formulaciones Parenterales de péptidos para el tratamiento de lupus Eritematoso sistemático

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K38/01 , A61P37/00

71. **SOLICITANTE** Teva Pharmaceutical Industries Ltd.

DOMICILIO Petach Tikva, Israel

74. **APODERADO** Dilia Maria Rodriguez D'Aleman

22. **BOGOTÁ, D. C.,** Agosto 10/05

(FORMA P-10)

90971 -Imprenta nacional de Colombia- 2004

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05079328 00000000 Folios: 355
Fecha (AMD): 2005-08-10 17:20:45
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

14-08-05

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO(COPIA)
Radicacion : 05079328 00000000 Folios: 2
Fecha (AMD): 2005-08-10 17:20:45
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de invención ☐ Pater

☒ Capitulo I. ☐ Capitulo II.

2) SOLICITANTE (71)	**Nombre: TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.** **Dirección: 5, Basel Street, P.O. Box 3190, 49131 Petach-Tikva, Israel** **Nacionalidad o domicilio: Petach-Tikva, Israel** **Lugar de constitución: Israel**	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☐ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **Cual** _____ **NÚMERO** _____
	Teléfono: **Fax:** **E. Mail:**	
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARIA RODRIGUEZ D´ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☒ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **NÚMERO:** 41.654.882 **TP:** 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	**Nombre: 1. COHEN-VERED, Sharon; 2. NAFTALI, Esmira; 3. WEINSTEIN, Vera; 4. GILBERT, Adrian; 5. KLINGER, Ety.** **Dirección: 1. Azar 167, Kfar Saba, Israel; 2. 44/6, He-beiyar St., 48056 Rosh Haayin, Israel; 3. Rambam St., P.O. Box 846, 90805 Mevaseret Zion, Israel; 4. 60B Apt. 5, Hankin Street, 43465 Ra' anana, Israel; 5. 16, Agadati Street, Tel Aviv 39930, Israel.** **Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, Israelitas**	

5) PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2004/000948 Fecha: ENERO 14, 2004

Publicación Internacional No. WO 2004/064787 A2 Fecha: Agosto 5, 2004

6)Título (54) FORMULACIONES PARENTERALES DE UN PÉPTIDO PARA EL TRATAMIENTO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTEMÁTICO

7) Clasificación Internacional: A 61 K 38/01. A61P 37/00

8) PRIORIDAD	**33) País de Origen**	**(32) Fecha**	**(31) Número de Solicitud**
SI ☒ **NO** ☐	**Estados Unidos**	**Enero 14, 2003**	**60/439,918**

9) Comprobante de pago N°. 05-59,068 Fecha: Agosto 8, 2005

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

V

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO Folios: 265
Radicacion : 05079328 00000000
Fecha (AMD): 2005-08-10 17:20:45
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO(COPIA)
Radicacion : 05079328 00000000 Folios: 265
Fecha (AMD): 2005-08-10 17:20:45
Tramite : 001 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 59,069
FECHA : AGOSTO 8 DE 2005

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	43456068	08/08/2005	5,505,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL : $	443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

P 165

10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud ✓
- [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- [ ] Poderes, si fuera el caso
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [x] *Copia de la solicitud Internacional.* (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos). ✓
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- [ ] Copia 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 12 x 12 y 8 x 6 cm*
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros:
  1. Solicitud PCT

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogota TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

LM

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
5 August 2004 (05.08.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/064787 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61K

(21) International Application Number:
PCT/US2004/000948

(22) International Filing Date: 14 January 2004 (14.01.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/439,918 14 January 2003 (14.01.2003) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/439,918 (CIP)
Filed on 14 January 2003 (14.01.2003)

(71) Applicant *(for all designated States except BB, US)*: TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD. [IL/IL]; 5 Basel Street, P.O. Box 3190, Petach-Tikva 49131 (IL).

(71) Applicant *(for BB only)*: TEVA PHARMACEUTICALS USA, INC. [US/US]; 1090 Horsham Road, North Wales, PA 19454 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: COHEN-VERED, Sharon [IL/IL]; Azar 167, Kfar Saba (IL). NAFTALI, Esmira [IL/IL]; 44/6 He-beiyar St., Rosh Haayin 48056 (IL). WEINSTEIN, Vera [IL/IL]; Rambam St., POB 846, Mevaseret Zion 90805 (IL). GILBERT, Adrian [IL/IL]; 60B Hankin Street, Apt. 5, Ra'anana 43465 (IL). KLINGER, Ety [IL/IL]; Agadati Street 16, Tel Aviv 39930 (IL).

(74) Agent: WHITE, John, P.; Cooper & Dunham LLP, 1185 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, 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.

WO 2004/064787 A2

(54) Title: PARENTERAL FORMULATIONS OF PEPTIDES FOR THE TREATMENT OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

(57) Abstract: The subject invention provides a pharmaceutical composition comprising: an, aqueous carrier; from 0.1 mg/ml to 20 mg/ml of the composition of a pharmaceutically acceptable salt of a) peptide comprising at least 12 and at most 30 consecutive amino acids having a sequence corresponding to (i) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a human monoclonal anti-DNA 16/6 Id antibody, or (ii) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a pathogenic anti-DNA monoclonal antibody that induces a systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease response in mice, or b) a peptide comprising consecutive amino acids having the sequence shown by any of SEQ ID NOS. 8-17, or c) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence of any of and b), or at least two of the sequences in (a)(1), (a) (ii) and (b)(i) through (b)(x), or d) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence comprising at least two identical sequences included in (a) (i), (a) (ii) and (b) (i) through (b)(x); and a solubility enhancer, wherein both the peptide and the solubility enhancer are dissolved in the aqueous carrier; and wherein the composition has a pH between 4 and 9, and a method of alleviating symptoms of SLE in a human by administering an effective amount of the composition.

PARENTERAL FORMULATIONS OF PEPTIDES FOR THE TREATMENT OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/439,918, filed January 14, 2003, the entire contents of which are hereby incorporated by reference.

Throughout this application, various publications are referenced by full citations. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference into this application in order to more fully describe the state of the art as known to those skilled therein as of the date of the invention described and claimed herein.

Background of the Invention

Systemic lupus erythematosus (SLE), or lupus, is a debilitating autoimmune disease characterized by the presence of an array of autoantibodies, including antibodies to dsDNA, to nuclear antigens and to ribonucleoproteins. SLE affects approximately 1 in 2000 individuals (U.S. 1 in 700 women). The disease primarily affects young women, with a female-to male ratio of approximately 9:1.

Systemic lupus can affect almost any organ or system of the body. Systemic lupus may include periods in which few, if any, symptoms are evident ("remission") and other times when the disease becomes more active ("flare"). Most often when people mention "lupus," they are referring to the systemic form of the disease.

Corticosteroids are the mainstay in treating systemic autoimmune disorders. Life threatening, severely disabling manifestations of SLE are treated with high doses of

glucocorticoids (1-2 mg/kg/day). Undesirable effects of chronic glucocorticoids include an array of prominent adverse effects such as cushingoid habitus, central obesity, hypertension, infection, capillary fragility, hirsutism, accelerated osteoporosis, cataracts, diabetes mellitus, myopathy and psychosis. In addition to corticosteroid toxicity, patient compliance to a dosage regimen also poses a serious problem.

Cytotoxic agents are also used for controlling active disease, reducing the rate of disease flares, and reducing steroid requirements. Undesirable side effects of the latter include bone marrow depression, increased infections with opportunistic organisms, irreversible ovarian failure, alopecia and increased risk of malignancy.

SLE is an inflammatory disease for which to date there is no definitive treatment or cure. The disease results in acute and chronic complications. The only treatments available are palliative, aimed at relieving acute symptoms and preventing chronic complications, often with profound side effects. There is therefore an unmet need in this field, and both physicians and patients would welcome new treatments which could potentially eliminate or reduce the unwanted manifestations of the disease.

Despite the extensive research on the mechanisms underlying the induction of SLE, the information on the etiology of the disease is very limited. Studies on SLE have been performed until recently using peripheral blood lymphocytes (PBL) of patients at different clinical stages and under various treatment protocols. Alternatively, murine strains that develop spontaneous SLE-like disease were investigated as a model for SLE. This kind of analysis led to incomplete and confusing

interpretations of the role of various immunological and non-immunological factors in either inducing or sustaining the disease, mainly due to the heterogeneity of patients on one hand and the inability to control the induction phase of the disease in murine SLE strains on the other hand.

Several years ago, an animal model of SLE was established. This model, based on the concept of the idiotypic network, developed a wide spectrum of lupus-related autoantibodies and clinical manifestations (Mendlovic, S. et al. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 85: 2260 (1988)). The induction was carried out by the immunization of mouse strains that do not develop any spontaneous autoimmune disorders, with a human anti-DNA monoclonal antibody (mAb) which bears a common idiotype termed 16/6 Id (Shoenfeld, Y. et al., *J. Exp. Med.* 158: 718 (1983)).

The human mAB 16/6 is an anti-DNA antibody originally of the IgM isotype and switched in culture to IgG1. The mAB was derived from a patient and expresses a common idiotype, the 16/6 Id (Shoenfeld et al., 1983; Mendlovic et al., 1988). The hybridoma cells secreting this mAB are routinely grown in culture, and the antibody is isolated from culture supernatants using an affinity column of Protein G coupled to Sepharose™. The human 16/6 anti-DNA mAB (IgG1/κ) was described in Shoenfeld, Y. et al., *J. Clin. Invest.* 70: 205-208 (1982) and in Waisman, A. et al., *Int. Immunol.* 7: 689-696 (1995).

Following immunization, the mice produced antibodies specific to the 16/6 Id, antibodies that bear the 16/6 Id and antibodies directed against different nuclear antigens (dsDNA, ssDNA, Sm, ribonucleoprotein (RNP), Ro, La and others). The serological findings were associated with leukopenia, elevated erythrocyte sedimentation rate, proteinuria, abundance of immune complexes in the kidneys and sclerosis of the glomeruli (Mendlovic et al., 1988), which are typical manifestations of SLE. It was

further shown that the experimental disease could be induced by a murine anti-16/6 Id mAb (Mendlovic, S. et al., *Eur. J. Immunol.* 19: 729, (1989)) and by the mouse anti-anti 16/6 Id (16/6 Id+) mAb (Waisman, A. et al., *Internatl. Immunol.* 5:1293 (1993); Waisman, A. and Mozes, E. *Eur. J. Immunol.* 23: 1566, (1993)). The induction of the disease is genetically controlled, and thus is strain dependent (Mendlovic, S. et al., *Immunology* 69: 228 (1990)). This unique model for the induction of experimental SLE provides the appropriate tools to clearly dissect the different steps and the linked immune parameters involved in the induction and development of SLE.

SLE is a systemic autoimmune disease characterized by the formation of auto antibodies against self-antigens, such as DNA, Sm, Ro, La, RNP, cardiolipin and histones. The etiology of SLE is unknown, and understanding the mechanism by which these self-antibodies arise provided insight. Monoclonal autoantibodies that were capable of eliciting antibodies that bear the 16/6 Id or react with it were found to be pathogenic and thus capable of inducing experimental SLE (Fricke, H. et al., *Internatl. Immunol.* 2: 225 (1990); Sthoeger, Z.M. et al., *J. Clin. Immunol.* 13: 127 (1993)). The variable (V) regions of nine autoantibodies that bind either DNA or HeLa nuclear extract (NE), isolated from the C3H.SW mice with experimental SLE, were sequenced (Waisman and Mozes, 1993). Monoclonal antibodies with different specificity were analyzed in an attempt to determine the connections between the different autoantibodies. Three mAb were found to bind DNA, and were shown to exhibit sequence characteristics of pathogenic anti-DNA antibodies. One of these mAb, designated 2C4C2, was shown to use a heavy (H) chain V region gene (V_H) identical to the V_H of anti-DNA mAb isolated from other lupus-prone mice, namely (NZB xNZW)F_1. The light (L) chain V region gene (V_L) of mAb 2C4C2 is 98% homologous to the V_L of another anti-DNA mAb, also isolated from (NZB xNZW)F_1 mice. The other two anti-DNA mAb,

designated 5G12-4 and 5G12-6, share 93% of their V_H sequences with that of mAb 2C4C2. Six mAb bound proteins of HeLa NE. The nine mAb use a total of five V_H and four V_L germ-line genes, demonstrating that the autoantibodies induced in mice with experimental SLE do not originate from one B cell clone. Three of the nine V_H and V_L were identical in sequence to germ-line genes, while at least three others had somatic mutations. The latter suggests that these autoantibodies arise in mice by both usage of existing (pre-immune) B cells, and through anantigen-driven process. Furthermore, it appears that autoantibodies found in mice with experimental SLE use genetic elements similar to those used by mAb that were isolated from mouse strains which develop lupus spontaneously.

T cells play an important role in the induction and development of experimental SLE. Thus, T cell lines and clones specific to the 16/6 Id were shown to induce experimental SLE in syngeneic recipients similarly to the 16/6 antibody. Therefore, following the inoculation of the activated cells of the lines, the mice developed both the serology and the renal damage which is typical to SLE (Fricke, H. et al., *Immunology* 73: 421 (1991)). Furthermore, a 16/6 Id specific T cell line of C3H.SW origin induced SLE in C57BL/6 mice that were shown to be resistant to the induction of the disease following injections with either the 16/6 Id or the anti-16/6Id mAb (Mendlovic et al., 1990).

In an attempt to identify the pathogenic region of the 16/6 Id, $(Fab')_2$ fragments were prepared of the 16/6 Id mAb and were found to retain the specificity and pathogenic capacity of the whole 16/6 Id molecule (Ruiz, P.J. et al., *Immun. Let.* 41: 79 (1994)).

The mAb 5G12 that was isolated from mice with experimental SLE and was shown to bind DNA and bear the 16/6 Id, is capable of inducing experimental SLE in mice (Waisman, A. et al.,

Internatl. Immunol. 5:1293 (1993)). T cells that react specifically to mAb by proliferation, are probably reacting to peptides representing sequences from their complementarity-determining regions (CDR). It is very likely that the T cells recognize the V regions of the above antibodies since they do not react with other antibodies that carry the same constant region but have different specificities. Within the variable region, the regions with the highest probability to be recognized are the CDR, since those are the regions that differ the most between the various antibodies. The CDR regions of the VH sequences of the nine pathogenic murine mAb mentioned above that induce SLE in mice, are boxed in Fig. 1 of Waisman and Mozes, 1993, in which the complete nucleotide and deduced amino acid sequences for the VH of the nine mAb are presented.

In experimental SLE models - Balb/c mice and SLE-prone mice, i.e. (NZBxNZW)F1 mice - treatment with either mCDR based-peptides or Compound 1 significantly reduced the SLE related findings, notably immune complex deposits (ICD) in the kidney, proteinuria and leukopenia. The treatment had no effect on the 16/6 Id specific antibody response (Waisman, A., et al. "Modulation of murine systemic lupus erythematosus with peptides based on complementarity determining regions of pathogenic anti -DNA monoclonal antibodies." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997), 94(4): 620; Eilat, E., et al., "Prevention of systemic lupus erythematosus-like disease in (NZBxNZW)F1 mice by treating with CDR1- and CDR3- based peptides of pathogenic autoantibody" *J. Clin. Immunol.* (2000), 20: 268; Eilat, E., et al., "The mechanism by which a peptide based on complementarity determining region-1 of pathogenic anti-DNA antibody ameliorates experimental SLE" (2001), *Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 98: 1148).

Human CDR1, Compound 1, shown in Figure 1, is a synthetic peptide of 19 amino acids based on the complementarity-determining region 1 (CDR1) of the human anti-dsDNA mAb denoted 16/6 Id (Waisman, A., et al. "Modulation of murine systemic lupus erythematosus with peptides based on complementarity determining regions of pathogenic anti-DNA monoclonal antibodies." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997), 94(4): 4620-4625).

These peptides, like many peptides, are not very soluble. Therefore, formulations that improve the solubility of the peptides are provided herein.

Summary of Invention

The subject invention provides a pharmaceutical composition comprising:

an aqueous carrier;

from 0.1 mg/ml to 20 mg/ml of the composition of a pharmaceutically acceptable salt of

a) a peptide comprising at least 12 and at most 30 consecutive amino acids having a sequence corresponding to

(i) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a human monoclonal anti-DNA 16/6 Id antibody, or

(ii) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a pathogenic anti-DNA monoclonal antibody that induces a systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease response in mice, or

b) a peptide comprising consecutive amino acids having the sequence

(i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11)
wherein X$_1$ is Met, Ala or Val; X$_2$ is Gln, Asp, Glu or Arg; X$_3$ is Trp or Ala; X$_4$ is Val or Ser; and X$_5$ is Lys, Glu or Ala;

(ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEQ ID NO:12)
wherein X$_6$ and X$_7$ are each Thr, Val or Ala; X$_8$ is Tyr or Phe; X$_9$ is Asn or Asp; X$_{10}$ is Gln or Glu; X$_{11}$ is Lys or Glu, and X$_{12}$ is Phe or Tyr;

(iii) YYCARX$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$PYAX$_{17}$X$_{18}$YWGQGS (SEQ ID NO:13)

wherein X_{13} is Phe, Thr or Gly; X_{14} is Leu, Ala or Ser; X_{15} is Trp or Ala; X_{16} is Glu or Lys; X_{17} is Met or Ala, and X_{18} is Asp, Lys or Ser;

(iv) $GYNX_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}SHGX_{25}X_{26}LEWIG$ (SEQ ID NO:14)
wherein X_{19} is Met or Ala; X_{20} is Asn, Asp or Arg; X_{21} is Trp or Ala; X_{22} is Val or Ser; X_{23} is Lys or Glu; X_{24} is Gln or Ala; X_{25} is Lys or Glu, and X_{26} is Ser or Ala;

(v) $YYCARX_{27}X_{28}X_{29}YGX_{30}X_{31}X_{32}GQTL$ (SEQ ID NO:15)
wherein X_{27} is Ser or Phe; X_{28} is Gly or Ala; X_{29} is Arg, Ala or Glu; X_{30} is Asn or Asp; X_{31} is Tyr or Phe, and X_{32} is Trp, His or Ala;

(vi) $X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}PX_{36}X_{37}GX_{38}EWIG$ (SEQ ID NO:16)
wherein X_{33} is Gly or Thr Gly; X_{34} is Arg or Lys; X_{35} is Pro or Ser; X_{36} is Gly or Glu; X_{37} is Lys or Asp; and X_{38} is Glu, Leu or Ser;

(vii) $YYCARX_{39}LLX_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}DVDYX_{45}GX_{46}DV$ (SEQ ID NO:17)
wherein X_{39} is Gly or Phe; X_{40} is Arg or Ala; X_{41} is Gly or Ala; X_{42} is Gly or Ala; X_{43} is Trp or Ala; X_{44} is Asn or Ala; X_{45} is Tyr or Trp; X_{46} is Met or Gln;

(viii) FSGYYWS (SEQ ID NO:8);

(ix) EINHSGSTNYKTSLKS (SEQ ID NO:9); or

(x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEQ ID NO:10), or

c) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence of any of a) and b), or at least two of the sequences in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x), or

d) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence comprising at least two identical sequences included in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x); and

a solubility enhancer selected from the group consisting of dimethyl-acetamide, polyethylene glycol, polyoxylated

castor oil, N-methyl-2-pyrrolidinone, 1-ethenyl-2-pyrrolidinone, polyoxyethylene sorbitan esters, and a substituted β-cyclodextrin,

wherein both the peptide and the solubility enhancer are dissolved in the aqueous carrier; and

wherein the composition has a pH between 4 and 9.

The subject invention also provides a method of alleviating symptoms of systemic lupus erythematosus (SLE) in a human subject comprising administering to the human subject any of the pharmaceutical compositions of the invention in an amount effective to alleviate the symptoms of SLE in the human subject.

Brief Description of Figures

Figure 1. Human CDR1 (Compound 1) as acetate salt - showing the molecular and structural formulas of hCDR1, the amino acid sequence, and physical parameters

Figure 2. IL-2 Secretion from cells taken from mice treated with Compound 1 and Captisol® solution after the cells were subsequently activated with a solution of Compound 1 in PBS.

-■- Compound 1 (RS) 50µg/mouse
-▲- Compound 1 (RS) 200µg/mouse
-□- DP 50µg/mouse
-Δ- DP 200µg/mouse
-●- 12% Captisol® ampulized

Figure 3. IFN-γ Secretion from cells taken from mice treated with Compound 1 solution after the cells were subsequently activated with a solution of compound 1 in EM-1 (2.5 x 10^6 cells/well).

-♦- Placebo
-●- Compound 1 50 µg/mouse (treatment dose)
-Δ- Compound 1 100 µg/mouse (treatment dose)
-X- Compound 1 200 µg/mouse (treatment dose)

Figure 4. IFN-γ Secretion from cells taken from mice treated with Compound 1 solution after the cells were subsequently activated with a solution of compound 1 in EM-1 (5 x 10^6 cells/well).

-♦- Placebo
-□- Compound 1 25 µg/mouse
-Δ- Compound 1 50 µg/mouse
-X- Compound 1 100 µg/mouse
-*- Compound 1 200 µg/mouse

Figure 5. Anti-dsDNA antibodies in (NZBxNZW)F1 mice after 10 injections with Compound 1 in Captisol® [OD=Optical Density; Compound 1 (C)= Compound 1 dissolved in Captisol®]

-□- Placebo

-◊- Compound 1 50 µg/mouse

-o- Compound 1 25 µg/mouse

Figure 6. Kidney sections from (NZBxNZW)F1 mice showing intensity of Immune Complex Deposits. The top row sections are from a Captisol®-treated mouse, the mid-row sections are from a mouse treated with 50 µg/mouse Compound 1 and the bottom row sections are from a mouse treated with 25 µg/mouse Compound 1. *Magnification*: Left: x100, Right: x400. FITC immunohistology.

Figure 7. Antibody titers in sera of SLE patients and healthy human controls by testing their sera for the ability to bind the peptides Ia, IIa and IIIa, or mAb 5G12 or a control peptide.

Figure 8. Concentrations of the human anti-DNA 16/6 Id mAb required for optimal stimulation of PBL of SLE patients and of healthy controls. PBL were stimulated with various concentrations (0.1-40 µg/well) of the 16/6 Id mAb. The concentration yielding the highest stimulation index was defined as optimal for triggering a proliferative response.

Figure 9. Proliferation of PBL from one SLE patient stimulated with the mitogen phytohemagglutinin (PHA) in the absence or presence of hCDR1 or hCDR3.

Figure 10. Proliferation of PBL from one SLE patient stimulated with human 16/6I mAb in the absence or presence of the human peptides hCDR1 or hCDR3 or the murine peptide mCDR3.

Figure 11. Proliferation of PBL from one SLE patient stimulated with human 16/6I mAb in the absence or presence of the human peptides hCDR1 or hCDR3 or the murine reversed peptides revmCDR1 and revmCDR3.

Figure 12. Inhibition of IL-2 secretion in PBL of SLE patients triggered by the human 16/6Id mAb in the absence or presence of hCDR1 or hCDR3.

Figure 13. Up-regulation of TGF-β secretion in the PBL of one representative SLE patient stimulated with the human 16/6Id mAb in the absence or presence of hCDR1 or hCDR3.

Figure 14. Representative gel showing activity of MMP-2 and MMP-9 in sera of SLE patients and healthy controls. Sera (5 µl) of 40 individual SLE patients and 25 healthy controls were analysed for their MMP-2 or MMP-9 activities by gel zymography. The figure shows representative results with serum samples of the two groups.

Figure 15. Graph showing quantitative analysis of MMP-2 and MMP-9 activities in sera of SLE patients (dark columns) and healthy controls (white columns). Thirty-six serum samples of SLE patients and 15 serum samples of healthy controls were tested for MMP-2 or MMP-9 activity using specific activity assay kits. Results are expressed as the mean ± s.e.m. *P = 0.0302.

Figures 16A-B. Graphs showing MMP-9 activity levels and disease activity indices (SLEDAI) in patients with SLE. Thirty-five serum samples from 8 male (Fig. 16A) and 27 female (Fig. 16B) SLE patients were tested for MMP-9 activity by a specific activity assay kit. The distribution of MMP-9 activity according to the SLEDAI of the patients is presented. The

dashed line represents the activity of MMP-9 in healthy controls.

Figures 17A-B. Graphs showing pattern of MMP-2 (white circles) and MMP-9 (black circles) activities in sera of two SLE patients sampled during 4-6 years of disease. The sera were tested for MMP-2 or MMP-9 activities by specific activity assay kits. The assays were performed in duplicate.

Detailed description

The subject invention provides a pharmaceutical composition comprising:

an aqueous carrier;

from 0.1 mg/ml to 20 mg/ml of the composition of a pharmaceutically acceptable salt of

a) a peptide comprising at least 12 and at most 30 consecutive amino acids having a sequence corresponding to

(i) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a human monoclonal anti-DNA 16/6 Id antibody, or

(ii) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a pathogenic anti-DNA monoclonal antibody that induces a systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease response in mice, or

b) a peptide comprising consecutive amino acids having the sequence

(i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11)
wherein X$_1$ is Met, Ala or Val; X$_2$ is Gln, Asp, Glu or Arg; X$_3$ is Trp or Ala; X$_4$ is Val or Ser; and X$_5$ is Lys, Glu or Ala;

(ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEQ ID NO:12)
wherein X$_6$ and X$_7$ are each Thr, Val or Ala; X$_8$ is Tyr or Phe; X$_9$ is Asn or Asp; X$_{10}$ is Gln or Glu; X$_{11}$ is Lys or Glu, and X$_{12}$ is Phe or Tyr;

(iii) YYCARX$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$PYAX$_{17}$X$_{18}$YWGQGS (SEQ ID NO:13)

wherein X_{13} is Phe, Thr or Gly; X_{14} is Leu, Ala or Ser; X_{15} is Trp or Ala; X_{16} is Glu or Lys; X_{17} is Met or Ala, and X_{18} is Asp, Lys or Ser;

(iv) $GYNX_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}SHGX_{25}X_{26}LEWIG$ (SEQ ID NO:14)
wherein X_{19} is Met or Ala; X_{20} is Asn, Asp or Arg; X_{21} is Trp or Ala; X_{22} is Val or Ser; X_{23} is Lys or Glu; X_{24} is Gln or Ala; X_{25} is Lys or Glu, and X_{26} is Ser or Ala;

(v) $YYCARX_{27}X_{28}X_{29}YGX_{30}X_{31}X_{32}GQTL$ (SEQ ID NO:15)
wherein X_{27} is Ser or Phe; X_{28} is Gly or Ala; X_{29} is Arg, Ala or Glu; X_{30} is Asn or Asp; X_{31} is Tyr or Phe, and X_{32} is Trp, His or Ala;

(vi) $X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}PX_{36}X_{37}GX_{38}EWIG$ (SEQ ID NO:16)
wherein X_{33} is Gly or Thr Gly; X_{34} is Arg or Lys; X_{35} is Pro or Ser; X_{36} is Gly or Glu; X_{37} is Lys or Asp; and X_{38} is Glu, Leu or Ser;

(vii) $YYCARX_{39}LLX_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}DVDYX_{45}GX_{46}DV$ (SEQ ID NO:17)
wherein X_{39} is Gly or Phe; X_{40} is Arg or Ala; X_{41} is Gly or Ala; X_{42} is Gly or Ala; X_{43} is Trp or Ala; X_{44} is Asn or Ala; X_{45} is Tyr or Trp; X_{46} is Met or Gln;

(viii) FSGYYWS (SEQ ID NO:8);

(ix) EINHSGSTNYKTSLKS (SEQ ID NO:9); or

(x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEQ ID NO:10), or

c) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence of any of a) and b), or at least two of the sequences in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x), or

d) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence comprising at least two identical sequences included in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x); and

a solubility enhancer selected from the group consisting of dimethyl-acetamide, polyethylene glycol, polyoxylated

castor oil, N-methyl-2-pyrrolidinone, 1-ethenyl-2-pyrrolidinone, polyoxyethylene sorbitan esters, and a substituted β-cyclodextrin,

wherein both the peptide and the solubility enhancer are dissolved in the aqueous carrier; and

wherein the composition has a pH between 4 and 9.

In one embodiment, at least 0.5 mg/ml of the composition is the pharmaceutically acceptable salt of the peptide.

In another embodiment, the peptide has a sequence selected from the group consisting of:

NH_2- Thr Gly Tyr Tyr Met Gln Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Lys Ser Leu Glu-Trp Ile Gly-COOH (SEQ ID NO:1);

NH_2- Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr-COOH (SEQ ID NO:2);

NH_2- Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Leu Trp Glu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser-COOH (SEQ ID NO:3);

NH_2- Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly-COOH (SEQ ID NO:4);

NH_2- Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Arg Tyr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Thr Leu -COOH (SEQ ID NO:5);

NH_2-Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly-COOH (SEQ ID NO:6);

NH_2-Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val-COOH (SEQ ID NO:7);

NH_2- Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser-COOH (SEQ ID NO:8);

NH_2- Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Lys Thr Ser Leu Lys Ser-COOH (SEQ ID NO:9); and

NH2- Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val-COOH (SEQ ID NO:10).

In one embodiment, the peptide comprises consecutive amino

acids having the sequence

$X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}PX_{36}X_{37}GX_{38}EWIG$ (SEQ ID NO:16)

wherein X_{33} is Gly or Thr Gly; X_{34} is Arg or Lys; X_{35} is Pro or Ser; X_{36} is Gly or Glu; X_{37} is Lys or Asp; and X_{38} is Glu, Leu or Ser.

In another embodiment of any of the above pharmaceutical compositions, the solubility enhancer is a substituted β-cyclodextrin.

In one embodiment, the substituted β-cyclodextrin is a hydroxypropyl, a sulfobutyl ether, or a sulfopropyl ether substituted β-cyclodextrin.

In another embodiment, the substituted β-cyclodextrin is a substituted sulfobutyl ether β-cyclodextrin.

In a further embodiment of any of the above compositions, the concentration of peptide in solution is at least 1 mg/ml.

In a further embodiment, the concentration of peptide in solution is at least 2.5 mg/ml.

In one embodiment, the concentration of the salt of the peptide is from 0.5 mg/ml to 10 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is from 0.5 mg/ml to 2.5 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is from 2.5 mg/ml to 5 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is from 5 mg/ml to 7 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is from 7 mg/ml to 8.5 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is from 8.5 mg/ml to 10 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is from 9 mg/ml to 10 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is from 10 mg/ml to 15 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is from 15 mg/ml to 20 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is 1.0 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is 2.5 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is 5 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is 10 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt of the peptide is 15 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt is from 0.1 mg/ml to 0.5 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt is from 0.1 mg/ml to 0.2 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt is from 0.2 mg/ml to 0.3 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt is from 0.3 mg/ml to 0.4 mg/ml.

In another embodiment, the concentration of the salt is from 0.4 mg/ml to 0.5 mg/ml.

In a further embodiment, the composition has a pH between 6.5 and 8.5.

In a further embodiment, the composition has a pH between 7.5 and 8.5.

In a further embodiment, the composition has a pH between 4 and 5.

In a further embodiment, the composition has a pH between 5 and 6.

In a further embodiment, the composition has a pH between 6 and 7.

In a further embodiment, the composition has a pH between 7 and 8.

In a further embodiment, the composition has a pH between 8 and 9.

In another embodiment of any of the above pharmaceutical compositions, the pharmaceutically acceptable salt is an acetate salt.

In a further embodiment, the pharmaceutically acceptable salt is an acetate salt, and the substituted β-cyclodextrin is hepta-(sulfobutyl ether)-β-cyclodextrin.

In another embodiment, the composition further comprises a pharmaceutically acceptable buffer in an amount and of a type suitable to make the pH of the pharmaceutical composition in the range of 4-9. The buffer may be acetate buffer, citrate buffer, or sodium carbonate.

The subject invention also provides a method of alleviating symptoms of systemic lupus erythematosus (SLE) in a human subject comprising administering to the human subject any of the above pharmaceutical compositions in an amount effective to alleviate the symptoms of the SLE in the human subject.

The subject invention also provides any of the above pharmaceutical compositions for use in treating SLE in a human subject.

The subject invention also provides a process for manufacturing any of the above pharmaceutical compositions comprising the steps of:

a) preparing a solution of dimethyl-acetamide, polyethylene glycol, polyoxylated castor oil, N-methyl-2-pyrrolidinone, 1-ethenyl-2-pyrrolidinone,polyoxyethylene sorbitan esters, or a substituted β-cyclodextrin in an aqueous carrier at a predetermined concentration;

b) adding a predetermined amount of a pharmaceutically acceptable salt of

1) a peptide comprising at least 12 and at most 30 consecutive amino acids having a sequence corresponding to

(i) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a human monoclonal anti-DNA 16/6 Id antibody, or

(ii) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a pathogenic anti-DNA monoclonal antibody that induces a systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease response in mice,

2) a peptide comprising amino acids having the sequence

(i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11)
wherein X$_1$ is Met, Ala or Val; X$_2$ is Gln, Asp, Glu or Arg; X$_3$ is Trp or Ala; X$_4$ is Val or Ser; and X$_5$ is Lys, Glu or Ala;

(ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEQ ID NO:12)
wherein X$_6$ and X$_7$ are each Thr, Val or Ala; X$_8$ is Tyr or Phe; X$_9$ is Asn or Asp; X$_{10}$ is Gln or Glu; X$_{11}$ is Lys or Glu, and X$_{12}$ is Phe or Tyr;

(iii) YYCARX$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$PYAX$_{17}$X$_{18}$YWGQGS (SEQ ID NO:13)
wherein X$_{13}$ is Phe, Thr or Gly; X$_{14}$ is Leu, Ala or Ser; X$_{15}$ is Trp or Ala; X$_{16}$ is Glu or Lys; X$_{17}$ is Met or Ala, and X$_{18}$ is Asp, Lys or Ser;

(iv) GYNX$_{19}$X$_{20}$X$_{21}$X$_{22}$X$_{23}$X$_{24}$SHGX$_{25}$X$_{26}$LEWIG (SEQ ID NO:14)
wherein X$_{19}$ is Met or Ala; X$_{20}$ is Asn, Asp or Arg; X$_{21}$ is Trp or Ala; X$_{22}$ is Val or Ser; X$_{23}$ is Lys or Glu; X$_{24}$ is Gln or Ala; X$_{25}$ is Lys or Glu, and X$_{26}$ is Ser or Ala;

(v) YYCARX$_{27}$X$_{28}$X$_{29}$YGX$_{30}$X$_{31}$X$_{32}$GQTL (SEQ ID NO:15)

wherein X_{27} is Ser or Phe; X_{28} is Gly or Ala; X_{29} is Arg, Ala or Glu; X_{30} is Asn or Asp; X_{31} is Tyr or Phe, and X_{32} is Trp, His or Ala;

(vi) X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}P$X_{36}X_{37}$GX_{38}EWIG (SEQ ID NO:16)

wherein X_{33} is Gly or Thr Gly; X_{34} is Arg or Lys; X_{35} is Pro or Ser; X_{36} is Gly or Glu; X_{37} is Lys or Asp; and X_{38} is Glu, Leu or Ser;

(vii) YYCARX_{39}LL$X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}$DVDY$X_{45}GX_{46}$DV (SEQ ID NO:17)

wherein X_{39} is Gly or Phe; X_{40} is Arg or Ala; X_{41} is Gly or Ala; X_{42} is Gly or Ala; X_{43} is Trp or Ala; X_{44} is Asn or Ala; X_{45} is Tyr or Trp; X_{46} is Met or Gln;

(viii) FSGYYWS (SEQ ID NO:8);

(ix) EINHSGSTNYKTSLKS (SEQ ID NO:9); or

(x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEQ ID NO:10), or

3) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence of any of a) and b), or at least two of the sequences in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x), or

4) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence comprising at least two identical sequences included in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x);

c) adjusting the pH of the solution of step b) until the peptide dissolves in the solution; and

d) if necessary, adjusting the pH of the solution of step c) to a pH of 4-9, thereby manufacturing the pharmaceutical composition.

In one embodiment, the predetermined amount of peptide is such which results in a final concentration of peptide in the pharmaceutical composition of at least 0.1 mg/ml.

In another embodiment, the predetermined amount of peptide is such which results in a final concentration of peptide in the pharmaceutical composition of at least 0.5 mg/ml.

In a further embodiment, the predetermined amount of peptide is such which results in a final concentration of peptide in the pharmaceutical composition of 2.5mg/ml, 2.0mg/ml, 1.0mg/ml, 0.5 mg/ml or 0.1 mg/ml.

In another embodiment, the predetermined amount of peptide is such which results in a final concentration of peptide in the pharmaceutical composition is 5 mg/ml, 10 mg/ml or 15 mg/ml.

In one embodiment of the process, the resulting final concentration of the substituted β-cyclodextrin in the pharmaceutical composition is from 70 mg/ml to 170 mg/ml.

In one embodiment of the process, the predetermined concentration of the substituted β-cyclodextrin is such which results in a final concentration of substituted β-cyclodextrin in the pharmaceutical composition of from 80 mg/ml to 170 mg/ml.

In one embodiment of the process, the predetermined concentration of the substituted β-cyclodextrin is such which results in a final concentration of substituted β-cyclodextrin in the pharmaceutical composition of from 90 mg/ml to 170 mg/ml.

In one embodiment of the process, the predetermined concentration of the substituted β-cyclodextrin is such which results in a final concentration of substituted β-cyclodextrin in the pharmaceutical composition of from 100 mg/ml to 170 mg/ml.

In one embodiment of the process, the predetermined concentration of the substituted β-cyclodextrin is such which results in a final concentration of substituted β-cyclodextrin in the pharmaceutical composition of from 110 mg/ml to 170 mg/ml.

In one embodiment of the process, the predetermined concentration of the substituted β-cyclodextrin is such which results in a final concentration of substituted β-cyclodextrin in the pharmaceutical composition of from 120 mg/ml to 170 mg/ml.

In one embodiment of the process, the predetermined concentration of the substituted β-cyclodextrin is such which results in a final concentration of substituted β-cyclodextrin in the pharmaceutical composition of from 130 mg/ml to 170 mg/ml.

In one embodiment of the process, the predetermined concentration of the substituted β-cyclodextrin is such which results in a final concentration of substituted β-cyclodextrin in the pharmaceutical composition of from 140 mg/ml to 170 mg/ml.

In one embodiment of the process, the predetermined concentration of the substituted β-cyclodextrin is such which results in a final concentration of substituted β-cyclodextrin in the pharmaceutical composition of from 150 mg/ml to 170 mg/ml.

In one embodiment of the process, the predetermined concentration of the substituted β-cyclodextrin is such which results in a final concentration of substituted β-cyclodextrin in the pharmaceutical composition of from 160 mg/ml to 170 mg/ml.

In one embodiment of the process, the predetermined concentration of the substituted β-cyclodextrin is such which results in a final concentration of substituted β-cyclodextrin in the pharmaceutical composition is 120 mg/ml.

In a further embodiment, step b) further comprises mixing the solution for 1 hour.

In a further embodiment, in step c) the pH is adjusted using HCl or NaOH 1.0N.

In a further embodiment, the process further comprises filtering the solution of step d) through a cellulose acetate filter.

In a further embodiment,

the predetermined amount of peptide is such which results in a final concentration of peptide in the pharmaceutical composition of 2.5mg/ml, 2.0mg/ml, 1.0mg/ml, 0.5 mg/ml or 0.1 mg/ml;

step b) further comprises mixing the solution for 1 hour; and

in step c) the pH is adjusted using HCl or NaOH 1.0N, further comprising filtering the solution of step d) through a cellulose acetate filter.

The subject invention also provides a composition prepared by any of the above processes.

The subject invention also provides a lyophilized pharmaceutical composition comprising from 0.1 mg/ml to 20 mg/ml of the composition of a pharmaceutically acceptable salt of

a) a peptide comprising at least 12 and at most 30 consecutive amino acids having a sequence corresponding to

(i) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a human monoclonal anti-DNA 16/6 Id antibody, or

(ii) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a pathogenic anti-DNA monoclonal antibody that induces a systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease response in mice, or

b) a peptide comprising consecutive amino acids having the sequence

(i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11)
wherein X$_1$ is Met, Ala or Val; X$_2$ is Gln, Asp, Glu or Arg; X$_3$ is Trp or Ala; X$_4$ is Val or Ser; and X$_5$ is Lys, Glu or Ala;

(ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEQ ID NO:12)
wherein X$_6$ and X$_7$ are each Thr, Val or Ala; X$_8$ is Tyr or Phe; X$_9$ is Asn or Asp; X$_{10}$ is Gln or Glu; X$_{11}$ is Lys or Glu, and X$_{12}$ is Phe or Tyr;

(iii) YYCARX$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$PYAX$_{17}$X$_{18}$YWGQGS (SEQ ID NO:13)
wherein X$_{13}$ is Phe, Thr or Gly; X$_{14}$ is Leu, Ala or Ser; X$_{15}$ is Trp or Ala; X$_{16}$ is Glu or Lys; X$_{17}$ is Met or Ala, and X$_{18}$ is Asp, Lys or Ser;

(iv) GYNX$_{19}$X$_{20}$X$_{21}$X$_{22}$X$_{23}$X$_{24}$SHGX$_{25}$X$_{26}$LEWIG (SEQ ID NO:14)
wherein X$_{19}$ is Met or Ala; X$_{20}$ is Asn, Asp or Arg; X$_{21}$ is Trp or Ala; X$_{22}$ is Val or Ser; X$_{23}$ is Lys or Glu; X$_{24}$ is Gln or Ala; X$_{25}$ is Lys or Glu, and X$_{26}$ is Ser or Ala;

(v) YYCARX$_{27}$X$_{28}$X$_{29}$YGX$_{30}$X$_{31}$X$_{32}$GQTL (SEQ ID NO:15)

wherein X_{27} is Ser or Phe; X_{28} is Gly or Ala; X_{29} is Arg, Ala or Glu; X_{30} is Asn or Asp; X_{31} is Tyr or Phe, and X_{32} is Trp, His or Ala;

(vi) X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}P$X_{36}X_{37}$GX_{38}EWIG (SEQ ID NO:16)
wherein X_{33} is Gly or Thr Gly; X_{34} is Arg or Lys; X_{35} is Pro or Ser; X_{36} is Gly or Glu; X_{37} is Lys or Asp; and X_{38} is Glu, Leu or Ser;

(vii) YYCARX_{39}LL$X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}$DVDY$X_{45}GX_{46}$DV (SEQ ID NO:17)
wherein X_{39} is Gly or Phe; X_{40} is Arg or Ala; X_{41} is Gly or Ala; X_{42} is Gly or Ala; X_{43} is Trp or Ala; X_{44} is Asn or Ala; X_{45} is Tyr or Trp; X_{46} is Met or Gln;

(viii) FSGYYWS (SEQ ID NO:8);

(ix) EINHSGSTNYKTSLKS (SEQ ID NO:9); or

(x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEQ ID NO:10), or

c) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence of any of a) and b), or at least two of the sequences in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x), or

d) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence comprising at least two identical sequences included in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x); and

a solubility enhancer selected from the group consisting of dimethyl-acetamide, polyethylene glycol, polyoxylated castor oil, N-methyl-2-pyrrolidinone, 1-ethenyl-2-pyrrolidinone, polyoxyethylene sorbitan esters, and a substituted β-cyclodextrin.

In one embodiment of the lyophilized pharmaceutical composition, at least 0.5 mg/ml of the composition is the pharmaceutically acceptable salt of the peptide.

The subject invention also provides a process of lyophilizing any of the above pharmaceutical compositions comprising the steps of:

a) lowering the temperature of the pharmaceutical composition to -40°C;

b) holding the temperature at -40°C for a predetermined time;

c) raising the temperature of the solution to 20°C;

d) holding the temperature at 20°C for a predetermined time; and

e) reducing the pressure and holding the temperature at 20°C for a predetermined time, thereby lyophilizing the pharmaceutical composition.

In one embodiment, step a) is performed within 2 hours.

In another embodiment, step b) is performed within 3 hours.

In another embodiment, step c) is performed over 13 hours.

In another embodiment, step c) is performed at a pressure of 110μbar.

In another embodiment, step d) is performed over 13 hours.

In another embodiment, step d) is performed at a pressure of 110μbar.

In another embodiment, in step e) the pressure is reduced to 10μbar.

In another embodiment, step e) is performed over 5 hours.

In another embodiment,

step a) is performed within 2 hours;

step b) is performed within 3 hours;

step c) is performed over 13 hours and at a pressure of 110μbar;

step d) is performed over 13 hours and at a pressure of 110μbar; and

step e) is performed over 5 hours and the pressure is reduced to 10μbar.

The subject invention also provides a lyophilized pharmaceutical composition prepared by any of the above processes.

The subject invention also provides a process of lyophilizing any of the above pharmaceutical compositions comprising the steps of:

a) lowering the temperature of the pharmaceutical composition to -45°C;

b) holding the temperature at -45°C for a predetermined time;

c) raising the temperature of the solution to -20°C;

d) raising the temperature of the solution to 25°C; and

e) holding the temperature at 25°C for a predetermined time, thereby lyophilizing the pharmaceutical composition.

In one embodiment, step a) is performed within 6 hours.

In another embodiment, step b) is performed within 3 hours.

In another embodiment, step c) is performed over 19 hours.

In another embodiment, step c) is performed at a pressure of 150μbar.

In another embodiment, step d) is performed over 13 hours.

In another embodiment, step d) is performed at a pressure of 150μbar.

In another embodiment, step e) is performed over 8 hours.

In another embodiment, step e) is performed at a pressure of 150μbar.

In another embodiment,

step a) is performed within 6 hours;

step b) is performed within 3 hours;

step c) is performed over 19 hours and at a pressure of 150μbar;

step d) is performed over 13 hours and at a pressure of 150μbar; and

step e) is performed over 8 hours and at a pressure of 150μbar.

The subject invention also provides a lyophilized pharmaceutical composition prepared by any of the above processes.

The subject invention also provides the above lyophilized pharmaceutical composition wherein the water content of the composition is less than 5%.

In one embodiment, the water content of the composition is less than 4.0%.

In another embodiment, the water content of the composition is less then 3.5%.

The subject invention also provides a packaged pharmaceutical composition comprised of:

a packaging material; and

a predetermined amount of any of the above lyophilized pharmaceutical compositions.

In another embodiment, the peptide has the formula

NH_2-Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly-COOH (SEQ ID NO:6).

The synthetic peptides of this invention are based on the CDR of monoclonal pathogenic autoantibodies isolated from mice with experimental SLE. Such monoclonal antibodies are obtained from supernatants of hybridomas produced by fusion, for example, of spleen cells of C3H.SW mice immunized with an anti-16/6 Id mAb, with X63.653 plasmacytoma cells (Waisman and Mozes, 1993).

Examples of such peptides are those of formulas Ia to Va herein, based on, respectively, the CDR1, CDR2 and CDR3 regions of the heavy chain of mAb 5G12 and the CDR1 and CDR3 regions of the heavy chain of mAb 2C4C2 (Waisman and Mozes, 1993), and analogs thereof.

Peptides of the present invention are intended to include analogs of peptides Ia-Va including substitution, deletion and addition analogs as described herein. Substitution analogs have amino acid substitutions at different positions, these substitutions being made based on the volume, hydrophobic-hydrophilic pattern and charge of the amino acids.

Amino acids may be divided along the lines of volume, hydrophobic-hydrophilic pattern and charge. With respect to volume, those of ordinary skill in the art understand that the amino acids with the largest volume are Trp, Tyr, Phe, Arg, Lys, Ile, Leu, Met and His, while those with the smallest

volumes are Gly, Ala, Ser, Asp, Thr and Pro, with others being in between.

With respect to hydrophobic-hydrophilic pattern, it is well known that the amino acids Gly, Ala, Phe, Val, Leu, Ile, Pro, Met and Trp are hydrophobic, whereas all of the remaining amino acids are hydrophilic. Among the hydrophilic amino acids, Ser, Thr, Gln, and Tyr have no charge, while Arg, Lys, His and Asn have a positive charge and Asp and Glu have negative charges.

In selecting peptides to be tested for their potential in inhibiting the proliferative response of T lymphocytes of mice that are high responders to SLE-inducing autoantibodies, it is important that the substitutions be selected from those which cumulatively do not substantially change the volume, hydrophobic-hydrophilic pattern and charge of the corresponding portion of the unsubstituted parent peptide. Thus, a hydrophobic residue may be substituted with a hydrophilic residue, or vice-versa, as long as the total effect does not substantially change the volume, hydrophobic-hydrophilic pattern and charge of the corresponding unsubstituted parent peptide.

It should be understood that other modifications of the peptides are also contemplated by the present invention. Thus, the peptide of the present invention is intended to include a "chemical derivative" thereof which retains at least a portion of the function of the peptide which permits its utility in preventing or inhibiting T cell proliferative responses and autoimmune disease.

A "chemical derivative" of a peptide of the present invention contains additional chemical moieties not normally a part of the peptide. Covalent modifications of the peptide are included within the scope of this invention. Such modifications may be

introduced into the molecule by reacting targeted amino acid residues of the peptide with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or terminal residues. Many such chemical derivatives and methods for making them are well known in the art.

Also included in the scope of the invention are salts of the peptides of the invention. As used herein, the term "salts" refers to both salts of carboxyl groups and to acid addition salts of amino groups of the peptide molecule. Salts of a carboxyl group may be formed by means known in the art and include inorganic salts, for example, sodium, calcium, ammonium, ferric or zinc salts, and the like, and salts with organic bases such as those formed for example, with amines, such astriethanolamine, arginine, or lysine, piperidine, procaine, and the like. Acid addition salts include, for example, salts with mineral acids such as, for example, hydrochloric acid or sulfuric acid, and salts with organic acids, such as, for example, acetic acid or oxalic acid. Such chemical derivatives and salts are preferably used to modify the pharmaceutical properties of the peptide insofar as stability, solubility, etc., are concerned.

The synthetic peptides and analogs thereof according to the invention may be selected from the group consisting of peptides having the sequences I to V herein, wherein:

(i) the peptide of sequence I has the formula (SEQ ID NO:11):

T G Y Y X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 Q S P E K S L E W I G [I]

wherein X_1 is Met, Ala or Val; X_2 is Gln, Asp, Glu or Arg; X_3 is Trp or Ala; X_4 is Val or Ser; and X_5 is Lys, Glu or Ala.

In one embodiment, the peptide of sequence I has the formula (Ia)(SEQ ID NO: 1):

T G Y Y M Q W V K Q S P E K S L E W I G (IIa)

(ii) the peptide of sequence II has the formula (SEQ ID NO:12):

E I N P S T G G X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} K A K A T [II]

wherein X_6 and X_7 are each Thr, Val or Ala; X_8 is Tyr or Phe; X_9 is Asn or Asp; X_{10} is Gln or Glu; X_{11} is Lys or Glu, and X_{12} is Phe or Tyr.

In one embodiment, the peptide of sequence II has the formula (IIa) (SEQ ID NO:2):

E I N P S T G G T T Y N Q K F K A K A T (IIa)

(iii) the peptide of sequence III has the formula (SEQ ID NO:13):

Y Y C A R X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} P Y A X_{17} X_{18} Y W G Q G S [III]

wherein X_{13} is Phe, Thr or Gly; X_{14} is Leu, Ala or Ser; X_{15} is Trp or Ala; X_{16} is Glu or Lys; X_{17} is Met or Ala, and X_{18} is Asp, Lys or Ser.

In one embodiment, the peptide of sequence III has the formula (IIIa) (SEQ ID NO:3):

Y Y C A R F L W E P Y A M D Y W G Q G S (IIIa)

(iv) the peptide of sequence IV has the formula (SEQ ID NO:14):

G Y N X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24} S H G X_{25} X_{26} L E W I G [IV]

wherein X_{19} is Met or Ala; X_{20} is Asn, Asp or Arg; X_{21} is Trp or Ala; X_{22} is Val or Ser; X_{23} is Lys or Glu; X_{24} is Gln or Ala; X_{25} is Lys or Glu, and X_{26} is Ser or Ala.

In one embodiment, the peptide of sequence IV has the formula (IVa) (SEQ ID NO:4):

G Y N M N W V K Q S H G K S L E W I G (IVa)

(v) the peptide of sequence V has the formula (SEQ ID NO:15):

Y Y C A R X_{27} X_{28} X_{29} Y G X_{30} X_{31} X_{32} G Q T L [V]

wherein X_{27} is Ser or Phe; X_{28} is Gly or Ala; X_{29} is Arg, Ala or Glu; X_{30} is Asn or Asp; X_{31} is Tyr or Phe, and X_{32} is Trp, His or Ala.

In one embodiment, the peptide of sequence V has the formula (Va) (SEQ ID NO:5):

Y Y C A R S G R Y G N Y W G Q T L (Va).

Peptides Ia to IIIa are based on the CDR1, CDR2 and CDR3 regions, respectively, of the V_H chain of mAb5G12, and peptides IVa and Va are based on the CDR1 and CDR3 regions, respectively, of the V_H chain of mAb 2C4C2 (Waisman and Mozes, 1993).

Once a peptide in accordance with the present invention is produced, its ability to inhibit the proliferative response of T lymphocytes of mice that are high responders to SLE inducing autoantibodies may be readily determined by those of ordinary skill in the art without undue experimentation using tests such as those described herein. One test which may be readily conducted is for the ability of substituted peptides to inhibit *in vitro* the proliferative responses of certain T cell lines and clones specific to SLE-inducing autoantibodies. The T cell lines and clones may, for example, be the T cell lines and clones specific to the 16/6 Id mAb (Fricke et al., 1991) established from immunized lymph node cells of mice by previously described methodology (Axelrod, O. and Mozes, E.

Immunobiology 172: 99 (1986)). Cells are exposed to the stimulating antibody presented on irradiated syngeneic spleen cells in the presence of enriched medium every two weeks. The T cell lines are cloned by the standard limiting dilution technique. The proliferative responses of these T cell lines and clones are tested, for example, by the method described in Materials and Methods herein.

Another test which can be conducted in order to select peptides having the desired activity is to test for the ability of the substituted peptides to inhibit the ability of the T cell lines and clones to provide help to peptide-specific B cells in the presence of the parent peptide. The substituted peptides may also be tested for their ability to bind directly, following biotinylation, to MMC Class II products on antigen-presenting cells of the relevant strains. For this purpose, N-terminal biotinylation of the relevant peptides is performed at 0°C with an excess of biotin-N-hydroxysuccinimide in aqueous solution (Mozes, E. et al., EMBO J. 8: 4049 (1989)). Mouse splenic adherent cells or human peripheral blood lymphocyte (PBL)-adherent cells ($1x10^6$/sample) are incubated with biotinylated peptides in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (PBS/BSA) at 37°C for 20 hr, followed by incubation with phycoerythrin-streptavidin for 30 min at 4°C. After each incubation, the cells are washed twice with the above solution. Thereafter, the cells are analyzed by flow cytometry using FACScan. In each analysis, a minimum of 5000 cells are examined (for above procedures, see, for example, Mozes et al., 1989; Zisman et al., 1991).

A further test which can be conducted is to test for the ability of the peptides to inhibit cytokine secretion by the T cell line or by T lymphocytes of mice that are high responders to SLE-inducing autoantibodies. The cytokines are detected as follows: IL-1 activity is assessed either by ELISA using a pair

of capture and detecting antibodies (as described below for IL-4, IL-6, IL-10) or using the LBRM-33(1A5) assay (Conlon, P.J. *J. Immune.* 134:1280 (1983))in which 1A5 cells are stimulated in the presence of phytohemagglutinin (PHA), with either supernatants or recombinant IL-1 at various concentrations to secrete IL-2. Following an overnight incubation, supernatants of 1A5 cells are transferred to the IL-2 dependent cytotoxic T lymphocyte (CTLL) line. Stimulation of the CTLL line by IL-2 is measured after 24 hr by incorporation of ^{3}[H]-thymidine. IL-2 is directly detected using the IL-2 dependent CTLL line or by ELISA. Levels of IL-4, IL-6, IL-10, INFγ and TNFα in the supernatants are determined by ELISA using antibodies to the various cytokines (Phamingen, San Diego, Ca., USA) according to the manufacturer's instructions.

Peptides which test positive in one or more of these *in vitro* tests will provide a reasonable expectation of *in vivo* activity. However, in vivo tests can also be conducted without undue experimentation. Thus, for example, adult mice may be injected with the candidate peptide at either day -3 or day 0. The mice are then immunized with the disease-inducing autoantibody or with the peptide. Ten days later, lymph node cells of the mice are tested for their ability to proliferate to the immunogen in order to find out the inhibitory capacity of the candidate peptide.

Another such *in vivo* animal test consists in measuring the therapeutic activity directly in the murine model *in vivo* for the production of SLE as described above. The peptides can be injected into the mice in which experimental SLE is induced by different routes at different dosages and at different time schedules. In order to determine the pharmacokinetic parameters of the peptides, including volume of distribution, uptake into antigen-presenting cells and clearance, one can use biotinylated derivatives of the peptides. The concentration of

the soluble fraction of the peptides in the various body fluids can be determined by ELISA, using avidin-coated plates and specific anti-peptide antibodies. Cell bound peptides can be analyzed by FACS, using fluorochromo-conjugated avidin or streptavidin. Furthermore, the treated mice can be tested periodically in order to determine the effect of the peptides on the autoantibody responses and on disease manifestations elicited in the mice by the SLE-inducing autoantibody.

Another *in vivo* procedure consists in tolerizing newborn mice with the candidate peptide followed by immunization of the mice with the pathogenic autoantibody, such as 16/6 Id+, or with the same peptide, and following the disease manifestations, such as serological findings associated with leukopenia, elevated erythrocyte sedimentation rate, proteinuria, abundance of immune complexes in the kidneys and sclerosis of the glomeruli. It can thus be seen that, besides the preferred embodiments which have been shown to be operable in the examples herein, those of ordinary skill in the art will be able to determine additional peptides which will also be operable following the guidelines presented herein without undue experimentation.

A relatively simple *in vitro* test can also be conducted in order to assay for the expected therapeutic efficacy of any given substituted peptide on any given SLE patient. In order to assess the ultimate goal of producing peptides that will bind with high affinity to the appropriate MHC Class II molecules but will not lead to further activation of T cells and will therefore have a therapeutic effect on SLE patients, the peptides may be assayed, following biotinylation, for their ability to bind directly to HLA Class II products on antigen-presenting cells in the peripheral blood lymphocytes of the SLE patients. Healthy control donors and control peptides may be used in such assays to verify their specificity.

In one embodiment, the therapeutic agent of the invention is a peptide selected from the group of peptides of formulas I to V herein, including peptides Ia to Va and substitution and/or deletion analogs thereof.

In another embodiment, the therapeutic agent in accordance with the present invention is the form of a multi-epitope single peptide. Thus, in a preferred embodiment, dual petides consisting of two different peptides selected from the group of peptides of formulas I-V herein, are covalently linked to one another, such as by a short stretch of alanine residues or by a putative site for proteolysis by cathepsin. See, for example, U.S. Patent 5,126,249 and European Patent 495,049 with respect to such sites. This will induce sitespecific proteolysis of the preferred form into the two desired analogs. Alternatively, a number of the same or different peptides of the present invention may be formed into a peptide polymer, such as, for example, polymerization of the peptides with a suitable polymerization agent, such as 0.1% glutaraldehyde (Audibert et al. (1981), *Nature* 289:593). The polymer will preferably contain from 5 to 20 peptide residues. Such peptide polymers may also be formed by crosslinking the peptides or attaching multiple peptides to macromolecular carriers. Suitable macromolecular carriers are, for example, proteins, such as tetanus toxoid, and linear or branched copolymers of amino acids, such as a linear copolymer of L-alanine, L-glutamic acid and L-lysine and a branched copolymer of L tyrosine, L-glutamic acid, L-alanine and L-lysine (T,G)-A-L-, or multichain poly-DLalanine (M. Sela et al. 1955, *J. Am. Chem. Soc.* 77:6175). The conjugates are obtained, for example, by first coupling the peptide with a water-soluble carbodiimide, such as 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, and then performing the conjugation with the macromolecular carrier as described by Muller, G.M. et al. (1982) *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 79:569. The contents of the coupled peptide in each

conjugate are determined by amino acid analysis, in comparison to the composition of the carrier alone.

According to one embodiment of the present invention, one or more active peptides may be attached to a suitable macromolecular carrier or may be polymerized in the presence of glutaraldehyde.

The peptides, polymers thereof or their conjugates with suitable macromolecular carriers, will be given to patients in a form that insures their bioavailability, making them suitable for treatment. If more than one peptide is found to have significant inhibitory activity, these peptides will be given to patients in a formulation containing a mixture of the peptides.

The invention further includes pharmaceutical compositions comprising at least one synthetic peptide according to the invention, a conjugate thereof with a suitable macromolecular carrier or a polymer thereof optionally with a pharmaceutically acceptable carrier.

Any suitable route of administration is encompassed by the invention, including oral, intravenous, subcutaneous, intraarticular, intramuscular, inhalation, intranasal, intrathecal, intraperitoneal, intradermal, transdermal or other known routes, including the enteral route.

The dose ranges for the administration of the compositions of the present invention should be large enough to produce the desired effect, whereby, for example, an immune response to the SLE-inducing autoantibody, as measured by T cell proliferation in vitro, is substantially prevented or inhibited, and further, where the disease is significantly treated.

The doses should not be so large as to cause adverse side effects, such as unwanted cross reactions, generalized immunosuppression, anaphylactic reactions and the like.

Effective doses of the peptides of this invention for use in treating SLE are in the range of 1 µg/kg to 1 mg/kg body weight. The dosage administered will be dependent upon the age, sex, health, and weight of the recipient, kind of concurrent treatment, if any, frequency of treatment, and the nature of the effect desired.

The synthetic peptides of the invention, particularly those of sequences I to V herein, are aimed at inhibiting or suppressing specific antigen responses of SLE patients, without affecting all other immune responses. This approach is of the utmost importance since most diagnosed patients are young women that have to be treated for many years and the currently accepted treatment for SLE involves administration of immunosuppressive agents, such as corticosteroids and/or cytotoxic drugs, that are both non-specific and have multiple adverse side effects.

The preparations of the present invention may be given parenterally, topically, or rectally. They are of course given by forms suitable for each administration route. For example, they are administered by injection, inhalation, ointment, suppository, etc. administration by injection, infusion or inhalation; topical by lotion or ointment; and rectal by suppositories.

The phrases "parenteral administration" and "administered parenterally" as used herein means modes of administration other than enteral and topical administration, usually by injection, and includes, without limitation, intravenous, intramuscular, intraarterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, intradermal, intraperitoneal,

transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal and intrasternal injection and infusion.

The phrases "systemic administration," "administered systematically," "peripheral administration" and "administered peripherally" as used herein mean the administration of a compound, drug or other material other than directly into the central nervous system, such that it enters the patient's system and, thus, is subject to metabolism and other like processes, for example, subcutaneous administration.

Details of general formulation procedures and information on additional excipients may be found in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition.

Synthetic peptides can be produced as described in PCT International Publication No. WO 02/067848, or in PCT International Publication No. WO 96/30057.

This invention will be better understood from the Experimental Details which follow. However, one skilled in the art will readily appreciate that the specific methods and results discussed are merely illustrative of the invention as described more fully in the claims which follow thereafter.

Experimental Details

The synthesis of peptides I to V and the testing showing the effectiveness of the synthesized peptides for treating SLE in animal models is described in PCT International Publication No. WO 96/30057. Additional animal testing is described in PCT International Publication No. WO 02/067848.

Example 1: Formulation Development for Compound 1

The peptides of the subject application are described in PCT International Publication No. WO 02/067848, published September 6, 2002, and can be prepared by methods well known in the art, (see, for example, Peptides: Synthesis, Structure and Applications, ed. by B. Gutte, Academic Press, 1995; Peptide Synthesis Protocols, ed. By M. Pennington and B. Dunn, Humana Press, 1994; Schnolzer, M. et al., "In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase synthesis. Rapid, High yield assembly of difficult sequences." *Int. J. Pept. Protein Res.* (1992) 40: 180-193).

Compound 1 is a synthetic polypeptide composed of 19 amino acids. It is provided as an acetate salt. The aqueous solubility of the peptide has been determined to be less than 0.5 mg/ml. Figure 1 shows compound 1 as an acetate salt.

In order to develop a formulation with peptide concentration exceeding 2 mg/ml, preferably up to 10 mg/ml, experiments with several solubility enahancers were performed. The preliminary experiments indicated that a concentration of 2 mg/ml cannot be easily attained. In order to develop a formulation for sub-cutaneous injection, it is also desirable that the pH be in the range of 4 to 9 and that the solution be iso-osmotic.

Based on an extensive literature survey, a few principal approaches were adopted in order to produce a formulation with maximal solubility. The factors considered were:

- pH adjustment and buffers
- Solvents
- Co-solvents
- Solubilizing agents

Methods

Compound 1 was dissolved in the chosen solubility enhancer solution either separately or in combination with other excipients and the solutions were stirred for at least an hour. The pH was adjusted if needed. The solutions were visually examined to estimate the solubility and sent for analytical assay determination. For a few chosen formulations, biological activity was also tested.

Results

Table 1 presents the type of solubility enhancers used for the formulation development. Tables 2 and 3 summarize the experiments that were performed with the various solubility enhancers. Table 2 summarizes the initial screening performed with peptide concentrations in the range of 5 to 10 mg/ml. The experimental work that was performed with higher peptide concentration was then repeated with the lower doses (see table 3).

Initial tests indicated that Compound 1 was more soluble at the limits of the desired pH levels, both acidic and basic, but was less stable at the basic pH range. Thus, several buffers and pH adjustment agents were tested, including acetate buffer, citrate buffer and sodium carbonate. None of the initially tested buffers achieved the desired peptide solubility level.

Only above pH 9.2 and below pH 3.0 were solubility levels of 2 mg/ml observed. Nevertheless, at the initial stage, formulations with acetate buffer and citrate buffer (with Mannitol as a tonicity agent) were selected for initial toxicology studies. These formulations were tested for biological activity and proven active.

Non aqueous solvents (see table 1) such as Ethanol, Glycerin, Propylene glycol, Chremophore and their combinations were tested but did not increase the solubility of Compound 1. A solution of 30% DMA (dimethyl-acetamide) yielded solubility in the desired ranges (5 to 9 mg/ml), but was not suitable for a pharmaceutical formulation due to its toxicity profile. Improved solubility was also observed using 30% (w/w) PEG 400 (5 to 9 mg/ml). This latter formulation was chosen for the toxicology studies, but it has proved to be both inactive in the biological assay, and may have been the cause of some adverse effects in a mouse toxicity study. Thus, it was decided not to further pursue this formulation. In view of the preliminary experiments non-aqueous solvents were not used in the subject formulations.

Several amino acids (see table 1) including L-Arginine, L-Glutamic acid, L-Glycine and L-Lysine were tested to improve the protein solubility. The solubility of the peptide in L-Arginine was at the desired level but the resulting pH was above 9. An attempt to decrease the pH or use an Arginine HCl salt resulted in precipitation of the peptide. Human Serum Albumin was also tested and improved the solubility of the peptide at low peptide concentrations (1 mg/ml) (see table 3). However, due to its potential immunogenicity and the low peptide solubility, it was not utilized in further experiments.

Bulking agents (see table 1) including Mannitol, Sorbitol and Dextran were tested alone and in combination with other excipients, but did not improve the solubility of the peptide in solution.

Co-solvents (see table 1), including Polysorbate 20 and Polysorbate 80 were tested alone and in combination with other excipients. While lower concentrations of Polysorbates (up to 6%) did not improve the solubility of the peptide, higher concentrations (up to 10% - see table 2) improved the solubility of the peptide up to 2 mg/ml. However, such high concentrations of Polysorbates were deemed unsuitable for pharmaceutical formulations.

Two types of cyclodextrins, both approved for use in marketed parenteral products, were also tested: Hydroxypropyl-β-cyclodextrin and Sulfobutylether-β-cyclodextrin (Captisol). Both markedly increased the solubility of the peptide (concentrations in the levels of 10 mg/ml for Hydroxypropyl-β-cyclodextrin and 2.5 for Captisol). The biological activity of the two cyclodextrin formulations was tested and was found to be equal to the activity of the peptide alone.

CAPTISOL® is a commercially available polyanionic β-cyclodextrin derivative with a sodium sulfonate salt separated from the hydrophobic cavity by a butyl ether spacer group, or sulfobutylether (SBE). CAPTISOL® is the trade name for CyDex Inc.'s hepta-substituted sulfobutylether β-cyclodextrin (SBE7-β-CD) preparation (www.captisol.com). The structure of CAPTISOL® allows drug molecules to fit in the hydrophobic cavity, thereby isolating the drug molecule from the aqueous solvent. Because the outer surface of CAPTISOL® is hydrophilic, the solubility of the complexed drug molecule is thereby enhanced. The use of cyclodextrins to enhance the solubility of

drug molecules is disclosed in U.S. Patent Nos. 5,134,127 and 5,376,645, the entire contents of which are hereby incorporated by reference.

According to the literature of CyDex Inc., CAPTISOL® is safe when administered parenterally and does not exhibit the nephrotoxicity associated with beta-cyclodextrin. Relative to beta-cyclodextrin, CAPTISOL® provides comparable or higher complexation characteristics and superior water solubility in excess of 90 grams/100ml - a 50-fold improvement.

Conclusions

Several solubility enhancers were found to match the desired solubility range: DMA, PEG-400, dimethyl-acetamide, polyethylene glycol, polyoxylated castor oil, N-methyl-2-pyrrolidinone, 1-ethenyl-2-pyrrolidinone, Polysorbate 20, Polysorbate 80, Hydroxypropyl-β-cyclodextrin and Sulfobutylether-β-cycldextrin (Captisol®). Of these solubility enhancers both cyclodextrins have proven to be superior with respect to solubility, biological activity and stability. Thus, it was decided to select Captisol® as the solubility enhancer for use in Example 5 formulations and to further study both cyclodextrin formulations. The final formulation for the Example 5 clinical studies consists of: 120 mg/ml of Captisol in water with the desired amount of peptide (0.5, 1.0 or 2.5 mg/ml), and HCl and NaOH for pH adjustment.

Table 1: Solubility enhancers used for Compound 1 formulation development

Solubility enhancer classification	Solubility Enhancers
Solvents	Cremophor EL, CMC, Ethanol, DMA, Gycerin, Propylene Glycol, PEG 400, Monotioglycerol
Co-solvents	Polysorbate 20, Ploysorbate 80
Solubilizing agents	Argenine, HSA, Glycine, Creatinine, Glutamic acid, Lysine (acetate salt and free base), Captisol, Hydroxypropyl-β-cyclodextrin,
Bulking agents	Mannitol, Sorbitol, Dextrose, Lactose Dextran
pH Adjustment Agents	Citrate buffer, Acetate buffer, Sodium Carbonate

Table 2. List of Cosolvents and Stabilizers evaluated in Compound 1 Peptide Formulations.

Solubility Enhancer *	% Used	% of Standard amount from the literature	Amount of peptide added (mg/ml)	Assay,%	pH of formulation	Remarks
Albumin (HSA), Dextrose	1.5 1.5	0.4-5.0	5		6.0 Adjust. to 4.1	Insoluble
Albumin (HSA), Polysorbate 80, Glycine	1.0 0.6 2.0	0.4-5.0 0.8-4.0 0.2-2.1	5	-	5.8 Adjust. to 4.1	Insoluble
Arginine	1.5	0.8-1.6	15	93	9.8	Clear solution
Arginine HCl	2.0	0.8-1.6	5	-	3.5	Insoluble
Arginine Lactose	1.5 1.5	0.8-1.6	15	93	9.8	When the pH was lowered below 8.5 the peptide precipitated and the solution turned into gel
Captisol	10.0 20.0	Up to 30.0	10	86 89	4.9 Adjust. to 4.4	Turbid solution
CMC (carboxy methyl cellulose) in acetate	0.2 0.05M		5	90	5.0	For toxicology studies
Crestanine	0.8	Up to 0.6	5	-	6.1 Adjust. to 4.1	Insoluble
Cremophor EL Ethanol Dimethylacetamide	15.0 10.0 6.0	– 10.0 0.6-32.9 0.012-6.0	5	-	4.0	Very turbid
Dextran	4.0 to 15.0	3.0-30.0	5	-	3.9	Insoluble
Dimethylacetamide (DMA)	6.0-20.0	0.012-6.0	5	-	4.6	Insoluble

Solubility Enhancer *	% Used	% of Standard amount	Amount of peptide added (mg/ml)	Assay,%	pH of formulation	Remarks
Dimethylacetamide (DMA)	25.0	0.012-6.0	5	87	5.1	Clear solution
Dimethylacetamide (DMA)	30.0	0.012-6.0	10	93	5.1	Clear solution
Ethanol	10.0	0.6-32.9	5	-	-	Insoluble
Glutamic acid	2.0		5	-	3.7	When the pH was increased above 4 the peptide precipitated and the solution turned into gel
Glycerin	1.5	1.6-32.5	5	37	4.5	Insoluble
Glycerin	30.0	1.6-32.5	5	-	3.7	Insoluble
Glycerin, Polysorbate 80	10.0 0.6	1.6-32.5 0.8-4	5	12	6.5 Adjust. to 4.5	Insoluble
Glycine	0.4	0.2-2.1	5	-	4.6	Insoluble
Hydroxypropyl β-cyclodextrin	20.0	Up to 30.0	10	99	4.6	Clear solution
Lysine Acetate Salt	2.0		5	-	3.8	Insoluble
Lysine Free base	2.0		5	-	9.2	When the pH was lowered below 8 the peptide precipitated and the solution turned into gel
Mannitol in Citrate buffer	4.0 0.035M	2.0-10.0	5	38	3.4	For toxicology studies
Mannitol in acetate buffer	4.0 0.05M	2.0-10.0	5	32	4.3	For toxicology studies
Mannitol, Glycine	20.0 0.4	2.0-10.0 0.2-2.1	5	14	6.4 Adjust. to 4.5	Insoluble
Mannitol, Polysorbate 20	20.0 0.6	2.0-10.0 -	5	22	6.5 Adjust. to 4.5	Insoluble
Monothioglycerol	1.0	0.1-10.0	5	-	4.5	Turbid solution
PEG 400	30.0	Up to 30.0	5	88	4.2	Slightly opalescent

Solubility Enhancer *	% Used	% of Standard amount from the literature	Amount of peptide added (mg/ml)	Assay, %	pH of formulation	Remarks
PEG 400	30.0	Up to 30.0	10	89	4.2	Turbid solution
PEG 400 with DMA	30.0 6.0	Up to 30.0 0.012-0.6	5	94	4.2	Clear solution
PEG 400	10.0	6.0-18.0	5	58	4.2	Insoluble
PEG 400 DMA	10.0 10.0	Up to 30.0 0.012-0.6	5	-	4.3	Insoluble
PEG 400 Propylene glycol PG	10.0 10.0	Up to 30.0 10.0	5	-	4.1	Insoluble
PEG 400 Propylene glycol	18.0 50.0	Up to 30.0 10.0	5	100	4.2	Clear solution
Polysorbate 80	1.6	0.8-4.0	5	24	7.2 Adjust. to 4.5	Insoluble
Polysorbate 80	6.0	0.8-4.0	5	-	3.9	Insoluble
Polysorbate 80 Creatinine	6.0 0.6	0.8-4.0 up to 0.6	5	-	4.0	Insoluble
Propylene glycol PG DMA	10.0 10.0	10.0 0.012-0.6	5	-	4.2	Insoluble
Propylene glycol PG	10.0, 30.0	10.0	5	-	4.2	Insoluble
Sodium Carbonate	1.5		5	-	11.4	When the pH was lowered below 8.5 the peptide precipitated and the solution turned into gel
Sorbitol	5.0	10.0-25.0	5	-	6.9 Adjust. to 4.5	Turbid solution

Table 3: Compound 1 formulations at low peptide concentrations

Solubility Enhancer *	% Used	% of Standard amount from the literature	Amount of peptide added (mg/ml)	Assay,%	pH of formulation	Remarks
Albumin (HSA),	5.0	0.4-5.0	1.0	90	6.9	Clear solution
			2.5	-	Adjust. to 4.5	Turbid solution
Arginine	1.5	0.8-1.6	1.0	24	10.6	When the pH was lowered below 8.5 the peptide precipitated and the solution turned into gel
					Adjust. to 8.5	
Captisol	12.0	Up to 30.0	1.0	106	5.3	Clear solution
			2.5	100	6.5 to 8.5	
Dextran	20.0	3.0-30.0	1.0	69	4.8	Turbid solution
					Adjust. to 4.0	
Glycerin	30.0	1.6-32.5	1.0	-	4.8	Turbid solution
					Adjust. to 4.0	
Mannitol	4.0	0.8-4.0	1.0	64	4.7	Turbid solution
					Adjust. to 4.0	
Polysorbate 20	10.0	-	1.0	95	5.8	Clear solution
			2.5	88	Adjust. to 4.8	Clear with small amount of precipitation
Polysorbate 20	10.0	-	2.5	115	5.1	Clear solution
Mannitol	2.0	2.0-10.0			Adjust. to 4.3	
Polysorbate 80	4.0	0.8-4.0	1.0	91	5.5	Clear solution
	6.0-10.0		2.5	89	Adjust. to 5.0	Slightly turbid solution
Polysorbate 80	4.0	0.8-4.0	2.5	88	5.1	Slightly turbid solution
Mannitol	2.0	2.0-10.0			Adjust. to 4.4	
Propylene glycol PG	10.0	10.0	1.0	78	5.0	Turbid solution
					Adjust. to 4.4	
Sorbitol	20.0	10.0-25	1.0	52	4.5	Turbid solution

WO 2004/064787 PCT/US2004/000048

Example 2: Preparation protocol for solution of Compound 1 in Captisol®

Standard dissolution methods, such as mixing dry Compound 1 and dry Captisol® into water or adding Compound 1 to a prepared solution of Captisol® and water did not result in complete dissolution at the desired concentrations. Several different concentrations of both Compound 1 and Captisol® were tested at various pH levels. However, the following method for producing a solution of Compound 1 in Captisol® resulted in complete dissolution at the desired concentrations.

Materials: Captisol®, Compound 1 and water

Method:

1. Weigh the appropriate amount of Captisol® to give a final concentration of 120 mg/ml.
2. Add 80% of the final amount of water and mix for 10 minutes with a magnetic stirrer.
3. Weigh Compound 1 to give a final concentration of 2.5 mg/ml, 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml or 0.1 mg/ml.
4. Add the peptide to the Captisol® solution. Mix for 1 hour.
5. Raise the pH to obtain clear solution (in the 2.0 mg/ml formulation there might be a need to raise the pH slightly above 9). pH should be adjusted using HCl 1.0 N and NaOH 1.0 N. Mix for 10 minutes.
6. Correct the pH to the range of 7.5 to 8.5 if needed (using either HCl or NaOH 1.0 N).
7. Add water to final volume.

8. Filter the solution through a 0.2μ cellulose acetate filter.
9. Record final pH.
10. Dispense into aliquots and store at the proper temperature.

Example 3: Lyophilization of Compound 1 and Captisol® solution

The current lyophilization process differs from other lyophilization processes in that the percentage of solids in the formulation is high (12%) whereas lyophilized products normally contain between 5 and 10% solids.

Equipment

The freeze drier used was an Edwards lyophilizer Lyoflex 0.6. The equipment IQ/OQ was performed and checked for compliance by quality assurance prior to the process development.

Solutions of Compound 1 and Captisol® at concentrations of 0.5 mg/ml, 1.0mg/ml and 2.5mg/ml of Compound 1 were prepared. The fill-volume was adjusted 1 ml (1.05 gr).

Main process steps:

1. Freezing
2. Holding (at low temperature)
3. Drying under vacuum in two stages:
   - 3.1. Primary drying - shelf warming to an upper hold temperature, controlling shelf temperature at the upper hold level.
   - 3.2. Secondary drying - Pressure reduction to a minimal value at the upper hold shelf temperature.

Batches 1-3

Freezing - Freezing was from room temperature to -40°C within 2 hours. Shelves were held at -40°C for 3 hours.

Drying - Drying was performed at 110 µbar pressure. Shelf temperature was increased to 20°C over 13 hours and held at that temperature for additional 13 hours.

Total process time was 31 hours.

Results:

Water content results were:

Batch no. 1: 3.8%

Batch no. 2: 4.0% and

Batch no. 3: 4.9%

Batches 4 and 5

Since the water content results of the processes leading to batches 1, 2 and 3 were higher then the desired value, it was decided to add a secondary drying step at the same temperature and at low pressure.

Drying - Drying was performed at 110µbar pressure. Shelf temperature was increased to 20°C over 13 hours and held at that temperature for additional 13 hours (Batch 4) or 8 hours (Batch 5). Pressure was decreased to 10µbar for additional 5 hours.

Total process time was 36 hours.

Results:

Water content results were

Batch 4: Placebo: 3.0%,

1 mg/ml: 3.9%.

Batch 5: Placebo: 4.1%

Conclusions

As shown, a satisfactory lyophilization process for Compound 1 with Captisol® was developed. Due to the high percentage of solids and hence the condensed cake, the developed process is longer then the currently available lyophilization cycles for peptides and it exhibits an additional secondary drying stage. Table 4 summarizes the developed process.

Table 4

Step	Compound 1 (Peptide) with Captisol®
Loading	5°C
Freezing	2 hours to -40°C
Hold at low temp.	3 hours to -40°C
Primary Drying:	
Warm to 20°C	13 hours pressure 110µbar
Hold at 20°C	13 hours pressure 110µbar
Secondary drying:	
Hold at 20°C	5 hours , pressure 10µbar
Storage at	-20°C
Process time	36 hours

Example 4.

Examination of the in-vivo biological activity of the lyophilized compound solution (DP, 1 mg/vial, 12% captisol®)

The biological activity was monitored by inhibition of IL-2 secretion from Compound 1 reference standard (RS) specific T-cells following subcutaneous (s.c.) treatment with the lyophilized compound solution, i.e. the drug product (DP), at two concentrations. The results of the treatment are compared to those of treating mice with Compound 1 (RS) in phosphate buffered saline (PBS). The results are shown in the tables below and in Figure 2.

Experimental design:

1. Immunization — Day 0
   (Compound 1 RS emulsified with CFA, at all four footpads)

2. Treatment
   (s.c. at the back of the neck, in 200 µl solution) — Day 0

3. In-vitro activation with: — Day 10
   a. Compound 1 RS at concentrations of 0; 0.5; 1; 2.5; 5; 10; 25; 50 and 100 µg/ml
   b. a peptide with the reverse order of amino acids of Compound 1 (negative control).
   c. Con A (positive control).

4. Incubation of culture for 20 hrs at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator.

5. IL-2 measurement by ELISA.

94

Table of experimental Groups:

Group	Immunization with	Treatment
A	50 µg Compound 1 RS	50µg Compd. 1 RS in PBS
B		200µg Compd. 1 RS in PBS
C		50µg DP(batch 2)
D		200µg DP (batch 2)
F		Placebo (12 % captisol)

IL-2 Secretion from Compound 1(DP) Treated Mice Following In-vitro Activation with Compound 1 RS (pg/ml)

		Treated with:								
	Group	F	A		B		C		D	
Activator	Concentration of activator (μg/ml)	12% captisol® Ampulized	Compd. 1 RS 50 μg/mouse	% Inhib.	Compd. 1 RS 200 μg/mouse	% Inhib.	DP 50 μg/mouse	% Inhib.	DP 200 μg/mouse	% Inhib.
Con A	2.5	5,825	6,215		5,403		3,537		4,069	
Compd. 1 RS	0	BQL	BQL		BQL		BQL		BQL	
Compd. 1 RS	0.5	11	9		10		8		BQL	
Compd. 1 RS	1	10	BQL		BQL		BQL		BQL	
Compd. 1 RS	2.5	15	8	51	BQL	NA	6	61	6	62
Compd. 1 RS	5	20	9	55	8	60	10	48	7	63
Compd. 1 RS	10	25	16	36	11	58	13	48	8	67
Compd. 1 RS	25	29	15	48	11	63	16	45	13	56
Compd. 1 RS	50	40	21	47	15	62	20	50	12	69
Compd. 1 RS	100	42	25	41	18	58	24	43	15	64
	Average inhibition (%) (at the range of 5-100 μg/ml)			45.6		60.4		46.6		63.7

BQL = Below Quantitation Limit

NA = Not Applicable

Rows 1-4 not included in the curve

Example 5: Evaluation of Optimal Dose for Treatment

The following abbreviations are used in the following description:

CFA	Complete Freund's adjuvant
Con A	Concanavalin A
DP	Drug Product
DS	Drug Substance
EM-1	Enriched DCCM-1 Medium
EM-3	Enriched RPMI-1640 + fetal calf serum medium
FCS	Fetal Calf Serum
IFN-γ	Interferon-gamma
LN	Lymph Node
PBS	Phosphate Buffered Saline
RS	Reference Standard
s.c.	Subcutaneous
TB	Trypan Blue
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
WFI	Water for Injection

Introduction

A group of 20 mice were immunized with 50 μg/mouse of Compound 1 RS. The immunized mice were allocated to five treatment groups as follows: placebo, 25, 50, 100 and 200μg/mouse of Compound 1 DP (subcutaneous administration). Ten days post immunization and treatment, LN was extracted and single cell suspension was prepared. The *in-vitro* secretion of IFN-γ and TGF-β by the cultured cells in response to activation with several concentrations of Compound 1 RS was then measured.

Experimental design

1. Immunization -Day 0
2. Treatment with Compound 1 DP -Day 0

3. In-vitro activation of LN cells from treated mice -Day 10
4. Collection of culture media (for IFN-γ determination) -Day 12
5. Collection of culture media (for TGF-β determination) -Day 13
6. ELISA for IFN-γ
7. ELISA for TGF-β

Table 7: Experimental Groups

Exp. Group	Treatment		In-vitro activation	
	Article	Mice/group	Cells/well	Compound 1 RS concentration
A1	Control 12% Captisol®	4	2.5×10^6	Compound 1 RS 0-100 μg/ml
			5×10^6	
A2	25 μg/mouse	4	2.5×10^6	
			5×10^6	
A3	50 μg/mouse	4	2.5×10^6	
			5×10^6	
A4	100 μg/mouse	4	2.5×10^6	
			5×10^6	
A5	200 μg/mouse	4	2.5×10^6	
			5×10^6	

Materials and Reagents

Animals

Mice: 20 female BALB/c mice, supplied by Harlan animals breeding center, Rehovot.

Age at immunization (week+days): 10

Average weight of mice included in the experiment: 19.01 gr.

Materials

General reagents

70% ethanol was prepared from 96% ethanol by diluting with purified H_2O.

Preparation of Compound 1 solutions for immunization

CFA-Compound 1 RS emulsion (500 µg/ml, 50 µg/mouse) was prepared as follows:

1. 1.874 mg of Compound 1 was dissolved in 1.87 ml of WFI to yield a solution of 1 mg/ml.
2. The solution was tested with a pH indicator strip and found to have a pH of 5.
3. 1.5 ml of the solution were emulsified with 1.5 ml CFA resulting in a final concentration of 500 µg/ml.

Preparation of solutions for Treatment

Treatment was by a s.c. injection of 200 µl solution.

Preparation of 12% captisol® solution

1.2 gr of captisol® were dissolved in 10 ml of WFI to yield a solution of 12% captisol®.

Experimental procedure

Mice weighing

Mice were weighed before immunization. Average mice weight: 19.01 ± 0.97 gr

Immunization

The immunization was performed by injecting 100 microliters of the immunization emulsion (50 microliters into each hind footpad).

Treatment

Following the immunization step the mice were treated by s.c. injection of 200 μl from the designated Compound 1 DP or 12% captisol® treatment solutions, at the back of their neck.

In-vitro culture

Mice were sacrificed by cervical dislocation. LN were extracted from the hind legs and were transferred to a sterile petri dish containing about 5 mL RPMI. The cells were extracted by gentle squeezing of the tissue against a 200 micrometer mesh stainless steel net. The cells were collected and centrifuged at 300 G for 10 minutes at RT.

Single cell suspensions were prepared from pooled LN of each experimental group.

2.5 and 5.0 million cells/ml/well suspensions were cultured with Compound 1 RS (0-100 μg/ml) in EM-1.

Secretion of IFN-γ and TGF-β, as indication of cellular response, were determined by ELISA of culture media (48hrs for IFN-γ and 72hrs for TGF-β).

Table 8: The *in-vitro* experimental groups

Experimental Group	Treatment	In-vitro activation	
	Article	Cells/well	Activation substance concentration
A1-2.5	Control 12% Captisol®	2.5×10^6	Compound 1 RS 0; 3.125; 6.25; 12.5; 50 and 100 µg/ml Con A 2.5 µg/ml
A1-5		5×10^6	
A2-2.5	DP 25 µg/mouse	2.5×10^6	
A2-5		5×10^6	
A3-2.5	DP 50 µg/mouse	2.5×10^6	
A3-5		5×10^6	
A4-2.5	DP 100 µg/mouse	2.5×10^6	
A4-5		5×10^6	
A5-2.5	DP 200 µg/mouse	2.5×10^6	
A5-5		5×10^6	

Preparation of cell suspensions

Table 9: Results of cell counting and preparation of cell suspensions (10×10^6/ml)

Grp	Vol. (ml)	Dilutn. factor	Viable cells	Dead cells	%Viable cells	%Dead cells	Average viable cells	Total viable cells ($\times 10^5$)	EM-1 to add (ml) for suspension of 10×10^6 cells/ml
A1	10	16	115	--	100	--	112	179.2	17.9
			109	--	100	--			
A2	10	16	50	4	92.6	7.4	47.5	76	7.6
			45	2	95.7	4.3			
A3	10	16	80	4	95.2	4.8	80.5	128.8	12.8
			81	5	94.2	5.8			
A4	10	16	87	--	100	--	89	142	14.2
			91	--	100	--			
A5	10	16	120	2	98.4	1.6	112.5	180	18
			105	2	98.1	1.9			

Preparation of cell suspensions (5×10^6/ml)

The 10×10^6 cells/ml suspensions were diluted 1:2 by adding 5 ml EM-1 to 5 ml cells suspension.

Incubation of LN cells cultures in 48 wells plates

3 tissue culture plates were prepared. The following was added to each plate.

Background control (cells incubated with culture media)

0.5 ml of cells suspension
0.5 ml of culture media (EM-1)

System positive control (cells stimulated with Con A)

0.5 ml of cells suspension

0.5 ml of Con A 5 μg/ml in EM-1 (final conc. 2.5 μg/well)

Cells incubated with Compound 1 activation solutions (samples)

0.5 ml of cells suspension
0.5 ml of Compound 1 RS 6.25 - 200 μg/ml (final conc. 3.125 - 100 μg/ml/well)

Incubation of LN cells cultures in 96 wells plates

After the 48-wells plates were prepared, 96-wells plates were prepared by applying 100 μl from the cell suspension and 100 μl from the activation solutions.

The culture plates were incubated at 37°. C in a humidified 5% CO_2 incubator, for either 48 or 72 hrs.

Supernatants Collection

The cultured plates were centrifuged at 300 g for 10 minutes at RT. Supernatants (850 μl from each well) were transferred either to mirror plates or to tubes. The supernatant was then divided into working aliquots (two aliquots of 200 and one aliquot of 450 μl), in order to avoid repeated freeze/thawing of the samples. Each tube was labeled with the following details:

1. Experimental code and time post incubation.
2. Group and sample number
3. Activator and concentration.
4. Date of sup collection

The supernatants were stored at -20°C until used for ELISA.

Results

Table 10: Summary of Groups

Experimental Groups:				
Immunization		Treatment		In-vitro
Exp.Groups	Immunization dose	Sub group	Article	activation
A	50µg/mouse	A1	12% Captisol® Placebo control	Compound 1 RS 3.125-100µg/ml
		A2	Compound 1 25µg/M	
		A3	Compound 1 50µg/M	
		A4	Compound 1 100µg/M	
		A5	Compound 1 200µg/M	

Table 11-A: Final cytokine concentrations

Final cytokine (pg/ml) (2.5 million cells/well)

Compound 1 concentration	Placebo	50µg/M	100µg/M	200µg/M
3.125µg/ml	321.3	54.1	64.5	103.9
6.25µg/ml	236.6	81.8	116.1	126.1
12.5µg/ml	397.1	123.1	160.9	129.0
25µ/ml	655.5	215.1	262.8	240.3
50µg/ml	573.9	292.5	518.3	378.1
100µg/ml	926.0	531.8	582.7	524.1
Con A	322.6	358.2	337.4	BQL

Table 11-B: Final cytokine concentrations

Final cytokine (pg/ml) (5 million cells/well)

Compound 1 concentration	Placebo	25µg/M	50µg/M	100µg/M	200µg/M
3.125µg/ml	522.3	BQL	76.2	90.8	204.4
6.25µg/ml	634.8	BQL	109.2	157.8	244.1
12.5µg/ml	962.8	41.9	179.5	257.1	466.1
25µ/ml	967.4	70.0	277.9	421.7	660.5
50µg/ml	1338.8	104.2	373.4	739.7	922.5
100µg/ml	2010.2	165.2	547.0	995.5	1006.2
Con A	6839.8	2995.3	4837.0	10126.8	7722.8

The results are also presented in Figures 3-4.

Observations

IFN-γ secretion

1. In the placebo group, a linear dose response upon Compound 1 activation in-vitro was shown. This graph resembles the graph obtained for the Ex-vivo model with the same immunization dose (50µg/mouse) and culturing medium (EM-1).
2. There was a dose response upon Compound 1 activation in vitro within all the tested groups.
3. Significant inhibition of IFN-γ secretion was seen with all the doses used for treatment (an average of 95% inhibition with treated dose of 25µg/mouse). A reverse correlation between the dose served for treatment and % inhibition can be found, mainly when $5x10^6$ cells/well were used. When $2.5x10^6$ cells/well were used, treatment of animals with 50µg/mouse gave better inhibition than 100 or 200µg. The point of 25µg is missing (lack of cells).
4. A better inhibition was seen when $5x10^6$ cells/well were used instead of $2.5x10^6$ cells/well.
5. In the linear range of the graphs, SD of % inhibition was low.
6. A technical problem with Con A is apparent when $2.5x10^6$ cells/well were used.

TGF-β secretion

1. In the placebo group, no dose response upon in vitro activation with compound 1 was seen. TGF-β secreted level was below the detection limit of the ELISA in all other treatment groups.

Example 6: Optimizations of freeze drying cycle with Compound 1 and Captisol® for injection (0, 0.5, 1.0 and 2.5 mg/vial)

Purpose

The purpose of this study was to optimize the freeze drying cycle for Compound 1 with captisol® for injection to improve the shape of the lyophilization cake and avoid collapse and cracking. Thus it was decided to improve and optimize the lyophilization cycle. This cycle is transferred to the production lyophilizers for the manufacturing of the phase I batches.

Process optimization

Batches of peptide at concentrations of 0.5 mg/ml 1.0mg/ml, 2.5mg/ml and Placebo were prepared and several freeze drying cycles were performed. The freeze drier used was an Edwards lyophilizer Lyoflex 0.6.

Solubility, water content and cake appearance were tested.
According to the obtained results a new lyophilization cycle for Compound 1 was selected. Due to the high percentage of solids (12%) and hence the condensed cake, the new process is longer than the lyophilization cycle in Example 3 and exhibits an additional primary drying stage. Table 12 summarizes the differences between the processes.

This page is not part of

the document!

US2004000948 / 2004-064787

2/2

Date: Aug 5, 2004

Recipient: IB

Address: Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes Geneve 20 1211 CH

Table 12

Step	Lyoph. cycle for Compound 1 and Captisol® of Example 3	New Lyoph. cycle for Compound 1 and Captisol®
Loading	5°C	5°C
Freezing	2 hours to -40°C	6 hours to -45°C
Hold at low temp.	3 hours to -40°C	3 hours to -45°C
Primary Drying: Stage I Stage II Hold at 20°C (25°C)	to 20°C 13 hours pressure 110μbar - 13 hours pressure 110μbar	to -20°C 19 hours pressure 150μbar to 25°C 13 hours pressure 150μbar 8 hours pressure 150μbar
Secondary drying: Hold at 20°C	 5 hours pressure 10μbar	 -
Storage at	5°C	5°C
Process time	36 hours	49 hours

Example 7: Effect of Compound 1 (administered in Captisol®) on lupus symptoms in the SLE-prone (NZBxNZW)F1 female mouse

Patients participating in clinical trials are to be treated with Compound 1 using Captisol® (sulfobutyl ether beta-cyclodextrin sodium) as the excipient. For this reason, it was important to determine whether treatment of (NZBxNZW)F1 mice with the formulation of Compound 1 given in Captisol® would have the same beneficial effects on lupus symptoms as observed when this strain of mice was treated with Compound 1 in PBS.

To this end, (NZBxNZW)F1 female mice (about 8 months old) were divided into 3 groups that were treated subcutaneously once a week for 10 weeks either with Captisol® alone (n=8) or with 25 or 50 μg/mouse Compound 1 in Captisol® (n=9 and 10, respectively). These doses were selected since prior studies indicated that doses in this range were more effective in ameliorating SLE symptoms than the higher doses tested (100 and 200 μg/mouse). The

same batch of drug substance was used in this study and in the first Phase I clinical trial with Compound 1.

The mice were followed for anti-dsDNA antibodies and for proteinuria. When the mice were sacrificed, the intensity of ICD was determined in kidneys.

As can be seen in Figure 5, no significant differences between groups could be observed in the levels of dsDNA-specific antibodies after 10 treatment injections.

Table 13 also shows that the beneficial effect of treatment with Compound 1 could be observed starting from the 5th injection and it was sustained up to the 10th injection. The mean levels of proteinuria in the Captisol® control group were consistently higher than in the Compound 1 -treated groups. Table 13 also shows that a reduction in the intensity of ICD was observed in kidneys of both Compound 1 dose groups. There was an overall trend showing that the lower dose (25 µg/mouse) was more effective than the higher dose (50 µg/mouse) in reducing the clinical symptoms of SLE in these mice.

Table 13. Clinical Symptoms of SLE in (NZBxNZW)F1 Mice Treated with 25 or 50 µg/mouse Compound 1 (in Captisol®)

Study Group	Mean Proteinuria ± SEM (g/L) Number of Weeks Following Treatment Initiation 5	7	8	10	ICD[a] (Mean ± SEM)
Captisol®	1.81 ± 1.22 (n=8)	5.74 ± 3.13 (n=8)	4.5 ± 2.92 (n=7)[b]	4.46 ± 2.93 (n=7)[b]	2.29 ± 0.28 (n=7)
Compound 1 (50 µg/mouse)	0.75 ± 0.3 (n=10)	0.81 ± 0.3 (n=10)	1.09 ± 0.4 (n=10)	1.29 ± 0.3 (n=10)	1.90 ± 0.23 (n=10)
Compound 1 (25 µg/mouse)	0.16 ± 0.05 (n=9)	1.26 ± 1.09 (n=9)	0.5 ± 0.31 (n=9)	0.56 ± 0.3 (n=9)	1.22[c] ± 0.32 (n=9)

[a] ICD=Immune Complex Deposits. ICD intensity scale: 0=none; 1=moderate; 2=severe; 3=severe/extremely intense.
[b] The death of one animal with a high level of proteinuria resulted in a lower group mean.
[c] $p<0.05$ (compared to Captisol®-treated control mice; Mann-Whitney).

Figure 6 shows representative sections of one kidney from each treatment group. The top row sections are from a Captisol®-treated mouse, the mid-row sections are from a mouse treated with 50 µg/mouse Compound 1 and the bottom row sections are from a mouse treated with 25 µg/mouse Compound 1. It can be seen that the intensity of immune complex deposits observed in kidney sections of mice treated with Compound 1 (dissolved in Captisol®) at either dose level was much lower than that observed in the control group.

Example 8: Phase I Clinical Study

A Phase I, Multicenter,, Randomised, Double-Blind, Placebo Controlled, Single Dose, Four-Arm Study to Assess the Tolerability and Safety of Compound 1 in Captisol® Subcutaneous Injection in SLE Subjects.

This was the first clinical study with Compound 1 in captisol® in humans, conducted in France. Its main objective was to evaluate tolerability and safety of Compound 1 in captisol®, administered as a single sc injection to SLE subjects. Its

secondary objective was to evaluate immunological responses following a single sc dose of Compound 1 in captisol® in these subjects.

Thirty-six (36) subjects participated in the study. To be eligible for inclusion in the study, SLE patients must have fulfilled at least four criteria used for the diagnosis of lupus by the American College of Rheumatology. Patients must also have had stable, mild/moderate disease and score less than or equal to 10 on the SLE Disease Activity Index, SLEDAI.

Each patient received a single sc injection of reconstituted Compound 1 for injection or its matching placebo (Captisol®) according to the following group assignment:

- **Group A**: Placebo (Captisol®)
- **Group B**: 0.5 mg Compound 1 in Captisol®
- **Group C**: 1 mg Compound 1 in Captisol®
- **Group D**: 2.5 mg Compound 1 in Captisol®

A standard battery of safety tests, including blood and urine collection for laboratory tests, was performed at screening, during the day of dosing, at 24 hours post-dose and at 2, 4 and 8 weeks following dosing. Prior to dosing, and on scheduled follow-up visits, blood samples were withdrawn for SLE-related immunological tests, anti-Compound 1 antibodies and PBL proliferation assay. The following immunology tests were performed:

- Coomb's (direct and indirect)
- C3, C4 and CH50
- Total IgG, IgM and IgA
- ANA, anti-dsDNA (Farr assay), anti-ssDNA
- Anti-ENA (including anti-La, anti-Ro, anti-RNP, anti-Sm)
- Anti-cardiolipin antibodies
- VDRL

- FTA antibodies
- Rheumatoid factor

The safety and tolerability of Compound 1 in captisol® in the subject population was evaluated on the basis of the following criteria:

- Occurrence of AEs, including SLE flare
- Vital signs
- 12-lead ECG
- Changes in physical examination
- Routine clinical laboratory tests
- SLEDAI score
- Immunological test results

Phase Ia clinical study details

Study Principal Investigators and Respective Study Sites: Six (6) study centers in France:Prof. Jean Charles Piette (Hopital La Pitie Salpetriere, Paris), Prof Oliver Meyer (Hopital Bichat, Paris), Prof. Jean Revuz (Hopital Henri Mondor, Creteil), Prof. Loic Guillevin (Hopital Avicenne, Bobigny), Prof. Eric Hachulla (Hopital Claude Huriez, Lille Cedex), Prof. Xavier Mariette (Hopital Bicetre, Kremlin Bicetre).

Compound 1 (in captisol®), Placebo, Water for Injection-Ampoules, Dose and Mode of Administration:
Vials of Compound 1 in Captisol® (120mg/vial) were injected subcutaneously as a single dose per subject in the following dosages:
0.5 mg Compound 1/vial in Captisol®, 1mg Compound 1/vial in Captisol® and 2.5 mg Compound 1/vial in Captisol®.
Placebo for Compound 1: 120 mg Captisol®/vial (identical in appearance to vials of Compound 1 in Captisol®).

Methodology

This was a multi-center, randomized; double blind, placebo-controlled, four-arm study, using a single subcutaneous injection of Compound 1 or placebo. SLE patients were screened up to 21 days prior to baseline procedures. Each eligible subject was randomized to one of the 4 treatment groups: subcutaneous injection of either 0.5, 1 or 2.5 mg Compound 1 or its matching placebo. All subjects were admitted to the clinic on pre-dosing day. Each subject received a single dose of one of the above listed treatments. Subjects were discharged from the clinic 24 hours after dosing. Subjects were further monitored at weeks 2, 4 and 8 following dosing. Blood samples (serum and whole blood) for safety laboratory tests were withdrawn at Screening, Dosing Day (pre-dose), Day 2 (post dose), at Weeks 2, 4 and 8 (Termination visit). Blood samples for immunological tests were withdrawn at: Screening, Dosing Day (pre-dose) and at Weeks 4 and 8. Peripheral blood lymphocytes (PBL) proliferation was evaluated at Dosing Day (pre-dose) and at Weeks 2, 4 and 8.

Number of Subjects (total and for each treatment):
Thirty six (36) subjects were randomized into this study as follows; 9 subjects into the 0.5 mg treatment group, 9 subjects into 1 mg treatment group, 10 subjects into the 2.5 mg treatment group, and 8 subjects into the placebo treatment group.

Diagnosis and Main Criteria for Inclusion:
Eligible subjects for this study were SLE patients who fulfilled at least four diagnostic criteria of the American College of Rheumatology (ACR). Their disease condition had to be stable, mild to moderate with a score equal to or less than 10 on the SLE disease activity index, year 2000 updated (SLEDAI 2K).

Excluded from participation were SLE patients who reported unstable or severe asthma, stroke, acute myocardial infarction, unstable angina, cerebral hemorrhage and pulmonary embolism during the six months prior to study screening. SLE patients

who had any clinically significant or unstable medical or surgical conditions, diabetes mellitus, liver disease (cirrhosis, active hepatitis, portal hypertension, and/or ascites), clinically significant hypertension, a medical history of any malignancy, dialysis, or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) were also excluded from study participation.

Also excluded from study participation were SLE patients who underwent plasmapheresis or were treated during the three months prior to screening with one of the drugs listed below: prednisone 30mg/day or greater (or an equivalent dose of another corticosteroid), intravenous corticosteroids, intravenous immunoglobulin G (IgG), oral anticoagulants and any cytotoxic agents (e.g. azathioprine, chlorambucil, cyclophosphamide, mycophenolate mofetil, methothrexate, tacrolimus.

In addition, SLE patients initiating treatment with corticosteroids (more than ± 10 mg/day prednisone, or an equivalent dose of another corticosteroid) and/or anti-malarials, during the last 3 months prior to screening were excluded from the study.

While an effort was made to retain baseline SLE medical treatments throughout the course of the study, investigators could nevertheless change participant medical treatment at any time during the study to maintain and optimize patient welfare.

Criteria for Evaluation

Safety:

The following safety parameters were assessed at Screening, during the hospitalization and at follow-up visits including Termination visit: vital signs (systolic blood pressure, diastolic blood pressure, pulse, oxygen saturation, temperature and weight), 12-lead ECG, change in physical examination and

clinical routine laboratory safety tests. Adverse events were recorded at the Dosing Day and at each visit thereafter.

Immunology:

SLE-related immunological tests were performed at Screening, during the hospitalization and at follow-up visits including Termination visit.

Drug-related immunological responses were followed by using the PBL proliferation assay and anti-Compound 1 antibodies assay at the Dosing Day and at follow-up visits including Termination visit.

Disease Activity:

Disease activity assessment using the SLE disease activity index score, year 2000 updated (SLEDAI 2K) was assessed at Screening, during the hospitalization and at follow-up visits including Termination visit.

Statistical Methods:

SAS® version 9.0 software was used to analyze and present data collected during this study. No power calculation was performed and no formal hypothesis testing was conducted for this Phase Ia study.

Adverse Experiences

The incidence and the frequency of adverse experiences was presented by System Organ Class and preferred terminology according to MedDRA dictionary version 5.0. The data is tabulated by treatment group.

Clinical Laboratory Data

Descriptive statistics of laboratory values including number of observations, mean, standard deviation, minimum and maximum were determined for Screening, Day 1 (pre dose), Day 2, Week 2, 4 and

8 are presented by treatment group. Changes from baseline to each time point/visit are also presented for each visit by treatment assignment. Percent of abnormal results (low and high, where applicable) are presented on a parameter basis, by treatment group and visit/time point. Shift analyses from baseline to 24-hours post dose and from baseline to termination visit were performed.

Vital Signs

Descriptive statistics for vital signs including number of observations, mean, standard deviation, median, minimum and maximum values were determined for Screening, Day 1 (pre and post dose, and at each time point) Day 2, Weeks 2, 4 and 8 are tabulated by the assigned treatment. Changes from baseline to each time point/visit is presented in by visit and treatment assignment.

Weight

Descriptive Statistics of Weight (kg) at baseline, termination and change from baseline is presented by treatment group.

ECG

Descriptive statistics of ECG parameters at baseline, termination and changes from baseline are presented. Shift analysis is presented as tables of shift from baseline to termination between normal/abnormal or present/absent ECG parameters. Potentially clinically significant (PCS) QTc (Bazett) measurements were identified according to the predefined criteria. Tables of shift analysis between PCS and non-PCS Absolute QTc (Bazett) and incidence table of PCS change in QTc (Bazett) from baseline to any visit are presented.

Physical Examination

Physical examination results are analyzed by incidence of subjects with abnormal or normal findings for each body system

at Baseline and Termination visit. Shift analysis between normal to abnormal and vice versa was also applied. When no change from baseline occurred, it was defined as "other".

Compound 1 related immunological tests

For immunological parameters, descriptive statistics, including number of observations, mean, standard deviation, median, minimum and maximum values were calculated and are presented by treatment group and visit. Change from baseline to each follow-up visit is also presented by treatment group. Where applicable, number and percent of subjects with negative/positive results is presented by treatment group and visit.

SLEDAI 2K

Descriptive statistics, including mean, standard deviation, median, minimum and maximum values of SLEDAI 2K are presented.

Results of Phase Ia clinical study:

Subject Disposition and SLE Characteristics

Thirty six (36) study subjects entered and completed this study per protocol. The majority of subjects (34) in all treatment groups were female (94.4%) and Caucasian (30, 83.3%). The mean age for all treatment groups was 35.6 years (range of means from 32 to 39 years). Most of the subjects (91.7%) had between 4 to 6 American College of Rheumatology (ACR) diagnostic criteria and a mean group SLEDAI 2K score ranged from 2.1 to 4.1.

Safety Results

There was no prominent difference between study drug treatment groups and the placebo group in the incidence of AEs. The most common AEs in all groups were headache, classified as mild or moderate in nature and injection site reaction classified as mild in nature. Dose response was not seen. No serious adverse event (SAE) or AE classified as severe occurred during the study.

No clinically significant effect attributable to study drug was seen for hematology, biochemistry or urinalysis values.

No clinically significant effect attributable to the study drug was seen for vital signs parameters (systolic blood pressure, diastolic blood pressure, pulse, oxygen saturation).

No clinically significant effect attributable to the study drug was seen for temperature and weight.

No differences of clinical significance were seen between Compound 1 -treated groups and placebo for categorical ECG measurements and digitized ECG parameters. No PCS QTc absolute value and no QTc change from baseline > 60 msec was recorded. A similar number of subjects in Compound 1 -treated and placebo groups had QTcB change from baseline between 30 and 60 msec.

No clinically significant effects of Compound 1 on physical exam were noted.

Immunology Results

Evaluation of serum samples from all subjects indicated that a single subcutaneous administration of Compound 1 at the dose levels of 0.5, 1 and 2.5 mg/patient did not induce the development of anti-Compound 1 specific antibodies. Seven subjects had a response to Compound 1 above the cut-off. These elevated levels of antibodies were already present prior to dosing. No increase in the levels of antibodies was observed in the follow up period (two months) of the study. The sera of these subjects were analyzed for the isotype of the reactive antibodies. The response in two of the subjects was associated with the IgM isotype and with the IgG isotype in two others. None of the seven had specific IgE antibodies.

The peripheral blood lymphocytes (PBL) assay showed that 50 % of the subjects (18) were classified as responders (SI>2) with similar distribution in all treatment groups. The T cell response was relatively low and no association between Compound 1 treatment dose or concentration used in the assay and responder/ non-responder status could be detected, taking into consideration that only a single SC dose of the study drug was administered. Also, no indication of increased incidence of responder status over time was observed. The tetanus toxoid (TTX) assay that serves as a safety control shows that the response to TTX was preserved throughout the study period in all treatment groups indicating that Compound 1 in captisol® did not change the immunological response to TTX recall antigen.

The immunological findings are the result of the administration of only a single dose of the study drug Compound 1.

Disease Activity Results

No clinically significant effects of Compound 1 on the SLEDAI score (change of ≥ 3, ≤ 12 points) were noted during the study except for one subject in the 0.5 mg treatment group for whom a change in the SLEDAI score of 2 to 10 points was recorded between baseline and week 4 on the basis of an urinalysis showing pyuria. This urinalysis finding was not confirmed by the investigator as a lupus flare per protocol definition and was resolved with no treatment change.

Conclusions

This Phase Ia study showed that a single subcutaneous injected dose of Compound 1 of 0.5, 1 or 2.5 mg in 120 mg Captisol was safe and well tolerated and allows continuation to a phase Ib multiple dose study.

Example 9: Phase Ib Clinical Study

A Phase I, Multicenter, Bi-National, Randomized, Double-Blind, Four-Arm, Placebo Controlled, Multiple Dose Study to Assess the Tolerability and Safety of Compound 1 in Captisol® Subcutaneous Injections in SLE Subjects

This study is being performed in order to evaluate the safety and tolerability of repeated Compound 1 sc administration to SLE subjects. The study's secondary objective is to evaluate immunological responses following repeated sc administration of Compound 1 in Captisol® in SLE subjects.

Compound 1 is given in doses of 0.5, 1.0 or 2.5 mg in Captisol®. The investigational product is administered every other day (excluding weekends) for a total of 12 sc injections, i.e. 3 doses a week for 4 weeks. Subjects are monitored on planned visits scheduled at 2, 4, 8 and 12 weeks after start of dosing. Safety and tolerability are evaluated using tests similar to those described in the Phase Ia Clinical Study above.

Results

This Phase Ib study shows that multiple subcutaneous injected doses of Compound 1 of 0.5, 1 or 2.5 mg in 120 mg Captisol ® are safe and well tolerated.

Example 10. Detection of antibodies against peptides Ia, IIa and IIIa, and anti-1616 Id antibodies in the sera of SLE patients and healthy controls

Human SLE patients (32 patients) were bled and their sera were tested by ELISA for their ability to bind the peptides Ia, IIa and IIIa, a control peptide p195-212 (a myasthogenic peptide described in PCT publication No. WO 94/00148) or mAb 5G12.

Detection of the antibodies was conducted on plates that were coated with 10µg/ml of peptides Ia, IIa, IIIa, p195-212 or mAb 5G12, in PBS for 2 hr, washed and blocked with 1% ovalbumin

in PBS for an additional 2 hr. ELISA was continued as described after blockage in Example 2 of PCT International Publication No. 96/30057, using goat anti-human IgG polyclonal antibody conjugated to peroxidase.

As shown in Fig. 7, SLE patients exhibited significantly higher levels of antibodies that bind either peptide Ia (open squares), IIa (open diamonds), IIIa (open circles), or mAb 5G12 (open triangles), in comparison to healthy controls (peptide Ia-healthy = closed diamonds; peptide IIa-healthy = crossed circles; peptide IIIa-healthy = inverted open triangles; 5G12-healthy = half filled squares). No binding could be observed when either sera of patients or controls were tested on plates coated with the non-relevant peptide p195-212 (p195-212-SLE = crossed squares; p195-212-healthy = half filled diamonds). The results indicate a correlation between the whole antibody molecule and the CDR-based peptides on the level of antibody titers.

Example 11. Proliferation of PBL from SLE patients and healthy controls in the presence of human 16/6Id mAb and peptides

Peripheral blood lymphocytes (PBL) were isolated from the blood of SLE patients or healthy controls using ficol gradient. Thereafter, the PBL were incubated in the presence of different concentrations of the peptides Ia, IIa or IIIa, or the human 16/6 Id mAb for 24 hr, when a sample was taken for IL-2 measurement. The assay was continued for a total of 7 days, and ^{3}H-thymidine was added for the last 16 hr. Proliferation was detected by reading the amount of radioactivity incorporated into the DNA of the cells.

As is seen in Table 14, a lower proportion of the PBL taken from SLE patients reacted to the peptides or to the 16/6 Id mAb, when compared to the healthy controls. The results are expressed in percentage of responder (34% in the first line) and the actual number of patients (11 out of 32: 11/32).

Similar results were obtained when the levels of the IL-2 produced by the PBL in the presence of the peptides or the 16/6 Id mAb were tested, as shown in the next example.

Table 14. Proliferation of PBL from SLE Patients and Healthy Controls in Presence of mAb 16/6 Id and Peptides Ia-IIIa EMI29.1

	SLE Patients		Healthy Controls	
16/6 Id	34%	11/32	72%	18/25
pep Ia	21%	7/32	44%	11/25
pep IIa	9%	3/32	28%	7/25
pep IIIa	31%	10/32	60%	15/25

Example 12. Production of IL-2 by PBL of SLE patients and healthy controls in the presence of human mAb 16/6 Id and peptides

PBL were isolated from blood of SLE patients or healthy controls using ficol gradient, and were incubated as in Example 11. A sample of 50µl was removed 24 hr after the assay was started, and incubated in the presence of IL-2 sensitive cells (CTLD) for 24 hr, after which ^{3}H-thymidine was added for 16 hr, and the plates were harvested and counted on a beta counter.

As in Table 14, it can also be seen from Table 15 that a lower proportion of the PBL taken from SLE patients reacted to the peptides or to the 16/6, Id mAb, when compared to the healthy controls, thus indicating that the response to the peptide corresponds to that of T cells of the patient to the pathogenic human autoantibody.

Table 15: Production by PBL of SLE Patients and Healthy Controls in Presence of mAb 16/6 Id and Peptides Ia-IIIa

	SLE Patients		Healthy Controls	
16/6 Id	31%	10/32	66%	17/25
pep Ia	16%	5/32	56%	14/25
pep IIa	90/o	3/32	32%	8/25
pep IIIa	16%	5/32	64%	16/25

Example 13.

Synthesis of the human peptides hCDR1 and hCDR3

The human hCDR1 (SEQ ID NO:6) and hCDR3 (SEQ ID NO:7) are shown below.

GYYWSWIRQPPGKGEEWIG (hCDR1)

YYCARGLLRGGWNDVDYYGMDV (hCDR3)

The peptides were prepared by methods well-known in the art, for example, by chemical solid phase or solution phase synthesis using an automated synthesizer by using the manufacturer's protocols for t-butyloxycarbonyl (t-Boc), fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) or other alpha-amino acid protecting group procedure essentially as described (see, for example, Peptides: Synthesis, Structure and Applications, ed. By B. Gutte, Academic Press, 1995; Peptide Synthesis Protocols, ed. by M. Pennington and B. Dunn, Humana Press,1994 ; Schnolzer M. et al., In situ neutralization in Bocchemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. Int. J. Pept. Protein Res. 40: 180-193,1992).

Example 14

Peptides hCDR1 and hCDR3 inhibit the proliferative response of PBL of SLE patients to the human16/6Id mAb.

Sixty-two patients, 9 males (14.5%) and 53 females (85.5%) with SLE participated in the study. The mean age at diagnosis was 32.95 ±12.92 (range 12-61) years and the mean follow-up period

was 10.98 ± 10.76 (range 1-32) years. All patients fulfilled at least 4 of the American College of Rheumatology (ACR) revised diagnostic criteria for SLE (Tan E.M. et al., *Arthritis Rheum* 25: 1271-77 (1982)). Patients were recruited from three Israeli Medical Centers (Kaplan, Rehovot; Ichilov, Tel Aviv; Asaf-Harofeh, Rishon Lezion). Disease activity was determined according to the SLEDAI lupus activity index (Bombardier C. et al., *Arthritis Rheum* 35: 630-40 (1992)). A control group of 36 sex- and age-matched healthy control volunteers was studied concomitantly with the SLE patients. The study was approved by the Ethical Committee of the Medical Center.

It was of interest to investigate whether the peptides hCDR1 and hCDR3, which are based on the CDR1 and CDR3 of the human 16/6Id mAb, are capable of inhibiting the specific proliferative responses of PBL of SLE patients to the human 16/6Id mAb. To this end, we first had to identify the patients whose PBL could be stimulated to proliferate by the human 16/6Id mAb (responders).

Therefore, PBL of 62 consecutive SLE patients were cultured in the presence of the human 16/6 Id and their proliferative responses and ability to secrete IL-2 were determined. PBL of 24 out of the total of 62 (39%) and of 23 out of 55 (42%) SLE patients tested responded (SI $\geq$ 2, range 2-5.6) by proliferation and by IL-2 secretion (SI $\geq$ 2, range 2-60), respectively. The frequency of responders in the group of SLE patients was lower than that observed in the group of healthy donors that was tested as control. Thus, PBL of 21 out of a total of 36 (58%) healthy donors responded by proliferation to the 16/6 Id. The extent of proliferation (SI levels) was similar for the SLE patients and for the healthy controls who responded to the 16/6 Id. However, as shown in Figure 8, the optimal response to the 16/6 Id of PBL of the control donors was observed at higher concentrations of 16/6 Id as compared to the SLE patients.

No differences could be demonstrated between gender and age of SLE patients that responded to the 16/6 Id and of the non-responder group of patients. However, the patients whose PBL proliferated in response to the 16/6 Id were sick for a shorter period of time (a mean of 9.78±8.36 vs. 11.73±12.06 years for responders and non-responders, respectively; $P \leq 0.036$). Table 16 summarizes the clinical characterization of the 16/6 Id responder and non-responder groups of SLE patients. As can be seen in the Table, both groups were similar in most SLE related clinical manifestations. The SLE disease activity score (SLEDAI) and the number of SLE diagnostic criteria were also similar in the two groups. Nevertheless, a higher frequency of neurological (both seizures and psychosis) and hematological involvement and a lower rate of renal involvement were noted in the responder group of patients in comparison to the group of non-responders. However, probably because of low number of patients in the relevant subgroups, the above differences did not reach statistical significance. Moreover, relatively less responder patients were determined between those treated with either steroids or cytotoxic agents at the time of the study. It is noteworthy that significantly more patients who never received steroids responded to the 16/6 Id in comparison to the non-responder group (54% vs 21% ; P=0.023).

It is noteworthy that the efficacy of the CDR-based peptides to inhibit the proliferative responses of PBL of healthy donors to the 16/6 Id was much lower than that observed for PBL of SLE patients (not shown).

Table 16. Clinical and laboratory characterization of SLE patients.

A: Diagnostic Criteria*

	All Patients	Responders	Non-responders
Number of Patients (%)	62(100)	24(39)	38(61)
Malar rash	19/62 (30.1)	8/24 (33.3)	11/38 (29)
Discoid rash	9/62 (15)	3/24 (12.5)	6/38 (16)
Photosensitivity	21/62 (34)	9/24 (37.5)	12/38 (32)
Mucosal ulcers	17/62 (27.4)	8/24 (33.3)	9/38 (23.7)
Arthritis	46/62 (74.2)	19/24 (79.2)	27/38 (71)
Serositis	14/62 (22.6)	5/24 (20.8)	9/38 (23.7)
Neurologic disorders‡	5/62 (8.1)	4/24 (16.7)	1/38 (2.7)
Renal disorder‡	24/62 (38.8)	7/24 (29.2)	17/38 (44.8)
Hematological disorders‡	44/62 (71)	19/24 (79.2)	25/38 (65.8)
ANA	61/62 (98.4)	24/24 (100)	37/38 (92.1)
A-dsDNA	54/62 (87.1)	19/24 (79.2)	35/38 (92.1)
APLA	35/62 (56.5)	12/24 (50.0)	23/38 (60.53)
B: Disease Activity			
SLEDAI Score	6.65±5.12	7.29±1.06	6.24±0.84
Number of ACR diagnostic criteria	5.44±1.39	5.54±0.33	5.34±0.2
C: Current Treatment			
NSAIDS	17/62 (27.4)	6/24 (25)	11/38 (29)
Anti-Malarial	37/62 (59.7)	15/24 (62.5)	22/38 (57.9)
Steroids†	33/62 (53.2)	11/24 (45.8)	22/38 (57.9)
Cytotoxic†	10/62 (16.1)	2/24 (8.3)	8/38 (21)

*Clinical involvement was defined according to the ACR revised criteria. Antinuclear antibodies (ANA) and anti-dsDNA antibodies were determined by Hep2 cells and *Crithidia luciliae*, respectively. Anti-phospholipid antibodies (APLA) were defined as activity in one or more of the following assays: false positive VDRL, lupus anti-coagulant (LAC) or ELISA for anticardiolipin antibodies.

† The anti-malarial agent, hydroxychloroquine, was used at a dose of 200-400 mg/day ; Steroid treatment was defined as a daily dose: 5mg of prednisone ; cytotoxic agents used were cyclophosphamide (0.75-1.0g/m^2 ; monthly) or azathioprine (100-150 mg/day).

‡ Parameters for which tendency was observed towards differences between the two groups of responder and non-responder SLE patients.

To test the ability of the peptides hCDR1 and hCDR3 to inhibit the proliferative response of PBL of SLE patients to the human 16/6Id mAb, PBL (2x10^5/well) of SLE patients were stimulated in vitro in triplicates with different concentrations (0.1-

20μg/well) of the human 16/6Id mAb in the absence or presence of the peptides hCDR1 and hCDR3 (either 50 or 100 μg/well). Following 6 days of incubation, ^{3}H-thymidine (0.5 μCi of 5 Ci/mmol) was added to each well for additional 18 hours of incubation. Cells were then harvested and radioactivity was counted using a β-counter. Results were expressed as mean counts per minute (cpm) of triplicate cultures. Stimulation indices (the ratio of mean cpm at the optimal concentration of 16/6Id to mean cpm without 16/6Id) were then calculated. A stimulation index (SI)≥2 was considered positive.

PBL of 24 out of the total of 62 (39%) SLE patients were found to proliferate to the 16/6Id mAb. The ability of the peptides hCDR1 and hCDR3 to inhibit the proliferative responses to the whole molecule of the 16/6Id autoantibody was tested on PBL of 19 responders SLE patients.

Table 17 shows the results of these experiments. Inhibition of above 50% of the proliferative capacity was considered positive. The Table represents the highest positive inhibition capacity for each peptide. It can be seen that the human hCDR1 and hCDR3 inhibited the proliferation of PBL of 16/19 (84.2%) and 15/19 (78.9%), respectively, of the 19 responders tested. Both peptides inhibited the proliferation of PBL of 18/19(95%) of responders tested. It can also be seen in the Table that the magnitudes of inhibitions were similar for both peptides. Thus, it can be concluded that peptides based on CDR1 and CDR3 of the human 16/6Id mAb are efficient inhibitors of the proliferation of PBL of SLE patients to the human 16/6Id mAb.

Table 17

Inhibition of proliferation of PBL of SLE patients by peptides hCDR1 and hCDR3.

Number	Percent Inhibition	
	hCDR1	hCDR3
1.	62	<50
2.	70	75
3.	69	<50
4.	<50	<50
5.	88.5	87.5
6.	80	80
7.	76	70.4
8.	58	56
9.	69.5	65
10.	68.2	71.8
11.	<50	72
12.	82	86
13.	63	64
14.	56	74
15.	63	69
16.	<50	68
17.	70.5	77.8
18.	51.5	<50
19.	63	60.8
Mean±SD	68.12±9.57	71.82±8.44

Example 15

Specificity of the inhibitory capacity of hCDR1 and hCDR3

It is important to demonstrate that the inhibitory effects of the hCDR-based peptides are specific to SLE-associated responses. To this end the peptides hCDR1 or hCDR3 were added to cultures of PBL of SLE patients that were stimulated with the mitogen phytohemagglutinin (PHA, 2 µg/ml). The results of such an experiment performed with PBL of one SLE patient is shown in Figure 9. The peptides hCDR1 and hCDR3 could not inhibit the proliferative responses (expressed in cpm) of the PBL to the mitogen PHA and the proliferative responses were similarly high

in the absence (black column) or presence of either hCDR1 or hCDR3.

In another experiment, cultures of PBL of SLE patients were stimulated with the human 16/6Id mAb and then incubated with the human peptides hCDR1 or hCDR3 or with the peptide IIIa as a control. The results of such an experiment performed with PBL of one SLE patient are shown in Figure 10. As shown in Figure 10, whereas both peptides hCDR1 and hCDR3 based on the human autoantibody inhibited efficiently the proliferative responses of PBL to the human 16/6Id mAb, the peptide mCDR3 based on the CDR3 of the murine antibody (i.e. peptide IIIa) did not inhibit the proliferation.

Two additional control peptides were used in these experiments, namely peptides synthesized at the reversed order of the Ia and IIIa peptides, and the results are shown in Figure 11. It can be seen that the two reversed peptides failed to inhibit significantly the proliferative responses of the PBL of the SLE patient to human 16/6Id mAb while peptides hCDR1 and hCDR3 did inhibit efficiently the proliferation, demonstrating that the inhibition of proliferation by the human hCDR-based peptides is specific to the peptides and to the SLE-associated T cell responses.

Example 16

Down-regulation of the secretion of IL-2 by PBL of SLE patients in the presence of the peptides hCDR1 and hCDR3

It was of interest to find out whether the hCDR peptides are capable of inhibiting IL-2 secretion by PBL of SLE patients following stimulation with the human 16/6Id mAb. Such inhibition might also suggest that the human CDR-based peptides inhibit the proliferative responses to the 16/6Id mAb at least partially by down-regulating IL-2 secretion. To this end, PBL of SLE patients were incubated with the human 16/61d mAb in the absence or

presence of the peptides hCDR1 or hCDR3. Supernatants of the cultures were collected following 48 hours of incubation. Assays to determine levels of IL-2 in the supernatants were performed using the CTLL IL-2 dependent line. Briefly, cells of the CTLL line ($2x10^4$/well) were incubated in the presence of the different supernatants for 24 hours, followed by the addition of ^3H-thymidine for an additional 18-hour incubation period. Cells were then harvested and radioactivity counted using a β-counter. Results were calculated based on recombinant human IL-2 used as a standard. The ability of the peptides to inhibit the IL-2 secretion of PBL of 23 responders stimulated by the human 16/6 Id was tested. The results, summarized in Table 18, show that hCDR1 and hCDR3 inhibited the secretion of IL-2 by PBL of 21/23 and 19/23 patients, respectively. Inhibition of proliferative responses of PBL directly correlated with IL-2 inhibition by the CDR-based peptides. Thus, inhibition of IL-2 secretion was observed in all cases where inhibition of proliferation were determined.

The results obtained with PBL of one SLE patient represented in Figure 12 (secretion of IL-2 is expressed in pg/ml) show that both hCDR1 and hCDR3 inhibited 100% of the IL-2 secretion by PBL of a SLE patient triggered by the human 16/6Id mAb.

Table 18. Inhibition of IL-2 secretion by hCDR1 and hCDR3

Peptide	Inhibitory Activity* %	Maximum inhibition %
hCDR1	91 (21/23)	84±31
hCDR3	83 (19/23)	78±34

*IL-2 secretion in the presence of 16/6 Id alone was considered as 100%. Inhibition of 50% or more was considered significant.

Example 17

Up-regulation of the secretion of the immunosuppressive cytokine TGF-β by CDR-based peptides

In attempts to shed light on the mechanisms by which the human CDR-based peptides inhibit the proliferative responses to the human monoclonal anti-DNA 16/6Id antibody, the levels of the immunosuppressive cytokine TGF-β in the supernatants of the cell cultures were determined. The rationale behind these experiments is based on our previous findings of elevated levels of TGF-β in cultures of splenocytes of mice with SLE either induced with the human anti-DNA 16/6Id mAb or spontaneous {(NZB x NZW) F1 mice} following treatment with the peptides based on mouse CDR (Eilat, E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A., 98, 1148 (2001)). The elevation in the levels of TGF-β correlated with amelioration of disease manifestations in the treated mice.

For this purpose, supernatants were removed from cultures of PBL of various SLE patients following 48 hours incubation with the human 16/6Id mAb in the absence or presence of the peptides hCDR1 or hCDR3. TGF-β was determined by ELISA according to the manufacturer's instructions. Briefly, Maxisorb plates (Nunc) were coated with recombinant human TGFβsRII/Fc chimera (R & D Systems) diluted in PBS (100 ng/ml). After blocking, cell supernatants were added. After 18 hours incubation the detecting biotinylated anti-human TGF-β antibody (R & D Systems) was added. The substrate solution used was the TMB Colour Reagent

(Helix Diagnostics) and enzyme activity was evaluated by the MRX ELISA reader using the 570 nm and 630 nm filters. The results are summarized in Table 19.

The results in Figure 13 demonstrate that peptides hCDR1 and hCDR3 triggered a significant up-regulation in the secretion ofTGF-ss (expressed in pg/ml) by the PBL of one representative SLE patient that were stimulated with the pathogenic human 16/6Id mAb.

Table 19

Up-regulation of TGF-β secretion of 16/6 Id-induced stimulation of PBL of SLE patients with hCDR1 and hCDR3 peptides.

Peptide	Up-Regulation of TGF-β %	Maximum Up-regulation %
hCDR1	100 (19/19)	305±221
hCDR3	100 (19/19)	338±242

Secretion of TGF-β in the presence of 16/6 Id alone (mean63625 pg/ml) was considered as100%. Results are expressed as percent secretion above that in the presence of16/6Id alone.

Example 18

Activity of MMP-9 (but not of MMP-2) is elevated in sera of SLE patients

In the present example, we determined the levels of MMP-9 and MMP-2 in sera of 40 patients with SLE and we demonstrate that MMP-9 but not MMP-2 activity is significantly elevated in sera of SLE patients compared to healthy controls. High MMP-9 activity correlated with the presence of discoid rash, Raynaud phenomenon, pneumonitis, mucosal ulcers and the presence of anti phospholipid antibodies (APLA). In addition, elevated levels of MMP-9 correlated with SLE activity in the group of male patients.

Materials and Methods

Patients. Forty patients, 32 females and 8 males with SLE participated in this study. All patients revealed at least four of the revised diagnostic criteria of the American College of Rheumatism (ACR) for the diagnosis of SLE (Winchester RJ. Systemic lupus erythematosus pathogenesis. In: Koopman WJ, ed. Birmingham. Alabama: William and Wilkins,pp. 1361-91 (1996)). Twenty-five sex-and age-matched healthy volunteers served as a control group in our studies. The mean age of patients at diagnosis was 29±9.7 (range 15-48) years and the mean follow-up period was 11±10 (range 1-32) years. Disease activity was determined according to the SLEDAI lupus activity index (Bombardier et al., 1992) and by the BILAG index (Hay E.M. et al., *Q. J. Med.* 86: 447-58 (1993)). The study was approved by the ethic committee of the Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel.

Measurement of MMP-2 and MMP-9 by activit assay kits. Activities of MMP-2 and MMP-9 were measured by specific Biotrak MMP-2 or MMP-9 activity assay kits (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, UK) according to the manufacturer's instructions. Sera were diluted 1:100 and 1:32 for the determination of MMP-2 and MMP-9 activities, respectively. The appropriate standards were added in each assay. In order to measure the total content of the MMPs, activation of the pro form of the MMPs was performed using p-aminophenylmercuric acetate (APMA).

Measurement of MMP-2 and MMP-9 activities by gel zymography. MMP-2 and MMP-9 activities were tested by gelatin zymography. A 5µl sample of serum was separated by an 8% SDS-PAGE gel polymerized with 1 mg/ml gelatin. Gels were washed once for 30 min in 2.5% Triton X-100 to remove the SDS, and once for 30 min in the reaction buffer containing 50 mM Tris-HCI, 200 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$ and 0.02%(w/v) Brij 35 (pH 7.5). The reaction buffer was changed to a fresh one, and the gels were incubated at37°C for 24 h. Gelatinolytic activity was visualized by staining the

gels with 0.5% Coomassie brilliant blue and was quantified by densitometry.

Statistical analyses. The data were evaluated using chi-square or Fisher exact tests, unpaired t-test and two tailed *P*-values. Pearson, Spearman and multivariate analyses were also used.

Example 18 (i)

Activity of MMP-9 but not of MMP-2 is elevated in SLE

As described above and in PCT International Publication No. WO 02/067848, MMP-9 was shown to be involved in several autoimmune diseases as well as in animal models of SLE. Thus, we were interested in studying whether MMP-9 is also elevated in sera of SLE patients. For this purpose, we examined sera of 40 SLE patients and of 25 healthy controls by gel zymography, in which both MMP-9 and MMP-2 activities can be visualized. A representative gel is shown in Figure 14. As can be seen in this figure, levels of MMP-9 are elevated in the sera of SLE patients when compared to healthy controls. Densitometric analysis of the zymograms of sera of 40 SLE patients and 25 healthy controls indicated that the mean MMP-9 activity for SLE patients was 109±5.6 densitometry units and for the healthy controls, 76.5±4.2 densitometry units (P=0.0001). Activity values of above 85 densitometry units (mean of healthy controls + 2 s.e.) were considered high. The results demonstrated high activity levels of MMP-9 in 68% of the SLE patients. Only 3% of healthy controls exhibited high MMP-9 activity (P=0.001). Densitometric analysis of MMP-2 levels in the same serum samples revealed that the differences in MMP-2 activity between sera of SLE patients and of healthy controls were not significant. Thus values of 109±7 and of 123±5 (mean activity densitometry units ± s.e.) were determined for healthy controls and SLE patients, respectively (P=0.0531). To quantify the activity levels of MMP-9 and MMP-2 in the serum further, we used activity assay kits.

Figure 15 shows that the activity of MMP-9 is elevated by threefold in sera of SLE patients compared with sera of healthy controls, and this elevation is statistically significant (P=0.0302). In contrast, the differences in the levels of MMP-2 between the two groups are not significant (P=0.1254).

Since we, as well as others (Ebihara I. et al., *Am J Kidney Dis* 32: 544-50 (1998); Ebihara I. et al., *Nephron* 83: 169 (1999) detected high MMP-9 levels in sera of patients with non-SLE chronic renal failure (e. g. diabetes mellitus, hypertension) probably due to the retention of the enzyme, we analysed the correlation between levels of MMP-9 and kidney function in the group of SLE patients tested. No correlation was observed between creatinine levels and MMP-9 levels (r^2=0.01), indicating that the elevated levels of MMP-9 in SLE patients were not the result of retention of the enzyme due to renal impairment.

Example 18 (ii)

Correlation of MMP-9 activity with clinical and laboratory parameters

The elevation in the activity levels of MMP-9 in sera of SLE patients prompted us to look for possible correlation between clinical and laboratory parameters, and serum MMP-9 levels. Statistical analysis (chi-square or Fisher exact tests) was performed by investigating the number of patients with high and normal MMP-9 levels for each clinical manifestation (Table 20) as well as by taking into consideration the actual mean activity levels of MMP-9 for patients with or without a certain clinical symptom. The results were similar by both analyses. It is noteworthy that for all clinical symptoms, the percent of patients with elevated MMP-9 levels is much higher than that in the group of healthy controls. Levels of MMP-9 did not correlate with gender, duration of disease or the age of its onset (Pearson, Spearman).

Table 20 shows the clinical and laboratory characteristics of the SLE patients according to their MMP-9 activity levels (lower or equal to healthy controls=normal). High levels of MMP-9 correlated significantly with the presence of Raynaud phenomenon (P=0.0138) and APLA (P=0.041). A strong correlation could be observed with pneumonitis, discoid rash, neurological disorders and mucosal ulcers. However, the number of patients with the latter manifestations was too small to perform a statistical analysis. Multivariate analysis revealed that Raynaud phenomenon and low complement (C3, C4) levels are positively correlated with high MMP-9 levels (P=0.0001 and 0.0137, respectively). In contrast, photosensitivity, arthritis and hematological disorders are negatively correlated with MMP-9 activity levels (P=0.0381, 0.0014 and 0.0065, respectively).

Table 20

Clinical characteristics of SLE patients with high and normal MMP-9 activities according to their MMP-9 levels.

		MMP-9 LEVELS (%)	
		High	Normal
Number of Patients (%)	40(100)	27 (68)	13 (32)
Photosensitivity	13	8 (62)	5 (38)
Mucosal ulcers	9	8 (89)	1 (11)
Malar rash	9	7 (78)	2 (22)
Discoid rash	5	5 (100)	0 (0)
Raynaud phenomenon	8	8 (100)	0 (0)
Vasculitis	18	14 (78)	4 (22)
Arthritis	31	21 (68)	10 (32)
Serositis	9	7 (78)	2 (22)
Pneumonitis	4	4 (100)	0 (0)
Neurological disorders	4	4 (100)	0 (0)
Renal disorder	16	11 (69)	5 (31)
Hematological Disorders	29	18 (62)	11 (38)
ANA	40	27 (68)	13 (32)
ads-DNA	36	24 (67)	12 (33)
APLA	25	20 (80)	5 (20)
Low complement (C3,C4)	30	21 (70)	9 (30)

Clinical involvement was defined according to the ACR revised criteria (Winchester, 1996). Anti-nuclear antibodies (ANA) and anti-ds DNA antibodies were determined by using Hep2 cells and *Crithidia lucilie*, respectively. Antiphospholipid antibodies (APLA) were defined as reactivity with one or more of the following assays: false positive VDR, lupus anti-coagulant (LAC) or ELISA for anticardiolipin antibodies.

We also looked for a possible correlation between SLEDAI and MMP-9 activity in male (Figure 16A) and female patients (Figure 16B). Interestingly, the correlation coefficient was significant and positive for men (r^2 = 0.6333) but insignificant and negative for women (r^2 = 0.0571). Similar results were obtained using the BILAG scoring system. Thus, a positive correlation coefficient

between MMP-9 activity and BILAG scores was observed for men (r^2 = 0.6442) and an insignificant one for women.

It was also of interest to determine whether a correlation exists between the use of various treatment modalities by the patients and MMP-9 activity. As can be seen in Table 21(A), there was no significant correlation between the current treatment of the patients and MMP-9 activity. However, when we looked at treatment of patients at any time during their disease course (Table 21(B)), high MMP-9 levels were associated with usage of cytotoxic agents (82%).

Table 21

Treatment modalities of SLE patients according to their MMP-9 levels.

	Total Number of Patients	MMP-9 Levels (%)	
		High	Normal
A. Current treatment.			
Cytotoxic agents	8	6 (75)	2 (25)
Steroids	23	17 (74)	6 (26)
Anti-Malarial	21	14 (67)	7 (33)
NSAID	7	5 (71)	2 (29)
B. Treatment along the follow up period.			
Cytotoxic agents	17	14 (82)	3 (18)
Steroids	29	19 (66)	10 (34)
Anti-Malarial	26	16 (62)	10 (38)
NSAID	18	12 (67)	6 (33)

The anti-malarial agent hydroxychloroquine was used at dose of 200-400 mg/day. Steroid treatment was defined as a daily dose $\geq$ mg of prednisone. Cytotoxic agents used were cyclophosphamide (0.5-1g/m^2 monthly) or azathioprine (100-150 mg/day).

Example 18 (iii)

Variations in MMP-9 activity in serum samples taken from individual SLE patients at different time points

Since disease activity varies over time, we measured the activity levels of MMP-9 and MMP-2 in the serum of individual patients that were sampled during 4-6 years of follow-up. Sera of nine patients taken at different time points were analysed. Levels of MMP-2 did not vary significantly between patients and healthy controls. In 5 out of the 9 patients tested, variations in MMP-9 activity in serum samples of individual patients could be observed with time. The results for 2 representative SLE patients are shown in Figures 17A-B. As can be seen, MMP-9 activity, but not MMP-2 activity, has been changing with time in the same patients. These changes were not associated with disease activity indices as determined by either the SLEDAI or BILAG systems. Changes in MMP-9 activity were not detected in sera of 5 healthy controls that were sampled at different time points (data not shown). In 4 other SLE patients, no substantial changes in MMP-9 or MMP-2 activity were observed with time, and MMP-9 activity levels remained either high or low, depending on the individual patient.

Discussion

The present study demonstrates for the first time the involvement of MMP-9 in human SLE. We show that the activity of MMP-9, but not MMP-2, is significantly elevated in sera of 68% of SLE patients compared with healthy controls. High MMP-9 levels correlated with Raynaud phenomenon, pneumonitis, neurological disorders, discoid rash and the presence of APLA. Changes in MMP-9 activity were observed in serum of the same patient at different periods of the disease. MMP-9 activity levels did not correlate with disease activity index (SLEDAI, BILAG) in female patients, but correlated with SLE activity in the group of male patients.

The present study shows that activity levels of MMP-2 are not elevated significantly in sera of SLE patients. These results are compatible with those reported previously (Zucker, S. *J Rheumatol*. 26,78 (1999)) that MMP-2 levels were not increased in SLE. Levels of MMP-2 were also constitutive and unchanged in other pathological conditions (like optic neuritis and multiple sclerosis) in which levels of MMP-9 were elevated relatively to the healthy controls (Gijbels K et al., *J. Neuroimmunol.* 41: 29-34 (1992).; Paemen, L. et al., *Eur. J. Neurol.* 1: 55-63 (1994)).

Involvement of an additional MMP, namely, MMP-3 was suggested in the pathogenesis of SLE, since it was significantly increased in sera of patients with SLE (Kotajima, L. et al., *Clin. Exp. Rheum.* 16: 409-415 (1998)). The frequency of SLE patients with elevated MMP-9 activity (68%) shown in the present example, resembles the frequencies reported (Kotajima et al., 1998) for high MMP-3 levels in SLE (76%) and in RA (82%) patients. Furthermore, the MMP-3 transcript was shown to increase significantly with the progression of nephritis in (NZB x NZW) F1 mice (Nakamura, T. et al., *Clin. Sci.* 85:295-301 (1993)).

The origin of the elevated MMPs in sera of SLE patients is not known. MMP-9 has been shown to be secreted by peripheral blood cells such as T cells, neutrophils, and macrophages (for review, see Goetzl, E. J. et al., *J. Immunol.* 156: 1-4 (1996)). The fact that no correlation was found between MMP-9 activity levels and the number of peripheral blood cells in the patients may suggest that MMP-9 was not secreted by peripheral blood immune cells but rather, by SLE-affected organs like kidneys or lungs/pleura. The observation that all SLE patients with pneumonitis exhibited high MMP-9 activity levels may suggest the diseased lung as a source of high MMP-9 levels. Moreover, the association between cytotoxic treatment, which represents the severity of SLE-related organ impairment, and high levels of MMP-9 in the sera

may also support the notion that the diseased organs are the source of MMP-9 activity in SLE patients. Nevertheless, the possibility still exists that less peripheral blood lymphocytes secreted higher activity levels of MMP-9.

TNF-α and IL-1 were shown to play an important role in the pathogenesis of SLE both in the human disease (Dean G.S. et al., *Ann Rheum Dis* 59: 243-51 (2000)) and in murine models (Segal R. et al., *J Immunol* 158: 3009-16 (1997); Theofilopoulos A.N. et al., *Ann Rheum Dis* 58 (suppl): 149-55 (1999); Eilat et al., 2001). It has been shown in several systems that these cytokines induce MMP-9 production (Guedez, L. et al., *Crit. Rev. Oncogenesis* 7: 205-225 (1996)), and thus, it is possible that the induction of the latter MMPs is part of the pathogenic effect of these cytokines in SLE. It has been reported that levels of MMP-9, that are secreted spontaneously by peripheral blood monocytes of healthy individuals, were upregulated upon exposureto TNF-α and IL-1β (Saren P. et al., *J Immunol* 157: 4159-65 (1996)). In addition, MMPs of both T cells and macrophages facilitate secretion of TNF-α by cleavage of the membrane-bound form (Gearing A.J.H. et al., *Nature* 370:555-7 (1994)). Thus, these examples demonstrate the mutual regulatory effects of MMP on the proinflammatory cytokines and vice versa. Nevertheless, the fact that in the sera of some of the patients the activity levels of MMP-9 remained within the normal range during the follow-up period, whereas high activity levels of MMP-9 were measured in the sera of most patients, may suggest the involvement of genetic factors in the regulation of the latter.

The results herein indicate that MMP-9 might play a role in the pathogenesis of SLE, and that measurement of plasma/serum activity levels of this metalloproteinase may provide important information when monitoring patients treated with drugs that interfere with MMP-9 activity.

What is claimed is:

1. A pharmaceutical composition comprising:

an aqueous carrier;

from 0.1 mg/ml to 20 mg/ml of the composition of a pharmaceutically acceptable salt of

a) a peptide comprising at least 12 and at most 30 consecutive amino acids having a sequence corresponding to

(i) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a human monoclonal anti-DNA 16/6 Id antibody, or

(ii) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a pathogenic anti-DNA monoclonal antibody that induces a systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease response in mice, or

b) a peptide comprising consecutive amino acids having the sequence

(i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11)
wherein X$_1$ is Met, Ala or Val; X$_2$ is Gln, Asp, Glu or Arg; X$_3$ is Trp or Ala; X$_4$ is Val or Ser; and X$_5$ is Lys, Glu or Ala;

(ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEQ ID NO:12)
wherein X$_6$ and X$_7$ are each Thr, Val or Ala; X$_8$ is Tyr or Phe; X$_9$ is Asn or Asp; X$_{10}$ is Gln or Glu; X$_{11}$ is Lys or Glu, and X$_{12}$ is Phe or Tyr;

(iii) YYCARX$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$PYAX$_{17}$X$_{18}$YWGQGS (SEQ ID NO:13)

wherein X_{13} is Phe, Thr or Gly; X_{14} is Leu, Ala or Ser; X_{15} is Trp or Ala; X_{16} is Glu or Lys; X_{17} is Met or Ala, and X_{18} is Asp, Lys or Ser;

(iv) $GYNX_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}SHGX_{25}X_{26}LEWIG$ (SEQ ID NO:14)
wherein X_{19} is Met or Ala; X_{20} is Asn, Asp or Arg; X_{21} is Trp or Ala; X_{22} is Val or Ser; X_{23} is Lys or Glu; X_{24} is Gln or Ala; X_{25} is Lys or Glu, and X_{26} is Ser or Ala;

(v) $YYCARX_{27}X_{28}X_{29}YGX_{30}X_{31}X_{32}GQTL$ (SEQ ID NO:15)
wherein X_{27} is Ser or Phe; X_{28} is Gly or Ala; X_{29} is Arg, Ala or Glu; X_{30} is Asn or Asp; X_{31} is Tyr or Phe, and X_{32} is Trp, His or Ala;

(vi) $X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}PX_{36}X_{37}GX_{38}EWIG$ (SEQ ID NO:16)
wherein X_{33} is Gly or Thr Gly; X_{34} is Arg or Lys; X_{35} is Pro or Ser; X_{36} is Gly or Glu; X_{37} is Lys or Asp; and X_{38} is Glu, Leu or Ser;

(vii) $YYCARX_{39}LLX_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}DVDYX_{45}GX_{46}DV$ (SEQ ID NO:17)
wherein X_{39} is Gly or Phe; X_{40} is Arg or Ala; X_{41} is Gly or Ala; X_{42} is Gly or Ala; X_{43} is Trp or Ala; X_{44} is Asn or Ala; X_{45} is Tyr or Trp; X_{46} is Met or Gln;

(viii) FSGYYWS (SEQ ID NO:8);

(ix) EINHSGSTNYKTSLKS (SEQ ID NO:9); or

(x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEQ ID NO:10), or

c) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence of any of a) and b), or at least two of the sequences in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x), or

d) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence comprising at least two identical sequences included in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x); and

a solubility enhancer selected from the group consisting of dimethyl-acetamide, polyethylene glycol, polyoxylated

castor oil, N-methyl-2-pyrrolidinone, 1-ethenyl-2-pyrrolidinone, polyoxyethylene sorbitan esters, and a substituted β-cyclodextrin,

wherein both the peptide and the solubility enhancer are dissolved in the aqueous carrier; and

wherein the composition has a pH between 4 and 9.

2. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein at least 0.5 mg/ml of the composition is the pharmaceutically acceptable salt of the peptide.

3. The pharmaceutical composition of claim 1 or 2, wherein the peptide has a sequence selected from the group consisting of:

NH_2- Thr Gly Tyr Tyr Met Gln Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Lys Ser Leu Glu-Trp Ile Gly-COOH (SEQ ID NO:1);

NH_2- Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr-COOH (SEQ ID NO:2);

NH_2- Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Leu Trp Glu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser-COOH (SEQ ID NO:3);

NH_2- Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly-COOH (SEQ ID NO:4);

NH_2- Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Arg Tyr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Thr Leu -COOH (SEQ ID NO:5);

NH_2-Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly-COOH (SEQ ID NO:6);

NH_2-Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val-COOH (SEQ ID NO:7);

NH_2- Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser-COOH (SEQ ID NO:8);

NH_2- Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Lys Thr Ser Leu Lys Ser-COOH (SEQ ID NO:9); and

NH2- Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val-COOH (SEQ ID NO:10).

4. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the

peptide comprises consecutive amino acids having the sequence

$X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}PX_{36}X_{37}GX_{38}EWIG$ (SEQ ID NO:16)

wherein X_{33} is Gly or Thr Gly; X_{34} is Arg or Lys; X_{35} is Pro or Ser; X_{36} is Gly or Glu; X_{37} is Lys or Asp; and X_{38} is Glu, Leu or Ser.

5. The pharmaceutical composition of any one of claims 1-4, wherein the solubility enhancer is a substituted β-cyclodextrin.

6. The pharmaceutical composition of claim 5, wherein the substituted β-cyclodextrin is a hydroxypropyl, a sulfobutyl ether, or asulfopropyl ether substituted β-cyclodextrin.

7. The pharmaceutical composition of claim 6, wherein the substituted β-cyclodextrin is a substituted sulfobutyl ether β-cyclodextrin.

8. The pharmaceutical composition of any one of claims 1-7, wherein the concentration of peptide in solution is at least 1 mg/ml.

9. The pharmaceutical composition of any one of claims 1-7, wherein the concentration of peptide in solution is at least 2.5 mg/ml.

10. The pharmaceutical composition of any one of claims 1-9, wherein the composition has a pH between 6.5 and 8.5.

11. The pharmaceutical composition of claim 10, wherein the composition has a pH between 7.5 and 8.5.

12. The pharmaceutical composition of any one of claims 1-11, wherein the pharmaceutically acceptable salt is an acetate

salt.

13. The pharmaceutical composition of claim 5, wherein the pharmaceutically acceptable salt is an acetate salt, and the substituted β-cyclodextrin is hepta-(sulfobutyl ether)-β-cyclodextrin.

14. A method of alleviating symptoms of systemic lupus erythematosus (SLE) in a human subject comprising administering to the human subject the pharmaceutical composition of any one of claims 1-13 in an amount effective to alleviate the symptoms of the SLE in the human subject.

15. The pharmaceutical composition of any one of claims 1-13 for use in treating SLE in a human subject.

16. A process for manufacturing the pharmaceutical composition of any one of claims 1-13 comprising the steps of:

e) preparing a solution of dimethyl-acetamide, polyethylene glycol, polyoxylated castor oil, N-methyl-2-pyrrolidinone, 1-ethenyl-2-pyrrolidinone, polyoxyethylene sorbitan esters, or a substituted β-cyclodextrin in an aqueous carrier at a predetermined concentration;

f) adding a predetermined amount of a pharmaceutically acceptable salt of ,

1) a peptide comprising at least 12 and at most 30 consecutive amino acids having a sequence corresponding to

(i) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a human monoclonal anti-DNA 16/6 Id antibody, or

(ii) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a pathogenic anti-DNA monoclonal antibody that induces a systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease response in mice,

2) a peptide comprising amino acids having the sequence

(i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11)
wherein X$_1$ is Met, Ala or Val; X$_2$ is Gln, Asp, Glu or Arg; X$_3$ is Trp or Ala; X$_4$ is Val or Ser; and X$_5$ is Lys, Glu or Ala;

(ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEQ ID NO:12)
wherein X$_6$ and X$_7$ are each Thr, Val or Ala; X$_8$ is Tyr or Phe; X$_9$ is Asn or Asp; X$_{10}$ is Gln or Glu; X$_{11}$ is Lys or Glu, and X$_{12}$ is Phe or Tyr;

(iii) YYCARX$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$PYAX$_{17}$X$_{18}$YWGQGS (SEQ ID NO:13)
wherein X$_{13}$ is Phe, Thr or Gly; X$_{14}$ is Leu, Ala or Ser; X$_{15}$ is Trp or Ala; X$_{16}$ is Glu or Lys; X$_{17}$ is Met or Ala, and X$_{18}$ is Asp, Lys or Ser;

(iv) GYNX$_{19}$X$_{20}$X$_{21}$X$_{22}$X$_{23}$X$_{24}$SHGX$_{25}$X$_{26}$LEWIG (SEQ ID NO:14)
wherein X$_{19}$ is Met or Ala; X$_{20}$ is Asn, Asp or Arg; X$_{21}$ is Trp or Ala; X$_{22}$ is Val or Ser; X$_{23}$ is Lys or Glu; X$_{24}$ is Gln or Ala; X$_{25}$ is Lys or Glu, and X$_{26}$ is Ser or Ala;

(v) YYCARX$_{27}$X$_{28}$X$_{29}$YGX$_{30}$X$_{31}$X$_{32}$GQTL (SEQ ID NO:15)
wherein X$_{27}$ is Ser or Phe; X$_{28}$ is Gly or Ala; X$_{29}$ is Arg, Ala or Glu; X$_{30}$ is Asn or Asp; X$_{31}$ is Tyr or Phe, and X$_{32}$ is Trp, His or Ala;

(vi) X$_{33}$YYWSWIX$_{34}$QX$_{35}$PX$_{36}$X$_{37}$GX$_{38}$EWIG (SEQ ID NO:16)
wherein X$_{33}$ is Gly or Thr Gly; X$_{34}$ is Arg or Lys; X$_{35}$ is Pro or Ser; X$_{36}$ is Gly or Glu; X$_{37}$ is Lys or Asp; and X$_{38}$ is Glu, Leu or Ser;

(vii) YYCARX$_{39}$LLX$_{40}$X$_{41}$X$_{42}$X$_{43}$X$_{44}$DVDYX$_{45}$GX$_{46}$DV (SEQ ID NO:17)

wherein X_{39} is Gly or Phe; X_{40} is Arg or Ala; X_{41} is Gly or Ala; X_{42} is Gly or Ala; X_{43} is Trp or Ala; X_{44} is Asn or Ala; X_{45} is Tyr or Trp; X_{46} is Met or Gln;

(viii) FSGYYWS (SEQ ID NO:8);

(ix) EINHSGSTNYKTSLKS (SEQ ID NO:9); or

(x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEQ ID NO:10), or

3) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence of any of a) and b), or at least two of the sequences in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x), or.

4) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence comprising at least two identical sequences included in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x);

g) adjusting the pH of the solution of step b) until the peptide dissolves in the solution; and

h) if necessary, adjusting the pH of the solution of step c) to a pH of 4-9, thereby manufacturing the pharmaceutical composition.

17. The process of claim 16, wherein the predetermined amount of peptide is such which results in a final concentration of peptide in the pharmaceutical composition of at least 0.1 mg/ml.

18. The process of claim 16, wherein the predetermined amount of peptide is such which results in a final concentration of peptide in the pharmaceutical composition of at least 0.5 mg/ml.

19. The process of claim 16, 17 or 18, wherein the predetermined amount of peptide is such which results in a final concentration of peptide in the pharmaceutical

composition of 2.5mg/ml, 2.0mg/ml, 1.0mg/ml, 0.5 mg/ml or 0.1 mg/ml.

20. The process of any one of claims 16-19, wherein step b) further comprises mixing the solution for 1 hour.

21. The process of any one of claims 16-20, wherein in step c) the pH is adjusted using HCl or NaOH 1.0N.

22. The process of any one of claims 16-21, further comprising filtering the solution of step d) through a cellulose acetate filter.

23. The process of claim 16, wherein

the predetermined amount of peptide is such which results in a final concentration of peptide in the pharmaceutical composition of 2.5mg/ml, 2.0mg/ml, 1.0mg/ml, 0.5 mg/ml or 0.1 mg/ml;

step b) further comprises mixing the solution for 1 hour; and

in step c) the pH is adjusted using HCl or NaOH 1.0N, further comprising filtering the solution of step d) through a cellulose acetate filter.

24. A composition prepared by the process of any one of claims 16-23.

25. A lyophilized pharmaceutical composition comprising from 0.1 mg/ml to 20 mg/ml of the composition of a pharmaceutically acceptable salt of

a) a peptide comprising at least 12 and at most 30 consecutive amino acids having a sequence corresponding to

(i) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a

heavy or a light chain of a human monoclonal anti-DNA 16/6 Id antibody, or

(ii) a sequence of amino acids found within a complementarity-determining region (CDR) of a heavy or a light chain of a pathogenic anti-DNA monoclonal antibody that induces a systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease response in mice, or

b) a peptide comprising consecutive amino acids having the sequence

(i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11)
wherein X$_1$ is Met, Ala or Val; X$_2$ is Gln, Asp, Glu or Arg; X$_3$ is Trp or Ala; X$_4$ is Val or Ser; and X$_5$ is Lys, Glu or Ala;

(ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEQ ID NO:12)
wherein X$_6$ and X$_7$ are each Thr, Val or Ala; X$_8$ is Tyr or Phe; X$_9$ is Asn or Asp; X$_{10}$ is Gln or Glu; X$_{11}$ is Lys or Glu, and X$_{12}$ is Phe or Tyr;

(iii) YYCARX$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$PYAX$_{17}$X$_{18}$YWGQGS (SEQ ID NO:13)
wherein X$_{13}$ is Phe, Thr or Gly; X$_{14}$ is Leu, Ala or Ser; X$_{15}$ is Trp or Ala; X$_{16}$ is Glu or Lys; X$_{17}$ is Met or Ala, and X$_{18}$ is Asp, Lys or Ser;

(iv) GYNX$_{19}$X$_{20}$X$_{21}$X$_{22}$X$_{23}$X$_{24}$SHGX$_{25}$X$_{26}$LEWIG (SEQ ID NO:14)
wherein X$_{19}$ is Met or Ala; X$_{20}$ is Asn, Asp or Arg; X$_{21}$ is Trp or Ala; X$_{22}$ is Val or Ser; X$_{23}$ is Lys or Glu; X$_{24}$ is Gln or Ala; X$_{25}$ is Lys or Glu, and X$_{26}$ is Ser or Ala;

(v) YYCARX$_{27}$X$_{28}$X$_{29}$YGX$_{30}$X$_{31}$X$_{32}$GQTL (SEQ ID NO:15)
wherein X$_{27}$ is Ser or Phe; X$_{28}$ is Gly or Ala; X$_{29}$ is Arg, Ala or Glu; X$_{30}$ is Asn or Asp; X$_{31}$ is Tyr or Phe, and X$_{32}$ is Trp, His or Ala;

(vi) X$_{33}$YYWSWIX$_{34}$QX$_{35}$PX$_{36}$X$_{37}$GX$_{38}$EWIG (SEQ ID NO:16)
wherein X$_{33}$ is Gly or Thr Gly; X$_{34}$ is Arg or Lys; X$_{35}$ is Pro or Ser; X$_{36}$ is Gly or Glu; X$_{37}$ is Lys or Asp; and X$_{38}$ is Glu, Leu or Ser;

(vii) YYCARX_{39}LL$X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}$DVDY$X_{45}GX_{46}$DV (SEQ ID NO:17) wherein X_{39} is Gly or Phe; X_{40} is Arg or Ala; X_{41} is Gly or Ala; X_{42} is Gly or Ala; X_{43} is Trp or Ala; X_{44} is Asn or Ala; X_{45} is Tyr or Trp; X_{46} is Met or Gln;

(viii) FSGYYWS (SEQ ID NO:8);

(ix) EINHSGSTNYKTSLKS (SEQ ID NO:9); or

(x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEQ ID NO:10), or

c) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence of any of a) and b), or at least two of the sequences in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x), or

d) a peptide comprising consecutive amino acids having a sequence comprising at least two identical sequences included in (a)(i), (a)(ii) and (b)(i) through (b)(x); and

a solubility enhancer selected from the group consisting of dimethyl-acetamide, polyethylene glycol, polyoxylated castor oil, N-methyl-2-pyrrolidinone, 1-ethenyl-2-pyrrolidinone, polyoxyethylene sorbitan esters, and a substituted β-cyclodextrin.

26. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 25 wherein at least 0.5 mg/ml of the composition is the pharmaceutically acceptable salt of the peptide.

27. A process of lyophilizing the pharmaceutical composition of any one of claims 1-13, comprising the steps of:

f) lowering the temperature of the pharmaceutical composition to -40°C;

g) holding the temperature at -40°C for a predetermined time;

h) raising the temperature of the solution to 20°C;

i) holding the temperature at 20°C for a predetermined time; and

e) reducing the pressure and holding the temperature at 20°C for a predetermined time, thereby lyophilizing the pharmaceutical composition.

28. The process of claim 27, wherein step a) is performed within 2 hours.

29. The process of claim 27, wherein step b) is performed within 3 hours.

30. The process of claim 27, wherein step c) is performed over 13 hours.

31. The process of claim 27, wherein step c) is performed at a pressure of 110μbar.

32. The process of claim 27, wherein step d) is performed over 13 hours.

33. The process of claim 27, wherein step d) is performed at a pressure of 110μbar.

34. The process of claim 27, wherein in step e) the pressure is reduced to 10μbar.

35. The process of claim 27, wherein step e) is performed over 5 hours.

36. The process of claim 27, wherein

step a) is performed within 2 hours;

step b) is performed within 3 hours;

step c) is performed over 13 hours and at a pressure of 110μbar;

step d) is performed over 13 hours and at a pressure of 110μbar; and

step e) is performed over 5 hours and the pressure is reduced to 10μbar.

37. A lyophilized pharmaceutical composition prepared by the process of any one of claims 27-36.

38. A process of lyophilizing the pharmaceutical composition of any one of claims 1-13, comprising the steps of:
f) lowering the temperature of the pharmaceutical composition to -45°C;
g) holding the temperature at -45°C for a predetermined time;
h) raising the temperature of the solution to -20°C;
i) raising the temperature of the solution to 25°C; and
j) holding the temperature at 25°C for a predetermined time, thereby lyophilizing the pharmaceutical composition.

39. The process of claim 38, wherein step a) is performed within 6 hours.

40. The process of claim 38, wherein step b) is performed within 3 hours.

41. The process of claim 38, wherein step c) is performed over 19 hours.

42. The process of claim 38, wherein step c) is performed at a pressure of 150μbar.

43. The process of claim 38, wherein step d) is performed over 13 hours.

44. The process of claim 38, wherein step d) is performed at a pressure of 150μbar.

45. The process of claim 38, wherein step e) is performed over 8 hours.

46. The process of claim 38, wherein step e) is performed at a pressure of 150μbar.

47. The process of claim 38, wherein

step a) is performed within 6 hours;

step b) is performed within 3 hours;

step c) is performed over 19 hours and at a pressure of 150μbar;

step d) is performed over 13 hours and at a pressure of 150μbar; and

step e) is performed over 8 hours and at a pressure of 150μbar.

48. A lyophilized pharmaceutical composition prepared by the process of any one of claims 38-47.

49. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 48, wherein the water content of the composition is less than 5%.

50. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 49, wherein the water content of the composition is less than 4.0%.

51. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 50, wherein the water content of the composition is less than 3.5%.

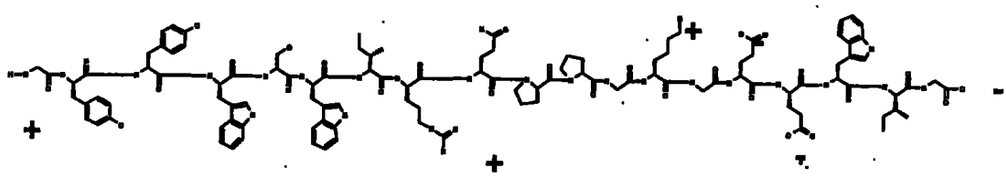
52. A packaged pharmaceutical composition comprised of:
a packaging material; and

a predetermined amount of the lyophilized pharmaceutical composition of claim 37 or 48.

WO 2004/064787

Figure 1

NH_2—G Y Y W S W I R Q P P G K G E E W I G—COOH



NH_2-Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly^{COOH}

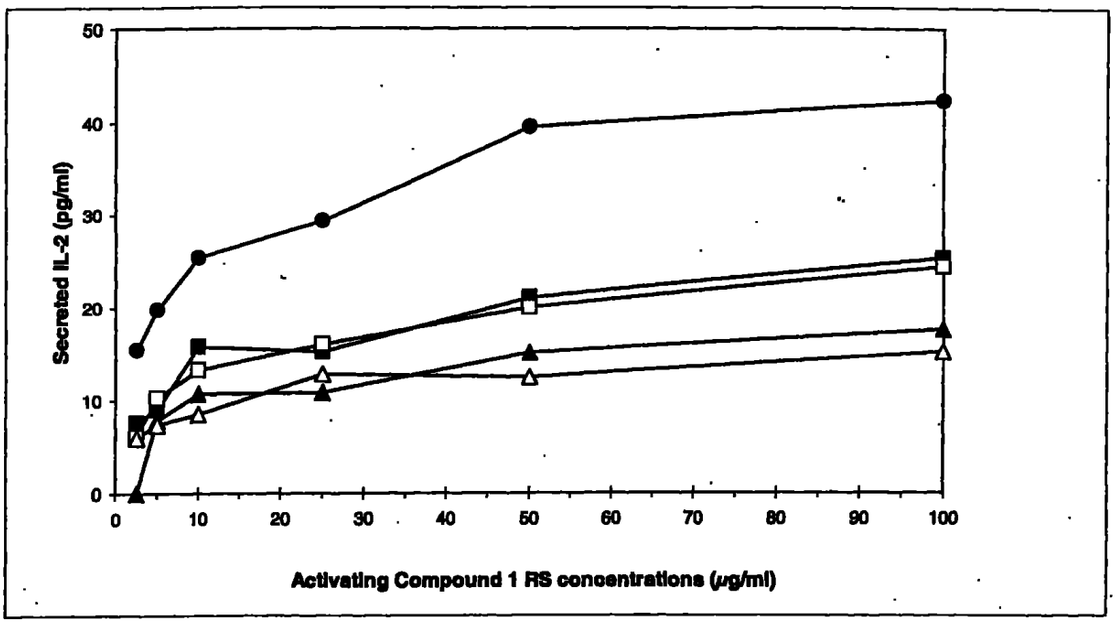
Molecular Weight =2309.59
Exact Mass =2307
Molecular Formula =$C_{111}H_{149}N_{27}O_{28}$
Molecular Composition =C 57.73% H 6.50% N 16.37% O 19.40%

Acetic to be added : CH_3CO_2H = $C_2H_4O_2$

$C_{111}H_{149}N_{27}O_{28}.\ C_2H_4O_2$

PCT/US2004/000948

Figure 2


Secreted IL-2 (pg/ml)
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Activating Compound 1 RS concentrations (µg/ml)

WO 2004/064787

PCT/US2004/000048

Figure 3

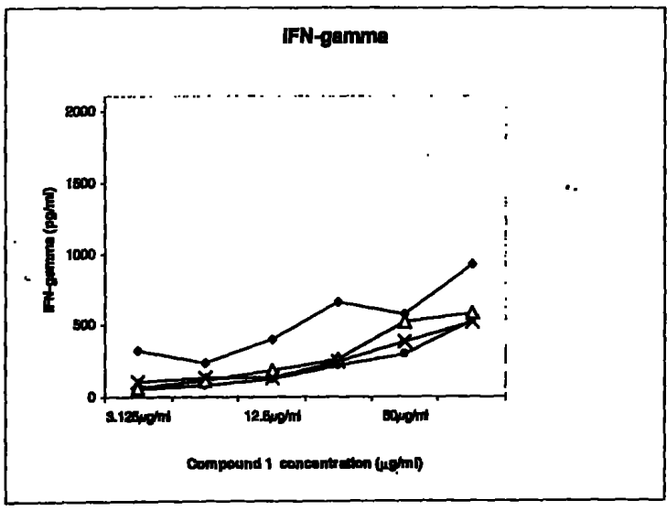


Figure 4

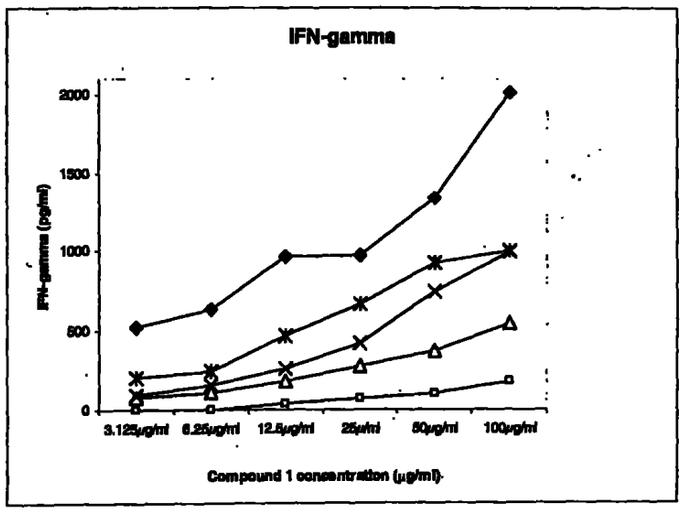

IFN-gamma
IFN-gamma (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
3.125µg/ml
6.25µg/ml
12.5µg/ml
25µ/ml
50µg/ml
100µg/ml
Compound 1 concentration (µg/ml)

Figure 5

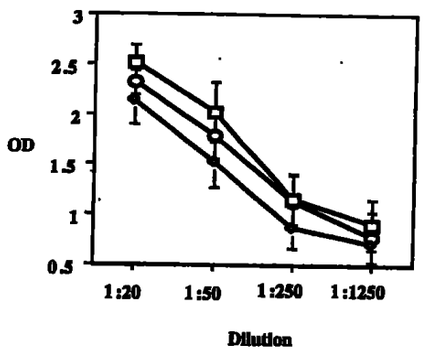
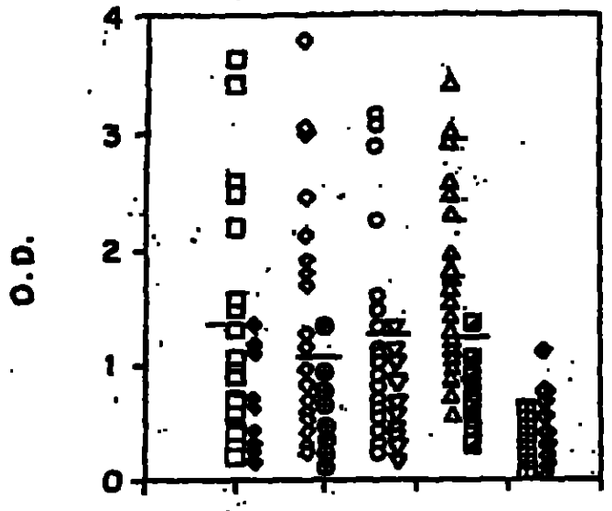


Figure 6

Fig. 7



- pep Ia-SLE
- pep IIa-SLE
- pep IIIa-SLE
- 5G12-SLE
- p195-212-SLE
- pep Ia-HEALTHY
- pep IIa-HEALTHY
- pep IIIa-HEALTHY
- 5G12-HEALTHY
- p195-212-HEALTHY

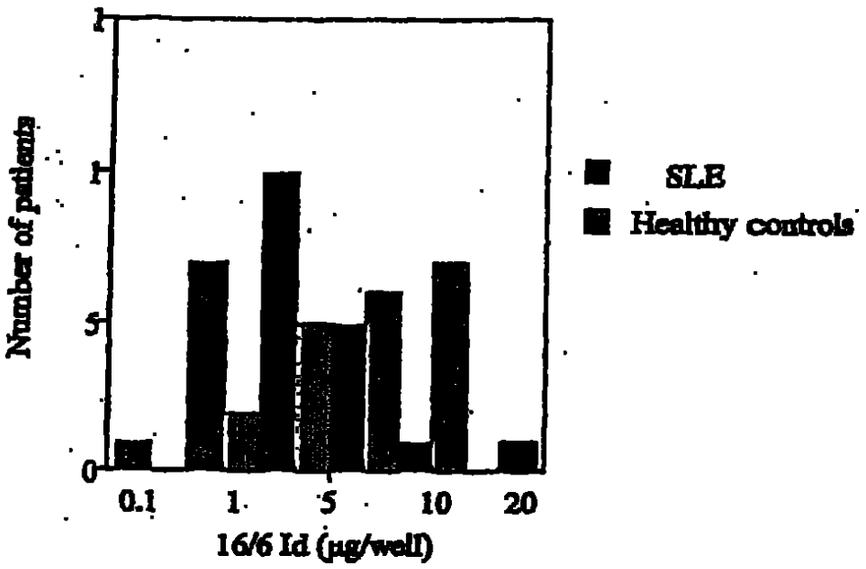

Number of patients
0
5
1
1
0.1
1
5
10
20
16/6 Id (µg/well)
SLE
Healthy controls

Fig. 8

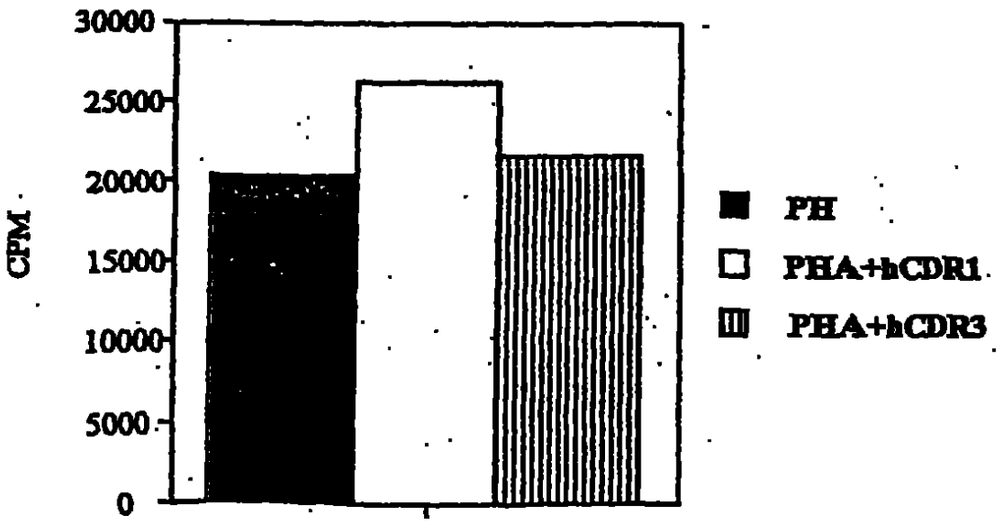

CPM
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
PH
PHA+hCDR1
PHA+hCDR3

Fig. 9

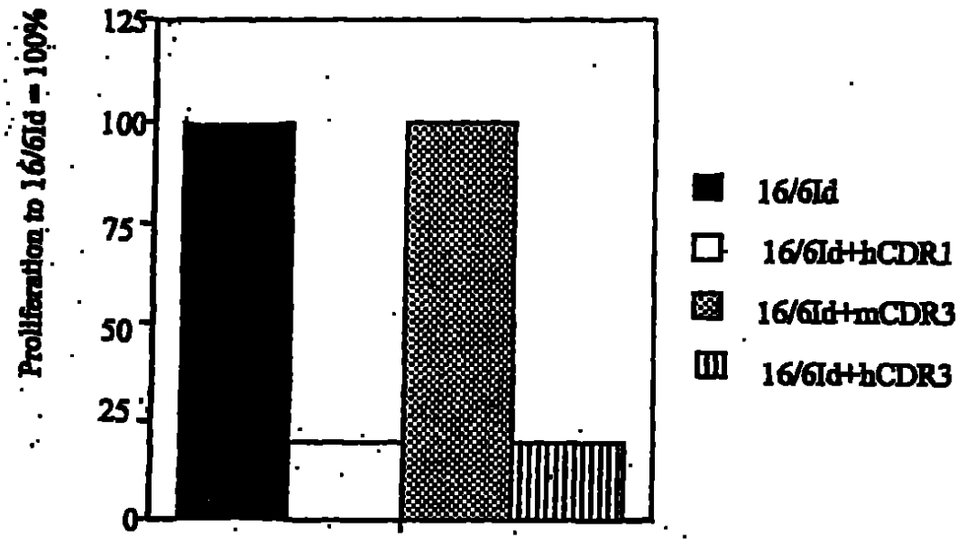

Proliferation to 16/6Id = 100%
125
100
75
50
25
0
16/6Id
16/6Id+hCDR1
16/6Id+mCDR3
16/6Id+hCDR3

Fig. 10

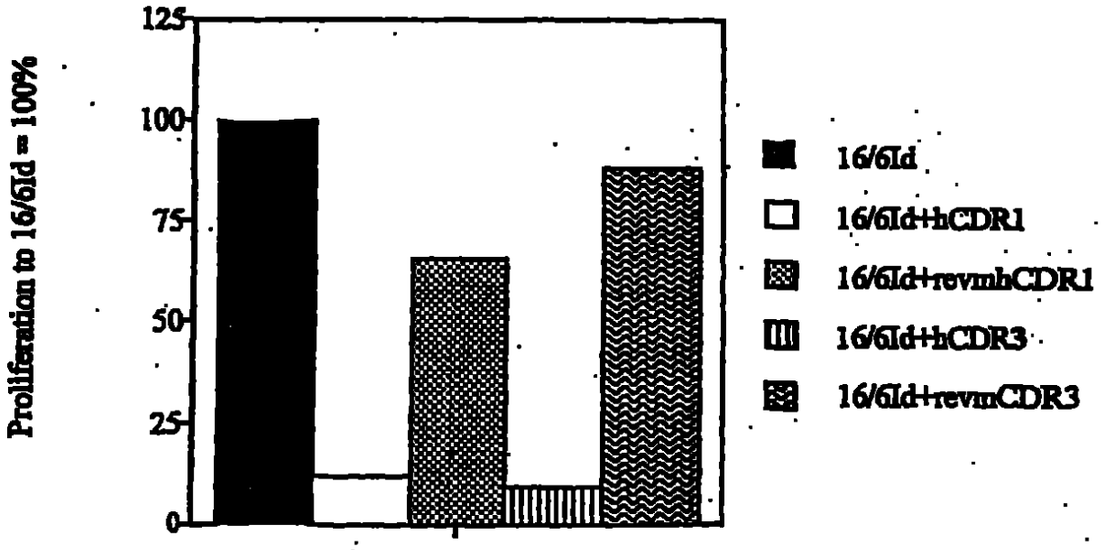

Proliferation to 16/6Id = 100%
125
100
75
50
25
0
16/6Id
16/6Id+hCDR1
16/6Id+revmhCDR1
16/6Id+hCDR3
16/6Id+revmCDR3

Fig. 11

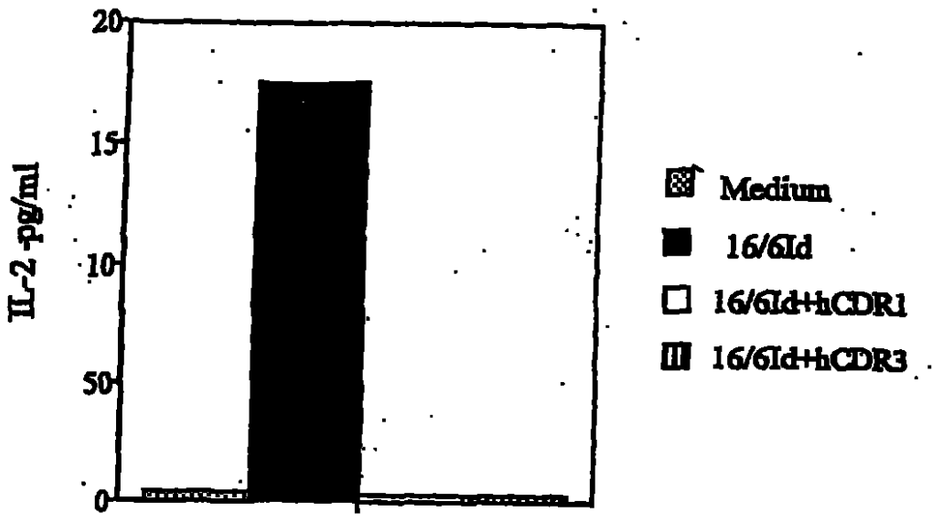

20
15
10
50
0
IL-2 -pg/ml
Medium
16/6Id
16/6Id+hCDR1
16/6Id+hCDR3

Fig. 12

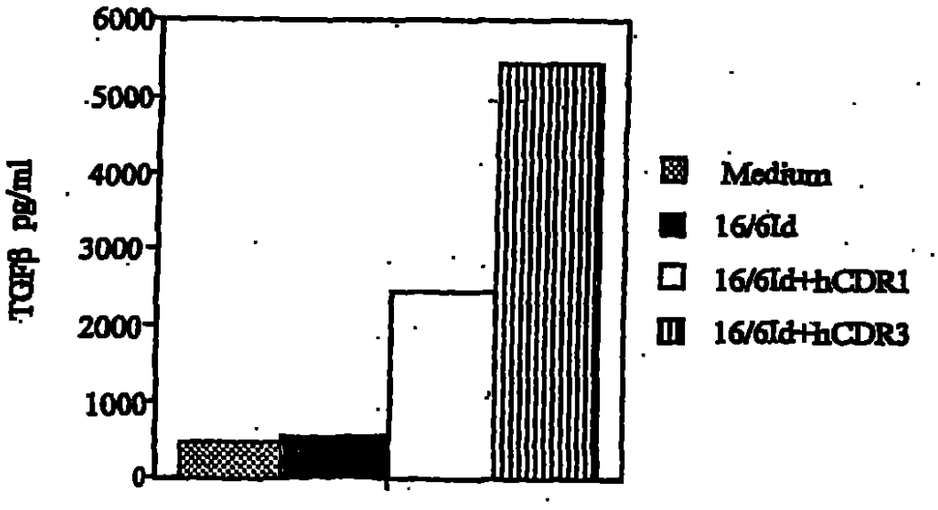

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
TGFβ pg/ml
Medium
16/6Id
16/6Id+hCDR1
16/6Id+hCDR3

Fig. 13

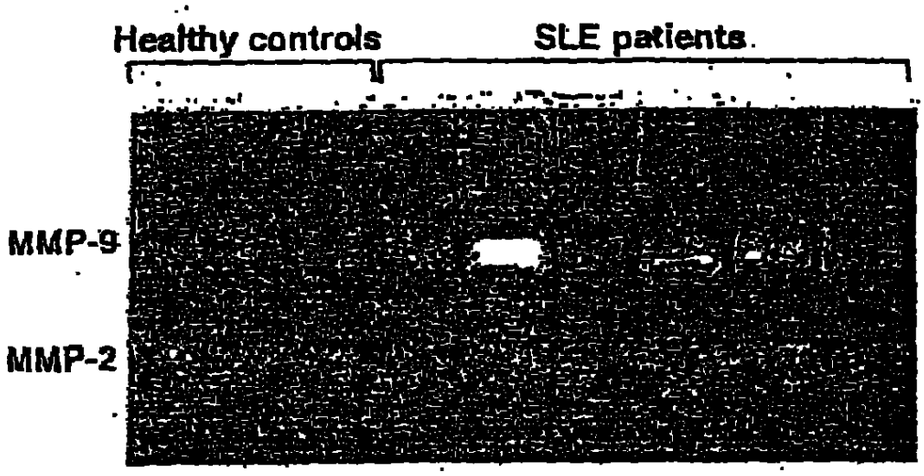

Healthy controls
SLE patients
MMP-9
MMP-2

Fig. 14

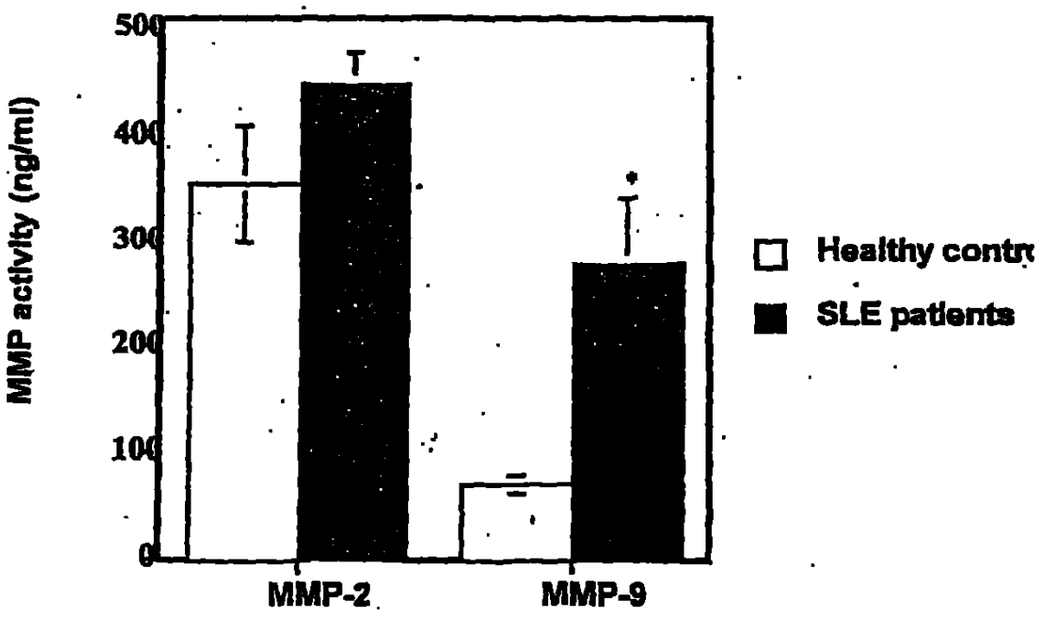

MMP activity (ng/ml)
500
400
300
200
100
0
MMP-2
MMP-9
Healthy contr
SLE patients

Fig. 15

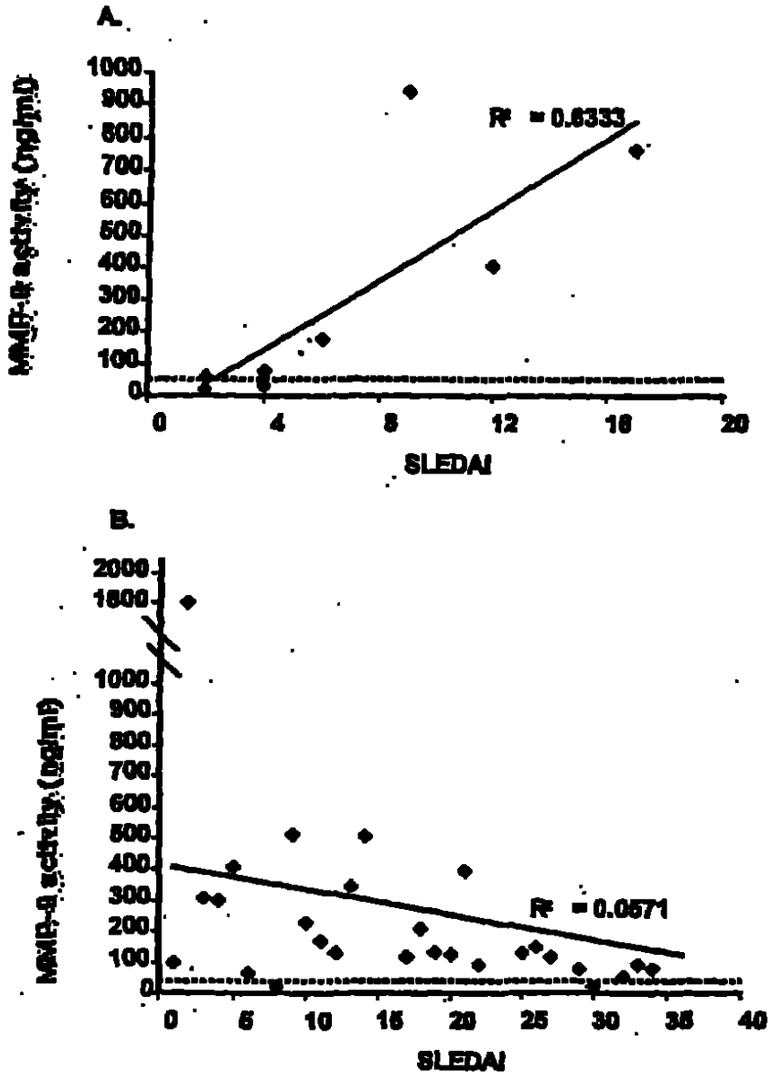

A.
MMP-9 activity (ng/ml)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
R² = 0.6333
0
4
8
12
16
20
SLEDAI
B.
MMP-9 activity (ng/ml)
2000
1600
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
R² = 0.0571
0
5
10
15
20
25
30
35
40
SLEDAI

Fig. 16

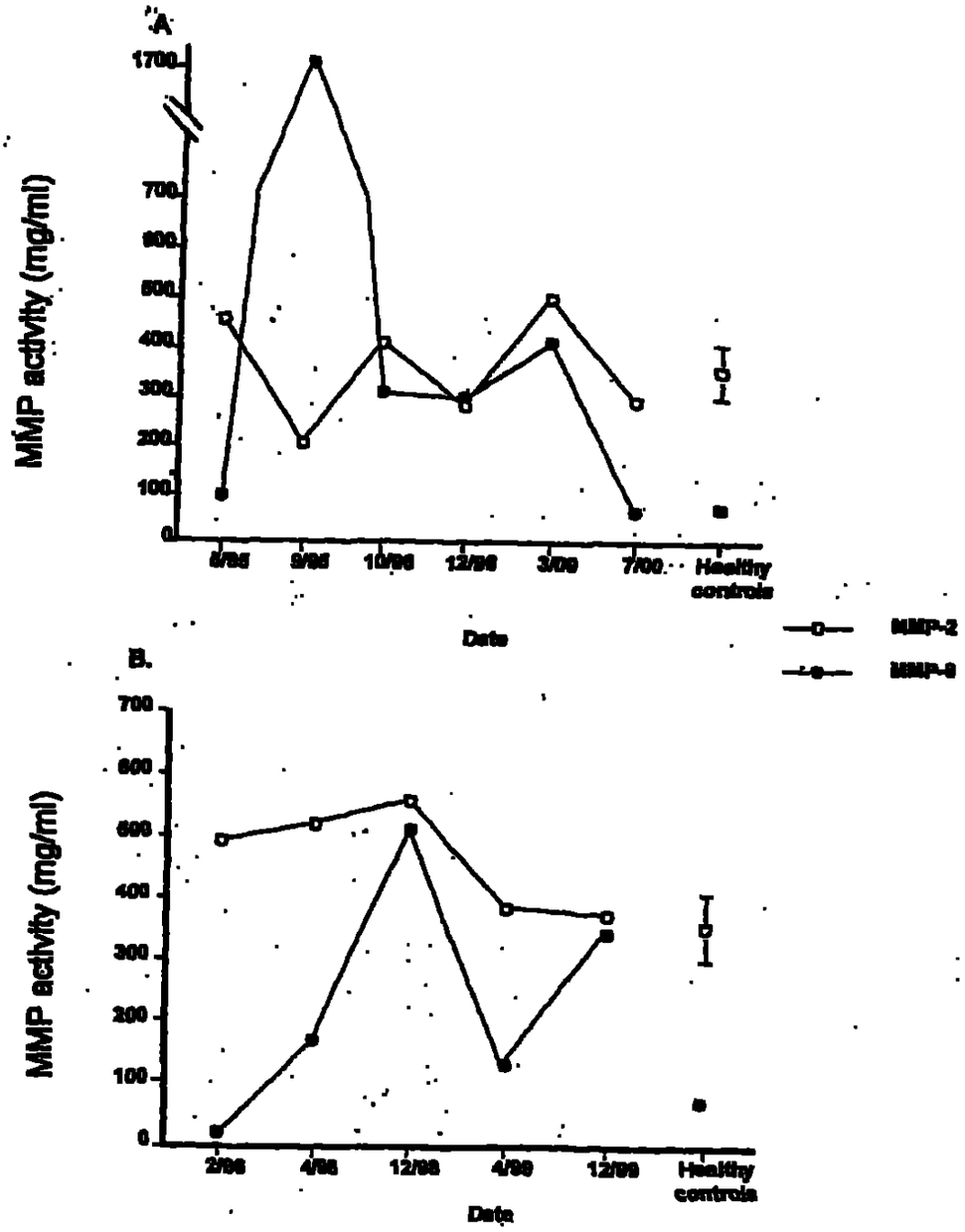

A.
MMP activity (mg/ml)
1700
700
600
500
400
300
200
100
0
6/98
9/98
10/98
12/98
3/99
7/00
Healthy controls
Date
MMP-2
MMP-9
B.
MMP activity (mg/ml)
700
600
500
400
300
200
100
0
2/98
4/98
12/98
4/99
12/99
Healthy controls
Date

Fig. 17

FORMULACIONES PARENTERALES DE PÉPTIDOS PARA EL TRATAMIENTO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud provisional EUA No. 60/439, 918, presentada el 14 de Enero de 2003, cuyo contenido total se incorpora en la presente invención por referencia.

En toda esta solicitud, se hace referencia a varias publicaciones por medio de citas. Las descripciones de estas publicaciones en tu totalidad se incorporan en la presente invención por referencia dentro de esta solicitud para poder describir más ampliamente el estado de la técnica tal y como se conoce por aquellos expertos en la presente invención, a partir que la fecha de invención se describió y reclamó en la presente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El lupus eritematoso sistémico (SLE), o lupus, es una enfermedad auto-inmune debilitante que se caracteriza por la presencia de un arreglo o disposición de anticuerpos, incluyendo anticuerpos a dsADN, a antígenos nucleicos y a ribonucleoproteínas. El lupus eritematoso sistémico (SLE) afecta aproximadamente de uno a de 2000 individuos en los Estados Unidos (1 de 700 mujeres). La enfermedad principalmente afecta a mujeres jóvenes, con una

proporción de sexo masculino a sexo femenino de aproximadamente 9:1.

El lupus sistémico puede afectar casi a cualquier órgano o sistema del cuerpo. El lupus sistémico puede incluir períodos en donde pocos síntomas, sino es que ningún síntoma es evidente ("remisión") y otras ocasiones cuando la enfermedad se vuelve más activa ("erupción"). Con mucha frecuencia, cuando la gente menciona "lupus", se refieren a la forma sistémica de la enfermedad.

Los corticoesteroides son el sostén principal en el tratamiento de enfermedades sistémicas auto inmunes. El riesgo de perder la vida, y severamente deshabilitando manifestaciones del SLE, se tratan con altas dosis de glucocorticoides (1-2 mg/kg/día). Los efectos indeseables de los glucocorticoides crónicos incluyen un arreglo de exposición de efectos adversos prominentes tales como la reacción de Cushing, obesidad central, hipertensión, infección, fragilidad capilar, hirsutismo (hipertricosis), osteoporosis acelerada, cataratas, *diabetes mellitus*, miopatía y psicosis. Además de la toxicidad corticoesteroide, el cumplimiento del paciente hacia un régimen de dosificación también plantea un problema muy serio.

Los agentes citotóxicos también se utilizan para controlar enfermedades activas, reduciendo la tasa de

erupciones de la enfermedad, y reduciendo los requerimientos de esteroides. Los efectos colaterales indeseables de esta última incluyen depresión de médula ósea, infecciones incrementadas con organismos oportunistas, con fallas ováricas irreversibles, alopecia y un riesgo de malignidad incrementado.

El SLE es una enfermedad inflamatoria para la cual hasta la fecha no existe un tratamiento definitivo o cura. La enfermedad resulta en complicaciones crónicas y agudas. Los únicos tratamientos disponibles son paliativos, destinados a aliviar los síntomas agudos y evitar complicaciones crónicas, con frecuencia con efectos secundarios profundos. Por lo tanto, existe una necesidad en este campo que no sidote ha cumplido, y que tanto médicos como pacientes darían la bienvenida a nuevos tratamientos que pudieran eliminar potencialmente o reducir las manifestaciones indeseadas de la enfermedad.

A pesar de la extensa investigación de mecanismos subyacentes a la inducción de SLE, la información de la etiología de la enfermedad es muy limitada. Los estudios sobre SLE que han sido desarrollados recientemente, utilizan linfocitos sanguíneos periféricos (PBL) de pacientes en diferentes etapas clínicas y bajo diferentes protocolos de tratamiento. Alternativamente, se han investigado cepas de murino que desarrollan en una

enfermedad espontánea similar a la SLE, como un modelo para el SLE. Esta clase de análisis condujo a interpretaciones incompletas y confEUAs del papel de varios factores inmunológicos y no inmunológicos, ya sea induciendo o sosteniendo la enfermedad, principalmente debido a la heterogeneidad de pacientes por un lado y la inhabilidad de controlar la fase de la enfermedad en cepas de SLE de murino por otro lado.

Hace muchos años, se estableció un modelo animal de SLE. Este modelo, que se basaba en el concepto de la red idiotípica, desarrolló un amplio espectro de anticuerpos relacionados con lupus y de manifestaciones clínicas relacionadas con el anterior (Mendlovic, S. *et al.* proa. Natl. Acad. Sci. EUA 85: 2260 (1988)). La inducción se llevó a cabo por medio de la inmunización de cepas de ratón que no desarrollaban ninguna enfermedad auto inmune espontánea, con un anticuerpo monoclonal anti-ADN humano (mAb) que porta un idiotipo común que se denomina 16/6 Id (Schoenfeld, Y. *et al.*, J. Exp. Med. 158: 718 (1983)).

El mAB 16/6 humano es un anticuerpo anti-ADN originalmente del isotipo IgM y se transfirió en cultivo a IgG1. El mAB fue derivado de un paciente y expresado como un idiotipo común, el 16/6 (Schoenfeld *et al.* 1983; Mendlovic *et al.*, 1988). Las células de hibridoma que secretaban este mAB se desarrollan en un cultivo

rutinariamente, y el anticuerpo se aísla de los sobrenadantes de un cultivo utilizando una columna de afinidad de Proteína G acoplada a Sepharose™. El anti-ADN 16/6 Mab (igG1/k) humano fue descrito en Shoenfeld, Y. *et al.*, J. Clin. Invest. 70: 205-208 (1982) y en Waisman, A. *et al.*, Int. Immunol. 7: 689-696 (1995).

Después de la inmunización, los ratones produjeron anticuerpos específicos al 16/6 Id, anticuerpos que portaban el 16/6 Id y anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos nucleares (dsADN, ssADN, Sm ribonucleoproteína (RNP), Ro, La y otras). Los hallazgos serológicos se asociaron con leucopenia, velocidad de sedimentación de eritrocitos elevada, proteinuria, abundancia de complejos inmunes en riñones y esclerosis de glomérulos (Mendlovic *et al*, 1988), que son manifestaciones típicas del SLE. Después se demostró que la enfermedad experimental podría ser inducida por un mAb iD anti-16/6 murino (Mendlovic, S. *et al.*, Eur, J. Immunol. 19: 729 (1989)) y por el mAb anti-anti 16/6 Id (16/6 Id+) (Waisman, A. *et al.*, Internatl. Immunol. 23: 1566, (1993)). La inducción de la enfermedad es genéricamente controlada, y por lo tanto es dependiente de la cepa (Mendlovic, S. *et al.*, Immunology 69: 228 (1990)). Este único modelo para la inducción del SLE experimental provee las herramientas apropiadas para diseccionar claramente las diferentes

etapas y los parámetros inmunes involucrados en la inducción y desarrollo del SLE.

El SLE es una enfermedad auto inmune sistémica caracterizada por la formación de auto anticuerpos contra auto-antígenos, tales como ADN, Sm, Ro, La, RNP, cardiolipina y histonas. La etiología del SLE es desconocida, y entendiendo el mecanismo por el cual estos auto-anticuerpos surgen, ofrecieron una nueva percepción. Los auto-anticuerpos monoclonales que tuvieron la capacidad de elegir anticuerpos que portaban el 16/6 Id o reaccionaban con él, se encontraron como patogénicos y por lo tanto, tenían la capacidad de inducir el SLE experimental (Fricke, H. *et al.*, Internatl. Immunol. 2: 225 (1990); Sthoeger, Z.M. *et al.*, Internatl. Immunol. 13: 127 (1993)). Las regiones variables (V) de nueve auto-anticuerpos que se unían ya sea al extracto nuclear (NE) HeLa o ADN, aislado de ratones C3H.SW con SLE experimental, fueron secuenciados (Waisman y Mozes, 1993). Los anticuerpos monoclonales con diferente especificidad fueron analizados en un intento para determinar las relaciones entre los diferentes auto-anticuerpos. Se encontró que tres mAb se unían a ADN, y se mostró que mostraban características de secuencia de anti-cuerpos ADN patogénicos. Uno de estos mAb, designados como 2C4C2, se mostró que utilizaban un gen (V_H) de región V de cadena

pesada (H) idéntico al V_H de mAb anti-ADN aislado de otros ratones propensos al lupus, a saber (NZB Xnzw) F_1. El gen (V_L) de región V de cadena ligera (L) de mAb 2C4C2 es 98% homóloga al V_L de otro mAb anti-ADN, también aislado de los ratones (NZB Xnzw) F_1. Los otros dos mAb de anti-ADN designados 5G12-4 y 5G12-6, comparten el 93% de sus secuencias V_H con aquellos de 2C4C2 mAb. Seis mAb se unieron a proteínas de HeLa NE. Los nueve mAb utilizan un total de cinco V_L genes de la línea de gérmenes cuatro V_L y cinco V_H, demostrando que los auto-anticuerpos indujeron en ratones con SLE experimental no se originan de uno de los clones de célula B. Tres de los nueve V_H y V_L fueron idénticos en secuencia a los genes de la línea de gérmenes, mientras que por lo menos otros tres tenían mutaciones somáticas. Este último sugiere que estos auto-anticuerpos surgen en ratones por medio de ambas, la utilización de las células B (pre-inmune) ya existentes, y a través de procesos impulsados por anantígenos. Además, parece que los auto-anticuerpos encontrados en ratones con SLE experimental utilizan elementos genéticos similares a aquellos utilizados por mAb que fueron aislados de cepas de ratones que desarrollan espontáneamente el lupus.

Las células T juegan un papel importante en la inducción y desarrollo del SLE experimental. Por lo tanto, las líneas de las células T y clones específicas a 16/6 Id

se mostraron que indujeron SLE experimental en receptores singenésicos similarmente al anti-cuerpo 16/6. Por lo tanto, seguido de la inoculación de las células activadas de estas líneas, los ratones desarrollaron tanto la serología como el daño renal que es típico del SLE (Fricke, H. *et al.*, Immunology 73: 421 (1991)). Más aún, una línea celular T específica 16/6 Id de origen C3H.SW indujo SLE en ratones C57BL/6 que se mostraron resistentes a la inducción de la enfermedad después de inyecciones ya sea con el 16/6 Id o el anti-16/61Id mAb (Mendlovic *et al.*, 1990).

En un intento para identificar la región patogénica de 16/6 Id, fragmentos $(Fab')_2$ se prepararon del mAb 16/6 Id y que retenían la especificidad y capacidad patogénica de toda la molécula de 16/6 Id (Ruiz, P.J. *et al.*, Immun. Let. 41: 79 (1994)).

El mAb 5G12 que fue aislado de ratones con SLE experimental y se mostró que se unía a ADN y portaba el 16/6 Id, tiene la capacidad de inducir el SLE experimental en ratones (Waisman, A. *et al.*, Internatl. Immunol. 5: 1293 (1993)). Las células T que reaccionan específicamente a mAb por proliferación, probablemente están reaccionando a péptidos que representan secuencias ya sea de sus regiones que determinan la complementariedad (CDR). Es muy probable que las células T reconozcan las regiones V de los anticuerpos anteriores ya que no reaccionan con los

anticuerpos que portan la misma constante región pero que tienen diferentes especificidades. Dentro de la región variable, las regiones con la probabilidad más alta de ser reconocidas son CDR, ya que estas son las regiones que difieren en su mayoría entre los diversos anticuerpos. Las regiones CDR de las secuencias VH de los nueve mAb de murino patogénicos mencionados anteriormente que inducen el SLE en ratones, se describen en la Figura 1 de Waisman y Mozes, 1993, y en donde se presentan las completas secuencias de aminoácidos deducidas y de nucleótidos completos para el VH de los nueve mAb.

En modelos SLE experimentales - el tratamiento con ratones Balb/c y ratones propensos a SLE, es decir, ratones (NZBxNZW) F_1, ya sea con péptidos basados en mCDR o el Compuesto 1 significativamente redujeron el SLE relacionado, notablemente con depósitos complejos inmunes (ICD) en los riñones, proteinuria y leucopenia. El tratamiento no tuvo efecto en la respuesta de anticuerpos específicos 16/6 Id (Waisman, A., *et al.* "Modulation of murine systemic lupus erythematosus with peptides based on complementarity determining regions of pathogenic anti-DNA monoclonal antibodies" ("Modulación del lupus sistémico erimatoso de murino con péptidos basados en regiones que determinan la complementariedad de anticuerpos monoclonales anti-ADN patogénicos"), (Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.

(1997), 94 (4): 620; Eilat, E., *et al.*, "Prevention of systemic lupus erithematosus-like disease in (NZBxNZW) F_1 mice by treating with CDR1- and CDR3- based peptides of pathogenic autoantibody" ("Prevención de enfermedad similar del lupus sistémico eritematoso en ratones (NZBxNZW) F_1 tratando con péptidos basados en CDR1- y CDR3- de auto-anticuerpos patogénicos") J. Clin Immunol. (200), 20: 268, Eilat, E., *et al.*, "The mechanism by which a peptide Based on complementarity determining region-1 of pathogenic anti-DNA antibody ameliorates experimental SLE" (2001). ("El mecanismo mediante el cual un péptido basado en la región-1 determinante de la complementariedad de anticuerpos anti-ADN patogénicos, disminuye el SLE experimental" (2001), Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 98: 1148).

El Compuesto humano CDR-1, Compuesto 1 que se muestra en la Figura 1, es un péptido sintético de 19 aminoácidos basados en la región 1 (CDR1) que determinan la complementariedad del mAb anti-dsADN humano, denotado 16/6 Id (Waisman, A., *et al.* "Modulation of murine systemic lupus erythematosus with peptides based on complementarity determining regions of pathogenic anti-DNA monoclonal antibodies" ("Modulación del lupus sistémico erimatoso de murino con péptidos basados en regiones que determinan la complementariedad de anticuerpos monoclonales anti-ADN

patogénicos"), (Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. (1997), 94 (4): 4620-4625).

Estos péptidos, como muchos otros péptidos, no son muy solubles. Por lo tanto, en la presente invención se presentan formulaciones que mejoran la solubilidad de los péptidos.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención provee una composición farmacéutica que comprende:

Un vehículo acuoso de 0.1 mg/ml a 20 mg/ml de la composición de una sal farmacéuticamente aceptable de:

a) un péptido que comprende por lo menos de 12 y a lo mucho 30 aminoácidos consecutivos que tiene una secuencia correspondiente a:

i) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo 16/6 Id de un anti-ADN monoclonal humano,o

ii) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo monoclonal anti-ADN patogénico que induce una respuesta en ratones de enfermedad similar a lupus sistémico eritematoso (SLE), o

b) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia de:

(i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEC ID NO: 11) en donde X$_1$ es Met, Ala o Val; X$_2$ es Gln, Asp, Glu o Arg; X$_3$ es Trp or Ala; X$_4$ es Val o Ser; y X$_5$ es Lys, Glu o Ala;

(ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEC ID NO:12) en donde X$_6$ y X$_7$ son cada Thr, Val o Ala; X$_8$ es Tyr o Phe; X$_9$ es Asn o Asp. X$_{10}$ es Gln o Glu; X$_{11}$ es Lys o Glu, y X$_{12}$ es Phe o Tyr;

(iii) YYCARX$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$X$_{17}$X$_{18}$YWGQGS (SEC ID NO : 13) en donde X$_{13}$ es Phe, Thr o Gly; X$_{14}$ es Leu, Ala o Ser; X$_{15}$ es Trp o Ala; X$_{16}$ es Glu o Lys; X$_{17}$ es Met o Ala, y X$_{18}$ es Asp, Lys o Ser;

(iv) GYNX$_{19}$X$_{20}$X$_{21}$X$_{22}$X$_{23}$X$_{24}$X$_{25}$X$_{26}$LEWIG (SEC ID NO: 14)en donde X$_{19}$ es Met o Ala; X$_{20}$ es Asn, Asp o Arg; X$_{21}$ es Trp o Ala; X$_{22}$ es Val o Ser; X$_{23}$ es Lys o Glu; X$_{24}$ es Gln o Ala; X$_{25}$ es Lys o Glu, y X$_{26}$ es Ser o Ala;

(v) YYCARX$_{27}$X$_{28}$X$_{29}$YGX$_{30}$X$_{31}$X$_{32}$GQTL (SEC ID NO: 15) en donde X$_{27}$ es Ser o Phe; X$_{28}$ es Gly o Ala; X$_{29}$ es Arg, Ala o Glu; X$_{30}$ es Asn o Asp; X$_{31}$ es Tyr o Phe.y X$_{32}$ es Trp, His o Ala;

(vi) X$_{33}$YYWSWIX$_1$34QX$_{35}$PX$_{36}$X$_{37}$GX$_{38}$EWIG (SEC ID NO: 16) en donde X$_{33}$ es Gly o Thr Gly; X$_{34}$ es Arg o Lys; X$_{35}$ es Pro o Ser; X$_{36}$ es Gly o Glu; X$_{37}$ es Lys o Asp; y X$_{38}$ es Glu, Leu o Ser;

(vii) YYCARX$_{39}$LLX$_{40}$X$_{41}$X$_{42}$X$_{43}$X$_{44}$DVDYX$_{45}$GX$_{46}$DV (SEC ID NO: 17) en donde X$_{39}$ es Gly o Phe; X$_{40}$ es Arg o Ala; X$_{41}$ es Gly o Ala; X$_{42}$ es Gly o Ala; X$_{43}$ es Trp o Ala; X$_{44}$ es Asn o Ala; X$_{45}$ es Tyr o Trp; X$_{46}$ es Met o Gln;

(viii) FSGYYWS (SEC ID NO: 8);

(ix) EINHSGSTNYKTSLKS (SEC ID NO: 9); o

(x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEC ID NO: 10), o

c) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia de cualquiera de a) y b), o por lo menos dos de las secuencias en (a) (i), (a) (ii) y (b) (i) hasta (b) (x), o

d) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que comprenpor lo menos de dos secuencias idénticas incluidas en (a) (i), (a) (ii) y (b) (i) hasta (b) (x); y

un incrementador de solubilidad seleccionado del grupo que consiste de dimetil-acetamida, polietilenglicol, aceite de castos polioxilado, N-metil-2-pirrolidinona, 1-etenil-2-pirrolidinona, esteres de sorbitán de polioxietileno, y una β-ciclodextrina substituida,

en donde tanto el péptido como el incrementador de solubilidad se disuelven en un vehículo acuoso; y en donde la composición tiene un pH entre 4 y 9.

La presente invención también provee un método para aliviar los síntomas del lupus sistémico eritematoso

(SLE) en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto humano cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención en una cantidad efectiva para aliviar los síntomas de SLE en el sujeto humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- CDR1 (compuesto 1) humano como sal de acetato que muestra las fórmulas moleculares y estructurales de hCDR1, la secuencia de aminoácidos y los parámetros físicos.

Figura 2.- Secreción de IL-2 de células tomadas de ratones tratados con el Compuesto 1 y con solución de Captisol® después que las células fueron posteriormente activadas con una solución del Compuesto 1 en PBS.

-■- Compuesto 1 (RS) 50 µg/ratón

-▲- Compuesto 1 (RS) 200 µg/ratón

-□- DP 50 µg/ratón

-△- DP 200 µg/ratón

-●- 12% Captisol® en ampolleta

Figura 3.- Secreción de IFN-γ de células tomadas de ratones con solución de Compuesto 1 después que la células fueron subsecuentemente activadas con una solución del Compuesto 1 en EM-1 (2.5×10^6 células/pozo).

-◆- Placebo

-●- Compuesto 1 50 µg/ratón (dosis de tratamiento)

-△- Compuesto 1 100 µg/ratón (dosis de tratamiento)

-✕- Compuesto 1 200 µg/ratón (dosis de tratamiento)

Figura 4.- Secreción de IFN-γ a partir de células tomadas de ratones tratados con la solución del Compuesto 1, después que las células fueron subsecuentemente activadas con una solución del Compuesto 1 en EM-1 (5 x 10^6 células/pozo).

-◆- Placebo

-□- Compuesto 1 25 µg/ratón

-△- Compuesto 1 50 µg/ratón

-✕- Compuesto 1 100 µg/ratón

-*- Compuesto 1 200 µg/ratón

Figura 5.- Anticuerpos anti-dsADN en ratones (NZBxNZW) F1 después de 10 inyecciones con Compuesto 1 en solución de Captisol® [OD = Densidad óptica; Compuesto 1 (C) = Compuesto 1 disuelto en Captisol®]

-□- Placebo

-◇- Compuesto 1 50 µg/ratón

-o- Compuesto 1 25 µg/ratón

Figura 6.- Las secciones de riñón de ratones (NZBxNZW) F1 que mostraban intensidad de Depósitos

complejos inmunes. Las secciones de la fila superior son de ratones tratados con Captisol®, las secciones de la fila media, son de un ratón tratado con el Compuesto 1 con 50 µg/ratón, y las secciones de la fila inferior son de un ratón tratado con 25 µg/ratón Compuesto 1. *Amplificación:* izquierda x100, Derecha: x400. Inmunohistología FITC.

Figura 7.- Títulos de anticuerpos en sueros de pacientes SLE y controles saludables de humanos probando su suero para la habilidad a unirse a los péptidos de Ia, IIa, IIIa, o mAb 5G12 o un péptido de control.

Figura 8.- Concentraciones de 16/6 Id mAb anti-ADN humano que se requieren para la estimulación óptima de PBL de pacientes SLE y de controles saludables. El PBL fue estimulado con varias concentraciones (0.1-40 µg/pozo) del 16/6 Id mAb. La concentración que rindió el índice más elevado de estimulación fue definida como óptima para impulsar una respuesta proliferativa.

Figura 9.- Proliferación de PBL de un paciente SLE estimulado con fitohemaglutinina mitógena (PHA) en ausencia o presencia de hCDR1 o hCDR3.

Figura 10.- Proliferación de PBL de un paciente con SLE estimulado con 16/6I mAb humano en ausencia o presencia de péptidos humanos hCDR1 o hCDR3 o el péptido mCDR3 de murino.

Figura 11.- Proliferación de PBL de un paciente con SLE estimulado con 16/6I mAb humano en ausencia o presencia de péptidos humanos hCDR1 o hCDR3 o los péptidos revertidos con murino revmCDR1 revmCDR3.

Figura 12.- Inhibición de la secreción IL-2 en PBL de pacientes SLE activados por medio del 16/6Id mAb humano en ausencia o presencia de hCDR1 o hCDR3.

Figura 13.- Regulación ascendente de la secreción TGF-β en el PBL de un paciente representativo con SLE estimulado con el 16/6Id mAb humano en ausencia o presencia de hCDR1 o hCDR3.

Figura 14.- Gel representativo mostrando actividad de MMP-2 y MMP-9 en sueros de pacientes SLE y controles saludables. Sueros (5 µl) de 40 pacientes individuales con SLE y 25 controles saludables fueron analizados para sus actividades de MMP-2 y MMP-9 por medio de zimografía de gel. La figura muestra resultados representativos con muestras de suero de dos grupos.

Figura 15.- Gráfica que muestra el análisis cuantitativo de las actividades de MMP-2 y MMP-9 en sueros de pacientes SLE (columnas oscuras) y con pacientes con controles saludables (columnas blancas). Se sometieron a prueba treinta y seis muestras de suero de pacientes SLE y 15 muestras de suero de controles saludables para verificar la actividad MMP-2 y MMP-9 utilizando kits de ensayo de

actividad especifica (equipos de ensayo). Los resultados fueron expresados como la ± s.e.m. *P = 0.0302 media.

Figura 16A-B.- Gráficas que muestran los niveles de actividad de MMP-9 y los índices de actividad de la enfermedad (SLEDAI) en pacientes con SLE. Treinta y cinco muestras de suero de pacientes con SLE 8, de sexo masculino (Figura 16A) y 27 de sexo femenino (Figura 16B), fueron sometidos a prueba para verificar la actividad MMP-9 por medio de un kit de ensayo de actividad especifica. La distribución de la actividad MMP-9 de acuerdo con SLEDAI de los pacientes es la que demostró en esta etapa. La línea punteada representa la actividad MMP-9 en controles saludables.

Figuras 17A-B.- Gráficas que muestran el patrón de las actividades MMP-2 (círculos blancos) y MMP-9 (círculos color negro) en los sueros de dos pacientes SLE que se sometieron a muestras durante 4-6 años de la enfermedad. Los sueros fueron sometidos a prueba para verificar las actividades MMP-2 y MMP-9 por medio de kits de ensayo de actividad específica. Los ensayos fueron desarrollados por duplicado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención provee una composición farmacéutica que comprende:

un vehículo acuoso;

de 0.1 mg/ml a 20 mg/ml de una sal farmacéuticamente aceptable de:

a) un péptido que comprenpor lo menos de 12 y a lo mucho 30 aminoácidos consecutivos con una secuencia correspondiente a:

i) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo 16/6 Id anti-ADN monoclonal humano, o

ii) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal anti-ADN patogénico, de cadena ligera o pesada que induce una respuesta similar al lupus sistémico eritematoso (SLE) en ratones, o

b) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia

i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEC ID NO: 11), en donde X$_1$ es Met, Ala o Val; X$_2$ es Gln, Asp, Glu o Arg; X$_3$ es Trp o Ala; X$_4$ es Val o Ser; y X$_5$ es Lys, Glu o Ala;

ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEC ID NO: 12), en donde X$_6$ y X$_7$, cada una son Thr, Val o Ara; X$_8$ es Tyr o Phe; X$_9$ es Asn o Asp; X$_{10}$ es Gln o Glu; X$_{11}$ es Lys o Glu; y X$_{12}$ es Phe o Tyr;

iii) YYCARX$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$PYAX$_{17}$X$_{18}$YWGQGS (SEC ID NO: 13), en donde X$_{13}$ es Phe, Thr o Gly; X$_{14}$ es Leu, Ala o Ser; X$_{15}$ es Trp o Ala; X$_{16}$ es Glu o Lys; X$_{17}$ es Met o Ala; y X$_{18}$ es Asp, Lys o Ser;

iv) GYNX$_{19}$X$_{20}$X$_{21}$X$_{22}$X$_{23}$X$_{24}$SHGX$_{25}$X$_{26}$LEWIG (SEC ID NO: 14), en donde X$_{19}$ es Met o Ala; X$_{20}$ es Asn, Ap o Arg; X$_{21}$ es Trp o Ala; X$_{22}$ es Val o Ser; X$_{23}$ es Lys o Glu; X$_{24}$ es Gln o Ala; X$_{25}$ es Lys o Glu; y X$_{26}$ es Ser o Ala;

v) YYCARX$_{27}$X$_{28}$X$_{29}$X$_{30}$X$_{31}$X$_{32}$GQTL (SEC ID NO: 15), en donde X$_{27}$ es Ser o Phe; X$_{28}$ es Gly o Ala; X$_{29}$ es Arg, Ala o Glu; X$_{30}$ es Asn o Asp; X$_{31}$ es Tyr o Phe, y X$_{32}$ es Trp, His o Ala;

vi) X$_{33}$YYWSWIX$_{34}$QX$_{35}$PX$_{36}$X$_{37}$GX$_{38}$EWIG (SEC ID NO: 16), en donde X$_{33}$ es Gly o Thr Gly; X$_{34}$ es Arg o Lys; X$_{35}$ es Pro o Ser; X$_{36}$ es Gly o Glu; X$_{37}$ es Lys o Asp; y X$_{38}$ es Glu, Leu o Ser;

vii) YYCARX$_{39}$LLX$_{40}$X$_{41}$X$_{42}$X$_{43}$X$_{44}$DVDYX$_{45}$GX$_{46}$DV (SEC ID NO: 17), en donde X$_{39}$ es Gly o Phe, X$_{40}$ es Arg o Ala; X$_{41}$ es Gly o Ala; X$_{42}$ es Gly o Ala; X$_{43}$ es Trp o Ala; X$_{44}$ es Asn o Ala; X$_{45}$ es Tyr o Trp; X$_{46}$ es Met o Gin;

viii) FSGYYWS (SEC ID NO: 8);

ix) EINHSGSTNYKTSLSKS (SEC ID NO: 9); o

x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEC ID NO: 10), o

c) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia de cualquiera de a) y

b), o por lo menos dos de las secuencias en (a)(i), (a)(ii), y (b)(i) hasta (b)(x), o

d) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que comprenpor lo menos de dos secuencias idénticas incluidas en (a)(i), (a)(ii) y (b)(i) a (b)(x); y

un incrementador de solubilidad que se selecciona desde el grupo consistente de dimetil-acetamida, polietilenglicol, aceite de castor polioxilado, N-metil-2-pirrolidinona, 1-etenil-2-pirrolidinona, ésteres de sorbitán de polioxietileno y una β-ciclodextrina sustituida;

en donde tanto el péptido como el incrementador de solubilidad son disueltos en el vehículo acuoso; y en donde la composición tiene un pH entre 4 y 9.

En una modalidad, por lo menos 0.5 mg/ml de la composición, es la sal farmacéuticamente aceptable del péptido.

En otra modalidad, el péptido tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de:

NH_2 - Thr Gly Tyr Met Gln Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Lys Ser Leu Glu - Trp Ile Gly - COOH (SEC ID NO: 1);

NH_2 - Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr - COOH (SEC ID NO: 2);

NH_2 - Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Leu Trp Glu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser - COOH (SEC ID NO: 3);

NH_2 - Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly - COOH (SEC ID NO: 4);

NH_2 - Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Arg Tyr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Thr Leu - COOH (SEC ID NO: 5);

NH_2 - Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly - COOH (SEC ID NO: 6);

NH_2 - Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val - COOH (SEC ID NO: 7);

NH_2 - Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser - COOH (SEC ID NO: 8);

NH_2 - Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Lys Thr Ser Leu Lys Ser - COOH (SEC ID NO: 9); y

NH_2 - Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val - COOH (SEC ID NO: 10).

En una modalidad, el péptido comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia $X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}PX_{36}X_{37}GX_{38}EWIG$ (SEC ID NO: 16),

en donde X_{33} es Gly o Thr Gly; X_{34} es Arg o Lys; X_{35} es Pro o Ser; X_{36} es Gly o Glu; X_{37} es Lys o Asp; y X_{38} es Glu, Leu o Ser.

En otra modalidad de las composiciones farmacéuticas anteriores el incrementador de solubilidad es una β-ciclodextrina sustituida.

En otra modalidad, la β-ciclodextrina sustituida es un éter sulfobutílico, o hidroxipropílico, o β-ciclodextrina sustituida de éter asulfopropílico, de.

En otra modalidad, la β-ciclodextrina sustituida es una β-ciclodextrina de éter sulfabutílico sustituida.

En una modalidad adicional de cualquiera de las composiciones anteriores, la concentración del péptido en la solución es por lo menos de 1 mg/ml.

En una modalidad adicional, la concentración del péptido en la solución es por lo menos 2.5 mg/ml.

En una modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 0.5 mg/ml a 10 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 0.5 mg/ml a 2.5 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 2.5 mg/ml a 5 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 5 mg/ml a 7 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 7 mg/ml a 8.5 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 8.5 mg/ml a 10 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 9 mg/ml a 10 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 10 mg/ml a 15 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 15 mg/ml a 20 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 1.0 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 2.5 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 5 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 10 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal del péptido es de 15 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal es de 0.1 mg/ml 0.5 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal es de 0.1 mg/ml 0.2 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal es de 0.2 mg/ml 0.3 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal es de 0.3 mg/ml 0.4 mg/ml.

En otra modalidad, la concentración de la sal es de 0.4 mg/ml 0.5 mg/ml.

En una modalidad adicional, la composición tiene un pH entre 6.5 y 8.5.

En una modalidad adicional, la composición tiene un pH entre 7.5 y 8.5.

En una modalidad adicional, la composición tiene un pH entre 4 y 5.

En una modalidad adicional, la composición tiene un pH entre 5 y 6.

En una modalidad adicional, la composición tiene un pH entre 6 y 7.

En una modalidad adicional, la composición tiene un pH entre 7 y 8.

En una modalidad adicional, la composición tiene un pH entre 8 y 9.

En otra modalidad de cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de acetato.

En una modalidad adicional, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de acetato, y la β-ciclodextrina sustituida es hepta-(sulfobutil éter)- β-ciclodextrina.

En otra modalidad, la composición además comprende un regulador de pH farmacéuticamente aceptable en

una cantidad y de un tipo adecuado para lograr que el pH de la composición farmacéuticamente sea de la escala de 4-9. El regulador de pH puede ser regulador de pH acetato, regulador de pH de citrato, o carbonato de sodio.

La presente invención también provee un método para aliviar los síntomas de lupus sistemático eritematoso (SLE) en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto humano cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores en una cantidad efectiva para aliviar los síntomas del SLE en el sujeto humano.

La presente invención también provee cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores para su uso en el tratamiento de SLE en un sujeto humano.

La presente invención también provee un procedimiento para fabricar cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores que comprende las siguientes etapas:

a) preparar una solución de dimetil-acetamida, polietilenglicol, aceite de castor polioxilado, N-metil-2-pirrolidinona, 1-etenil-2-pirrolidinona, ésteres de sorbitán polioxietileno, o una β-ciclodextrina sustituida en un vehículo acuoso en una concentración predeterminada;

b) agregar una cantidad predeterminada de una sal farmacéuticamente aceptable de:

1) un péptido que comprenpor lo menos de 12 y a lo sumo 30 aminoácidos consecutivos que tiene una secuencia correspondiente a

(i) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región que determina la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo 16/6 Id anti-ADN monoclonal humano, o

(ii) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo monoclonal anti-ADN patogénico que induce un lupus sistémico eritematoso (SLE) que es una respuesta a dicha enfermedad SLE en ratones,

2) un péptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia:

(i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEC ID NO: 11), en donde X$_1$ es Met, Ala o Val; X$_2$ es Gln, Asp, Glu o Arg; X$_3$ es Trp o Ala; X$_4$ es Val o Ser; y X$_5$ es Lys, Glu o Ala;

(ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEC ID NO: 12), en donde X$_6$ y X$_7$, cada una son Thr, Val o Ara; X$_8$ es Tyr o Phe; X$_9$ es Asn o Asp; X$_{10}$ es Gln o Glu; X$_{11}$ es Lys o Glu; y X$_{12}$ es Phe o Tyr;

(iii) YYCARX$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$PYAX$_{17}$X$_{18}$YWGQGS (SEC ID NO: 13), en donde X$_{13}$ es Phe, Thr o Gly; X$_{14}$ es Leu, Ala o Ser;

X_{15} es Trp o Ala; X_{16} es Glu o Lys; X_{17} es Met o Ala; y X_{18} es Asp, Lys o Ser;

(iv) $GYNX_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}SHGX_{25}X_{26}LEWIG$ (SEC ID NO: 14), en donde X_{19} es Met o Ala; X_{20} es Asn, Ap o Arg; X_{21} es Trp o Ala; X_{22} es Val o Ser; X_{23} es Lys o Glu; X_{24} es Gln o Ala; X_{25} es Lys o Glu; y X_{26} es Ser o Ala;

(v) $YYCARX_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}GQTL$ (SEC ID NO: 15), en donde X_{27} es Ser o Phe; X_{28} es Gly o Ala; X_{29} es Arg, Ala o Glu; X_{30} es Asn o Asp; X_{31} es Tyr o Phe, y X_{32} es Trp, His o Ala;

(vi) $X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}PX_{36}X_{37}GX_{38}EWIG$ (SEC ID NO: 16), en donde X_{33} es Gly o Thr Gly; X_{34} es Arg o Lys; X_{35} es Pro o Ser; X_{36} es Gly o Glu; X_{37} es Lys o Asp; y X_{38} es Glu, Leu o Ser;

(vii) $YYCARX_{39}LLX_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}DVDYX_{45}GX_{46}DV$ (SEC ID NO: 17), en donde X_{39} es Gly o Phe, X_{40} es Arg o Ala; X_{41} es Gly o Ala; X_{42} es Gly o Ala; X_{43} es Trp o Ala; X_{44} es Asn o Ala; X_{45} es Tyr o Trp; X_{46} es Met o Gin;

(viii) FSGYYWS (SEC ID NO: 8);

(ix) EINHSGSTNYKTSLSKS (SEC ID NO: 9); o

(x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEC ID NO: 10), o

3) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia de cualquiera de a) y b), y por lo menos dos de las secuencias en (a)(i), (a)(ii), y (b)(i) a (b)(x); o

4) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que comprenpor lo menos de dos secuencias idénticas incluidas en (a)(i), (a)(ii) y (b)(i) a (b)(x);

c) ajustar el pH de la solución de la etapa b) hasta que el péptido se disuelva en la solución; y

d) si es necesario, ajustar el pH de la solución de la etapa c) a un pH de 4 a 9, fabricando de esa manera la composición farmacéutica.

En una modalidad, la cantidad predeterminada de péptido es tal, que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica por lo menos de 0.1 mg/ml.

En una modalidad, la cantidad predeterminada de péptido es tal, que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica por lo menos de 0.5 mg/ml.

En otra modalidad, la cantidad predeterminada de péptido es tal, que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica por lo menos de 2.5 mg/ml, 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml o 0.1 mg/ml.

En otra modalidad, la cantidad predeterminada de péptido es tal, que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica por lo menos de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml.

En una modalidad del procedimiento, la concentración resultante final de la β-ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica es de 70 mg/ml a 170 mg/ml.

En una modalidad del procedimiento, la concentración resultante final de la β-ciclodextrina sustituida y es tal que resulta en una concentración de final de β-ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica de 80 mg/ml a 170 mg/ml.

En una modalidad del procedimiento, la concentración resultante final de la β-ciclodextrina sustituida y es tal que resulta en una concentración de final de β-ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica de 90 mg/ml a 170 mg/ml.

En una modalidad del procedimiento, la concentración resultante final de la β-ciclodextrina sustituida y es tal que resulta en una concentración de final de β-ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica de 100 mg/ml a 170 mg/ml.

En una modalidad del procedimiento, la concentración resultante final de la β-ciclodextrina sustituida y es tal que resulta en una concentración de final de β-ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica de 110 mg/ml a 170 mg/ml.

En una modalidad del procedimiento, la concentración resultante final de la β-ciclodextrina sustituida y es tal que resulta en una concentración de final de β-ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica de 120 mg/ml a 170 mg/ml.

En una modalidad del procedimiento, la concentración resultante final de la β-ciclodextrina sustituida y es tal que resulta en una concentración de final de β-ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica de 130 mg/ml a 170 mg/ml.

En una modalidad del procedimiento, la concentración resultante final de la β-ciclodextrina sustituida y es tal que resulta en una concentración de final de β-ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica de 140 mg/ml a 170 mg/ml.

En una modalidad del procedimiento, la concentración resultante final de la β-ciclodextrina sustituida y es tal que resulta en una concentración de final de β-ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica de 150 mg/ml a 170 mg/ml.

En una modalidad del procedimiento, la concentración resultante final de la β-ciclodextrina sustituida y es tal que resulta en una concentración de final de β-ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica de 160 mg/ml a 170 mg/ml.

En una modalidad del procedimiento, la concentración resultante final de la β-ciclodextrina sustituida y es tal que resulta en una concentración de final de β-ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica 120 mg/ml.

En una modalidad adicional, en la etapa b) además comprende mezclar la solución durante una hora.

En una modalidad adicional, en la etapa c) el pH se ajusta utilizando HCl o NaOH 1.0N.

En una modalidad adicional, el procedimiento además comprende filtrar la solución de la etapa d) a través de un filtro de acetato de celulosa.

En una modalidad adicional,

la cantidad predeterminada de péptido es tal que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica de 2.5 mg/ml, 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml o 0.1 mg/ml;

la etapa b) además comprende mezclar la solución por una hora;

en la etapa c) el pH se ajusta utilizando HCl o NaOH 1.0N, que además comprende filtrar la solución de la etapa d) a través de un filtro de acetato de celulosa.

La presente invención también provee una composición preparada por medio de cualquiera de los procedimientos anteriores.

La presente invención también provee una composición farmacéutica liofilizada que comprende de 0.1 mg/ml a 20 mg/ml de la composición de una sal farmacéuticamente aceptable de

a) un péptido que comprende por lo menos de 12 y a lo sumo 30 aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia correspondiente a

(i) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región que determinante de complementariedad (CDR) de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo 16/6 Id anti-ADN monoclonal humano, o

(ii) una secuencia de aminoácidos encontrada de una región que determinante de complementariedad (CDR) de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo monoclonal anti-ADN patogénico que induce una respuesta a la enfermedad similar al lupus sistémico eritematoso (SLE) en ratones, o

b) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia de

(i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEC ID NO: 11), en donde X$_1$ es Met, Ala o Val; X$_2$ es Gln, Asp, Glu o Arg; X$_3$ es Trp o Ala; X$_4$ es Val o Ser; y X$_5$ es Lys, Glu o Ala;

(ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEC ID NO: 12), en donde X$_6$ y X$_7$, cada una son Thr, Val o Ara; X$_8$ es Tyr o

Phe; X_9 es Asn o Asp; X_{10} es Gln o Glu; X_{11} es Lys o Glu; y X_{12} es Phe o Tyr;

(iii) YYCAR$X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}$PYA$X_{17}X_{18}$YWGQGS (SEC ID NO: 13), en donde X_{13} es Phe, Thr o Gly; X_{14} es Leu, Ala o Ser; X_{15} es Trp o Ala; X_{16} es Glu o Lys; X_{17} es Met o Ala; y X_{18} es Asp, Lys o Ser;

(iv) GYN$X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}SHGX_{25}X_{26}$LEWIG (SEC ID NO: 14), en donde X_{19} es Met o Ala; X_{20} es Asn, Ap o Arg; X_{21} es Trp o Ala; X_{22} es Val o Ser; X_{23} es Lys o Glu; X_{24} es Gln o Ala; X_{25} es Lys o Glu; y X_{26} es Ser o Ala;

(v) YYCAR$X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$GQTL (SEC ID NO: 15), en donde X_{27} es Ser o Phe; X_{28} es Gly o Ala; X_{29} es Arg, Ala o Glu; X_{30} es Asn o Asp; X_{31} es Tyr o Phe, y X_{32} es Trp, His o Ala;

(vi) X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}P$X_{36}X_{37}$GX_{38}EWIG (SEC ID NO: 16), en donde X_{33} es Gly o Thr Gly; X_{34} es Arg o Lys; X_{35} es Pro o Ser; X_{36} es Gly o Glu; X_{37} es Lys o Asp; y X_{38} es Glu, Leu o Ser;

(vii) YYCARX_{39}LL$X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}$DVDY$X_{45}GX_{46}$DV (SEC ID NO: 17), en donde X_{39} es Gly o Phe, X_{40} es Arg o Ala; X_{41} es Gly o Ala; X_42 es Gly o Ala; X_{43} es Trp o Ala; X_{44} es Asn o Ala; X_{45} es Tyr o Trp; X_{46} es Met o Gin;

(viii) FSGYYWS (SEC ID NO: 8);

(viii) FSGYYWS (SEC ID NO: 9);

(ix) EINHSGSTNYKTSLSKS (SEC ID NO: 9); o

(x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEC ID NO: 10), o

c) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia de cualquiera de a) y b), o por lo menos dos de las secuencias en (a)(i), (a)(ii), y (b)(i) a (b)(x); o

d) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que comprende por lo menos de dos secuencias idénticas incluidas en (a)(i), (a)(ii) y (b)(i) a (b)(x); y

un incrementador de solubilidad que se selecciona desde el grupo consiste de dimetil-acetamida, polietilenglicol, aceite de castor polioxilado, N-metil-2-pirrolidinona, 1-etenil-2-pirrolidinona, ésteres de sorbitán de polioxietileno y una β-ciclodextrina sustituida.

En una modalidad de la composición farmacéutica liofilizada, por lo menos de 0.5 mg/ml de la composición es la sal farmacéuticamente aceptable del péptido.

La presente invención también provee un procedimiento para liofilizar cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores que comprende los siguientes pasos:

a) disminuir la temperatura de la composición farmacéutica a -40°C;

b) sostener la temperatura a -40°C durante un tiempo predeterminado;

c) elevar la temperatura de la solución a 20°C;

d) sostener la temperatura a 20°C durante un tiempo predeterminado; y

e) reduciendo la presión y sosteniendo la temperatura a 20°C durante un tiempo predeterminado, liofilizando de esa manera la composición farmacéutica.

En una modalidad, la etapa a) se desarrolla en un periodo de 2 horas.

En una modalidad, la etapa b) se desarrolla en un periodo de 3 horas.

En una modalidad, la etapa c) se desarrolla en un periodo de más de 13 horas.

En una modalidad, la etapa c) se desarrolla en una presión de 110 µbarias.

En una modalidad, la etapa d) se desarrolla en un periodo de más de 13 horas.

En una modalidad, la etapa d) se desarrolla en una presión de 110 µbarias.

En una modalidad, la etapa e) la presión se reduce a 10 µbarias.

En una modalidad, la etapa e) se desarrolla en un periodo de más de 5 horas.

En otra modalidad,

la etapa a) se desarrolla en un periodo de 2 horas.

la etapa b) se desarrolla en un periodo de 3 horas.

la etapa c) se desarrolla en un periodo de más 13 horas y a una presión de 110 µbarias

la etapa d) se desarrolla en un periodo de más 13 horas y a una presión de 110 µbarias; y

la etapa e) se desarrolla en un periodo de más 5 horas y a una presión de 10 µbarias

La presente invención también provee una composición farmacéutica liofilizada preparada por medio de cualquiera de los procedimientos anteriores.

La presente invención también provee un procedimiento para liofilizar cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores, que comprende las etapas de:

a) disminuir la temperatura de la composición farmacéutica a -45°C;

b) sostener la temperatura a -45°C durante un tiempo predeterminado;

c) elevar la temperatura de la solución a -20°C;

d) sostener la temperatura a 25°C durante un tiempo predeterminado; y

e) reduciendo la presión y sosteniendo la temperatura a 25°C durante un tiempo predeterminado, liofilizando de esa manera la composición farmacéutica.

En una modalidad, la etapa a) se desarrolla en un periodo de 6 horas.

En una modalidad, la etapa b) se desarrolla en un periodo de 3 horas.

En una modalidad, la etapa c) se desarrolla en un periodo de más de 19 horas.

En una modalidad, la etapa c) se desarrolla en una presión de 150 µbarias.

En una modalidad, la etapa d) se desarrolla en un periodo de más de 13 horas.

En una modalidad, la etapa e) se desarrolla en una presión de 150µbarias.

En una modalidad, la etapa e) se desarrolla en un periodo de más de 8 horas.

En una modalidad, la etapa e) se desarrolla en una presión de 150µbarias.

En una modalidad,

la etapa a) se desarrolla en un periodo de 6 horas.

la etapa b) se desarrolla en un periodo de 3 horas.

la etapa c) se desarrolla en un periodo de más 19 horas y a una presión de 150 µbarias

la etapa d) se desarrolla en un periodo de más 13 horas y a una presión de 150 µbarias

la etapa e) se desarrolla en un periodo de más 8 horas y a una presión de 150 µbarias

La presente invención también provee una composición farmacéutica liofilizada preparada por cualquiera de los procedimientos anteriores.

La presente invención también provee la composición farmacéutica liofilizada anterior, en donde el contenido de agua de la composición es menor de 5%.

En una modalidad, el contenido de agua de la composición es menor que 4.0%.

En una modalidad, el contenido de agua de la composición es menor que 3.5%.

La presente invención también provee una composición farmacéutica envasada que comprende:

un material de envase; y

una cantidad predeterminada de cualquiera de las composiciones farmacéuticas liofilizadas.

En otra modalidad, el péptido tiene la fórmula NH_2 - Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly - COOH (SEC ID NO: 6).

Los péptidos sintéticos de esta invención se basan en el CDR de anticuerpos patogénicos monoclonales aislados de ratones con SLE experimental. Dichos anticuerpos monoclonales son obtenidos de sobrenadantes de hibridomas producidos por fusión, por ejemplo de células de bazo de ratones C3H, SW inmunizados con Id mAb anti-16/6, con células de plasmacitoma (Waisman and Mozes, 1993).

Los ejemplos de dichos péptidos son aquellos de fórmulas Ia a Va en la presente invención, que se basan respectivamente, en regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de mAb 5G12 y el regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de mAb 2C4C2 (Waisman and Mozes, 1993) y análogos de los mismos.

Los péptidos de la presente invención tienen la intención de incluir análogos de péptidos Ia-Va que incluyen análogos de sustitución, eliminación y adición tal como se describen en la presente invención. Los análogos de sustitución tienen sustituciones de aminoácidos en diferentes posiciones, estas sustituciones se realizan con base en el patrón hidrofílico-hidrofóbico en el volumen y en la carga de los aminoácidos.

Los aminoácidos se pueden dividir a lo largo de las líneas de patrón de hidrofóbico-hidrofílico, volumen y carga. Con respecto al volumen, aquellos expertos en la técnica entenderán que los aminoácidos con el mayor volumen

son Trp, Tyr, Phe, Arg, Lys, Ile, Leu, Met y His, mientras que aquellos con los menores volúmenes son Gly, Ala, Ser, Asp, Thr y Pro, con otros en medio.

Con respecto al patrón hidrofóbico-hidrofílico, es muy conocido que los aminoácidos Gly, Ala, Phe, Val, Leu, Ile, Pro, Met y Trp sean hidrofóbicos, mientras que todos los aminoácidos restantes son hidrofílicos; entre los aminoácidos hidrofílicos, Ser, Thr, Gln y Tyr no tienen ninguna carga, mientras que Arg, Lys, His y Asn tienen una carga positiva y Asp y Glu tienen cargas negativas.

Al seleccionar los péptidos que se van a someter a prueba para obtener su potencial en inhibir la respuesta proliferativa de linfocitos T de ratones, que tienen alta respuesta a auto anticuerpos que inducen SLE, es importante que las sustituciones sean seleccionadas de aquellas que acumulativamente más no sustancialmente cambien el volumen, el patrón hidrofóbico-hidrofílico y la carga de la correspondiente porción del péptido origen no sustituido. Por lo tanto, un residuo hidrofóbico puede ser sustituido con un residuo hidrofílico, o viceversa, siempre y cuando el efecto total no cambie sustancialmente el volumen, el patrón hidrofóbico-hidrofílico en la carga del péptido origen no sustituido correspondiente.

Se deberá entender que se pueden contemplar en la presente invención otras modificaciones de los péptidos.

Por lo tanto, el péptido de la presente invención tiene la intención de incluir un "derivado químico" del mismo, que retenga por lo menos una porción de la función del péptido que permite que se evite su utilidad o inhiba las respuestas prolíferas de las células T y enfermedad auto inmune.

Un "derivado químico" de un péptido de la presente invención contiene porciones químicas adicionales que no son normalmente una parte del péptido. Las modificaciones covalentes del péptido se incluyen dentro del alcance de esta invención. Dichas modificaciones pueden ser introducidas en la molécula haciendo reaccionar residuos aminoácidos objetivo de reacción, del péptido con un agente de derivación orgánico que tenga la capacidad de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. También se conocen en la técnica muchos derivados químicos y métodos para manufacturarlos.

También se incluye en el alcance de la invención sales de los péptidos de la invención. Como se utiliza en la presente, el término "sales" se refiere a ambas sales de los grupos carboxilo y a las sales de adición ácidas de grupos amino de la molécula del péptido. Las sales de un grupo carboxilo pueden ser formadas por medios conocidas en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo sodio, calcio, amonio, sales férricas o de zinc, y similares, y

sales con bases orgánicas tales como aquellas formadas por ejemplo con aminas, tales como astrietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición ácida se incluyen por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Dichos derivados y sales químicas de preferencia se utilizan para modificar las propiedades farmacéuticas del péptido siempre y cuando estén involucradas la estabilidad, solubilidad, etcétera.

Los péptidos y análogos sintéticos de las mismas de acuerdo con la invención, pueden ser seleccionados del grupo que consiste de péptidos que tienen secuencias I a IV en la presente invención, en donde:

(i) el péptido de la secuencia I tiene la fórmula (SEC ID NO: 11):

T G Y Y X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 Q S P E K S L E W I G [I]

en donde X_1 es Met, Ala o Val; X_2 es Gln, Asp, Glu o Arg; X_3 es Trp or Ala; X_4 es Val o Ser; y X_5 es Lys, Glu o Ala;

En una modalidad, el péptido de la secuencia I tiene la fórmula (Ia) (SEC ID NO: 1):

T G Y Y M Q W V K Q S P E K S L E W I G (Ia)

(ii) el péptido de la secuencia II tiene la fórmula (SEC ID NO: 12):

E I N P S T G G X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} K A K A T

[II]

en donde X_6 y X_7 son cada uno Thr, Val o Ala; X_8 es Tyr o Phe; X_9 es Asn o Asp. X_{10} es Gln o Glu; X_{11} es Lys o Glu, y X_{12} es Phe o Tyr.

En una modalidad, el péptido de la secuencia II tiene la fórmula (IIa) (SEC ID NO: 2):

E I N P S T G G T T Y N Q K F K A K A T (II a)

(iii) el péptido de la secuencia III tiene la fórmula (SEC ID NO: 13):

Y Y C A R X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} Y W G Q G S (III)

en donde X_{13} es Phe, Thr o Gly; X_{14} es Leu, Ala o Ser; X_{15} es Trp o Ala; X_{16} es Glu o Lys; X_{17} es Met o Ala, y X_{18} es Asp, Lys o Ser;

En una modalidad, el péptido de la secuencia III tiene la fórmula (IIIa) (SEC ID NO: 3):

Y Y C A R F L W E P Y A M D Y W G Q G S (IIIa)

(iv) el péptido de la secuencia IV tiene la fórmula (SEC ID NO: 14):

G Y N X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24} X_{25} X_{26} L E W I G [IV]

en donde X_{19} es Met o Ala; X_{20} es Asn, Asp o Arg; X_{21} es Trp o Ala; X_{22} es Val o Ser; X_{23} es Lys o Glu; X_{24} es Gln o Ala; X_{25} es Lys o Glu, y X_{26} es Ser o Ala;

En una modalidad, el péptido de la secuencia IV tiene la fórmula (IVa) (SEC ID NO: 4):

G Y N M N W V K Q S H G K S L E W I G (IVa)

(v) el péptido de la secuencia V tiene la fórmula (SEC ID NO: 15):

Y Y C A R X_{27} X_{28} X_{29} Y G X_{30} X_{31} X_{32} G Q T L [V]

en donde X_{27} es Ser o Phe; X_{28} es Gly o Ala; X_{29} es Arg, Ala o Glu; X_{30} es Asn o Asp; X_{31} es Tyr o Phe y X_{32} es Trp, His o Ala;

En una modalidad, el péptido de la secuencia V tiene la fórmula (Va) (SEC ID NO: 5):

Y Y C A R S G R Y G N Y W G Q T L (Va).

Los péptidos Ia a IIIa se basan en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la cadena V_H de mAb5g12, y los péptidos IV y Va se basan en las regiones CDR1 y CDR3, respectivamente, de la cadena V_H de mAb 2C4C2 (Waisman and Mozes, 1993).

Una vez que un péptido de acuerdo con la presente invención es producido, su habilidad para inhibir la respuesta proliferativa de linfocitos T en ratones que tienen alta respuesta a auto anticuerpos que inducen SLE, se pueden determinar fácilmente por aquellos expertos en la técnica sin experimentación indebida utilizando pruebas tales como las que se describen en la presente invención. Una de las pruebas, que se puede conducir fácilmente es para la habilidad de péptido sustituidos para inhibir *in vitro* las respuestas prolíferas de ciertas líneas celulares

T y clones específicos a auto anticuerpos que inducen SLE. Las líneas y clones de células T por ejemplo pueden ser las líneas y clones de células T específicas al mAb Id 16/6 (Fricke et al., 1991) establecidos de las células de nódulos linfáticos de ratones por medio de la metodología previamente descrita (Axelrod, O. and Mozes, E. *Inmunobiology* 172: 99 (1986)). Las células se exponen al anticuerpo estimulador presentado en células de bazo singenéticas y radiada en presencia de un medio enriquecido cada dos semanas. Las líneas de células T se clonan por medio de la técnica estándar de dilución limitante. Las respuestas prolíferas de estas líneas y clones de células T se someten a prueba por ejemplo, mediante el método descrito en los Materiales y Métodos que se describen en la presente invención.

Otra prueba que se puede conducir para poder seleccionar péptidos que tienen la actividad deseada es someter la prueba para la habilidad de los péptidos sustituidos al inhibir la habilidad de las líneas y clones de células T para ofrecer ayuda a las células B específicas a péptido en presencia de péptido origen. Los péptidos sustituidos también pueden ser sometidos a prueba para obtener su habilidad a unirse directamente, después de biotinilación, a los productos de la Clase II MMC, en células que presentan antígenos de las cepas relevantes.

Para este propósito, la biotinilación de N-terminal de los péptidos relevantes se desarrolla a 0°C con un exceso de biotin-N-hidroxisuccinimida en solución acuosa (Mozes, E. et al., *EMBO J.* 8: 4049 (1989)). Las células adherentes esplénicas de ratón en células adherentes (PBL) de linfocito sanguíneo periférico (muestra de $1x10^6$) se incuban con péptidos biotinilados en PBS conteniendo albúmina de suero de bovino al 0.1% (PBS/BSA) a 37°C durante 20 horas, seguido de la incubación con ficoeritrinestreptavidina durante 30 minutos a 4°C. Después de cada incubación, las células se lavan dos veces con la solución anterior. Posteriormente a ello, las células se analizan por medio de citometría de flujo utilizando exploración FACScan. En cada análisis, se examina un mínimo de 5000 células (para los procedimientos anteriores, véase por ejemplo, Mozes et al., 1989; Zisman et al., 1991).

Una prueba adicional, que puede ser conducida después, es probar la habilidad de los péptidos para inhibir la secreción de citocinas por medio de la línea celular T o por medio de linfocitos T de ratones que tienen una alta respuesta a los auto-anticuerpos que inducen SLE. La citocinas son detectadas conforme a lo siguiente: se evalúa la actividad de IL-1 por medio de prueba de ELISA, utilizando un par de anticuerpos de captura y de detección

(como se describe a continuación para IL-4, IL-6, IL-10), utilizando la prueba LBR.-33 (1A5) (Conlon, P.J.J. Immune. 134:1280 (1983)) en donde las células 1A5 son estimuladas en presencia de fitohemaglutinina (PHA), ya sea con sobrenadantes o con IL-1 recombinante en varias concentraciones para secretar IL-2. Después de una incubación de toda la noche, los sobrenadantes de las células 1A5 se transfieren a la línea de linfocitos T citotóxicos (CTLL) dependientes de IL-2. La estimulación de la línea CTLL por medio de IL-2 se mide después de 24 horas por medio de la incorporación de ^{3}[H]-timidina. IL-2 es detectado directamente utilizando la línea CTLL dependiente de IL-2 o por medio de ELISA. Se determina por medio de ELISA los niveles de IL-4, IL-5, IL-10, INFy y TNFα, utilizando anticuerpos a las varias citocinas (Phamingen, San Diego Ca., EUA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los péptidos que dan positivo a la prueba en una o más de estas pruebas *in vitro* proveerán una expectativa razonable de la actividad *in vivo*. Sin embargo, en las pruebas *in vivo* también se pueden conducir sin experimentación indebida. Por lo tanto, por ejemplo, los ratones adultos pueden ser inyectados con el péptido candidato ya sea en el día -3 o en el día 0. Los ratones entonces son inmunizados con el auto-anticuerpo que induce

a la enfermedad o con el péptido. Diez días después, las células de los nódulos linfáticos de los ratones se someten a prueba para ver su habilidad a la proliferación al inmunógeno para poder averiguar la capacidad inhibidora del péptido candidato.

Otras dichas pruebas en animales *in vivo* consisten en medir la actividad terapéutica directamente en el modelo murino *in vivo* para la producción de SLE como se describió anteriormente. Los péptidos pueden ser inyectados en los ratones en donde el SLE experimental es inducido por diferentes rutas a diferentes dosificaciones y con diferentes programaciones de periodos. Para poder determinar los parámetros farmacocinéticos de los péptidos, incluyendo el volumen de distribución, la absorción en células que presentan antígenos y su liberación, uno puede utilizar derivados biotinilados de los péptidos. La concentración de la fracción soluble de los péptidos en los diversos fluidos corporales puede ser determinada por medio de ELISA; utilizando placas revestidas con avidita y anticuerpos específicos de antipéptidos. Los péptidos unidos a células pueden ser analizados por medio de la prueba FACS, utilizando avidina o estreptavidina conjugada con fluorocromo. Además, los ratones tratados pueden ser sometidos a pruebas periódicamente para poder determinar el efecto de los péptidos en las respuestas auto-anticuerpos y

en manifestaciones de la enfermedad elegidas en los ratones por medio del anticuerpo que induce SLE.

Otro procedimiento *in vivo* consiste en ratones recién nacidos tolerantes con el péptido candidato seguido por la inmunización de los ratones con el auto-anticuerpo patogénico, tal como 16/6 Id+, o con el mismo péptido, y seguido de las manifestaciones de la enfermedad, tales como hallazgos serológicos asociados con leucopenia, con velocidades sedimentación de litocitos elevada, protoinuria, abundancia de complejos inmunes en riñones y en esclerosis de los glomérulos. Por lo tanto, se puede apreciar que, además de las modalidades preferidas que se han mostrado como operables y funcionales en los ejemplos en la presente invención, aquellos expertos en la técnica podrán determinar péptidos adicionales que también serán funcionales después de los lineamientos presentados en la presente invención sin experimentación indebida.

También se puede conducir una prueba *in vitro* relativamente simple para poder someter a ensayo la eficacia terapéutica esperada de cualquier péptido sustituido determinado en cualquier paciente de SLE determinado. Para poder evaluar la meta final para producir péptidos que se unirán con una alta afinidad a las moléculas apropiadas de la Clase II de MHC, pero que no conducirán a una activación adicional de las células T y

por lo tanto tendrán un efecto terapéutico en pacientes SLE, los péptidos se pueden someter a ensayo, seguido de biotinilación, para su habilidad a unirse directamente a los productos de Clase II HLA en células que presentan el antígeno, en los linfocitos sanguíneos periféricos de los pacientes SLE. Los donadores de control saludable y los péptidos de control se pueden utilizar en dichos ensayos para verificar su especificidad.

En una modalidad, el agente terapéutico de la invención es un péptido seleccionado del grupo de péptidos de las fórmulas I a V de la presente invención, incluyendo péptidos Ia a Va y los análogos de sustitución y/o eliminación de los mismos.

En otra modalidad, el agente terapéutico de acuerdo con al presente invención es la forma de un solo péptido multi-epítope. Por lo tanto, en una modalidad preferida, los péptidos dobles que consisten de dos diferentes péptidos seleccionados del grupo de péptidos de las fórmulas I-V en la presente invención, están enlazados covalentemente entre sí, tal como por medio de un corto ensanchamiento de residuos de alanina o por medio de un sitio putativo para proteólisis por medio de catepsina. Véase, por ejemplo, la patente EUA 5,126,249 y la patente europea 495,049 con respecto a dichos sitios. Esto inducirá proteólisis cito-específica de la forma preferida

en dos análogos deseados. Alternativamente, se puede formar un número del mismo péptido o de diferentes péptidos de la presente invención en un polímero péptido, tal como por ejemplo, la polimerización de péptidos con un agente de polimerización adecuado, tal como glutaraldehído al 0.1% (Audibert et al. (1981), *Nature* 289:593). El polímero preferiblemente contendrá de 5 a 20 residuos de péptido. Dichos polímeros de péptido también pueden ser formados entrelazando los péptidos o uniendo los múltiples péptidos a vehículos macromoleculares. Entre los vehículos macromoleculares adecuados se encuentran por ejemplo, las proteínas, tales como toxoide tetánico, copolímeros lineales o ramificados de aminoácidos, tal como el copolímero lineal de L-alanina, ácido L-glutámico y L-lisina y un copolímero ramificado de L-tirosina, ácido L-glutámico, L-alanina y L-lisina (T,G)-A-L-, o con polímeros multicadena como el poly-DLalanina de cadena múltiple (M. Sela et al. 1955, J. Am. Chem. Soc. 77:6175). Se obtienen los conjugados por ejemplo, acoplando primero el péptido con una carbodiimida soluble al agua, tal como clorhidrato 1-etil-3- (3'-dimetilaminopropil) carbodiimida, y después realizando la conjugación con el vehículo macromolecular como lo describió Miller, G.M. et al. (1982) *Proc. Natl.Acad. Sci EUA* 79:569. El contenido de un péptido acoplado en cada conjugado se determina por medio de

análisis de aminoácidos, en comparación con la composición del vehículo solo.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, se pueden fijar una o más péptidos activos a un vehículo macromolecular o se pueden polimerizar en presencia de glutaraldehído.

Los péptidos, polímeros de los mismos o sus conjugados con vehículos macromoleculares adecuados, se darán a los pacientes en forma que aseguren su biodisponibilidad, haciéndolos adecuados para el tratamiento. Si se encuentra que más de un péptido tiene una actividad inhibidora significativa, estos péptidos se administrarán a pacientes en una formulación que contenga una mezcla de los péptidos.

La invención además incluye composiciones farmacéuticas que comprenden por lo menos un péptido sintético de acuerdo con la invención, un conjugado del mismo con un vehículo o un polímero macromolecular adecuado, opcionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Cualquier ruta adecuada de administración está contemplada en la invención, incluyendo la vía oral, intravenosa, subcutánea, intraarticular, intramuscular, por medio de inhalación, intranasal, intratecal,

intraperitoneal, intradérmica, transdérmica u otras rutas conocidas, incluyendo la ruta entérica.

Los rangos de dosis para la administración de las composiciones de la presente invención, serán lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado, en donde por ejemplo, una respuesta inmune tanto al auto-anticuerpo que induce SLE, tal como se mide por medio de la proliferación de células T *in vitro*, se puede evitar o inhibir sustancialmente, y además, en donde la enfermedad se puede tratar significativamente.

Las dosis no deberán ser tan altas como para provocar efectos adversos secundarios, tales como las reacciones secundarias indeseadas, la inmunosupresión generalizada, las reacciones anafilácticas y similares.

Las dosis efectivas de los péptidos de esta invención para que se utilicen en el tratamiento de SLE son en la escala de 1 µg/kg a 1 mg/kg por peso corporal. La dosificación administrada dependerá de la edad, del sexo, de la salud y peso del receptor, de la clase de tratamiento concurrente, si es que existen, de la frecuencia del tratamiento, y de la naturaleza del efecto deseado.

Los péptidos sintéticos de la invención, particularmente aquellos de secuencias de la I a la V de la presente invención, están objetivadas a inhibir o suprimir respuestas específicas de antígenos de pacientes SLE sin

afectar otras respuestas inhumes. Este enfoque es de ulterior importancia ya que la mayoría de los pacientes diagnosticados son mujeres jóvenes que tienen que ser tratadas por muchos años y el tratamiento aceptado actualmente para el SLE involucra la administración de agentes inmunusupresores, tales como córtico esteroides y/o farmacocitotóxicos, que son tanto no específicos como que tienen múltiples efectos colaterales adversos.

Las preparaciones de la presente invención se pueden administrar parenteralmente, tópicamente o rectalmente. Por supuesto son formas determinadas adecuadas para cada ruta de administración. Por ejemplo, se administran por medio de inyección, inhalación, ungüentos, supositorios, etc., o por administración mediante inyección, infusión o inhalación; o tópica por medio de lociones o ungüentos; y rectal por medio de supositorios.

Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" como se utiliza en la presente invención, significan modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, generalmente por medio de inyección e incluye sin limitación alguna las rutas intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal,

transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e inyección intraestérnica e infusión.

Las frases "administración sistémica", "administrado sistemáticamente", "administración periférica" y "periféricamente administrada" como se utiliza en la presente invención, significa la administración de un compuesto, fármaco u otro material diferente que no sea directamente en el sistema nervioso central, tal como entra al sistema del paciente y por lo tanto, está sujeto al metabolismo y a otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

Los detalles de los procedimientos e información general de la formulación en excipientes adicionales se pueden encontrar en Ramington: The Science and Practice of Pharmacy "Remington: La ciencia y práctica de la farmacia". 20ª edición.

Los péptidos sintéticos se pueden producir tal como se describe en la Publicación Internacional PCT No. WO 02/067848, o en la Publicación Internacional No. WO 96/30057.

Esta invención se entenderá de mejor manera a partir de los detalles experimentales que se definen a continuación. Sin embargo, aquellos expertos en la técnica podrán apreciar fácilmente que los métodos específicos y

los resultados analíticos que se analizan aquí, son simplemente ilustrativos de la invención tal como se describe más ampliamente en las reivindicaciones que siguen a continuación.

Detalles experimentales

La síntesis de los péptidos I a V y las pruebas que muestran la efectividad de los péptidos sintetizados para tratar SLE en modelos animales se describen en la Publicación Internacional PCT No. WO 96/30057. Las pruebas animales adicionales se describen en la Publicación Internacional PCT No. WO 02/067848.

EJEMPLO 1

Desarrollo de la formulación para el compuesto 1

Los péptidos de la solicitud sujeto, se describen en la Publicación Internacional PCT No. WO 02/067848, publicada el 6 de septiembre de 2002, y pueden ser preparadas por métodos muy conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Peptides: Synthesis, Structure and Applications "Péptidos; Síntesis, estructura y aplicaciones", editado por B. Gutte, Academia Press, 1995; Peptide Synthesis Protocols "Protocolos de síntesis de péptidos" editado por M. Pennington and B. Dunn, Humana Press, 1994; Schnolxer, M. et al., "In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase synthesis. Rapid, High yield

assembly of difficult sequences." "Neutralización en sitio en síntesis de fase sólida Boc-química. Ensamble rápido de alto rendimiento de secuencias de dificultad". Int. J. Rept. Protein Res. (1992) 40: 180-193).

El compuesto 1 es un polipéptido sintético compuesto de 19 aminoácidos. Es provisto como una sal de acetato. La solubilidad acuosa del péptido ha sido determinada menor que 0.5 mg/ml. La Figura 1 muestra el compuesto 1 como una sal de acetato.

Para poder desarrollar una formulación con una concentración de péptidos que excedan 2 mg/ml, de preferencia hasta 10 mg/ml, se desarrollaron experimentos con varios incrementadotes de solubilidad. Los experimentos preliminares indicaron que una concentración de 2 mg/ml no se puede lograr tan fácilmente. Para poder desarrollar una formulación para inyección subcutánea, también es deseable que el pH esté en la escala de 4 a 9, y que la solución sea iso-osmótica.

Basándose en estudios de literatura extensa, se adoptaron algunos enfoques principales para poder producir una formulación con una solubilidad máxima. Los factores considerados fueron:

- Ajuste de pH y reguladores de pH
- Solventes
- Co-solventes

• Agentes solubilizantes

Métodos

El compuesto 1 se disolvió en la solución incrementadora de solubilidad elegida, ya sea separada o en combinación con otros excipientes y las soluciones se agitaron por lo menos por una hora. El pH se ajustó si se necesitaba. Las soluciones se examinaron visualmente para calcular la solubilidad, y fueron enviadas para determinación de prueba analítica. Para algunas formulaciones elegidas, también se sometió a prueba la actividad biológica.

Resultados

El Cuadro 1 presenta el tipo de incrementadores de solubilidad que se utilizan para el desarrollo de la formulación. Los Cuadros 2 y 3 resumen los experimentos que fueron realizados con los diversos incrementadores de solubilidad. El Cuadro 2 resume el cribado inicial desarrollado con concentraciones de péptidos en la escala de 5 a 10 mg/ml. El trabajo experimental se desarrolló con una concentración más elevada de péptidos y después se repitió con dosis menores (véase cuadro 3).

Las pruebas iniciales indicaron que el compuesto 1 era más soluble a los límites de los niveles de pH deseados, tanto ácidos como básicos, pero eran menos estables en la escala de pH básica. Por lo tanto, se

sometieron a prueba varios reguladores de pH y agentes de ajustes de pH, incluyendo el regulado de pH de acetato, el regulador de pH de citrato y carbonato de sodio. Ninguno de los reguladores de pH inicialmente comprobados logró el nivel deseado de solubilidad de los péptidos.

Solamente arriba de pH 9.2 y debajo de pH 3.0, los niveles de solubilidad que se observaron fueron de 2 mg/ml. Sin embargo, en la etapa inicial, las formulaciones con regulador pH de acetato y el regulador de citrato (con Manitol como agente de tonicidad) fueron seleccionados para los estudios de toxicología inicial. Estas formulaciones se probaron para la actividad biológica y se comprobaron activos.

Los solventes no acuosos (véase cuadro 1) tal como etanol, glicerina, propilenglicol, cremóforo y sus combinaciones fueron probados, más no incrementaron la solubilidad del Compuesto 1. Una solución de 30% de DMA (dimetil-acetamida) rindió una solubilidad en las escalas deseadas) (5 a 9 mg/ml), pero no fue adecuado para la formulación farmacéutica debido a su perfil de toxicidad. También se observó una solubilidad mejorada utilizando 30% (p/p) de PEG 400 (5 a 9 mg/ml). Esta formulación fue elegida para los estudios de toxicología, pero se comprobó que era tanto inactivo en el ensayo biológico y podría ser también la causa de ciertos efectos adversos en un estudio

de toxicidad en ratones. Por lo tanto, se decidió no perseguir más esta formulación. En vista de los experimentos preliminares, no se utilizaron solventes no acuosos en las formulaciones sujeto.

Se probaron varios aminoácidos (ver cuadro 1) incluyendo L-Arginina, ácido Glutámico, L-Glicina, y L-Lisina, para mejorar la solubilidad de la proteína. La solubilidad del péptido en L-Arginina fue al nivel deseado, pero el pH resultante era arriba de 9. Un intento para disminuir el pH utilizar una sal de HCl de Arginina resulto en la precipitación del péptido. También se probó Albúmina de suero humano y se mejoró la solubilidad del péptido a concentraciones del péptido bajas (1 mg/ml) (ver cuadro 3). Sin embargo, debido a su inmunogenicidad potencial y la baja solubilidad del péptido, no se utilizó en experimentos adicionales.

Los ingredientes para carga, (véase cuadro 1) incluyendo Mannnitol, Sorbitol y Dextrano, se sometieron a prueba solos y en combinación con otros excipientes, pero no mejoraron la solubilidad del péptido en la solución.

Los co-solventes (véase cuadro 1), incluyendo Polisorbato 20 y Polisorbato 80, se sometieron a pruebas solos y en combinación con otros excipientes. Aunque concentraciones menores de Polisorbatos (hasta el 6%) no mejoraron la solubilidad del péptido, concentraciones más

elevadas (hasta el 10% - véase el cuadro 2) mejoraron la solubilidad del péptido hasta 2 mg/ml. Sin embargo, dichas concentraciones elevadas de Polisorbato se consideraron inadecuadas para las formulaciones farmacéuticas.

Dos tipos de ciclodextrinas, tanto aprobadas para su uso en productos parenterales comercializados, se sometieron a prueba también: hidroxipropil-β-ciclodextrina y sulfobutileter-β-ciclodextrina (Captisol). Ambos incrementaron marcadamente la solubilidad del péptido (concentraciones en niveles de 10 mg/ml para Hidroxipropil-β-ciclodextrina y 2.5 para Captisol). La actividad biológica de las dos formulaciones de ciclodextrina se sometió a prueba, y se encontró que eran iguales a la actividad del péptido solo.

CAPTISOL® es un derivado de β-ciclodextrina polianinónico comercialmente disponible con una sal de sulfonato de sodio separada de la actividad hidrofóbica por medio de un grupo separador de heterbutílico, o éter sulfobutílico (SBE). CAPTISOL® es el nombre comercial para la preparación CyDex Inc. de sulfobutiléter β-ciclodextrina repta-sustituida de CyDex Inc. (SBE7-β-CD) (www.captisol.com). La estructura de CAPTISOL® permite que las moléculas del fármaco se ajusten en la cavidad hidrofóbica, aislando de esa manera la molécula del fármaco

a partir de un solvente acuoso. Debido a que la superficie exterior de CAPTISOL® es hidrofílica, por lo tanto se mejora la solubilidad de la molécula del fármaco formada en complejos. El uso de ciclodextrinas para mejorar la solubilidad de las moléculas del fármaco, se describe en la Patente EUA números 5,134,127 y 5,376,645, cuyos contenidos totales se incorporan en la presente por referencia.

De acuerdo con la literatura del CAPTISOL® de CyDex Inc., es segura cuando se administra parenteralmente y por lo tanto, no muestra la nefrotoxicidad asociada con β-ciclodextrina. Con relación a la β-ciclodextrina, el CAPTISOL® provee características de formación de complejos comparables o más elevadas y una superior solubilidad en agua en un exceso de 90 gramos/100 ml - con una mejora de 50 veces.

Conclusiones

Se encontró que varios incrementadores de solubilidad coinciden con la escala de solubilidad deseada: DMA, PEG-400, dimetil-acetamida, polietilenglicol, aceite de castor polioxilado, N-metil-2-pirrolidinona, 1-etenil-2-pirrolidinona, Polisorbato 20, Polisorbato 80, Hidroxipropil-β-ciclodextrina y Sulfobutiléter-β-ciclodextrina (Captisol®). De estos incrementadores de solubilidad, se ha comprobado que ambas ciclodextrinas son superiores con respecto a la solubilidad, actividad

biológica y estabilidad. Por lo tanto, se decidió seleccionar Captisol® como el incrementador de solubilidad para su uso en las formulaciones del Ejemplo 5 y para estudiar adicionalmente ambas formulaciones de ciclodextrina. La formulación final para los estudios clínicos del Ejemplo 5, consisten de 120 mg/ml de Captisol en agua con la cantidad deseada de péptido (0.5, 1.0 ó 2.5 mg/ml) y HCl y NaOH para el ajuste de pH.

CUADRO 1

Incrementadores de solubilidad utilizados para el desarrollo de la formulación del compuesto 1.

Clasificación del incrementador de solubilidad	**Incrementadores de Solubilidad**
Solventes	Cremofor EL, CMC, Etanol, DMA, glicerina, Propilenglicol, PEG 400, Monotioglicerol
Co-solventes	Polisorbato 20, Polisorbato 80
Agentes de solubilización	Argenina, HSA, Glicina, Creatinina, Ácido Glutámico, Licina (sal de acetato y base libre), Captisol, Hidroxipropil-β-ciclodextrina,
Agentes de formación	Manitol Sorbitol, Dextrosa, Dextranlactosa
Agentes de ajuste pH	Regulador de citrato, regulador de acetato, Carbonato de sodio

CUADRO 2

Lista de co-solventes y estabilizadores evaluados en las formulaciones del péptido del compuesto 1

Incrementador de solubilidad *	% Utilizado	% de la cantidad estándar a partir de la literatura	Cantidad de péptido agregado (mg/ml)	% Análisis	pH de formulación	Observaciones
Albúmina (HSA), Dextrosa	1.5 1.5	0.4-5.0	5	-	6.0 Ajustar a 4.1	Insoluble
Albúmina (HSA), Polisorbato 80, glicina	1.0 0.6 2.0	0.4-5.0 0.8-4.0 0.2-2.1	5	-	5.8 Ajustar a 4.1	Insoluble
Arginina	1.5	0.8-1.6	15	93	9.8	Solución transparente
Arginina HCl	2.0	0.8-1.6	5	-	3.5	Insoluble
Arginina Lactosa	1.5 1.5	0.8-1.6	15	93	9.8	Cuando el pH fue reducido bajo 8.5, el péptido se precipitó y la solución se tornó en un gel
Captisol	10.0 20.0	Hasta 30.0	10	86 89	4.9 Ajustar a 4.4	Solución turbia
CMC (carboxi-metil celulosa) en acetato	0.2 0.05M		5	90	5.0	Para estudios toxicológicos

Incrementador de solubilidad *	% Utilizado	% de la cantidad estándar a partir de la literatura	Cantidad de péptido agregado (mg/ml)	% Análisis	pH de formulación	Observaciones
Creatinina	0.8	Hasta 0.6	5	-	6.1 Ajustar a 4.1	Insoluble
Cremofor EL Etanol Dimetilacetamida	15.0 10.0 6.0	-10.0 0.6-32.9 0.012-6.0	5	-	4.0	Muy turbia
Dextrano	4.0 a 15.0	3.0-30.0	5	-	3.9	Insoluble
Dimetilacetamida (DMA)	6.0-20.0	0.012-6.0	5	-	4.6	Insoluble
Dimetilacetamida (DMA)	25.0	0.012-6.0	5	87	5.1	Solución transparente
Dimetilacetamida (DMA)	30.0	0.012-6.0	10	93	5.1	Solución transparente
Etanol	10.0	0.6-32.9	5	-	-	Insoluble
Ácido glutámico	2.0		5	-	3.7	Cuando el pH se incrementó sobre 4, el péptido se precipitó y la solución se tornó en un gel
Glicerina	1.5	1.6-32.5	5	-	4.5	Insoluble

Incrementador de solubilidad *	% Utilizado	% de la cantidad estándar a partir de la literatura	Cantidad de péptido agregado (mg/ml)	% Análisis	pH de formulación	Observaciones
Glicerina	30.0	1.6-32.5	5	-	3.7	Insoluble
Glicerina, Polisorbato 80	10.0 0.6	1.6-32.5 0.8-4	5	12	6.5 Ajustar a 4.5	Insoluble
Glicina	0.4	0.2-2.1	5	-	4.6	Insoluble
Hidroxipropil-β-ciclodextrina	20.0	Hasta 30.0	10	99	4.6	Solución transparente
Sal de acetato de lisina	2.0		5	-	3.8	Insoluble
Base libre de Lisina	2.0		5	-	9.2	Cuando el pH se incrementó sobre 8, el péptido se precipitó y la solución se tornó en un gel
Manitol en regulador de pH de citrato	4.0 0.035M	2.0-10.0	5	38	3.4	Para estudios de toxicología
Manitol en regulador de pH de acetato	4.0 0.05M	2.0-10.0	5	32	4.3	Para estudios de toxicología
Manitol, Glicina	20.0 0.4	2.0-10.0 0.2-2.1	5	14	6.4 Ajustar a 4.5	Insoluble

Incrementador de solubilidad *	% Utilizado	% de la cantidad estándar a partir de la literatura	Cantidad de péptido agregado (mg/ml)	% Análisis	pH de formulación	Observaciones
Manitol, Polisorbato 20	20.0 0.6	2.0-10.0	5	22	6.5 Ajustar a 4.5	Insoluble
Monotioglicerol	1.0	0.1-10.0	5	-	4.5	Solución turbia
PEG 400	30.0	Hasta 30.0	5	88	4.2	Ligeramente opaca
PEG 400	30.0	Hasta 30.00	10	89	4.2	Solución turbia
PEG 400 con DMA	30.0 6.0	Hasta 30.0 0.012-0.6	5	94	4.2	Solución transparente
PEG 400	10.0	6.0-18.0	6	58	4.2	Insoluble
PEG 400 DMA	10.0 10.0	Hasta 30.0 0.012-0.6	5	-	4.3	Insoluble
PEG 400 Propilenglicol PG	10.0 10.0	Hasta 30.0 10.0	5	-	4.1	Insoluble
PEG 400 Propilenglicol	18 50.0	Hasta 30.0 10.0	5	100	4.2	Solución transparente
Polisorbato 80	1.6	0.8-4.0	5	24	7.2 Ajustar a 4.5	Insoluble
Polisorbato 80	6.0	0.8-4.0	5	-	3.9	Insoluble
Polisorbato 80 Creatinina	6.0 0.6	0.8-4.0 hasta 0.6	5	-	4.0	Insoluble

Incrementador de solubilidad *	% Utilizado	% de la cantidad estándar a partir de la literatura	Cantidad de péptido agregado (mg/ml)	% Análisis	pH de formulación	Observaciones
Propilenglicol PG DMA	10.0 10.0	10.0 0.012-0.6	5	-	4.2	Insoluble
Propilenglicol PG	10.0-30.0	10.0	5	-	4.2	Insoluble
Carbonato de sodio	1.5		5	-	11.4	Cuando el pH se incrementó sobre 8.5, el péptido se precipitó y la solución se tornó en un gel
Sorbitol	5.0	10.0-25.0	5	-	6.9 Ajustar a 4.5	Solución turbia

CUADRO 3

Formulaciones del compuesto 1 a concentraciones bajas del péptido

Incrementador de solubilidad *	% Utilizado	% de la cantidad estándar a partir de la literatura	Cantidad de péptido agregado (mg/ml)	% Análisis	pH de formulación	Observaciones
Albúmina (HSA)	5.0	0.4-5.0	1.0 2.5	90 -	6.9 Ajustar a 4.5	Solución transparente Solución turbia
Arginina	1.5	0.8-1.6	1.0	24	10.6 Ajustar a 8.5	Cuando el pH se incrementó sobre 8.5, el péptido se precipitó y la solución se tornó en un gel
Captisol®	12.0	Hasta 30.0	1.0 2.5	106 100	5.3 6.5 a 8.5	Solución transparente
Dextrano	20.0	3.0-30.0	1.0	69	4.8 Ajustar a 4.0	Solución turbia
Glicerina	30.0	1.6-32.5	1.0	-	4.8 Ajustar a 4.0	Solución turbia
Manitol	4.0	0.8-4.0	1.0	64	4.7 Ajustar a 4.0	Solución turbia

Incrementador de solubilidad *	% Utilizado	% de la cantidad estándar a partir de la literatura	Cantidad de péptido agregado (mg/ml)	% Análisis	pH de formulación	Observaciones
Polisorbato 20	10.0	-	1.0 2.5	95 88	5.8 Ajustar a 4.8	Solución transparente Transparente con una pequeña cantidad de precipitación
Polisorbato 20 Manitol	10.0 2.0	2.0-10.0	2.5	115	5.1 Ajustar a 4.3	Solución transparente
Polisorbato 80	4.0 6.0-10.0	0.8-4.0	1.0 2.5	91 89	5.5 Ajustar a 5.0	Solución transparente Solución ligeramente turbia
Polisorbato 80 Manitol	4.0 2.0	0.8-4.0 2.0-10.0	2.5	88	5.1 Ajustar a 4.4	Solución ligeramente turbia
Propilenglicol PG	10.0	10.0	1.0	78	5.0 Ajustar a 4.4	Solución turbia
Sorbitol	20.0	10.0-25	1.0	52	4.5	Solución turbia

EJEMPLO 2

Protocolo de preparación para solución del compuesto 1 en Captisol®.

Los métodos de solución estándar, tales como el mezclado del Compuesto 1 en seco y Captisol® en seco en agua o agregando el Compuesto 1 a una solución preparada de Captisol® y agua no dieron como resultado la completa disolución en las concentraciones deseadas. Diversas concentraciones diferentes tanto el Compuesto 1 como de Captisol® se sometieron a prueba a varios niveles de pH. Sin embargo, el siguiente método para producir una solución del Compuesto 1 en Captisol® resultó en la completa disolución en las concentraciones deseadas.

Materiales: Captisol®, Compuesto 1 y agua.

Método:

1.- Pesar la cantidad apropiada de Captisol® para dar una concentración final de 120 mg/ml.

2.- Agregar 80% de la cantidad final de agua mezclado por 10 minutos con un agitador magnético.

3.- Pesar el Compuesto 1 para dar una concentración final de 2.5 mg/ml, 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml ó 0.1 mg/ml.

4.- Agregar el péptido a la solución de Captisol®. Mezclar por 1 hora.

5.- Elevar el pH para obtener una solución transparente (en la formulación de 2.0 mg/ml podría existir la necesidad de elevar el pH ligeramente arriba de 9). El pH se debe ajustar utilizando HCl 1.0 N y NaOH 1.0 N. Mezclar durante 10 minutos.

6.- Corregir el pH a la escala de 7.5 a 8.5 si se necesita (utilizando ya sea HCl o NaOH 1.0 N).

7.- Agregar agua al volumen final.

8.- Filtrar la solución a través de un filtro de acetato de celulosa 0.2µ.

9.- Registrar el pH final.

10.- Dispensar en cantidades alícuotas y almacenar la temperatura adecuada.

EJEMPLO 3

Liofilización del Compuesto 1 y solución de Captisol®.

El procedimiento de actual de liofilización difiere de otros procedimientos de liofilización ya que el porcentaje de sólidos en la formulación es alto (12%) mientras que los productos liofilizados normalmente contienen entre 5 y 10% de sólidos.

Equipo

La secadora que se utilizó fue una secadora liofilizadora Edwards Lyoflex 0.6. Se desarrolló el IQ/OQ del equipo y se verificó para que tuviera su cumplimiento

151

en aseguramiento de calidad antes del desarrollo del procedimiento.

Se prepararon las soluciones del Compuesto 1 y Captisol® en concentraciones de 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml y 2.5 mg/ml del Compuesto 1. El volumen de relleno se ajustó a 1 ml (1.05 gr).

Principales etapas del procedimiento:

1.- Congelar

2.- Sostener (a temperatura baja)

3.- Secar bajo vacío en dos etapas:

3.1 Secado primario - entibiado en el instante para sostener la temperatura, controlar la temperatura de estante al nivel más elevado.

3.2 Secado secundario - Reducción de presión a un valor mínimo a la temperatura superior del estante.

Lotes 1 - 3

Congelación - La congelación fue de temperatura ambiente a -40° C en un periodo de 2 horas. Los estantes se mantuvieron a -40° C durante 3 horas.

Secado - Se desarrolló el secado a una presión de 110 µbarias. La temperatura de estante se incrementó a 20° C sobre 13 horas y se sostuvo a esa temperatura por otras 13 horas adicionales.

El tiempo total del procedimiento fue de 31 horas.

Resultados:

Los resultados de contenido de agua fueron:

Lote no. 1: 3.8%

Lote no. 2: 4.0% y

Lote no. 3: 4.9%

Lotes 4 y 5

Como los resultados del contenido de agua de los procedimientos que condujeron a los lotes 1, 2 y 3 fueron más elevados que el valor deseado, se decidió agregar una etapa secundaria de secado a la misma temperatura y a una presión baja.

Secado - Se desarrolló el secado a una presión 110 µbarias. Se incrementó la temperatura de estante a 20° C por más de 13 horas y se sostuvo a esa temperatura por otras 13 horas más. (Lote 4) u 8 horas (Lote 5). Se redujo la presión a 10 µbarias durante otras 5 horas adicionales.

Tiempo total del procedimiento de 36 horas.

Resultados:

Los resultados del contenido de agua fueron

Lote 4: Placebo: 3.0%.

1 mg/ml: 3.9%.

Lote 5: Placebo: 4.1%

Conclusiones

Como se muestra, se desarrolló un procedimiento de liofilización satisfactoria para el Compuesto 1 con Captisol®. Debido al alto porcentaje de sólidos y por lo tanto a la torta condensada, el procedimiento desarrollado es más largo que los ciclos actualmente disponibles de liofilización para péptidos y muestra una etapa secundaria de secado adicional. El Cuadro 4 resume el procedimiento desarrollado.

CUADRO 4

Etapa	**Compuesto 1 (Péptido) con Captisol®**
Cargado	5° C
Congelado	2 horas a -40° C
Sostener a baja temperatura	3 horas a -40° C
Secado primario: Entibiar a 20° C Sostener a 20° C	 13 horas, presión 110 µbar 13 horas, presión 110 µbar
Secado secundario: Sostener a 20° C	5 horas, presión 110 µbar
Almacenaje a	-20° C
Tiempo de procesamiento	36 horas

EJEMPLO 4

Reexaminación de la actividad biológica *in vivo* de la solución del compuesto liofilizado (DP, 1 mg/frasco, Captisol® al 12%)

Se controló la actividad biológica por medio de inhibición de la secreción de IL-2 de las células T específicas de estándar de referencia (RS) del Compuesto 1 seguido de tratamiento subcutáneo (s.c.) con la solución del compuesto liofilizado, es decir, el producto del fármaco (DP), a dos concentraciones. Los resultados del tratamiento se comparan con aquellos para tratar ratones con Compuesto 1 (RS) en solución salina regulada con pH de fosfato (PBS). Los resultados se muestran en los cuadros a continuación y en la Figura 2.

Diseño experimental:

1.- Inmunización Día 0

(Compuesto 1 RS emulsificado con CFS, todos ellos en cuatro soportes de pedestal)

2.- Tratamiento Día 0

(s.c. (subcutánea) en la parte trasera del cuello en solución al 200 µl)

3.- Activación *in vitro* con: Día 10

a) Compuesto 1 RS concentraciones de 0; 0.5; 1; 2.5; 5; 10; 25; 50 y 100 µg/ml

b) un péptido con el orden inverso de aminoácidos del Compuesto 1 (control negativo).

c) Con A (control positivo).

4.- Incubación de cultivo durante 20 horas a 37°C en una incubadora de 5% CO_2 modificada.

5.- Medición de IL-2 por medio de ELISA.

CUADRO DE GRUPOS EXPERIMENTALES

GRUPO	INMUNIZACIÓN CON	TRATAMIENTO
A	50 µg Compuesto 1 RS	Compuesto 50µg 1 RS en PBS
B		Compuesto 200µg 1 RS en PBS
C		50µg DP (lote 2)
D		200µg DP (lote 2)
F		Placebo (Captisol® al 12 %)

Secreción de iL-2 de ratones tratados con el compuesto 1 (dp) después de la activación in-vitro con el compuesto 1 RS (pg/ml)

		TRATADO CON:								
	GRUPO	F	A		B		C		D	
Activador	Concentración de Activador (µg/ml)	Captisol® al 12% en ampolletas	COMP.1 RS 50 µg/ratón	% inhib.	COMP.1 RS 200 µg/ratón	% inhib.	DP 50 µg/ratón	% inhib.	DP 200 µg/ ratón	% inhib.
Con A	2.5	5,825	6,215		5,403		3,537		4,069	
Comp.1 RS	0	BQL	BQL		BQL		BQL		BQL	
Comp.1 RS	0.5	11	9		19		8		BQL	
Comp.1 RS	1	10	BQL		BQL		BQL		BQL	
Comp.1 RS	2.5	15	8	51	BQL	NA	6	61	6	62
Comp.1 RS	5	20	9	55	8	60	10	48	7	63
Comp.1 RS	10	25	16	38	11	58	13	48	8	67
Comp.1 RS	25	29	15	48	11	63	16	45	13	56
Comp.1 RS	50	40	21	47	15	62	20	50	12	69
Comp.1 RS	100	42	25	41	18	58	24	43	15	64
	Inhibición promedio (%) (en la escala de 5-100µg/ml)			45.6		60.4		46.8		63.7

BQL= Debajo del límite de cuantificación
Filas 1-4 no se incluyeron en la curva

NA = No aplica

EJEMPLO 5

Evaluación de la dosis óptima para el tratamiento

Se utilizan las siguientes abreviaturas en la siguiente descripción:

CFA	Adyuvante completo de Freund
Con A	Concanavalina A
DP	Producto del fármaco
DS	Sustancia del fármaco
EM-1	Medio DCCM-1 enriquecido
EM-3	Medio de suero de becerro fetal RPMI-1640 +
FCS	Suero de becerro fetal
IFN-γ	Gama interferón
LN	Nódulo linfático
PBS	Solución salina regulada con fosfato
RS	Solución estándar de referencia
s.c.	Subcutánea
TB	Azul tripano
TGF-β	Factor de crecimiento beta de transformación
WFI	Agua para inyección

Introducción

Se inmunizó un grupo de 20 ratones con 50 µg/ratón de Compuesto 1 RS. Los ratones inmunizados se

asignaron a cinco grupos de tratamiento conforme a lo que sigue: placebo, 25, 50, 100 y 200 µg/ratón de Compuesto 1 DP (administración subcutánea). Diez días después de la inmunización y el tratamiento, se extrajo LN y se preparó una suspensión unicelular. Se midió la secreción *in vitro* de IFN-γ y TGF-β por la células cultivadas en respuesta a la activación con diferentes concentraciones del Compuesto 1 RS.

Diseño experimental

1.- Inmunización -Día 0

2.- Tratamiento con el Compuesto 1 DP -Día 0

3.- Activación *in vitro* de células LN de los ratones tratados -Día 10

4.- Recopilación de cultivo (para la determinación de IFN-γ) -Día 12

5.- Recopilación de cultivo (para la determinación de TGF-β) -Día 13

6.- ELISA para IFN-γ

7.- ELISA para TGF-β

159

CUADRO 7
Grupos experimentales

Grupo experimental	Tratamiento		Activación in-vitro	
	Artículo	Ratón/ grupo	Células/ pocillo	Compuesto 1 rs concentración
A1	Control 12% Captisol®	4	2.5×10^5 / 5×10^5	Compuesto 1 RS 0-100 µg/ml
A2	25 µg/ratón	4	2.5×10^5 / 5×10^5	
A3	50 µg/ratón	4	2.5×10^5 / 5×10^5	
A4	100 µg/ratón	4	2.5×10^5 / 5×10^5	
A5	200 µg/ratón	4	2.5×10^5 / 5×10^5	

Materiales y reactivos

Animales

Ratones: 20 ratones hembra BALB/c, proporcionados por Harlan animals breeding center, Rehoboth.

Edad a la inmunización (semanas + días): 10

Peso promedio de los ratones incluidos en el experimento: 19.01 gr.

Materiales

Reactivos generales

Se preparó etanol al 70% a partir de 96% de etanol diluyendo con H_2O purificada.

Preparación de las soluciones del Compuesto 1 para la inmunización

Se preparó una emulsión RS del Compuesto CFA-1 (500 µg/ml, 50 µg/ratón) conforme a lo siguiente:

1.- Se disolvieron 1.874 mg del Compuesto 1 en 1.87 ml de WFI para rendir una solución de 1 mg/ml.

2.- Se sometió a prueba la solución con una banda indicadora de pH y se encontró que tenía un pH de 5.

3.- Se emulsificaron 1.5 ml de la solución con CFA de 1.5 ml resultando en una concentración final de 500 µg/ml.

Preparación de las soluciones para el tratamiento

El tratamiento fue por medio de una inyección subcutánea con una solución de 200 µl.

Preparación de la solución de Captisol® al 12%

Se disolvieron 1.2 gr de captisol® en 10 ml de WFI para dar una solución de captisol® al 12%.

Procedimiento experimental

Pesado de los ratones

Se pesaron los ratones antes de la inmunización. El peso promedio de los mismos fue de 19.01 + 0.97 gr.

Inmunización

Se desarrolló la inmunización inyectando 100 microlitros de la emulsión de inmunización (50 microlitros dentro de cada soporte trasero).

Tratamiento

Seguido de la etapa de inmunización, se trataron los ratones por medio de inyección subcutánea de 200 µl del Compuesto 1 DP o con soluciones del tratamiento con captisol® al 12%, en la parte posterior del cuello de los ratones.

Cultivo *in vitro*

Se sacrificaron los ratones por medio de dislocación cervical. Se extrajo LN de las patas traseras y se transfirieron a una caja de petri estéril conteniendo aproximadamente 5 ml de RPMI. Se extrajeron las células por medio de un apretado delicado del tejido contra una red de acero inoxidable de medida de 200 micrometros red. Se cultivaron las células se centrifugaron a 300 G durante 10 minutos a RT.

Se prepararon suspensiones unicelulares del LN de los pozos de cada grupo experimental.

Se cultivaron suspensiones de 2.5 y 5.0 millones de células/mililitro/pozo con el Compuesto 1 RS (0-100 µg/ml) en EM-1.

Se determinó por medio de ELISA del medio de cultivo la secreción de IFN-γ y TGF-β, como indicación de la respuesta celular (48 horas para IFN-γ y 72 horas para TGF-β).

162

CUADRO 8

Grupos Experimentales In-Vitro

Grupo experimental	Tratamiento	Activación in-vitro	
	Artículo	Células/pocillo	Concentración de la sustancia de activación
A1-2.5	Control 12% Captisol®	2.5×10^6	Compuesto 1 RS 0; 3.125; 6.25; 12.5; 50 y 0-100 µg/ml Con A 2.5 µg/ml
A1-5		5×10^6	
A2-2.5	DP 25 µg/ratón	2.5×10^6	
A2-5		5×10^6	
A3-2.5	DP 50 µg/ratón	2.5×10^6	
A3-5		5×10^6	
A4-2.5	DP 100 µg/ratón	2.5×10^6	
A4-5		5×10^6	
A5-2.5	DP 200	2.5×10^6	

Preparación de suspensiones celulares

CUADRO 9

Resultados del conteo de células y preparación de las suspensiones de células

(10 X 10^6/ml)

Gpo.	Vol. (ml)	Factor Dilut.	Células viable	Células muertas	Células viables%	Células muertas%	Prom. Células viables	Total células viables (x 10^6)	EM-1 para agregar (ml) para suspensión de 10 x 10^6 células/ml
A1	10	16	115 / 109	-- / --	100 / 100	-- / --	112	179.2	17.9
A2	10	16	50 / 45	4 / 2	92.6 / 95.7	7.4 / 4.3	47.5	76	7.6
A3	10	16	80 / 81	4 / 5	95.2 / 94.2	4.8 / 5.8	80.5	128.8	12.8
A4	10	16	87 / 91	-- / --	100 / 100	-- / --	89	142	14.2
A5	10	16	120 / 105	2 / 2	98.4 / 98.1	1.6 / 1.9	112.5	180	18

Preparación de suspensiones celulares (5 x 10^6/ml)

Se diluyeron las suspensiones 10 x 10^6 células/ml al 1:2 agregando 5ml EM-1 a una suspensión de 5 ml de células.

Incubación de cultivos de células LN en placas de 48 pozos

Se prepararon 3 placas de cultivo de tejido. Se agregó lo siguiente a cada placa.

Control antecedente (células incubadas con medio de cultivo)

0.5 ml de suspensión de células

0.5 ml de cultivo medio (EM-1)

Control positivo de sistema (células estimuladas con Con A)

0.5 ml de suspensión de células

0.5 ml de cultivo medio (EM-1)

0.5 ml de Con A 5 µg/ml en EM-1 (concentración final: 2.5 µg/pozo)

Células incubadas con soluciones de activación del Compuesto 1 (muestras)

0.5 ml de suspensión de células

0.5 ml de Compuesto 1 RS 6.25 - 200 µg/ml (concentración final 3.125 - 100 µg/ml/pozo)

Incubación de cultivos de células LN en placas de 96 pozos

Después de que se prepararon las placas con 48 pozos, se prepararon placas con 96 pozos aplicando 100 µl a partir de la suspensión celular y 100 µl de las soluciones de activación.

Las placas de cultivo se incubaron a 37°C en un incubador de CO^2, al 5% humidificado, tanto como para 48 como para 72 horas.

Recolección de sobrenadantes

Se centrifugaron las placas cultivadas a 300 g por 10 minutos a RT. Se transfirieron los sobrenadantes (850 µl de cada pozo) a placas espejo o a tubos. El sobrenadante se dividió en cuotas alicotas de funcionamiento (dos alicotas de 200 y una alicota de 450 µl). Para poder evitar un congelamiento/descongelamiento repetido de las muestras. Cada tubo se etiquetó con los siguientes detalles:

1.- Código experimental y tiempo post-incubación.

2.- Número de muestra y grupo.

3.- Activador y concentración.

4.- Fecha de recopilación sobrenadante.

Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta que se utilizaron para la prueba ELISA.

Resultados

CUADRO 10

Resumen de grupos

Grupos experimentales:

Inmunización		Tratamiento		Activación in-vitro
Grupos exp.	**Dosis de inmunización**	**Sub-grupo**	**Artículo**	
		A1	12% Captisol® Control Placebo	
		A2	Compuesto 1 25 µg/M	Compuesto 1 rs
A	50 µg/ratón	A3	Compuesto 1 50µg/M	3.125-10025 µg/ml
		A4	Compuesto 1 100µg/M	
		A5	Compuesto 1 200µg/ml	

CUADRO 11-A

Concentraciones de Citosina Final

CITOSINA FINAL (pg/ml) (2.5 millones de células/pocillo)

Concentración de Compuesto 1	Placebo	50 µg/M	100 µg/M	200 µg/M
3.125 µg/ml	321.3	54.1	64.5	103.9
6.25 µg/ml	238.6	81.8	116.1	126.1
12.5 µg/ml	397.1	123.1	180.9	129.0
25 µg/ml	655.5	215.1	262.8	240.3
50 µg/ml	573.9	292.5	518.3	378.1
100 µg/ml	926.0	531.8	582.7	524.1
Con A	322.6	356.2	337.4	BQL

CUADRO 11-B

Concentraciones finales de citosina

CITOSINA FINAL (pg/ml) (5 millones de células/pozo)

Concentración del Compuesto 1	Placebo	25 µg/M	50 µg/M	100 µg/M	200 µg/M
3.125 µg/ml	522.3	BQL	76.2	90.8	204.4
6.25 µg/ml	634.8	BQL	109.2	157.8	244.1
12.5 µg/ml	962.8	41.9	179.5	257.1	466.1
25 µg/ml	967.4	70.0	277.9	421.7	660.5
50 µg/ml	1338.8	104.2	373.4	739.7	922.5
100 µg/ml	2010.2	185.2	547.0	995.5	1006.2
Con A	6839.8	2995.3	4837.0	10126.8	7722.8

Los resultados también se presentan en las Figuras 3-4.

Observaciones

Secreción de IFN-γ

1.- En el grupo de placebo, se mostró una respuesta lineal a la dosis con la activación de Compuesto 1 *in vitro*. Esta gráfica se asemeje a la gráfica obtenida para el modelo *Ex-vivo* con la misma dosis de inmunización (50 µg/ratón) y medio de cultivo (EM-1).

2.- Hubo una respuesta a la dosis con la activación del Compuesto 1 *in vitro* con todos los grupos probados.

3.- Se apreció una inhibición significativa de la secreción IFN-γ con todas las dosis utilizadas para el tratamiento (un promedio de inhibición de 95% con la dosis tratada de 25 µg/ratón). Se puede encontrar una correlación inversa entre la dosis servida para el tratamiento y el porcentaje de inhibición, principalmente cuando se utilizaron $5x10^5$ células/pozo. Cuando se utilizaron $2.5x10^6$ células/pozo, el tratamiento con animales con 50 µg/ratón, dieron mejor inhibición que 100 ó 200 µg. El punto de 25 µg es faltante (carencia de células).

4.- Se apreció una mejor inhibición cuando se utilizaron $5x10^6$ células/pozo en lugar de $2.5x10^6$ células/pozo.

5.- En la escala lineal de las gráficas, la SD del % de inhibición fue baja.

6.- El problema técnico con A es aparente cuando se utilizaron $2.5x10^6$ células/pozo.

Secreción de TGF-β

1.- En el grupo de placebo, no se apreció ninguna respuesta a la dosis sobre activación *in vitro* con el

Compuesto 1. El nivel secretado de TGF-β fue debajo del límite de detección de la prueba ELISA en los demás grupos de tratamiento.

EJEMPLO 6

Optimizaciones del ciclo de secado por congelación con el compuesto 1 y Captisol® para la inyección (0, 0.5, 1.0 y 2.5 mg/frasco)

Objetivo

El objetivo de este estudio fue optimizar el ciclo de secado por congelación para el Compuesto 1 con Captisol® para la inyección para mejorar la forma de la torta de liofilización y evita el colapso de fractura. Por lo tanto se decidió mejorar y optimizar el ciclo de liofilización. Este ciclo se transfiere a los liofilizadores de producción para la manufactura de los lotes de la fase I.

Optimización del procedimiento

Se prepararon lotes del péptido a concentraciones de 0.5 mg/ml 1.0 mg/ml, 2.5 mg/ml y Placebo y se desarrollaron varios ciclos de secado por congelación. La secadora por congelación que se utilizó fue un liofilizador Edwards Lyoflex 0.6.

Se probaron la solubilidad, el contenido de agua y la apariencia de la torta. De acuerdo con los resultados

obtenidos, se seleccionó un nuevo ciclo para el Compuesto 1. Debido al alto porcentaje de sólidos (12%) y por lo tanto de la torta condensada, el nuevo procedimiento es más prolongado que el ciclo de liofilización en el Ejemplo 3 y muestra la etapa adicional primaria de secado. El Cuadro 12 resume las diferencias entre los procedimientos.

CUADRO 12

Etapa	Liofilización, ciclo para el Compuesto 1 y Captisol® del Ejemplo 3	Nuevo ciclo de liofilización para el Compuesto 1 y Captisol®
Carga	5° C	5° C
Congelamiento	2 horas a -40° C	6 horas a -45° C
Sustentación a baja temperatura	3 horas a -40° C	3 horas a -45° C
Secado primario: Etapa I Etapa II Sostener a 20° C (25° C)	A 20° C presión de 13 horas 110 µbarias - presión de 13 horas 110 µbarias	A -20° C 19 horas presión 150 µbarias a 25° C 13 horas presión 150 µbarias 8 horas presión 150 µbarias
Secado secundario:	presión de 5 horas 10 µbarias	-
Almacenaje a	5° C	5° C
Tiempo de procedimiento	36 horas	49 horas

EJEMPLO 7

Efecto del Compuesto 1 (administrador en Captisol®) en síntomas de lupus en el ratón hembra SLE propenso a (NZBxNXW) F1.

Los pacientes que participaron en las pruebas clínicas deben ser tratados por el Compuesto 1 utilizando Captisol® (éter sulfobutílico de beta-ciclodextrina sódica) como excipiente. Por esta razón, era importante determinar si el tratamiento de los ratones (NZBxNZW) F1 con la formulación del Compuesto 1 dado en Captisol®, tendrían los mismos efectos benéficos en síntomas de Lupus como se observó cuando esta sepa de ratones fue tratada con el Compuesto 1 en PBS.

Hasta este extremo, los ratones hembra (NZBxNZW) F1 (aproximadamente de 8 meses de edad), se dividieron en 3 grupos que fueron tratados subcutáneamente una vez a la semana durante 10 semanas ya sea con Captisol® únicamente (n=8) o con 25 o 50 µg/ratón del Compuesto 1 en Captisol (n=9 y 10, respectivamente). Estas dosis fueron seleccionadas ya que los estudios previos indicaron que las dosis en esta escala eran más efectivas para mejorar los síntomas de SLE que las dosis más altas comprobadas (100 y 200 µg/ratón). Se utilizó el mismo lote de la sustancia del fármaco en este estudio y en la primera prueba clínica de la Fase 1 con el Compuesto 1.

Se les dio seguimiento a los ratones para verificar los anticuerpos anti-dsDNA y para proteinura. Cuando se sacrificaron los ratones, se determinó la intensidad de ICD en riñones.

Como se puede apreciar en la Figura 5, no se pudo observar ninguna diferencia significativa entre los grupos en los niveles de anticuerpos específicos a dsDNA después de 10 inyecciones del tratamiento.

El Cuadro 13 también muestra que se pudo observar el efecto benéfico del tratamiento con el Compuesto 1, iniciando desde la 5ª inyección y se sostuvo hasta la 10ª inyección. Los niveles medios de proteinura en el grupo de control con Captisol® fueron consistentemente más elevados que en los grupos tratados con el Compuesto 1. El Cuadro 13 también muestra que se observó una reducción en la intensidad de ICD en riñones de ambos grupos de dosis con el Compuesto 1. Hubo una tendencia general que mostraba que una dosis más baja (25 µg/ratón) era más efectiva que la dosis más elevada (50 µg/ratón) para reducir los síntomas clínicos de SLE en ratones.

CUADRO 13

Síntomas clínicos de SLE en (NZBXNZW)F1 ratones tratados con 25 ó 50 µg/ratón del Compuesto 1 (en Captisol®)

Grupo de estudio	Proteinuria media ± SEM (g/L) Número de semanas seguido del inicio del tratamiento				ICD[a] (Media SEM)
	5	7	8	10	
Captisol®	1.81 ± 1.22 (n=8)	5.74 ± 3.13 (n=8)	4.5 ± 2.92 (n=7)[b]	4.46 ± 2.93 (n=7)[b]	2.29 ± 0.28 (n=7)
Compuesto 1 (50 µg/ratón)	0.75 ± 0.3 (n=10)	0.81 ± 0.3 (n=10)	1.09 ± 0.4 (n=10)	1.29 ± 0.3 (n=10)	1.90 ± 0.23 (n=10)
Compuesto 1 (25 µg/ratón)	0.16 ± 0.05 (n=9)	1.26 ± 1.09 (n=9)	0.5 ± 0.31 (n=9)	0.56 ± 0.3 (n=9)	1.22[c] ± 0.32 (n=9)

[a] Depósitos del complejo inmune = ICD. Escala de intensidad ICD: 0 = ninguna; 1 = moderada; 2 = severa; 3 = severa/extremadamente intensa.

[b] Resultó en la muerte de un animal con un alto nivel de proteinura en una media más inferior del grupo.

[c] $p<0.05$ (comparado con los ratones de control tratados con Captisol®; Mann-Whitney).

La Figura 6 muestra secciones representativas de un riñón de cada grupo de tratamiento. Las secciones de la fila superior son de un ratón tratado con Captisol®, las secciones de la fila media son de un ratón tratado con el Compuesto 1 de 50 µg/ratón y las secciones de la fila inferior son de un ratón tratado con el Compuesto 1 25 µg/ratón. Se puede apreciar que la intensidad de los depósitos del complejo inmune observados en secciones de riñón de los ratones tratados con el Compuesto 1 (disuelto en Captisol®) en cualquier nivel de dosis fue mucho menor que el observado en el grupo de control.

EJEMPLO 8

Fase 1 Estudio clínico

Fase 1 A, multicentro, aleatorizado, doble ciego, controlado por Placebo, una sola dosis, estudio de cuatro

etapas para evaluar la capacidad de tolerancia y seguridad del Compuesto 1 en inyección subcutánea con Captisol® en sujetos con SLE.

Este fue el primer estudio clínico con el Compuesto 1 con Captisol® en humanos, que se condujo en Francia. Su objetivo principal fue evaluar la capacidad de tolerancia y seguridad del Compuesto 1 en Captisol®, administrado como una sola inyección subcutánea SC a sujetos con SLE. Su objetivo secundario fue evaluar las respuestas inmunológicas siguiendo una sola dosis subcutánea SC del Compuesto 1 en Captisol® en estos sujetos.

Participaron en el estudio 36 (treinta y seis) sujetos. Para ser elegible para la inclusión en el estudio, los pacientes de SLE debieron haber cumplido por lo menos con cuatro criterios utilizados para el diagnóstico de lupus por el Colegio Americano de Reumatología. Los pacientes también debieron haber sido estables, con una enfermedad estable ligera/moderada, y haber apuntado una calificación menor o igual a 10 en el índice de actividad de la enfermedad SLE, SLEDAT.

Cada paciente recibió una sola inyección subcutánea SC del Compuesto 1 reconstituido para inyección o su placebo coincidente (Captisol®) de acuerdo con la asignación del grupo siguiente.

176

- **Grupo A**: Placebo (Captisol®)
- **Grupo B**: 0.5 mg del Compuesto en Captisol®
- **Grupo C**: 1 mg del Compuesto en Captisol®
- **Grupo D**: 2.5 mg del Compuesto en Captisol®

Se desarrolló una batería estándar de pruebas de seguridad, incluyendo la recopilación de orina y sangre para las pruebas de laboratorio, esto se elaboró en la etapa de control y monitoreo durante el día de la dosificación, a las 24 horas post-dosis a las 2, 4 y 8 semanas después de la dosificación. Previo a la dosificación, y en las visitas de seguimiento programadas, se retiraron las muestras para las pruebas inmunológicas relacionadas con SLE, para los anticuerpos de anti-Compuesto 1 y para el ensayo de proliferación PBL. Se realizaron las siguientes pruebas de inmunología:

- Prueba de Coomb (directa e indirecta)
- C3, C4 y CH50
- IgG, IgM e IgA total
- ANA, anti-dsDNA (ensayo Farr), anti-ssDNA
- Anti-ENA (incluyendo anti-La, anti-Ro, anti-RNP, anti-Sm)
- Anticuerpos anti-cardiolipina
- VDRL
- Anticuerpos FTA

- Factor reumatoide

Se evaluó la seguridad y capacidad de tolerancia al Compuesto 1 en Captisol® en la población sujeto, basándose en el siguiente criterio.

- Ocurrencia de AEs, incluyendo erupción de SLE
- Signos vitales
- Electrocardiograma de 12-guías
- Cambios en el examen físico
- Pruebas rutinarias del laboratorio clínico
- Calificación SLEDAI
- Resultados de la prueba inmunológica

Detalles del estudio clínico de la Fase Ia

Investigadores principales del estudio y sitios respectivos del mismo:

6 (seis) centros de estudio en Francia: Profesor Jean Charles Piette (Hospital La Pitie Salpetriere, París), Profesor Oliver Meyer (Hospital Bichat, París), Profesor Jean Revuz (Hospital Henri Mondor, Credeil), Profesor Loic Guillevin (Hospital Avicente, Bobigny), Profesor Eric Hachulla (Hospital Claude Huriez, Lille Cedex), Profesor Xavier Mariette (Hospital Bicetre, Kremlin Bicetre).

Compuesto 1 (en Captisol®), Placebo, agua para ámpulas de inyección, dosis y modo de administración.

Se inyectaron frascos del Compuesto 1 en Captisol® (120 mg/frasco) subcutáneamente como una sola dosis por sujeto en las siguientes dosificaciones:

0.5 mg del Compuesto 1/frasco en Captisol®, 1 mg del Compuesto/frasco en Captisol® y 2.5 mg del Compuesto 1/frasco en Captisol®.

Placebo para el Compuesto 1: 120 mg del Captisol®/frasco (idéntico en apariencia a los frascos del Compuesto 1 en Captisol®).

Metodología

Esto fue un estudio de cuatro etapas de centros múltiples, aleatorizado; de doble ciego, controlado con placebo, utilizando una sola inyección subcutánea del Compuesto 1 o un placebo. Se monitorearon los pacientes SLE hasta 21 días previos a los procedimientos de línea basal. Cada sujeto elegible fue aleatorizado a uno de los 4 grupos de tratamiento: inyección subcutánea ya sea de 0.5, 1 ó 2.5 mg del Compuesto 1 o su placebo coincidente. Todos los sujetos fueron admitidos en la clínica en el día de la pre-dosificación. Cada sujeto recibió una sola dosis de uno de los tratamientos que se enlistaron anteriormente. Se dieron de alta los sujetos de la clínica 24 horas después de la dosificación. Después se controlaron los sujetos a la semana 2, 4 y 8 seguido de la dosificación. Las muestras de sangre (suero y sangre total), para las

pruebas de laboratorio de seguridad se retiraron en la etapa de Control, Día de dosificación (previa a la dosis), al Día 2 (post-dosis) a la semanas 2, 4 y 8 (visita de Conclusión). Las muestras sanguíneas para las pruebas inmunológicas se retiraron en las etapas de Control, Día de dosificación (pre-dosis) en las semanas 4 y 8; la proliferación de linfocitos sanguíneos periféricos (PBL) se evaluó en los días de dosificación (pre-dosis), y a las semanas 2, 4 y 8.

Número de sujetos (total y para cada tratamiento):

Se clasificaron aleatoriamente 36 (treinta y seis) sujetos en este estudio como sigue: 9 sujetos en el grupo de tratamiento de 0.5 mg, 9 sujetos en el tratamiento de 1 mg y 10 sujetos en el tratamiento de 2.5 mg, y 8 sujetos en el grupo de tratamiento con placebo.

Diagnóstico y criterio principal para la inclusión

Los sujetos elegibles para este estudio fueron pacientes con SLE que complementaron y requisitaron por lo menos cuatro criterios de diagnóstico del Colegio Americano de Reumatología (ACR). Su condición de enfermedad tenía que ser estable, de ligera a moderada con una calificación igual o menor a 10 en el índice de actividad de la enfermedad de SLE, en el año 2000 actualizado (SLEDAI 2K).

Los pacientes con SLE excluidos de la participación, fueron aquellos que reportaron un asma inestable o severo, infarto, infarto agudo al miocardio, angina inestable, hemorragia cerebral, embolismo pulmonar durante los seis meses previo al monitoreo del estudio. Los pacientes con SLE que tuvieron alguna condición quirúrgica o médica inestable o clínicamente significativa, o diabetes melitus, enfermedad en el hígado (como cirrosis, hepatitis activa, hipertensión portal y/o ascitos; hipertensión clínicamente significativa, alguna historia médica o cualquier malignidad, diálisis o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) también fue excluido de la participación en el estudio.

También se excluyeron en la participación del estudio los pacientes con SLE que sufrieron plasmaféresis o que fueron tratados durante los tres meses previo a la selección con uno de los fármacos enlistados a continuación con prednisona 30 mg/al día o mayor (una dosis equivalente de otro corticoesteroide), con corticoesteroide intravenosos, con inmunoglobina intravenosa G (IgG), con anticoagulantes orales y cualesquiera agentes citotóxicos (por ejemplo, con azatioprina, clorambucil, ciclofosfamida, mofetil micofenolato, con metotrexato, o con tacrolimus (fármaco inmunosupresor).

Además, los pacientes SLE que iniciaron el tratamiento con corticoesteriodes (más de ± 10 mg/día con prednisona, o una dosis equivalente de otro corticoesteroide) y/o anti-malaria, durante los últimos 3 meses previo a la selección, fueron excluidos del estudio.

Aunque hizo un gran esfuerzo para retener los tratamientos médicos SLE de línea basal a lo largo del curso del estudio, los investigadores sin embargo, no pudieron cambiar el tratamiento médico participante en ningún momento, durante el estudio para poder mantener y optimizar el bienestar del paciente.

Criterios para la evaluación.

Seguridad:

Se evaluaron los siguientes parámetros de seguridad en las etapas de control, selección, o entre la hospitalización y en las visitas de seguimiento incluyendo en la visita de conclusión: signos vitales (presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, pulso, saturación con oxígeno, temperatura y peso), electrocardiograma de 12 guías, cambio en el examen físico y pruebas rutinarias de laboratorio clínicas. Se registraron los eventos adversos al día de la dosificación en cada visita posterior a la anterior.

Inmunología:

182

Se desarrollaron pruebas inmunológicas relacionadas con SLE en la etapa de selección, durante la hospitalización y en las visitas de seguimiento, incluyendo la visita de conclusión.

Las respuestas inmunológicas relacionadas con el fármaco fueron seguidas utilizando el ensayo de proliferación PBL y el ensayo con anticuerpos, anti-Compuesto 1 en el día de la dosificación y, en las visitas de seguimiento incluyendo la visita de Conclusión.

Actividad de la enfermedad:

La valoración de la actividad de la enfermedad utilizando la puntuación del índice de actividad de enfermedad de SLE, en el año 2000 actualizado (SLEDAT 2K) se evaluó en las etapas de Selección, durante la hospitalización y en las visitas de seguimiento incluyendo la vista de Conclusión.

Métodos estadísticos:

Se utilizó un software SAS® versión 9.0 para analizar y presentar datos recopilados durante este estudio. No se desarrolló ningún cálculo de potencia y no se condujo ninguna prueba de hipótesis formal para este estudio de Fase Ia.

Experiencias adversas:

Se presentó la incidencia y la frecuencia de experiencias adversas por medio de Clase de órganos del

sistema y por la terminología preferida de acuerdo con el diccionario MedDRA versión 5.0. Los datos se tabularon por grupo de tratamiento.

Datos de laboratorio clínico:

Estadísticas descriptivas de valores de laboratorio incluyendo el número de observaciones, desviación estándar, desviación media, mínima y máxima y se determinaron para la etapa de Selección, Día 1, (pre-dosis), Día 2, Semana 2, 4 y 8, y se presentaron por grupo de tratamiento. También se presentaron los cambios de línea basal a cada visita/punto, de tiempo, para cada asignación por tratamiento. El porcentaje de los resultados anormales (bajo y alto, donde aplicaba) se presenta sobre una base de parámetro, por grupo de tratamiento y por punto de visita/periodo. Se desarrollaron análisis de turno desde la línea basal a 24 horas post- dosis y de la línea basal hasta la visita de conclusión.

Signos vitales:

Estadísticas descriptivas para los signos vitales incluyen el número de observaciones, la media, desviación estándar, valores medianos, mínimos y máximos, y se determinaron para la etapa de Selección, Día 1 (pre y post-dosis, y en cada punto de periodo). Día 2, Semanas 2, 4 y 8, se tabulan por el tratamiento asignado. Los cambios de

línea basal a cada punto de periodo/visita, se presentan por visita y por asignación de tratamiento.

Peso:

Estadísticas descriptivas de peso (kilogramos) en la línea basal, terminación y cambio de la línea basal, que se presente por grupo de tratamiento.

Electrocardiograma (ECG)

Estadísticas descriptivas de los parámetros de electrocardiograma en línea basal, terminación y cambios desde la línea basal, son los que se presentan en este párrafo. Se presenta el análisis de turno conforme a los cuadros de turno desde línea basal hasta la conclusión entre parámetros normal/anormal o presente/ausente del electrocardiograma (ECG). Se identificaron las medidas potencial y clínicamente significativas (PCS) QTc (Bazett), de acuerdo con los criterios predefinidos. Se presentan los cuadros de análisis de cambio entre el PCS y el cuadro de incidencia de PCS y QTc no-PCS absoluta (Bazett) de cambio de PCS en QTc (Bazett) desde la línea basal hasta cualquier visita.

Examen físico:

Se analizaron los resultados del examen físico por incidencia de sujetos con hallazgos anormales o normales para cada sistema corporal en la visita de Línea basal y en la visita de terminación. Los análisis de

cambio entre anormal y normal y viceversa también se aplicaron. Cuando no hubo cambio que ocurriera en la línea basal, se definió como "otros".

Pruebas inmunológicas relacionadas con el Compuesto 1

Para los parámetros inmunológicos, estadísticas descriptivas, incluyendo el número de observaciones, media, desviación estándar, mediana y valores mínimo y máximo, se calcularon en este caso y se presentaron por un grupo de tratamiento y por visita. El cambio desde la línea basal a cada visita de seguimiento también se presenta por un grupo de tratamiento. Cuando aplicaba, se presentó el número y porcentaje de sujetos con resultados negativos/positivos por grupo de tratamiento y visita.

SLEDAI 2K

Estadísticas descriptivas incluyendo desviación estándar, media, valores mínimos y máximos, mediana, de SLEDAI 2K.

Resultados del estudio clínico de fase Ia:

Disposición sujeta y características SLE

Se ingresaron treinta y seis (36) sujetos del estudio y completaron este estudio por protocolo. La mayoría de sujetos (34) en todos los grupos de tratamiento fueron del sexo femenino (94.4%) y caucásicas (30, 83.3%). La edad media para todos los grupos de tratamiento fue de

35.6 años (rango de media de 32 a 39 años). La mayoría de los sujetos (91.7%) tenían entre 4 a 6 criterios de diagnóstico según el Colegio americano de reumatología (ACR) y una puntuación de grupo de media SLEDAI 2K que variaba de 2.1 a 4.1.

Resultados de seguridad

No hubo diferencia prominente entre los grupos de tratamiento con el fármaco de estudio y el grupo de placebo en la incidencia de AEs. Los AEs más comunes en todos los grupos fueron dolor de cabeza, clasificado de ligero a moderado en naturaleza y una reacción en el sitio de inyección clasificada como ligera naturaleza. No se apreció respuesta a la dosis. No hubo evento adverso grave (SAE) o AE clasificado como grave que haya ocurrido durante el estudio.

No hubo ningún evento clínicamente significativo atribuible al fármaco bajo estudio que se pudiera apreciar para los valores de hematología, bioquímica o análisis de orina.

No hubo efecto clínicamente significativo atribuible al fármaco bajo estudio que se apreciará para los parámetros de signos vitales (presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica), pulso, saturación de oxígeno).

No hubo efecto clínicamente significativo atribuible al fármaco bajo estudio que se pudiera observar para temperatura y peso.

No hubo diferencias clínicamente significativas que se apreciará entre los grupos tratados con el Compuesto 1 y el placebo para las medidas categóricas de electrocardiograma ECG y los parámetros de ECG digitalizados. No hubo valor absoluto QTc de la PCS y no hubo cambio QTc desde línea basal > 60 mseg que se hubiera registrado. Un número similar en sujetos en los grupos tratados con Compuesto 1 y con placebo tuvo cambio QTcB desde línea basal entre 30 a 60 mseg.

No se anotaron efectos clínicamente significativos de Compuesto 1 en el examen físico.

Resultados inmunológicos

La evaluación de muestras de suero de todos los sujetos indicaron que una sola administración subcutánea del Compuesto 1 a los niveles de dosis de 0.5, 1 y 2.5 mg/paciente no indujo el desarrollo de anticuerpos específicos al anti-Compuesto 1. Siete sujetos tuvieron una respuesta al Compuesto 1 sobre el valor límite. Estos niveles elevados de anticuerpos no estaban presentes previo a la dosificación. No hubo incrementos en los niveles de anticuerpos que se observaran en el periodo de seguimiento (dos meses) del estudio. Los sueros de estos sujetos

fueron analizados para el isotipo de los anticuerpos reactivos. La respuesta en dos de los sujetos estuvo asociada con el isotipo IgM y con el isotipo IgG en los otros dos. Ninguno de los siete tenía anticuerpos IgE específicos.

El ensayo de linfocitos sanguíneos periféricos (PBL) mostró que el 50% de los sujetos (18) fueron clasificados como activos a la respuesta (SI>2) con distribución similar en todos los grupos de tratamiento. La respuesta de células T fue relativamente baja y no hubo asociación entre la dosis de tratamiento al Compuesto 1 o la concentración utilizada en el ensayo y se pudo detectar un estatus de activo a respuesta/sin respuesta, tomando en consideración que solamente una dosis subcutánea SC del fármaco bajo estudio fue administrada. Además no se observó indicio de incidencia incrementada del estatus de respuesta durante el transcurso del tiempo. El ensayo de toxoide tetánico (TTX) que sirve como un control de seguridad muestra que la respuesta a TTX es conservó a lo largo de todo el periodo de estudio en todos los grupos de tratamiento indicando que el Compuesto 1 en Captisol® no cambió la respuesta inmunológica al antígeno de respuesta libre TTX.

Los hallazgos inmunológicos son el resultado de la administración de solamente una sola dosis de Compuesto 1 del fármaco bajo estudio.

Resultados de la actividad de la enfermedad

No hubo efecto clínicamente significativo del Compuesto 1 en la puntuación SLEDAI, (cambio de ≥ 3, ≤ 12 puntos) que se pudieren notado durante el estudio excepto para un sujeto en el grupo de tratamiento con 0.5 mg para quien, se les registró un cambio en la puntuación SLEDAI o 2 a 10 puntos entre la línea basal y la semana 4 basándose en un análisis de orina que mostraba pyuri. Este hallazgo en el análisis de orina no fue confirmado por el investigador como una erupción de lupus por definición de protocolo y fue resuelto sin cambio de tratamiento.

Conclusiones

Este estudio de Fase Ia mostró que una sola dosis inyectada subcutáneamente de Compuesto 1 con 0.5, 1 o 2.5 mg en 120 mg de Captisol® era segura y bien tolerada y permitió la continuación hacia el estudio de dosis múltiple de fase Ib.

EJEMPLO 9

ESTUDIO CLÍNICO DE FASE IB

La fase I, múltiples centros, binacional, clasificado aleatoriamente, doble ciego, Cuatro etapas controlado con placebo, estudio de dosis múltiple para

evaluar la capacidad de tolerancia y seguridad del Compuesto 1, en inyecciones subcutáneas con Captisol® en sujetos SLE.

Este estudio se desarrolla para evaluar la seguridad y capacidad de tolerancia de la administración repetida subcutánea de Compuesto 1 a sujetos SLE. El objetivo secundario del estudio es evaluar las respuestas inmunológicas seguida la administración subcutánea repetida sc del Compuesto 1 en Captisol® en sujetos con SLE.

El Compuesto 1 se administra en dosis de 0.5, 1.0 o 2.5 mg en Captisol®. El producto bajo investigación es administrado en cualquier otro día (excluyendo fines de semana) para un total de 12 inyecciones subcutáneas sc, es decir, 3 dosis a la semana por 4 semanas. Los sujetos son controlados en visitas planeadas que fueron planeadas a las 2, 4, 8 y 12 semanas después del inicio de la dosificación. Se evaluó la seguridad y la capacidad de tolerancia utilizando pruebas similares a aquellas descritas en el estudio clínica de fase Ia anterior.

Resultados

Este estudio de fase Ib muestra que múltiples dosis inyectadas subcutáneamente del Compuesto 1 de 0.5, 1 o 2.5 mg en 120 mg de Captisol®, son seguros y bien tolerados.

EJEMPLO 10

Detección de anticuerpos contra péptidos ia, iia y iiia, y anticuerpos anti-1616 Id en los sueros de pacientes SLE en controles saludables

Se extrajo a 32 pacientes SLE (32) con SLE humanos y se analizaron los sueros por medio de ELISA para obtener su habilidad a unirse a péptidos Ia, IIa y IIIa, y al péptido de control p195-212 (un péptido miastogénico descrito en la publicación PCT No. 94/00148) o mAb 5G12.

Se condujo la detección de anticuerpos en placas que fueron revestidas con 10 µg/ml de péptidos Ia, IIa y IIIa, p195-212 o mAb 5G12, en PBS durante 2 horas, se lavaron y bloquearon con ovalbúmina al 1% en PBS para una prueba adicional de 2 horas de ELISA, que se continuó y se describió después del bloqueo en el ejemplo 2 de la Publicación internacional PCT No. 96/30057, utilizando anticuerpo policlonal IgC antihumano de cabra, conjugado a peroxidasa.

Como se muestra en la Figura 7, los pacientes SLE exhibieron niveles significativamente más elevados de anticuerpos que se unían tanto al péptido Ia (cuadros abiertos), como al péptido IIa (diamantes abiertos), IIIa (círculos abiertos), o mAb 5G12 (triángulos abiertos), en comparación con controles saludables (péptido Ia-saludable = a diamantes cerrados; péptido IIa-saludable = círculos

cruzados; péptido IIIa-saludable = a triángulos abiertos invertidos, 5G12-saludable = cuadros medianamente rellenados). No se pudo observar ninguna comunión ya sea con sueros de pacientes o controles, que se sometieron a prueba en placas revestidas con el péptido no relevante p195-212 (p195-212-SLE = cuadros cruzados; p195-212-saludable = diamantes medio rellenos). Los resultados indican una correlación entre la molécula total del anticuerpo y los péptidos basados en CDR a nivel de títulos de anticuerpos.

EJEMPLO 11

Proliferación de PBL en pacientes SLE y controles saludables en presencia de 16/6 Id mAb humano y péptidos

Se aislaron linfocitos sanguíneos periféricos (PBL) de la sangre de pacientes SLE o controles saludables utilizando gradiente ficol. Posteriormente a ello, el PBL fue incubado en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos Ia, IIa y IIIa, o el 16/6 Id mAb humano durante 24 horas, cuando se tomó una muestra para la medida IL-2. Se continuó la prueba o ensayo para un total de 7 días, y se agregó ^{3}H-timidina, para las últimas 16 horas. Se detectó la proliferación mediante lectura de la cantidad de radioactividad incorporada en ADN de las células.

Como se puede apreciar en el cuadro 14, una menor proporción de PBL tomada de pacientes SLE reaccionó a los

péptidos o al 16/6 Id mAb, cuando se comparó con los controles saludables.

Los resultados se expresaron en porcentaje de personas con respuesta (34% en la primera línea) y el número real de pacientes (11 de 32: 11/32).

Se obtuvieron resultados similares cuando los niveles de IL-2 producidos por PBL en presencia de péptidos o el Id mAb, y se comprobaron como se presenta en la siguiente muestra.

CUADRO 14

Proliferación de PBL a partir de pacientes SLE y controles saludables en presencia de mAb 16/6 id y péptidos Ia-IIIa EM129.1

		PACIENTES SLE		CONTROLES SALUDABLES
16/6 Id	34%	11/32	72%	18/25
pep Ia	21%	7/32	44%	11/25
pep IIa	9%	3/32	28%	7/25
pep IIIa	31%	10/32	60%	15/25

EJEMPLO 12

Producción de Il-2 por PBL de pacientes SLE y controles saludables en presencia de mAb 16/6 id y péptidos

Se aislaron PBL de la sangre de pacientes SLE o controles saludables utilizando gradiente ficol, y se incubaron en el Ejemplo 11, se retira una muestra de 50µl 24 horas después de que el ensayo inicio, y se incubaron en presencia de células sensibles a IL-2 (CTLD) durante 24

horas, después de lo cual se agregó ^{3}H-timidina, durante 16 horas, y las placas se cultivaron y contaron en un contador beta.

Como sucede en el Cuadro 14, también se puede apreciar del Cuadro 15 que una menor proporción de PBL tomado de pacientes SLE reaccionaron a los péptidos o al 16/6 Id mAb cuando se compararon con los controles saludables, indicando de esa manera que la respuesta al péptido corresponde a aquella de las células T del paciente al auto anticuerpo humano patogénico.

CUADRO 15

Proliferación de PBL a partir de pacientes SLE y controles saludables en presencia de mAb 16/6 Id y péptidos Ia-IIIa

		PACIENTES SLE	CONTROLES SALUDABLES	
16/6 Id	31%	10/32	66%	17/25
pep Ia	16%	5/32	56%	14/25
pep IIa	90%	3/32	32%	8/25
pep IIIa	16%	5/32	64%	16/25

EJEMPLO 13

Síntesis de péptidos humanos hCDR1 y hCDR3

El hCDR1 humano (SEC ID NO:6) y hCDR3 (SEC ID NO:7) se muestran a continuación.

GYYWSWIRQPPGKGEEWIG (hCDR1)

YYCARGLLRGGWNDVDYYGMDV (hCDR3)

Los péptidos fueron preparados por métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante síntesis fase de solución o de fase sólida química, utilizando un sintetizador automatizado y utilizando los protocolos del fabricante para t-butiloxicarbonilo (t-Boc), fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) u otro alfa-aminoácido de grupo protector del procedimiento esencialmente como se describió (véase, por ejemplo, Péptidos: Síntesis, Estructuras y Aplicaciones, [editado por B. Gutte, Academia Press, 1995]; Peptide Synthesis Protocols (Protocolos de síntesis de péptidos), editado por M. Pennington y B. Dunn, Humana Presss, 1994; Schnolzer M. et al., [In situ neutralization in Bocchemistry solid phase peptide synthesis] (Neutralización *in situ* en síntesis de péptidos de fase sólida bioquímica) Rapid, high yield assembly of difficult sequences (Rápido ensamble y de alto rendimiento de secuencias difíciles).[Int. J. Pept. Protein Res. 40: 180-193,1992].

EJEMPLO 14

Péptidos hcdr1 y hcdr3 que inhiben la respuesta proliferativa de pbl en pacientes SLE al 16/6 id mAb humano

Sesenta y dos pacientes, 9 del sexo masculino (14.5%) y 53 del sexo femenino (85.5%) con SLE participaron

en el estudio. La edad media en el diagnóstico fue de 32.95 ± 12.92 (escala de 12-61) años de edad y el periodo de seguimiento medio fue de 10.98 ± 10.76 (escala 1-32 años). Todos los pacientes cumplieron por lo menos con 4 de los criterios de diagnósticos revisados para SLE del Colegio Americano de Reumatología (ACR) (Tan E.M. et al., *Arthritis Rheum* 25: 1271-77 (1982)). Los pacientes fueron reclutados y seleccionados de tres centros médicos israelíes (Kaplan, Rehoboth, Ichilov, Tel Aviv; Asaf-Harofeh, Rishon Lezion). Se determinó la actividad de la enfermad de cuerdo con el índice de actividad de lupus SLEDAI (Bombardier C. et al., *Arthritis Rheum* 35: 630-40 (1992)). Se estudió un grupo de control de 36 voluntarios de control saludable con comparaciones de edad y sexo concomitantemente con los pacientes SLE. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Centro Médico.

Fue de gran interés investigar su los péptidos hCDR1 y hCDR3 que se basaban en el CDR1 y CDR3 del mAb 16/6 Id de humano, tenían la capacidad de inhibir las respuestas proliferativas específicas de PBL en pacientes con SLE al 16/6 mAb Id humano. Hasta este punto, primero se tuvieron que identificar los pacientes cuyo PBL podría ser estimulado para proliferarse por el 16/6 mAb Id humano (los que manifestaron respuesta).

Por lo tanto, el PBL de 62 pacientes de SLE consecutivos fueron cultivados en presencia de 16/6 mAb Id humano y sus respuestas proliferativas y la habilidad para secretar IL-2 fueron determinadas. El PBL de 24 de un total de 62 (39%) y de 23 de 55 (42%) de pacientes con SLE probaron haber respondido a (SI ≥ 2, escala 2-5.6) por proliferación y por secreción IL-2 (SI ≥ 2, escala 2-60), respectivamente, la frecuencia de los que respondieron en el grupo de pacientes SLE fue menor que la observada en el grupo de donadores saludables que fueron probados como control. Por lo tanto, el PBL de 21 de un total de 36 (58%) donadores saludables respondieron por proliferación al 16/6 Id. El grado de proliferación (niveles SI) fue similar para los pacientes SLE y para los controles saludables que respondieron al 16/6 Id. Sin embargo, como se muestra en la Figura 8, la respuesta óptima al 16/6 Id de PBL de los donadores de control se observaron a mayores concentraciones de 16/6 Id, comparado con los pacientes SLE.

No hubo diferencias que se pudieran demostrar entre el género y edad de los pacientes SLE que respondieron al 16/6 Id y al grupo que no respondió de esos pacientes. Sin embargo, los pacientes cuyo PBL se prolifero en respuesta al 16/6 Id estuvieron enfermos por un periodo más corto (una media de 9.78 ± 8.36 vs. 11.73 ± 12.06 años

para los que respondieron y los que no respondieron respectivamente, P ≤ 0.036). El Cuadro 16 resume la caracterización clínica de los grupos que respondieron y los que no respondieron a 16/6 Id de pacientes SLE. Como se puede apreciar en el Cuadro, ambos grupos fueron similares en la mayoría de las manifestaciones clínicas relacionadas con SLE. La calificación de la actividad de la enfermedad SLE (SLEDAI) y el número de criterios de diagnóstico SLE también fueron similares en ambos grupos. Sin embargo, se notó una mayor frecuencia de involucramiento hematológico y neurológico (tanto convulsiones como psicosis), y una menor tasa de involucramiento renal en el grupo de pacientes que respondieron en comparación con el grupo de pacientes que no respondieron. Sin embargo, probablemente al bajo número de pacientes en los subgrupos relevantes, las diferencias anteriores no alcanzaron un significado estadístico. Más aún, se determinaron relativamente menos pacientes con respuesta entre aquellos tratados tanto con esteroides o agentes citotóxicos al momento del estudio. Por lo tanto, cabe notar que es significativamente más pacientes que nunca recibieron esteroides, respondieron al 16/6 Id en comparación con el grupo que no respondió (54% vs 21%; P = 0.23).

Cabe notar que la eficacia de los péptidos basados en CDR que inhiben la respuestas proliferativas de

PBL de donadores saludables al 16/6 Id fue mucho menor que lo observado para PBL en pacientes con SLE (que no se muestra).

CUADRO 16.

Caracterización clínica y de laboratorio de pacientes SLE

A: Criterios de diagnóstico*

	Todos los pacientes	Grupo que obtuvo respuesta	Grupo que no obtuvo respuesta
Número de pacientes (%)	62(100)	24(39)	38(61)
Urticaria malaria	19/62(30.1)	8/64(33.3)	11/38(29)
erupción discoide	9/62(15)	3/24(12.5)	6/38(16)
Fotosensibilidad	21/62(34)	9/24(37.5)	12/38(32)
Úlceras en mucosa	17/62(27.4)	8/24(33.3)	9/38(23.7)
Artritis	46/62(74.2)	19/24(79.2)	27/38(71)
Serositis	14/62(22.6)	5/24(20.8)	9/38(23.7)
Trastornos neurológicos‡	5/62(8.1)	4/24(16.7)	1/38(2.7)
Trastornos renales‡	24/62(38.8)	7/24(29.2)	17/38(44.8)
Trastornos hematológicos‡	44/62(71)	19/24(79.2)	25/38(65.8)
ANA	61/62(98.4)	24/24(100)	37/38(92.1)
A-dsADN	54/62(87.1)	19/24(79.2)	35/38(92.1)
APLA	35/62(56.5)	12/24(50.0)	23/38(60.53)
B-Actividad de la enfermedad			
Puntuación SLEDAI	6.65±5.12	7.29±1.06	6.24±
Número de criterios de diagnóstico ACR	5.44±1.39	5.54±0.33	5.34±0.2
C: Tratamiento actual			
NSAIDDS	17/62(27.4)	6/24(25)	11/38(29)
Anti-malaria	37/62(59.7)	15/24(62.5)	22/38(57.9)
Esteroides‡	33/62(53.2)	11/24(45.8)	22/38(57.9)
Citotóxico‡	10/62(16.1)	2/24(8.3)	8/38(21)

*Involucramiento clínico, que se definió de acuerdo con los criterios revisados de ACR. Los anticuerpos antinucleares

(ANA) y los anticuerpos anti-dsADN fueron determinados por células Hep2 y *Crithidia Luciliae*, respectivamente. Los anticuerpos antifosfolípidos (APLA) fueron definidos como una actividad de uno o más de los siguientes ensayos: VDRL falso o positivo, anticoagulante lupus (LAC) o anticuerpos ELISA para anticuerpos anticardiolipina.

† El agente anti-malaria, hidroxicloroquina, se utilizó en una dosis de 200-400 mg/día; el tratamiento de esteroides fue definido como una dosis diaria. 5 mg de prednisona; agentes citotóxicos, que se utilizaron, fueron ciclofosfamida (0.75-1.0 g/m^2; mensual) o azatioprina (100-150 mg/día).

‡ Parámetros para los cuales se observó tendencia hacia las diferencias entre los dos grupos de pacientes SLE que respondían y que no respondían.

Para comprobar la habilidad de los péptidos hCDR1 y hCDR3 para inhibir la respuesta proliferativa de PBL de pacientes SLE ante el 16/6 mAb Id humano, [PBL ($2x10^5$/pocillo]de pacientes SLE fueron estimulados *in vitro* en triplicados con diferentes concentraciones (0.1-20µg/pocillo) del 16/6 mAb Id humano en ausencia o presencia de los péptidos hCDR1 y hCDR3 (tanto 50 ó 100 µg/pocillo). Después de 6 días de incubación, se agregó ^3H-timidina (0.5 µCi de 5 Ci/mmol) a cada pocillo durante 18 horas adicionales de incubación. Después de cultivaron las

células y se contó la radioactividad utilizando un β-contador. Se expresaron los resultados como conteos medios o cuentas media por minuto (cpm) de cultivos triplicados. La estimulación cuyos índices son (la relación de cpm media a la concentración óptima de 16/6 Id a la cpm media sin 16/6 Id) fue finalmente calculada. Un índice de estimulación (SI)≥2 se consideró como positivo.

El PBL de 24 de un total de 62 (39%) de pacientes SLE se encontró con proliferantes a 16/6 mAb Id. La habilidad de los péptidos hCDR1 y hCDR3 para inhibir las respuestas proliferativas a la molécula total del auto anticuerpo, fue comprobado en PBL de 19 pacientes de SLE con respuesta.

El Cuadro 17 muestra los resultados de estos experimentos. La inhibición de arriba del 50% de la capacidad proliferativa se consideró positiva. El Cuadro representa la más alta capacidad de inhibición positiva para cada péptido. Se puede apreciar que el hCDR1, hCDR2 y hCDR3 inhibió la proliferación de PBL de 16/19 (84.2%) y 15/19 (78.9%) respectivamente, de los 19 que respondieron que se sometieron a la prueba. Ambos péptidos inhibieron la proliferación de PBL de 18/19 (95%) de los que obtuvieron respuesta y que se sometieron a prueba. También se puede apreciar en el cuadro que las magnitudes de inhibiciones fueron similares para ambos péptidos. Por lo tanto, se

puede concluir que los péptidos basados en CDR1 y CDR3 del 16/6 mAb Id humano son inhibidores eficientes de la proliferación de PBL de pacientes SLE al 16/6 mAb Id humano.

CUADRO 17

Inhibición de la proliferación de PBL de pacientes SLE por péptidos hCDR1 y hCDR3.

Número		Inhibición porcentual
	hCDR1	hCDR3
1.	62	<50
2.	70	75
3.	69	<50
4.	<50	<50
5.	88.5	87.5
6.	80	80
7.	76	70.4
8.	58	56
9.	69.5	65
10.	68.2	71.8
11.	<50	72
12.	82	86
13.	63	64
14.	56	74
15.	63	69
16.	<50	68
17.	70.5	77.8
18.	51.5	<50
19	63	60.8
Media ± SD	**68.12±9.57**	**71.82± 8.44**

EJEMPLO 15

Especificidad de la capacidad inhibidora de hCDR1 y hCDR3

Es importante demostrar que los efectos inhibidores de los péptidos basados en hCDR son específicos a las respuestas asociadas con el SLE. Hasta este punto los

péptidos se agregaron a cultivos de PBL de pacientes SLE que fueron estimulados con la fitohemaglutinina mitogena (PHA, 2 µg/ml). Los resultados de dicho experimento desarrollado con PBL de un paciente SLE se muestran en la Figura 9. Los péptidos hCDR1 y hCDR3 no pudieron inhibir las respuestas proliferativas (expresadas en cpm) de PBL al PHA mitogeno y las respuestas proliferativas fueron similarmente altas en ausencia (columna color negro) o presencia de cualquiera de hCDR1 o hCDR3.

En otro experimento, los cultivos de PBL de pacientes SLE fueron estimulados con el 16/6 mAb Id humano y después incubados con los péptidos humanos hCDR1 o hCDR3, o con el péptido IIIa como un control. Los resultados de dicho experimento desarrollados con PBL de un paciente SLE se muestran en la Figura 10. Como se muestra en la Figura 10, ya sea que ambos péptidos hCDR1 y hCDR3 se basen en el auto anticuerpo humano, que se hayan inhibido eficientemente las respuestas proliferativas de PBL al 16/6 mAb Id humano, el péptido basado en mCDR3 en CDR3 del anticuerpo murino (es decir péptido IIIa) no inhibió la proliferación.

Se utilizaron dos péptidos de control adicionales en estos experimentos, a saber, péptidos sintetizados en el orden inverso de los péptidos Ia y IIIa, y los resultados se muestran en la Figura 11. Se puede apreciar que los dos

péptidos inmersos no cumplieron al inhibir significativamente las respuestas proliferativas del PBL del paciente SLE al 16/6 mAb Id humano mientras que los péptidos hCDR1 y hCDR3 se inhibieron eficientemente en la proliferación, demostrando que la inhibición de proliferación por los péptidos basados en hCDR humanos son específicos a los péptidos y a las respuestas de células T asociados con SLE.

EJEMPLO 16

Regulación descendente de la secreción de IL-2 por PBL de pacientes SLE en presencia de los péptidos hCDR1 y hCDR3

Fue interesante encontrar si los péptidos hCDR tenían la capacidad de inhibir la secreción IL-2 por PBL de pacientes SLE seguido de estimulación con el 16/6 mAb Id humano. Dicha inhibición podría también sugerir que los péptidos basados en CDR humano inhiben las respuestas proliferativas al 16/6 mAb Id por lo menos parcialmente regulando descendentemente la secreción de IL-2. A este extremo, el PBL de pacientes SLE fueron incubados con el 16/6 mAb Id humano en ausencia o presencia de los péptidos hCDR1 o hCDR3. Los sobrenadantes de los cultivos fueron recopilados después de 48 horas de incubación. Los ensayos para determinar los niveles de IL-2 en un sobrenadante se desarrollaron utilizando la línea dependiente de CTLL IL-2.

Brevemente, se incubaron células de la línea CTLL ($2x10^4$/pocillo) de los diferentes sobrenadantes por 24 horas, seguido por la visión de ^3H-timidina para un periodo adicional de 18 horas. Después se cultivaron las células y se contó la radiactividad utilizando un β-contador. Los resultados se calcularon basados en el IL-2 recombinante humano que se utilizaron como un estándar. La habilidad de los péptidos para inhibir la secreción de PBL de 23 que obtuvieron respuesta estimulados por el 16/6 Id humano fueron sometidos a prueba. Los resultados, resumidos en el Cuadro 18, muestran que hCDR1 y hCDR3 inhibieron la secreción de IL-2 por PBL de 21/23 y 19/23 pacientes, respectivamente. La inhibición de respuestas proliferativas de PBL directamente correlacionadas con la inhibición IL-2 por los péptidos basados en CDR. Por lo tanto, se observó una inhibición de la secreción IL-2 en todos los casos donde la inhibición de la proliferación fue determinada.

Los resultados obtenidos con PBL en un paciente SLE representados en la Figura 12 (secreción de IL-2 se expresa en pg/ml) muestran que tanto hCDR1 como hCDR3 inhibieron el 100% de la secreción de IL-2 por PBL de un paciente SLE impulsado por el 16/6 mAb Id humano.

CUADRO 16

Inhibición de la secreción IL-2 por hCDR1 y hCDR3

Péptido	Actividad inhibidora* %	Inhibición máxima %
hCDR1	91 (21/23)	84 ± 31
hCDR3	83 (119/23)	78 ± 34

* Secreción IL-2 en presencia de 16/6 Id solamente que se consideró como el 100%. La inhibición de 50% más fue considerada significativa.

CUADRO 17

Regulación ascendente de la secreción de la citosina inmunosupresiva TGF-β por péptidos basados en CDR

En intentos para ilustrar los mecanismos por los cuales los péptidos basados en CDR humano inhiben las respuestas proliferativas al anticuerpo 16/6 Id de antiADN monoclonal humano, los niveles de la TGF-β citosina inmunosupresiva y en los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron determinados. La razón fundamental detrás de estos experimentos se basa en nuestros hallazgos anteriores de niveles elevados de TGF-β en cultivos de esplenocitos de ratones con SLE ya sea inducidos con el 16/6 mAb Id de anti-ADN humano o espontáneo {(NZB x NZW) F1 ratones} seguido del tratamiento con los péptidos basados en CDR de ratón (Eilat, E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*

E.U.A., 98, 1148 (2001)). La elevación en los niveles de TGF-β correlacionados con la mejoría de las manifestaciones de la enfermedad en los ratones tratados.

Para este objetivo, se retiraron los sobrenadantes de los cultivos de PBL de varios pacientes de SLE después de 48 horas de incubación con el 16/6 mAb Id humano en ausencia o presencia de los péptidos. Se determinó TGF-β por medio de ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se revistieron placas Maxisorb (Nunc) recombinante humano TGF-βsRII/Fc (quimera) (R & D Systems) diluidos en PBS (100 ng/ml). Después del bloqueo, se agregaron sobrenadantes de células. Después de 8 horas de incubación, se agregó anticuerpo TGF-β antihumano biotinilado (R & D Systems). La solución de sustrato utilizada fue el Reactivo de color TMB (Helix Diagnostics) y se evaluó la actividad de la enzima por medio del lector de ELISA MRX utilizando los filtros de 570 nm y 639 nm. Los resultados se resumen en el Cuadro 19.

Los resultados en la Figura 13 demuestran que los péptidos hCDR1 y hCDR3 impulsaron una regulación ascendente significativa en los ofTGF-ss de secreción (expresados en pg/ml) por medio de la PBL de un paciente SLE representativo que fueron estimulados con el 16/6 mAb Id humano patogénico.

CUADRO 19

Regulación ascendente de la secreción TGF-β de la estimulación inducida por 16/6 Id de pacientes SLE con péptidos hCDR1 y hCDR3

Péptido	Porcentaje de regulación ascendente de TGF-β	Porcentaje máximo de regulación ascendente
hCDR1	100.(19/19)	305±221
hCDR3	100 (19/19)	338±242

* Secreción de TGF-β en presencia de 16/6 Id sólo (media) 63625 pg/ml) que se consideró como el 100%. Los resultados se expresan como la secreción porcentual sobre la misma en presencia de 16/6 Id.

EJEMPLO 18

Actividad de MMP-9 (más no de MMP-2) que se eleva en sueros de pacientes SLE

En el presente ejemplo, se determinaron los niveles de MMP-9 y MMP-2 en sueros de 40 pacientes con SLE y se demostró que la actividad de MMP-9 más no MMP-2 es significativamente elevada en los sueros de pacientes SLE comparado con los controles saludables. La alta actividad de MMP-9 correlacionada con la presencia de urticaria discoide, el fenómeno de Raynaud, neumonitis, ulceras en

mucosas y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (APLA). Además los niveles elevados de MMP-9 correlacionados con la actividad SLE en el grupo de pacientes masculinos.

Materiales y métodos

Pacientes

Cuarenta pacientes, 32 de sexo femenino y 8 de sexo masculino con SLE participaron en este estudio. Todos los pacientes revelaron por lo menos de cuatro de los criterios de diagnóstico revisados del Colegio Americano de Reumatismo (ACR) para el diagnóstico de SLE (Winchester RJ. Systemic lupus erythematosus pathogenesis. "Patogénesis de lupus sistémico eritematoso" (In: Koopman Wj, ed. Birmingham. Alabama: William and Wilkins, pp. 1361-91 (1996)). Veinticinco voluntarios saludables que coincidían en edad y en sexo sirvieron como un grupo de control en nuestros estudios. La edad media de los pacientes en el diagnóstico fue 29±9.7 (escala 15-48) años y el periodo de seguimiento medio fue 11 ±10 (escala 1-32) años. La actividad de la enfermedad se determinó de acuerdo con el índice de actividad de lupus SLEDAI (Bombardier et al., 1992) y por el índice BILAG (Hay E.M. et al., *Q. J. Med.* 86; 447-58 (1993)). El estudio fue aprobado por el comité de ética del Centro Médico Kaplan, Rehoboth, Israel.

Medición de MMP-2 y MMP-9 por medio de kits de ensayo de actividad

Se midieron las actividades de MMP-2 y MMP-9 por medio de kits de ensayo de actividad MMP-2 o MMP-9 Biotrak (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sueros se diluyeron 1;100 y 1:32 para la determinación de las actividades de MMP-2 y MMP-9, respectivamente. Se agregaron los estándares apropiados en cada ensayo. Para medir el contenido total de los MMPs, se desarrolló la activación de la pro forma de los MMPs utilizando acetato p-aminofenilmercurico (APMA).

Medición de las actividades de MMP-2 y MMP-9 por medio de zimografía de gel.

Se probaron las actividades de MMP-2 y MMP-9 por medio de zimografía de gelatina. Una muestra de 5 µl de suero fue separada por medio de un gel 8% SDS-PAGE polimerizado con gelatina 1 mg/ml. Se lavaron los geles una vez durante 30 minutos en Triton X-100 al 2.5% para remover el SDS y una vez por 30 minutos en el regulador de pH de reacción conteniendo 50 mM Tris-HCI, 200 nM NaCl, 10 mM $CaCl_2$ y 0.02% (p/v) Brij 35 (pH 7.5). El regulador de pH de reacción se cambió a uno más fresco, y los geles se incubaron a 37°C por 24 horas. Se visualizó la actividad gelatinolítica detectando con color los geles con azul

brillante 0.5% Coomassie y se cuantificó por medio de densitometría.

Análisis estadístico

Los datos se evaluaron utilizando pruebas exactas de chi cuadrada o Fisher, t-prueba impar y dos valores P con También, se utilizaron los análisis de multivarianza de Pearson, Spearman.

EJEMPLO 18 (I)

Actividad de MMP-9 más no de MMP-2 que se eleva en SLE

Como se describió anteriormente y en la Publicación Internacional PCT No. WO 02/067848, se demostró MM-9 como involucrado en varias enfermedades autoinmunes, así como en modelos animales de SLE. Por lo tanto, estuvo un interés en estudiar si MMP-9 también está elevado en sueros de pacientes SLE. Para este objetivo, examinamos los sueros de pacientes 40 SLE de 25 controles saludables por medio de zimografía de gel en donde se pueden visualizar ambas actividades de MMP-9 y MMP-. Un gel representativo se muestra en la Figura 14. Como se puede apreciar en esta figura, los niveles de MMP-9 son elevados en los sueros de pacientes SLE cuando se comparan con los controles saludables. El análisis densitométrico de los zimogramas de sueros de 40 pacientes SLE. y 25 controles saludable indicaron que la actividad media MMP-9 para pacientes SLE

fue de 109±5.6. de unidades de densitometría y para los controles saludables, unidades de densitometría 76.5±4.2 (P=0.0001). Los valores de actividad de unidades de densitometría arriba de 85 (media de controles saludables + 2 s.e.) se consideraron altos. Los resultados mostraron niveles de alta actividad de MMP-9 en 68% de pacientes SLE. Solamente el 3% de controles saludables mostraron una alta actividad en MMP-9 (P=0.0001). Los análisis densitométricos de niveles MMP-2 en las mismas muestras de suero revelaron que las diferencias en la actividad MMP-2 entre los sueros de pacientes SLE y de controles saludables no fueron significativos. Por lo tanto, los valores de 109±7 y de 123±5 (unidades de densitometría de actividad media ± s.e.) fueron determinados para los controles saludables y pacientes SLE respectivamente ((P=0.0531). Para cuantificar los niveles de actividad de MMP-9 y MMP-2 en el suero adicionalmente, utilizamos kits de ensayote actividad.

La Figura 15 muestra que la actividad de MMP-9 es elevada tres veces en sueros de pacientes SLE comparados con sueros de controles saludables, y esta elevación es estadísticamente significativa (P=0.0302). En contraste, las diferencias en los niveles de MMP-2 entre los dos grupos no son significativas (P=0.1254).

Por lo tanto los presentes inventores así como otros (Ebihara I. et al., *Am J Kidney Dis* 32: 544-50

(1998); Ebihara I. et al., *Nephron* 83: 169 (1999) detectaron altos niveles de MMP-9 en sueros de pacientes con disfunción renal crónica que no es SLE (por ejemplo diabetes melitus, hipertensión) probablemente debido a la retención de la enzima, se analizó la correlación entre los niveles de MMP-9 y la función renal en el grupo de pacientes SLE. No hubo correlación entre niveles de creatinina y niveles de MMP-9 (r^2=0.01), indicando que los niveles de elevados de MMP-9 en pacientes SLE no fueron el resultado de la retención de la enzima debido a la disfunción renal.

EJEMPLO 18

Correlación de la actividad MMP-9 con parámetros clínicos y de laboratorio

La elevación en los niveles de actividad de MMP-9 en usuarios de pacientes SLE nos impulsaron a buscar una posible correlación entre los parámetros clínicos y de laboratorio, y los niveles de MMP-9 en suero. Los análisis estadísticos (pruebas exactas de chi-cuadrada o Fisher) se desarrollaron investigando el número de pacientes con niveles altos y normales de MMP-9 para cada manifestación clínica (Cuadro 20) así como tomando en consideración la actividad media real cuyos niveles de MMP-9 para pacientes con o sin un cierto síntoma clinico. Los resultados fueron similares por ambos análisis. Cabe mencionar de manera

importante que para todos los síntomas clínicos, el porcentaje de pacientes con niveles de MMP-9 elevados es mucho más elevado que en el grupo de controles saludables. Los niveles de MMP-9 no se correlacionaron con el género, duración de la enfermedad o la edad de su inicio. (Pearson, Spearman).

El Cuadro 20 muestra las características clínicas y de laboratorio de los pacientes SLE de acuerdo con sus niveles de actividad MMP-9 (menor o igual a los controles saludables = a normal). Altos niveles de MMP-9 correlacionados significativamente con la presencia del fenómeno de Raynaud (P=0.0138) y APLA (P=0-041). Se pudo observar una fuerte correlación con neumonitis, urticaria discoide, con trastornos neurológicos y úlceras en mucosas. Sin embargo, el número de pacientes con las últimas manifestaciones era muy pequeño para desarrollar un análisis estadístico. Los análisis de multivarianza revelaron que el fenómeno de Raynaud y los bajos niveles de complemento (C3, C4) estaban positivamente correlacionados con altos niveles de MMP-9 (P=0.0001, y 0.0137). en contraste, la fotosensibilidad, la artritis y los trastornos hematológicos están negativamente correlacionados con los niveles de actividad MMP-9 (P=0.0381, 0.0014 y 0.0065, respectivamente).

CUADRO 20

Características clínicas de pacientes SLE con actividad altas y normales de MMP-9 de acuerdo con los niveles MMP-9

		NIVELES MMP-9 %	
		Alto	Normal
Número de pacientes (%)	40(100)	27(68)	13(32)
Fotosensibilidad	13	8(62)	5(38)
Úlceras en mucosa	9	8(89)	1(11)
Urticaria malaria	9	7(78)	2(22)
Urticaria discoide	5	5(100)	0(0)
Fenómeno de Raynaud	8	8(100)	0(0)
Vasculitis	18	14(78)	4(22)
Artritis	31	21(68)	10(32)
Serositis	9	7(78)	2(22)
Neumonitis	4	4(100)	0(0)
Trastornos neurológicos	4	4(100)	0(0)
Trastornos renales	16	11(69)	5(31)
Trastornos hematológicos	29	18(62)	11(38)
ANA	40	27(68)	13(32)
dsADN	36	24(67)	12(33)
APLA	25	20(80)	5(20)
Complemento bajo (C3, C4)	30	21(70)	9(30)

El involucramiento clínico fue definido de acuerdo con los criterios revisados de ACR (Winchester, 1996). Los anticuerpos anti-nucleares (ANA) y los anticuerpos ADN anti-ds fueron determinados por utilizar células Hep2 y *Crithidia lucilie*, respectivamente. Los anticuerpos antifosfolípidos (APLA) fueron definidos como

la capacidad de reacción con uno o más de los siguientes ensayos: VDR falso positivo, anti-coagulante lupus (LAC) o ELISA para anticuerpos anticardiolipina.

También se buscó una posible correlación entre la actividad MMP-9 y SLEDAI en pacientes de sexo masculino (Figura 16A) y sexo femenino (Figura 16B). De manera interesante, el coeficiente de correlación fue significativo y positivo para hombres (r^2 = 0.6333) pero insignificante y negativo para mujeres. Se obtuvieron los resultados similares utilizando el sistema de clasificación BILAG. Por lo tanto, un posible coeficiente de correlación entre la actividad MMP-9 y las calificaciones BILAG se observaron para hombres (r^2 = 0.6442) y un muy insignificante para mujeres.

También fue de gran interés determinar si existe una correlación entre el uso de varias modalidades de tratamiento por los pacientes y la actividad MMP-9. Como se puede apreciar en el Cuadro 21 (A), no hubo correlación significativa entre el tratamiento actual de los pacientes y la actividad MMP-9, Sin embargo, cuando se observó el tratamiento de pacientes en cualquier momento durante el curso de su actividad (Cuadro 21 (B)), se asociaron altos niveles de MMP-9 con el uso de agentes citotóxicos (82%).

CUADRO 21

Modalidad de tratamiento de pacientes SLE de acuerdo con sus niveles MMP-9

	Número total de pacientes	Niveles MMP-9 (%)	
		Alto	Normal
A. Tratamiento actual			
Agentes citotóxicos	8	6 (75)	2 (25)
Esteroides	23	17(74)	6 (26)
Antimalaria	21	14 (67)	7 (33)
NSAID	7	5 (71)	2 (29)
B. Tratamiento a lo largo del periodo de seguimiento			
Agentes citotóxicos	17	14 (82)	3 (18)
Esteroides	29	19 (66)	10 (34)
Antimalaria	26	16 (62)	10 (38)
NSAID	18	12 (67)	6 (33)

El agente antimalaria hidroxicloroquina se utilizó una dosis de 200-400 mg/día. El tratamiento esteroide fue definido como una dosis diaria $\geq$ mg de prednisona. Los agentes citotóxicos utilizados fueron ciclofosfamida (0.5-1g/m^2 mensual) o azatioprina (100-150 mg/día).

EJEMPLO 18 (III)

Variaciones en la actividad MMP-9 en muestras de suero tomadas de pacientes SLE individuales en diferentes puntos de tiempo

Como la actividad de la enfermedad varía conforme trascurre el tiempo, se midieron los niveles de actividad

de MMP-9 y MMP-2 en el suero de pacientes individuales en donde se les tomó una muestra durante 4-6 años de seguimiento. Se analizaron los sueros de nueve pacientes tomados en diferentes puntos de tiempo. Los niveles de MMP-2 no variaron significativamente entre pacientes y controles saludables. En 5 de 9 pacientes que se sometieron a la prueba, se pudieron observar con el tiempo variaciones en la actividad MMP-9 en muestras de suero de pacientes individuales. Los resultados para 2 pacientes SLE representativos se muestran en las Figuras 17A-B. Como se puede apreciar, la actividad MMP-9, más no la actividad MMP-2, ha estado cambiando con el tiempo en los mismos pacientes. Estos cambios no estaban asociados con los índices de actividad de la enfermedad como se determinó tanto por los sistemas SLEDAI com BILAG. Los cambios en la actividad MMP-9 no fueron detectados en sueros de 5 controles saludables que se sometieron a muestran a diferentes puntos de tiempo (no se muestran datos). En otros 4 pacientes SLE, no hubo cambios sustanciales en la actividad de MMP-9 y MMP-2 que se observaran con el transcurso del tiempo y los niveles de actividad MMP-9 se mantuvieron tanto altos como bajos, dependiendo del paciente individual.

Análisis

El presente estudio demuestra por primera vez el involucramiento de MMP-9 en SLE humano. Se muestra la actividad de MMP-9, más no de MMP-2, y es significativamente elevada en sueros de 68% de pacientes SLE, comparado con controles saludables. Altos niveles de MMP-9 correlacionados con el fenómeno de Raynaud, neumonitis, trastornos neurológicos, urticaria discoide y presencia de APLA. Se observaron cambios en la actividad MMP-9 en suero del mismo paciente en diferentes periodos de la enfermedad. Los niveles MMP-9 no se correlacionaron con el índice de la actividad de la enfermedad (SLEDAI, BILAG) en pacientes de sexo masculino, pero se correlacionaron con la actividad SLE en el grupo de pacientes de sexo femenino.

El presente estudio muestra que los niveles de actividad MMP-2 no están elevados significativamente en los sueros de pacientes SLE. Estos resultados son compatibles con aquellos reportados previamente (Zucker, S. *J Rheumatol.* 26, 78 (1999)) en que los niveles de MMP-2 no fueron incrementados en SLE.. Los niveles de MMP-2 también fueron constitutivos y sin cambios en otras conexiones patológicas (como neuritis óptica y múltiple esclerosis) en donde los niveles de MMP-9 fueron elevados relativamente a los controles saludables (Gijbels K et al., *J. Neuroimmunol.* 41: 29-34 (1992).; Paemen, L. et al,, Eur. *J. Neurol.* 1: 55-63 (1994)).

Involucramiento de un MMP adicional, a saber MMP-3 se sugirió en la patogénesis de SLE, ya que se incrementó significativamente en los sueros de pacientes con SLE (Kotajima, L. et al., *Clin. Exp. Rheum.* 16: 409-415 (1998)). La frecuencia de pacientes SLE con actividad elevada de MMP-9 (68%) que se muestra e el presente ejemplo, se asemeja a las frecuencias reportadas (Kotajima, L. et al., (1998) para altos niveles de MMP-3 en SLE (76%) y en pacientes RA en (82%). Además, la trascripción de MMP-3 se mostró incrementada significativamente con el progreso de nefritis en (NZB x NZW) F1 (Nakamura, T. et al., Clin. Sci. 85:295-301 (1993)).

El origen de los MMPs elevados en suero de pacientes SLE no se muestra. Se han demostrado que MMP-9 se secreta por medio de las células sanguíneas periféricas tales como células T, neutro filos y macrófagos (para su revisión, consulte Goetzl, E. J. et al., *J. Immunol.* 156: 1-4 (1996)). El hecho que no se encontró correlación alguna entre los niveles de actividad MMP-9 y el número de células sanguíneas periféricas en pacientes, puede sugerir que MMP-9 fue secretado por células inmuno sanguíneas periféricas pero en su lugar por órganos afectados por SLE como riñones o pulmones/pleura. La observación de que todos los pacientes SLE con neumonitis se exhibieron a altos niveles de actividad MMP-9 puede sugerir un pulmón enfermo como una

fuente de altos niveles MMP-9. Sin embargo, y además, la asociación entre el tratamiento citotóxico que representa la severidad de la disfunción orgánica relacionada con SLE, y altos niveles de MMP-9 en los sueros también pueden soportar la noción de que los órganos enfermos son la fuente de la actividad MMP-9 en pacientes SLE. Sin embargo, existe todavía la posibilidad de que existan menos linfocitos sanguíneos periféricos secretados con niveles más altos de actividad de MMP-9.

Se mostraron TNF-α e IL-1 como importantes en el desempeño de una patogénesis de SLE en enfermedad humana (Dean G.S. et al., *Ann Rheum Dis* 59: 243-51 (2000)) y en modelos de murino (Segal R. et al., *J Immunol* 158: 3009-16 (1997); Theofilopulos A.N. et al., *Ann Rheum Dis* 58 (suppl): 149-55 (1999); Eilat et al., 2001), se ha mostrado en varios sistemas que esta citosinas inducen la producción MMP-9 (Guedez, L. et al., *Crit. Rev. Oncogenesis* 7: 205-225 (1996)), y por lo tanto, es posible que la inducción de los últimos MMPs es parte del efecto patogénico de estas citosinas en SLE. Se ha reportado que los niveles de MMP-9 que se secretan espontáneamente por monocitos sanguíneos periféricos de individuos saludables, fueron regulados ascendentemente hasta TNF-α e IL-1β (Saren P. et al., *J Immunol* 157: 4159-65 (1996)). Además, los MMPs de ambas células T y macrófagos facilitan la secreción de TNF-α por

medio de un enclavamiento de la forma unida a la membrana (Gearing A.J.H. et al., *Nature* 370:555-7 (1994)). Por lo tanto, estos ejemplos demuestran los efectos reguladores mutuos de MMP en la citosina proinflamatorias y viceversa. Sin embargo, el hecho que en el suero de algunos pacientes los niveles de actividad de MMP-9 se mantuvieron dentro de la escala normal durante el periodo de seguimiento, mientras que altos niveles de actividad MMP-9 se midieron en los sueros de la mayoría de los pacientes, puede sugerir el involucramiento de factores genéticos en la regulación de éste último.

Los resultados en la presente invención indican que MMP-9 puede desempeñar un papel importante en la patogénesis de SLE y la medición de los niveles de actividad de plasma/suero de esta metaloproteinasa puede ofrecer una información importante cuando se controlen pacientes tratados con fármacos que interfieran con la actividad de MMP-9.

NOVEDAD DE LA INVENCIÓN

Habiendo descrito el presente invento, se considera como una novedad y, por lo tanto, se reclama como prioridad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

1.- Una composición farmacéutica, que comprende: un vehículo acuoso; desde 0.1 mg/ml a 20 mg/ml de la composición de una sal farmacéuticamente aceptable de a) un péptido que comprende por lo menos 12 y por lo menos 30 aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia correspondiente a (i) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región que determina la capacidad de complementación (CDR) de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo ID 16/6 anti-ADN monoclonal humano o (ii) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región que determina la capacidad de complementación (CDR) de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo monoclonal anti-ADN patogénico que induce una respuesta similar al lupus sistémico eritematoso (SLE) en ratones, o b) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia (i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO: 11), caracterizado porque X$_1$ es Met, Ala o Val; X$_2$ es Gln, Asp, Glu o Arg; X$_3$

es Trp o Ala; X_4 es Val o Ser; y X_5 es Lys, Glu o Ala; (ii) EINPSTGG$X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}$KAKAT (SEQ ID NO: 12), caracterizado porque X_6 y X_7, cada una son Thr, Val o Ara; X_8 es Tyr o Phe; X_9 es Asn o Asp; X_{10} es Gln o Glu; X_{11} es Lys o Glu; y X_{12} es Phe o Tyr; (iii) YYCAR$X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}$PYA$X_{17}X_{18}$YWGQGS (SEQ ID NO: 13), caracterizada porque X_{13} es Phe, Thr o Gly; X_{14} es Leu, Ala o Ser; X_{15} es Trp o Ala; X_{16} es Glu o Lys; X_{17} es Met o Ala; y X_{18} es Asp, Lys o Ser; (iv) GYN$X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}SHGX_{25}X_{26}$LEWIG (SEQ ID NO: 14), caracterizada porque X_{19} es Met o Ala; X_{20} es Asn, Ap o Arg; X_{21} es Trp o Ala; X_{22} es Val o Ser; X_{23} es Lys o Glu; X_{24} es Gln o Ala; X_{25} es Lys o Glu; y X_{26} es Ser o Ala; (v) YYCAR$X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$GQTL (SEQ ID NO: 15), caracterizada porque X_{27} es Ser o Phe; X_{28} es Gly o Ala; X_{29} es Arg, Ala o Glu; X_{30} es Asn o Asp; X_{31} es Tyr o Phe, y X_{32} es Trp, His o Ala; (vi) X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}P$X_{36}X_{37}$GX_{38}EWIG (SEQ ID NO: 16), caracterizada porque X_{33} es Gly o Thr Gly; X_{34} es Arg o Lys; X_{35} es Pro o Ser; X_{36} es Gly o Glu; X_{37} es Lys o Asp; y X_{38} es Glu, Leu o Ser; (vii) YYCARX_{39}LL$X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}$DVDY$X_{45}GX_{46}$DV (SEQ ID NO: 17), caracterizada porque X_{39} es Gly o Phe, X_{40} es Arg o Ala; X_{41} es Gly o Ala; X_{42} es Gly o Ala; X_{43} es Trp o Ala; X_{44} es Asn o Ala; X_{45} es Tyr o Trp; X_{46} es Met o Gin; (viii) FSGYYWS (SEQ ID NO: 8); (ix) EINHSGSTNYKTSLSKS (SEQ ID NO: 9); o (x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEQ ID NO: 10), o c) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que

tienen una secuencia de cualquiera de a) y b), o por lo menos dos de las secuencias en (a)(i), (a)(ii), y (b)(i) a (b)(x), o d) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que comprende por lo menos dos secuencias idénticas incluidas en (a)(i), (a)(ii) y (b)(i) a (b)(x); y un incrementador de solubilidad que se selecciona desde el grupo consistente en dimetil-acetamida, polietilenglicol, aceite de castor plioxilado, N-metil-2-pirrolidinona, 1-etenil-2-pirrolidinona, ésteres de sorbitán plioxietilénicos y una β-ciclodextrina sustituida; caracterizado porque tanto el péptido como el incrementador de solubilidad se encuentran disueltos en el vehículo acuoso; y caracterizado porque la composición tiene un pH entre 4 y 9.

2.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque cuando menos 0.5 mg/ml de la composición es sal faramacèuticamente aceptable del péptido.

3.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque el péptido tiene una secuencia seleccionada desde el grupo que consiste en: NH_2 - Thr Gly Tyr Met Gln Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Lys Ser Leu Glu - Trp Ile Gly - COOH (SEQ ID NO: 1); NH_2 - Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr - COOH (SEQ ID NO: 2); NH_2

- Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Leu Trp Glu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser - COOH (SEQ ID NO: 3); NH_2 - Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly - COOH (SEQ ID NO: 4); NH_2 - Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Arg Tyr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Thr Leu - COOH (SEQ ID NO: 5); NH_2 - Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly - COOH (SEQ ID NO: 6); NH_2 - Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val - COOH (SEQ ID NO: 7); NH_2 - Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser - COOH (SEQ ID NO: 8); NH_2 - Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Lys Thr Ser Leu Lys Ser - COOH (SEQ ID NO: 9); y NH_2 - Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val - COOH (SEQ ID NO: 10).

4.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1; caracterizada porque el péptido comprende aminoácidos consecutivos que tiene la secuencia $X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}PX_{36}X_{37}GX_{38}EWIG$ (SEQ ID NO: 16), caracterizada porque X_{33} es Gly o Thr Gly; X_{34} es Arg o Lys; X_{35} es Pro o Ser; X_{36} es Gly o Glu; X_{37} es Lys o Asp; y X_{38} es Glu, Leu o Ser.

5.- La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el incrementador de solubilidad es una β-ciclodextrina sustituida.

6.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la β-ciclodextrina sustituida es un hidropropilo, una β-ciclodextrina de éter sulfobutílico.

7.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque la β-ciclodextrina sustituida es un β-ciclodextrina de éter sulfobutílico sustituida.

8.- La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque la concentración de péptido en la solución es de por lo menos 1 mg/ml.

9.- La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque la concentración de péptido en la solución es de por lo menos 2.5 mg/ml.

10.- La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque la composición tiene un pH entre 6.5 y 8.5.

11.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque la composición tiene un pH entre 7.5 y 8.5.

12.- La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11,

caracterizada porque la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de acetato.

13.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de acetato, y la β-ciclodextrina sustituida es hepta-(éter sulfobutílico)- β-ciclodextrina.

14.- Un método para aliviar síntomas de lupus sistemático eritematoso (SLE) en un sujeto humano, que comprende administrar al sujeto humano la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en una cantidad efectiva para aliviar los síntomas del SLE en el sujeto humano.

15.- La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso en el tratamiento de SLE en un sujeto humano.

16.- Un procedimiento para fabricar la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende los pasos de: e) preparar una solución de dimetil-acetamida, polietilenglicol, aceite de castor plioxilado, N-metil-2-pirrolidinona, 1-etenil-2-pirrolidinona, ésteres de sorbitán polioxietilénicos, o una β-ciclodextrina sustituida en un vehículc acuoso en una concentración predeterminada; f) agregar una cantidad predeterminada de

una sal farmacéuticamente aceptable de 1) un péptido que comprende por lo menos 12 y cuando mucho 30 aminoácidos consecutivos que tiene una secuencia que corresponde con (i) una secuencia de aminoácidos encontrados dentro de una región que determina la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo ID 16/6 anti-ADN monoclonal humano, o (ii) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región que determina la capacidad de complementación (CDR) de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo monoclonal anti-ADN patogénico que induce una respuesta similar al lupus sistémico eritematoso (SLE) en ratones, 2) un péptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia (i) TGYYX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO: 11), caracterizado porque X$_1$ es Met, Ala o Val; X$_2$ es Gln, Asp, Glu o Arg; X$_3$ es Trp o Ala; X$_4$ es Val o Ser; y X$_5$ es Lys, Glu o Ala; (ii) EINPSTGGX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$KAKAT (SEQ ID NO: 12), caracterizado porque X$_6$ y X$_7$, cada una son Thr, Val o Ara; X$_8$ es Tyr o Phe; X$_9$ es Asn o Asp; X$_{10}$ es Gln o Glu; X$_{11}$ es Lys o Glu; y X$_{12}$ es Phe o Tyr; (iii) YYCARX$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$PYAX$_{17}$X$_{18}$YWGQGS (SEQ ID NO: 13), caracterizada porque X$_{13}$ es Phe, Thr o Gly; X$_{14}$ es Leu, Ala o Ser; X$_{15}$ es Trp o Ala; X$_{16}$ es Glu o Lys; X$_{17}$ es Met o Ala; y X$_{18}$ es Asp, Lys o Ser; (iv) GYNX$_{19}$X$_{20}$X$_{21}$X$_{22}$X$_{23}$X$_{24}$SHGX$_{25}$X$_{26}$LEWIG (SEQ ID NO: 14), caracterizada porque X$_{19}$ es Met o Ala; X$_{20}$ es Asn, Ap o Arg; X$_{21}$ es Trp o Ala; X$_{22}$ es Val o Ser; X$_{23}$ es Lys o Glu;

X_{24} es Gln o Ala; X_{25} es Lys o Glu; y X_{26} es Ser o Ala; (v) YYCAR$X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$GQTL (SEQ ID NO: 15), caracterizada porque X_{27} es Ser o Phe; X_{28} es Gly o Ala; X_{29} es Arg, Ala o Glu; X_{30} es Asn o Asp; X_{31} es Tyr o Phe, y X_{32} es Trp, His o Ala; (vi) X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}P$X_{36}X_{37}$GX_{38}EWIG (SEQ ID NO: 16), caracterizada porque X_{33} es Gly o Thr Gly; X_{34} es Arg o Lys; X_{35} es Pro o Ser; X_{36} es Gly o Glu; X_{37} es Lys o Asp; y X_{38} es Glu, Leu o Ser; (vii) YYCARX_{39}LL$X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}$DVDY$X_{45}GX_{46}$DV (SEQ ID NO: 17), caracterizada porque X_{39} es Gly o Phe, X_{40} es Arg o Ala; X_{41} es Gly o Ala; X_{42} es Gly o Ala; X_{43} es Trp o Ala; X_{44} es Asn o Ala; X_{45} es Tyr o Trp; X_{46} es Met o Gin; (viii) FSGYYWS (SEQ ID NO: 8); (viii) FSGYYWS (SEQ ID NO: 8); (ix) EINHSGSTNYKTSLSKS (SEQ ID NO: 9); o (x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEQ ID NO: 10), o c) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia de cualquiera de a) y b), o por lo menos dos de las secuencias en (a)(i), (a)(ii), y (b)(i) a (b)(x); o 4) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que comprende por lo menos dos secuencias idénticas incluidas en (a)(i), (a)(ii) y (b)(i) a (b)(x); g) ajustar el pH de la solución del paso b) hasta que el péptido se disuelva en la solución; y h) si s necesario, ajustar el pH de la solución del paso c) a un pH de 4 a 9, de se modo fabricando la composición farmacéutica.

17.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la cantidad predeterminada de péptido es tal, que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica de por lo menos 0.1 mg/ml.

18.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la cantidad predeterminada de péptido es tal, que resulta en una concentración final de por lo menos 0.5 mg/ml.

19.- El procedimiento de conformidad con las reivindicaciones 16, 17 o 18, caracterizado porque la cantidad predeterminada de péptido es tal, que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica de 2.5 mg/ml, 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml o 0.1 mg/ml.

20.- El procedimiento de conformidad con cualquier a de las reivindicaciones 16 a 19, caracterizado porque el paso b) además comprende mezclar la solución durante una hora.

21.- El procedimiento de conformidad con cualquier a de las reivindicaciones 16 a 20, caracterizado porque en el paso c) el pH se ajusta utilizando HC1 o NaOH 1.0N.

22.- El procedimiento de conformidad con las reivindicaciones 16 a 21, que además comprende filtrar la

solución del paso d) a través de un filtro de acetato de celulosa.

23.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la cantidad predeterminada de péptido es tal, que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica de 2.5 mg/ml, 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml o 0.1 mg/ml; el paso b) además comprende mezclar la solución durante una hora; en el paso c) el pH se ajusta utilizando HCl o NaOH 1.0N, que además comprende filtrar la solución del paso d) a través de un filtro de acetato de celulosa.

24.- Una composición preparada por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23.

25.- Una composición farmacéutica liofilizada que comprende de 0.1 mg/ml a 20 mg/ml de la composición de una sal farmacéuticamente aceptable de a) un péptido que comprende por lo menos 12 y cuando mucho 30 aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia correspondiente a (i) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región que determina la capacidad de complementación (CDR) de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo ID 16/6 anti-ADN monoclonal humano o (ii) una secuencia de aminoácidos encontrada dentro de una región que determina

la capacidad de complementación (CDR) de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo monoclonal anti-ADN patogénico que induce una respuesta similar al lupus sistémico eritematoso (SLE) en ratones, o b) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia (i) $TGYYX_1X_2X_3X_4X_5QSPEKSLEWIG$ (SEQ ID NO: 11), caracterizado porque X_1 es Met, Ala o Val; X_2 es Gln, Asp, Glu o Arg; X_3 es Trp o Ala; X_4 es Val o Ser; y X_5 es Lys, Glu o Ala; (ii) $EINPSTGGX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}KAKAT$ (SEQ ID NO: 12), caracterizado porque X_6 y X_7, cada una son Thr, Val o Ara; X_8 es Tyr o Phe; X_9 es Asn o Asp; X_{10} es Gln o Glu; X_{11} es Lys o Glu; y X_{12} es Phe o Tyr; (iii) $YYCARX_{13}X_{14}X_{15}X_{16}PYAX_{17}X_{18}YWGQGS$ (SEQ ID NO: 13), caracterizada porque X_{13} es Phe, Thr o Gly; X_{14} es Leu, Ala o Ser; X_{15} es Trp o Ala; X_{16} es Glu o Lys; X_{17} es Met o Ala; y X_{18} es Asp, Lys o Ser; (iv) $GYNX_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}SHGX_{25}X_{26}LEWIG$ (SEQ ID NO: 14), caracterizada porque X_{19} es Met o Ala; X_{20} es Asn, Ap o Arg; X_{21} es Trp o Ala; X_{22} es Val o Ser; X_{23} es Lys o Glu; X_{24} es Gln o Ala; X_{25} es Lys o Glu; y X_{26} es Ser o Ala; (v) $YYCARX_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}GQTL$ (SEQ ID NO: 15), caracterizada porque X_{27} es Ser o Phe; X_{28} es Gly o Ala; X_{29} es Arg, Ala o Glu; X_{30} es Asn o Asp; X_{31} es Tyr o Phe, y X_{32} es Trp, His o Ala; (vi) $X_{33}YYWSWIX_{34}QX_{35}PX_{36}X_{37}GX_{38}EWIG$ (SEQ ID NO: 16), caracterizada porque X_{33} es Gly o Thr Gly; X_{34} es Arg o Lys; X_{35} es Pro o Ser; X_{36} es Gly o Glu; X_{37} es Lys o Asp; y X_{38}

es Glu, Leu o Ser; (vii) YYCARX_{39}LL$X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}$DVDY$X_{45}GX_{46}$DV (SEQ ID NO: 17), caracterizada porque X_{39} es Gly o Phe, X_{40} es Arg o Ala; X_{41} es Gly o Ala; X_{42} es Gly o Ala; X_{43} es Trp o Ala; X_{44} es Asn o Ala; X_{45} es Tyr o Trp; X_{46} es Met o Gin; (viii) FSGYYWS (SEQ ID NO: 8); (viii) FSGYYWS (SEQ ID NO: 8); (ix) EINHSGSTNYKTSLSKS (SEQ ID NO: 9); o (x) GLLRGGWNDVDYYYGMDV (SEQ ID NO: 10), o c) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia de cualquiera de a) y b), o por lo menos dos de las secuencias en (a)(i), (a)(ii), y (b)(i) a (b)(x); o d) un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que comprende por lo menos dos secuencias idénticas incluidas en (a)(i), (a)(ii) y (b)(i) a (b)(x); y un incrementador de solubilidad que se selecciona desde el grupo consistente en dimetil-acetamida, polietilenglicol, aceite de castor plioxilado, N-metil-2-pirrolidinona, 1-etenil-2-pirrolidinona, ésteres de sorbitán plioxietilénicos y una β-ciclodextrina sustituida.

26.- La composición farmacéutica liofilizada de conformidad con la reivindicación 25, caracterizada porque por lo menos 0.5 mg/ml de la composición es la sal farmacéuticamente aceptable del péptido.

27.- Un procedimiento para liofilizar la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 13, que comprende los pasos de: f)

disminuir la temperatura de la composición farmacéutica a -40°C; g) mantener la temperatura a -40°C por un tiempo predeterminado; h) elevar la temperatura de la solución a 20°C; i) mantener la temperatura a 20°C por un tiempo predeterminado; y j) reducir la presión y mantener la temperatura a 20°C por un tiempo predeterminado, de ese modo liofilizando la composición farmacéutica.

28.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el paso a) se lleva a cabo dentro de un lapso de 2 horas.

29.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el paso b) se lleva a cabo dentro de un lapso de 2 horas.

30.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el paso c) se lleva a cabo dentro de un lapso de 13 horas.

31.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el paso c) se lleva a cabo a una presión de 110µbar.

32.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el paso d) se lleva a cabo dentro de un lapso de 13 horas.

33.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el paso d) se lleva a cabo a una presión de 110µbar.

34.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque en el paso e) la presión se reduce a 10µbar.

35.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el paso e) se lleva a cabo dentro de un lapso de 5 horas.

36.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el paso a) se lleva a cabo dentro de un lapso de 2 horas; el paso b) se lleva a cabo dentro de un lapso de 3 horas; el paso c) se lleva a cabo dentro de un lapso de 13 horas y a una presión de 110µbar; el paso d) se lleva a cabo dentro de un lapso de 13 horas y a una presión de 110µbar; y el paso 4) se lleva a cabo dentro de un lapso de 5 horas y la presión se reduce a 10µbar.

37.- Una composición farmacéutica liofilizada preparada por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 36.

38.- Un proceso para liofilizar la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende los pasos de: f) disminuir la temperatura de la composición farmacéutica a -45°C; g) mantener la temperatura a -45°C por un tiempo predeterminado; h) elevar la temperatura de la solución a -20°C; i) elevar la temperatura de la solución a 25°C; j) mantener la

temperatura a 25°C por un tiempo predeterminado, de ese modo liofilizando la composición farmacéutica.

39.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el paso a) se lleva a cabo dentro de un lapso de 6 horas.

40.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el paso b) se lleva a cabo dentro de un lapso de 3 horas.

41.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el paso c) se lleva a cabo dentro de un lapso de 19 horas.

42.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el paso c) se lleva a cabo a una presión de 150µbar.

43.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el paso d) se lleva a cabo dentro de un lapso de 13 horas.

44.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el paso d) se lleva a cabo a una presión de 150µbar.

45.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el paso e) se lleva a cabo dentro de un lapso de 8 horas.

46.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el paso e) se lleva a cabo a una presión de 150µbar.

47.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el paso a) se lleva a cabo dentro de un lapso de 6 horas; el paso b) se lleva a cabo dentro de un lapso de 3 horas; el paso c) se lleva a cabo dentro de un lapso de 19 horas y a una presión de 150µbar; el paso d) se lleva a cabo dentro de un lapso de 13 horas y a una presión de 150µbar; y el paso e) se lleva a cabo dentro de un lapso de 8 horas y a una presión de 150µbar.

48.- Una composición farmacéutica liofilizada preparada por el procedimiento de conformidad con las reivindicaciones 38 a 47.

49.- La composición farmacéutica liofilizada de conformidad con la reivindicación 48, caracterizada porque el contenido de agua de la composición es menor al 5%.

50.- La composición farmacéutica liofilizada de conformidad con la reivindicación 49, caracterizada porque el contenido de agua de la composición es menor al 4.0%.

51.- La composición farmacéutica liofilizada de conformidad con la reivindicación 49, caracterizada porque el contenido de agua de la composición es menor al 3.5%.

52.- Una composición farmacéutica envasada, comprendida de: un material de empaque; y una cantidad predeterminada de la composición farmacéutica liofilizada de conformidad con las reivindicaciones 37 a 48.

210

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención provee una composición farmacéutica que comprende un vehículo acuoso de 0.1 mg/ml a 20 mg/ml de la composición de una sal farmacéuticamente aceptable de un péptido que tiene la fórmula estructural NH_2-Gly Tyr Tyr Tip Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly-cooH; y una 13-ciclodextrina sustituida en una cantidad efectiva para disolver el péptido en el vehículo acuso en donde la composición tiene un pH entre 4 y 9, un procedimiento para su preparación, y un método para aliviar los síntomas del lupus sistémico eritematoso (SLE) en un ser humano que comprende administrar a dicho ser humano la composición farmacéutica.

^{NH_2} – G Y Y W S W I R Q P P G K G E E W I G – ^{COOH}

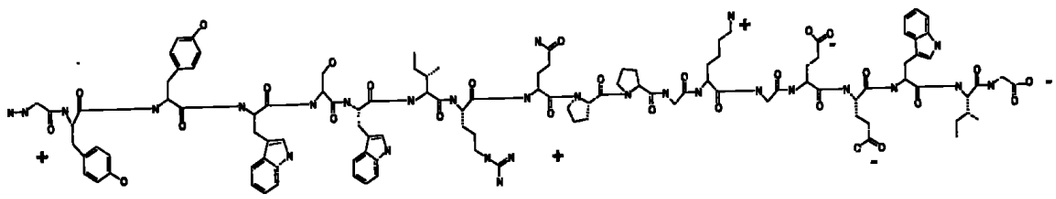


FIGURA 1

^{NH_2} – Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly – ^{COOH}

Peso Molecular = 2309.59
Masa Exacta = 2307
Fórmula Molecular = $C_{111}H_{149}N_{27}O_{28}$
Composición Molecular = C 57.73% H 6.50% N 16.37% O 19.40%

Acético a agregarse: $CH_3CO_2H = C_2H_4O_2$

$C_{111}H_{149}N_{27}O_{28}.\ C_2H_4O_2$

FIGURA 2

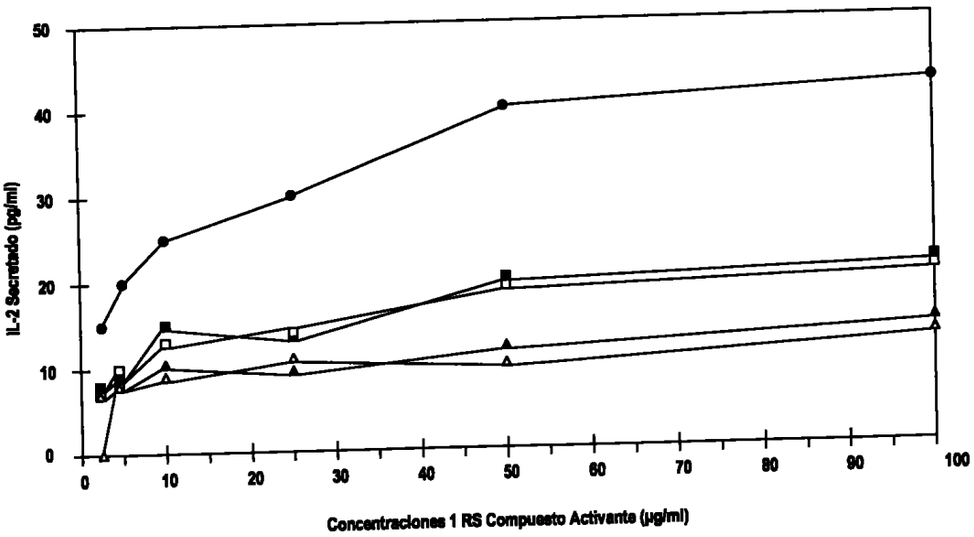

IL-2 Secretado (pg/ml)
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Concentraciones 1 RS Compuesto Activante (µg/ml)

FIGURA 3

2000
1500
1000
500
0
IFN-gama (pg/ml)
3.125 µg/ml
12.5 µg/ml
50 µg/ml
Concentración de Compuesto 1 (µg/ml)

FIGURA 4

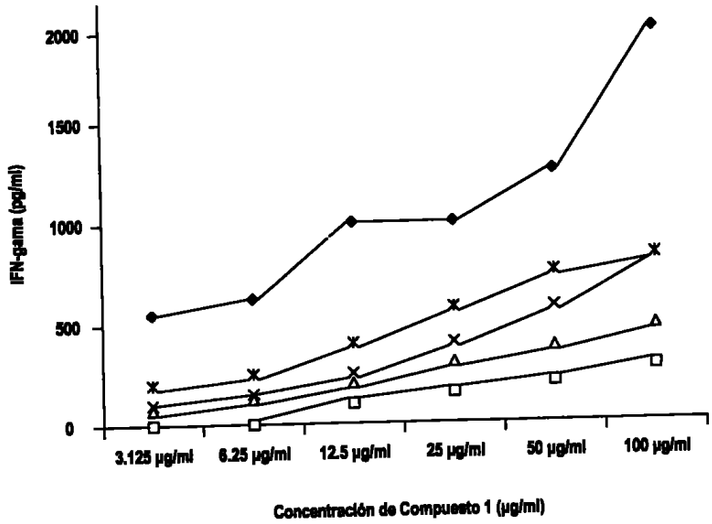

2000
1500
1000
500
0
IFN-gama (pg/ml)
3.125 µg/ml
6.25 µg/ml
12.5 µg/ml
25 µg/ml
50 µg/ml
100 µg/ml
Concentración de Compuesto 1 (µg/ml)

FIGURA 5

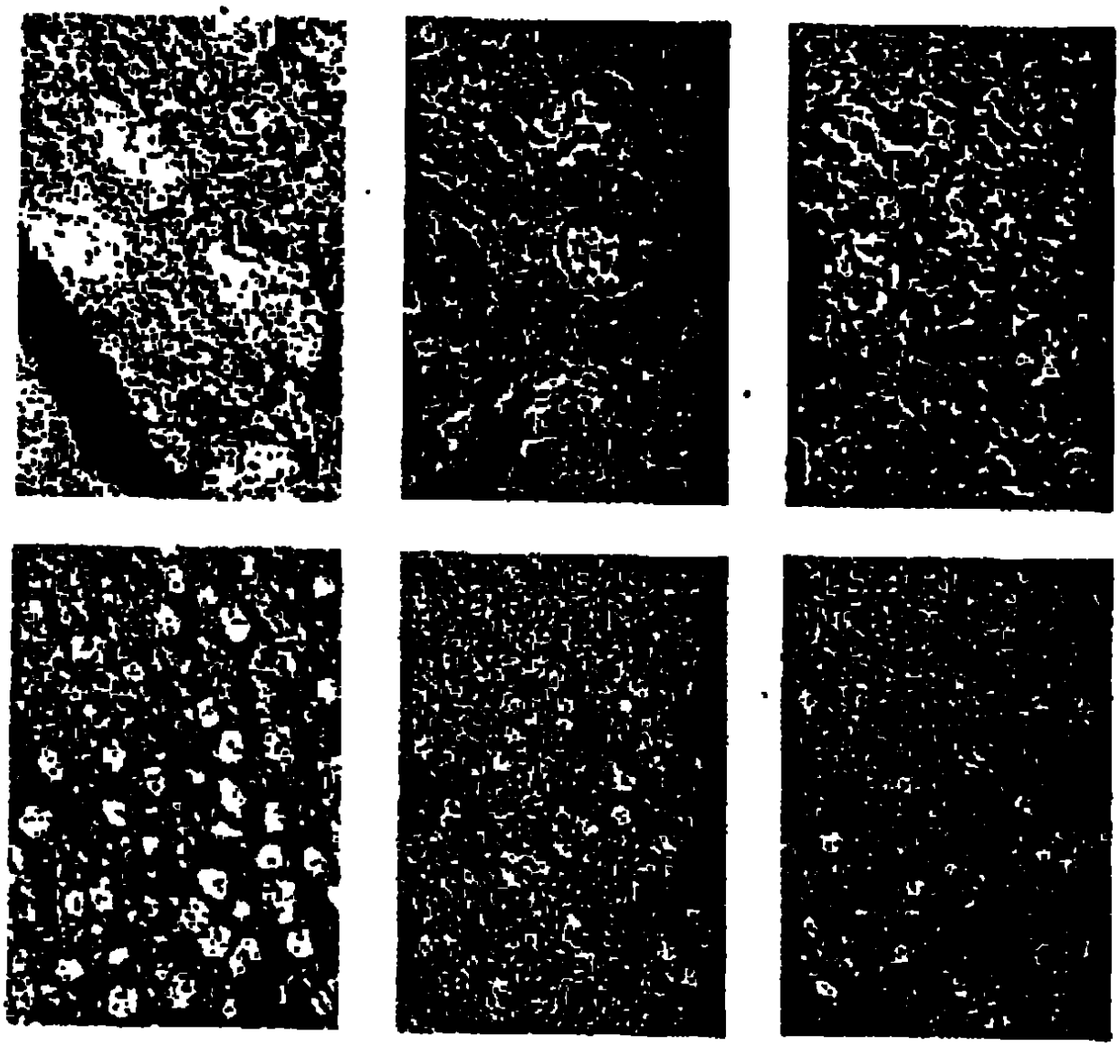
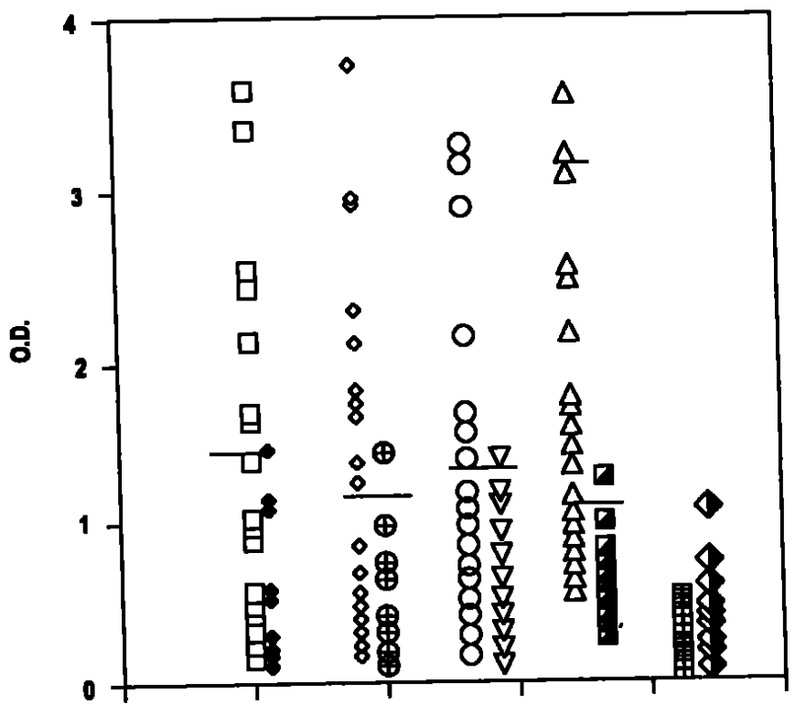


FIGURA 6



- pep Ia - SLE
- pep IIa - SLE
- pep IIIa - SLE
- 5G12 - SLE
- P195 – 212 - SLE
- pep Ia - SALUDABLE
- pep IIa - SALUDABLE
- pep IIIa - SALUDABLE
- 5G12 - SALUDABLE
- P195 – 212 - SALUDABLE

FIGURA 7

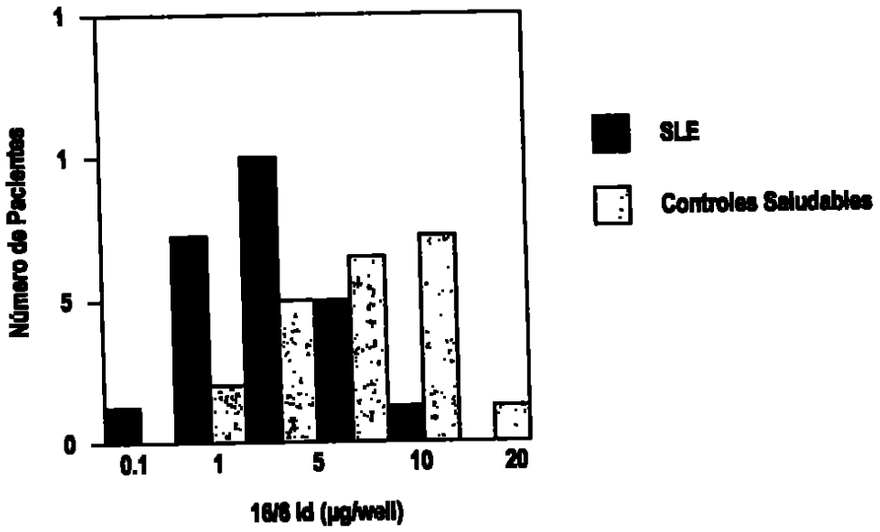


FIGURA 8

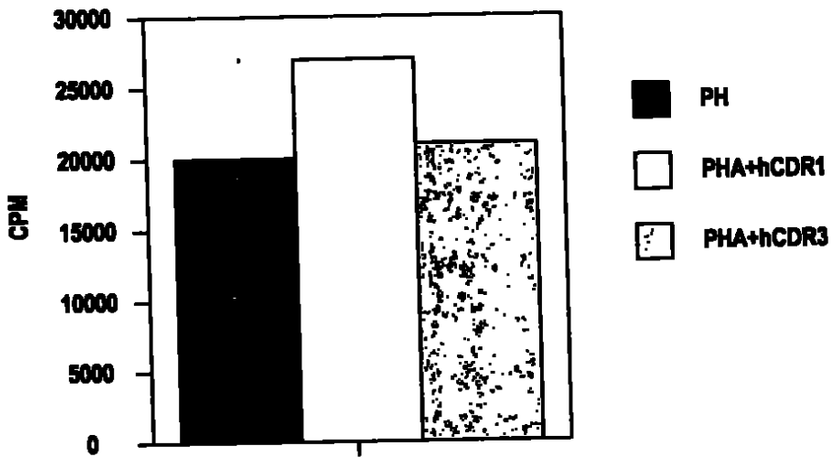


FIGURA 9

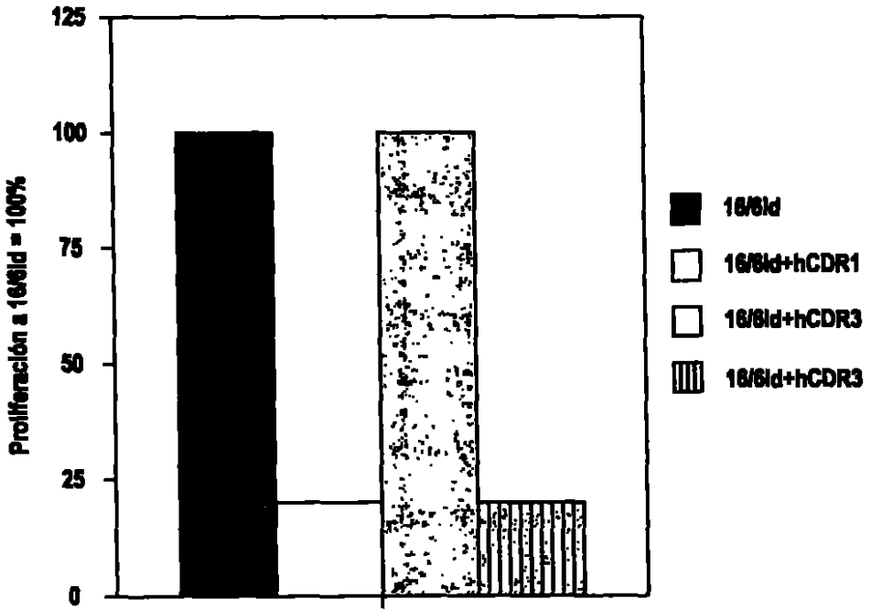


FIGURA 10

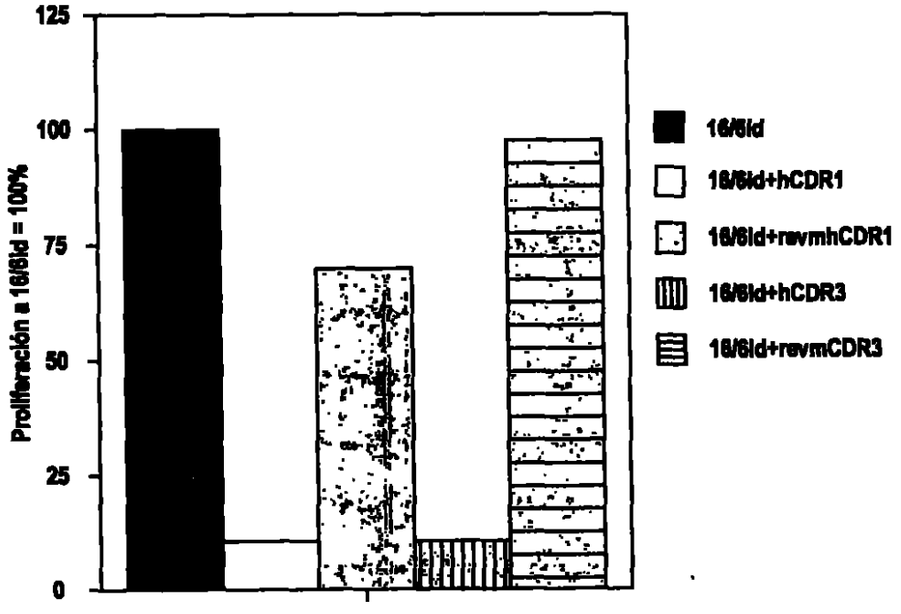


FIGURA 11

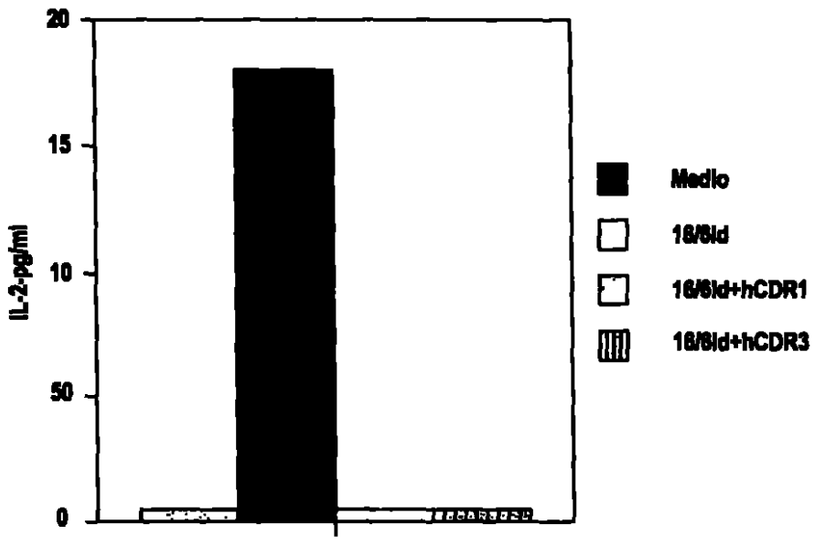


FIGURA 12

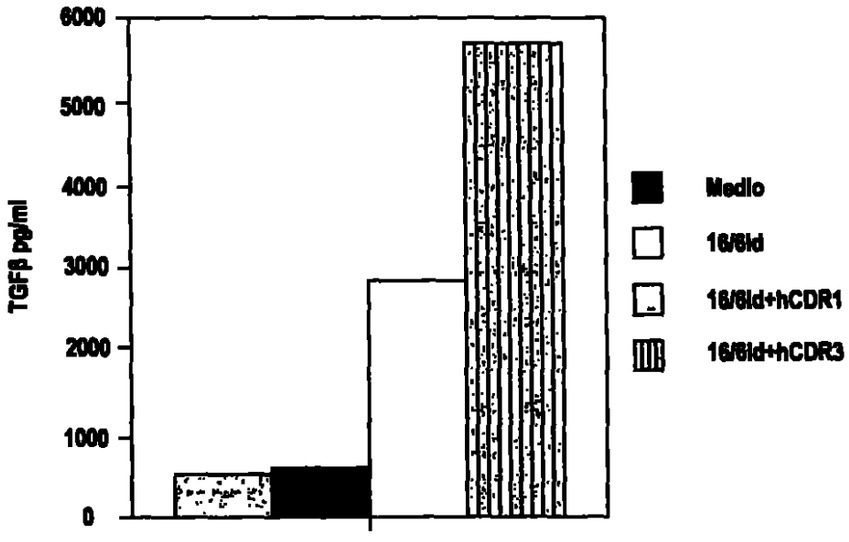


FIGURA 13

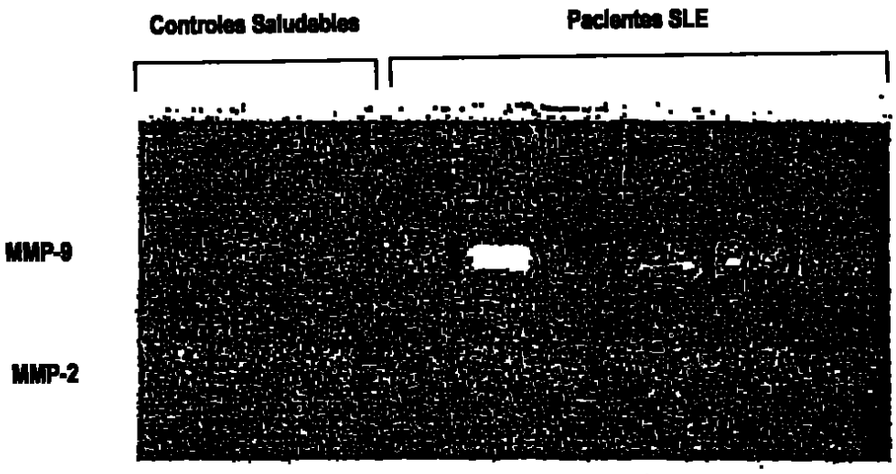


FIGURA 14

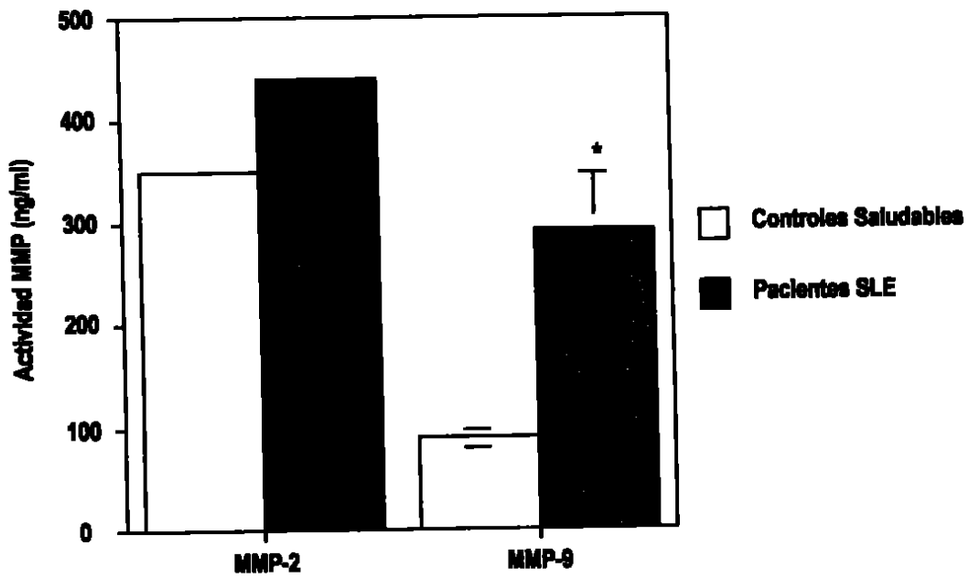


FIGURA 15

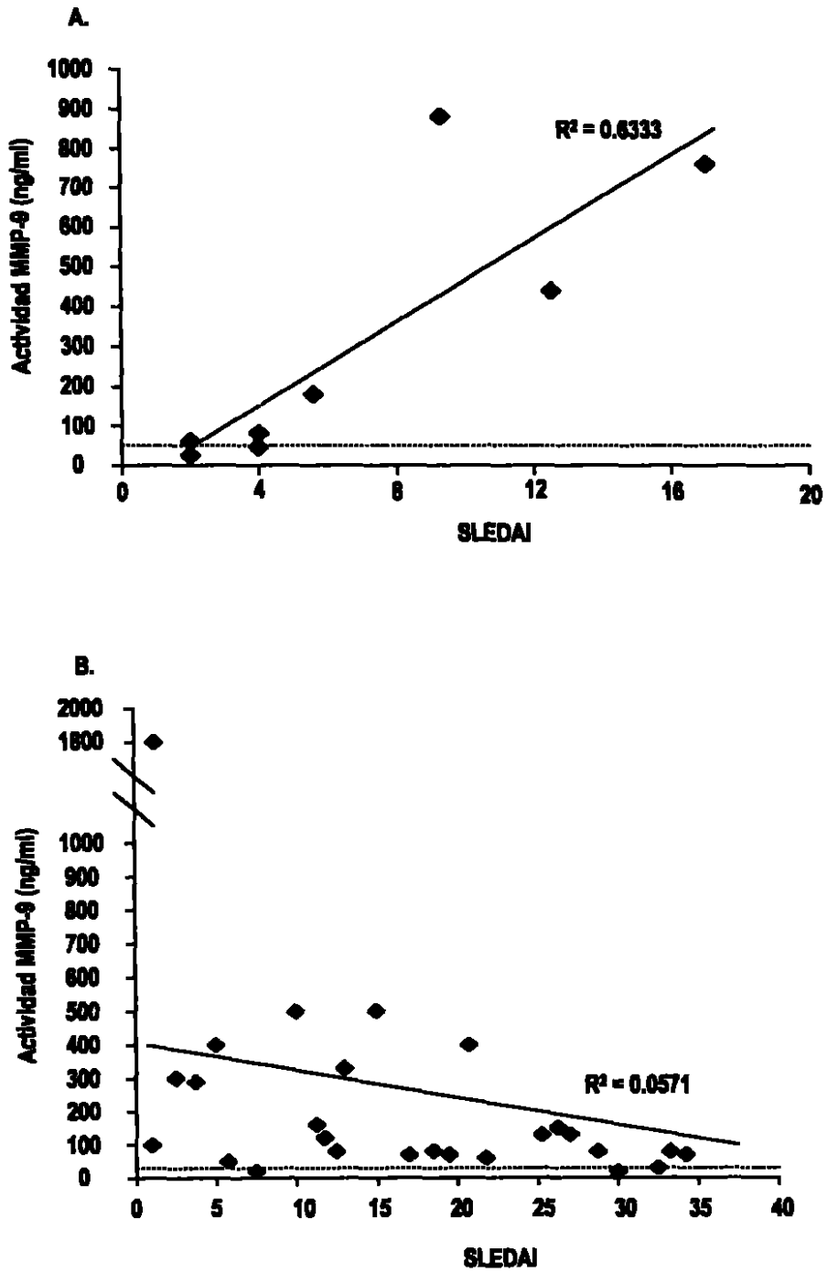

A.
Actividad MMP-9 (ng/ml)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
R² = 0.6333
0
4
8
12
16
20
SLEDAI
B.
Actividad MMP-9 (ng/ml)
2000
1800
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
R² = 0.0571
0
5
10
15
20
25
30
35
40
SLEDAI

FIGURA 16

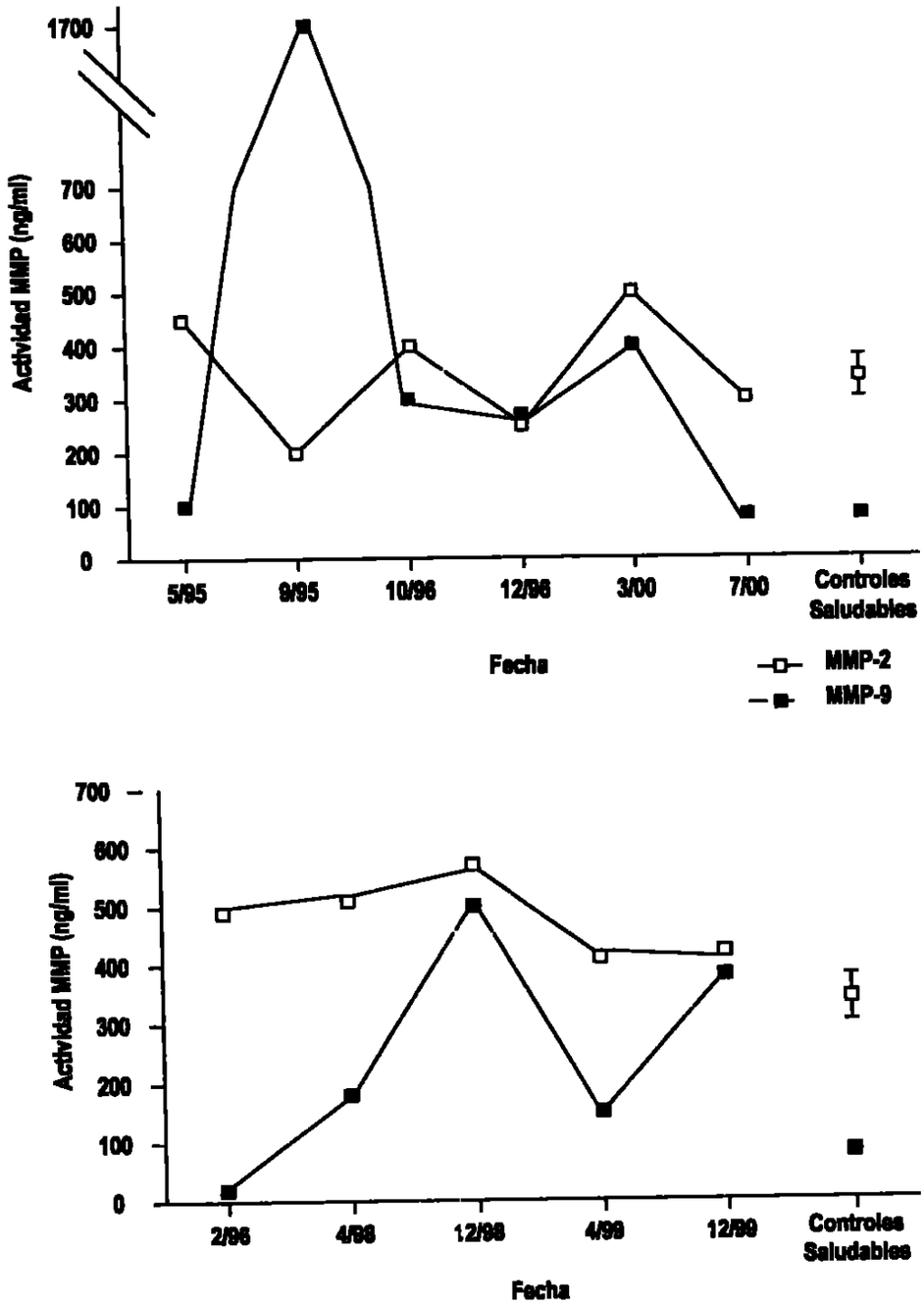

1700
700
600
500
400
300
200
100
0
Actividad MMP (ng/ml)
5/95
9/95
10/96
12/96
3/00
7/00
Controles Saludables
Fecha
MMP-2
MMP-9
700
600
500
400
300
200
100
0
Actividad MMP (ng/ml)
2/96
4/98
12/98
4/99
12/99
Controles Saludables
Fecha

FIGURA 17

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) 68811-A-PCT/JPW/JCC

Box No. I TITLE OF INVENTION PARENTERAL FORMULATIONS OF PEPTIDES FOR THE TREATMENT OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
5 Basel Street
P.O. Box 3190
Petach-Tikva 49131
ISRAEL

Telephone No.: None

Facsimile No.: None

Teleprinter No.: None

Applicant's registration No. with the Office: None

State (that is, country) of nationality: Israel

State (that is, country) of residence: Israel

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☒ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

TEVA PHARMACEUTICALS USA, INC.
1090 Horsham Road
North Wales, PA 19454
United States of America

This person is:
☒ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office:

State (that is, country) of nationality: United States of America

State (that is, country) of residence: United States of America

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☒ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

WHITE, John P.
Cooper & Dunham LLP
1185 Avenue of the Americas
New York, New York 10036
United States of America

Telephone No.: (212) 278-0400

Facsimile No.: (212) 391-0526

Teleprinter No.: None

Agent's registration No. with the Office: 28,678

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

255

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

COHEN-VERED, Sharon
Azar 167
Kfar Saba
ISRAEL

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: Israel

State *(that is, country)* of residence: Israel

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

NAFTALI, Esmira
44/6 He-beiyar St.
Rosh HaAyin 48056
ISRAEL

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: Israel

State *(that is, country)* of residence: Israel

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

WEINSTEIN, Vera
Rambam St., POB 846
Mevaseret Zion 90805
ISRAEL

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: Israel

State *(that is, country)* of residence: Israel

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

GILBERT, Adrian
60B Apt. 5, Hankin Street
Ra'anana 43465
ISRAEL

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: Israel

State *(that is, country)* of residence: Israel

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

286

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

KLINGER, Ety
Agadati Street, 16
Tel Aviv 39930
ISRAEL

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: Israel

State *(that is, country)* of residence: Israel

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

287
257

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No...." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:*

   (i) If more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;

   (ii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;

   (iii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;

   (iv) If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;

   (v) If, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.

2. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other parent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(iii) and 49bis.1(a) or (b)).*

3. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis.1(d)).*

Continuation on Box No. II:

TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD: AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LI, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, SZ, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW (i.e. All States Except US and BB)

Continuation of Box No. III:

TEVA PHARMACEUTICALS USA, INC.: BB

US United States of America (continuation-in-part)
US: 60/439,918
filed: 14 January 2003 (14.01.03)

259

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection

☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection

☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
Item (1) (14.01.03) 14 January 2003	60/439,918	US		
Item (2)				
Item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* identified above as:

☐ all items ☒ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

* *Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):* ....

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used)*:

ISA / US

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)*:

Date *(day/month/year)* Number Country *(or regional Office)*

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)*:		Number of declarations
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

259

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) In paper form, the following number of sheets:

request (including declaration sheets)	:	9
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	:	104
claims	:	14
abstract	:	1
drawings	:	13
Sub-total number of sheets	:	141
sequence listing	:	0
tables related thereto	:	0
(for back, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)		
Total number of sheets	:	141

(b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the
- ☐ sequence listing: .....
- ☐ tables related thereto: .....

(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*: — Number of items

1. ☒ fee calculation sheet : 1
2. ☐ original separate power of attorney :
3. ☐ original general power of attorney :
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: ..... :
5. ☐ statement explaining lack of signature :
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): ..... :
7. ☐ translation of international application into *(language)*: ..... :
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :
9. ☐ sequence listing in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*
   - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) :
   - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter :
   - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column :
10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing *(indicate type and number of carriers)*
    - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application) :
    - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater) :
    - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column :
11. ☒ other *(specify)*: Express Mail Certificate of Mailing dated: Jan. 142004. bearing Express Mail Label No.EV305641715US

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

NAME: Yehudah Livneh DATE: 22/2/04 NAME: Irit Pinchasi DATE

TITLE: Manager, Patents Department TITLE: Vice President, R&D

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:
2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /
6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

260

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) In paper form, the following number of sheets:

request (including declaration sheets)	:	9
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	:	104
claims	:	14
abstract	:	1
drawings	:	13
Sub-total number of sheets	:	141
sequence listing	:	0
tables related thereto	:	0
(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)		
Total number of sheets	:	141

(b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the:
- ☐ sequence listing: .....
- ☐ tables related thereto: .....

(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*: — Number of items

1. ☒ fee calculation sheet : 1
2. ☐ original separate power of attorney :
3. ☐ original general power of attorney :
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: ..... :
5. ☐ statement explaining lack of signature :
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): ..... :
7. ☐ translation of international application into (language): ..... :
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :
9. ☐ sequence listing in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*
   - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) :
   - (ii) ☐ *(only where check-box 8(i) or 9(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter :
   - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column :
10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing *(indicate type and number of carriers)*
    - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application) :
    - (ii) ☐ *(only where check-box 8(ii) or 9(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater) :
    - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column :
11. ☒ other *(specify)*: Express Mail Certificate of Mailing dated: Jan. 14 2004. bearing Express Mail Label No. EV305641715US

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Must be each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

NAME: Yehudah Livneh DATE

TITLE: Manager, Patents Department

NAME: Irit Pinchasi 22/2/04 DATE

TITLE: Vice President, R&D

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:
2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /
6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

261

Box No. IX CHECK LIST NGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) in paper form, the following number of sheets:

request (including declaration sheets)	:	9
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	:	104
claims	:	14
abstract	:	1
drawings	:	13
Sub-total number of sheets	:	141
sequence listing	:	0
tables related thereto	:	0
(for box, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)		
Total number of sheets	:	141

(b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the
- ☐ sequence listing: .....
- ☐ tables related thereto: .....

(additional copies to be indicated under items V(ii) and/or 10(ii), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*: — Number of items

1. ☒ fee calculation sheet : 1
2. ☐ original separate power of attorney :
3. ☐ original general power of attorney :
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: ..... :
5. ☐ statement explaining lack of signature :
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): ..... :
7. ☐ translation of international application into (language): ..... :
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :
9. ☐ sequence listing in computer readable form *(indicate type and number of carrier(s))*
   - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application) :
   - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter* :
   - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column :
10. ☒ tables in computer readable form related to sequence listing *(indicate type and number of carrier(s))*
    - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*) only (and not as part of the international application) :
    - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*) :
    - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column :
11. ☒ other *(specify)*: Express Mail Certificate of Mailing dated: Jan. 14 2004. bearing Express Mail Label No. EV305641715US

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

TEVA PHARMACEUTICALS USA, INC.

NAME: Richard S. Egosi DATE: 1/14/04

TITLE: Vice President and General Counsel

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:
2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /
6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

262

Box No. IX CHECK LIS. ANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) In paper form, the following number of sheets:

request (including declaration sheets)	:	9
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	:	104
claims	:	14
abstract	:	1
drawings	:	13
Sub-total number of sheets	:	141
sequence listing	:	0
tables related thereto	:	0
(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)		
Total number of sheets	:	141

(b) ☐ only in computer readable form* (Section 801(a)(i))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the
- ☐ sequence listing: .....
- ☐ tables related thereto: .....

(additional copies to be indicated under items V(ii) and/or I0(ii), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*: — Number of items

1. ☒ fee calculation sheet : 1
2. ☐ original separate power of attorney :
3. ☐ original general power of attorney :
4. ☒ copy of general power of attorney; reference number, if any: ..... :
5. ☐ statement explaining lack of signature :
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): ..... :
7. ☐ translation of international application into (language): ..... :
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :
9. ☐ sequence listing in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*
   - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application) :
   - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter* :
   - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column :
10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing *(indicate type and number of carriers)*
    - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application) :
    - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater) :
    - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column :
11. ☒ other *(specify)*: Express Mail Certificate of Mailing dated: Jan. 142004, bearing Express Mail Label No. EV305617150S

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Sharon Cohen-Vered	08 Feb 2004	Esmira	08 Feb 04
	DATE	Esmira Naftali	DATE
Vera Weinstein	DATE		

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 14(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

263

Box No. IX CHECK LIST ANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) in paper form, the following number of sheets:

request (including declaration sheets)	:	9
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	:	104
claims	:	14
abstract	:	1
drawings	:	13
Sub-total number of sheets	:	141
sequence listing	:	0
tables related thereto	:	0
(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form: see (c) below)		
Total number of sheets	:	141

(b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the
- ☐ sequence listing: .....
- ☐ tables related thereto: .....

(additional copies to be indicated under item 9(i) and/or 10(i), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*: — Number of items

1. ☒ fee calculation sheet : 1
2. ☐ original separate power of attorney :
3. ☐ original general power of attorney :
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: ..... :
5. ☐ statement explaining lack of signature :
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): ..... :
7. ☐ translation of international application into (language): ..... :
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :
9. ☐ sequence listing in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*
   - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application) :
   - (ii) ☐ *(only where check-box 6(i) or 7(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter* :
   - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column :
10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing *(indicate type and number of carriers)*
    - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application) :
    - (ii) ☐ *(only where check-box 6(i) or 7(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater) :
    - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column :
11. ☒ other *(specify)*: Express Mail Certificate of Mailing dated: Jan. 142004, bearing Express Mail Label No. EV305641715US

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Sharon Cohen-Vered	DATE	Esmira Naftali	DATE
Vera Weinstein	Feb. 5, 2004		
Vera Weinstein	DATE		

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:
2. Drawings:
   - ☐ received:
   - ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /
6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

264

Box No. IX CHECK LIS. .NGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) in paper form, the following number of sheets:

request (including declaration sheets)	:	9
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	:	104
claims	:	14
abstract	:	1
drawings	:	13
Sub-total number of sheets	:	141
sequence listing	:	0
tables related thereto	:	0
(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)		
Total number of sheets	:	141

(b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the
- ☐ sequence listing: .....
- ☐ tables related thereto: .....

(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*:

		Number of items
1. ☒	fee calculation sheet	: 1
2. ☐	original separate power of attorney	:
3. ☐	original general power of attorney	:
4. ☐	copy of general power of attorney; reference number, if any:	:
5. ☐	statement explaining lack of signature	:
6. ☐	priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:
7. ☐	translation of international application into (language):	:
8. ☐	separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:
9. ☐	sequence listing in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*	
(i) ☐	copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application)	:
(ii) ☐	*(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter*	:
(iii) ☐	together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column	:
10. ☒	tables in computer readable form related to sequence listing *(indicate type and number of carriers)*	
(i) ☒	copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*) only (and not as part of the international application)	:
(ii) ☐	*(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*)	:
(iii) ☐	together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:
11. ☒	other *(specify)*: Express Mail Certificate of Mailing dated: Jan. 142004, bearing Express Mail Label No.EV305641715US	

Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Adrian Gilbert	February 9, 2004	Ety Klinger	DATE
	DATE		

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

Box No. IX CHECK LIS. .NGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) in paper form, the following number of sheets:

request (including declaration sheets)	:	9
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	:	104
claims	:	14
abstract	:	1
drawings	:	13
Sub-total number of sheets	:	141
sequence listing	:	0
tables related thereto	:	0
(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)		
Total number of sheets	:	141

(b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the
- ☐ sequence listing: .....
- ☐ tables related thereto: .....

(additional copies to be indicated under items 9(iii) and/or 10(iii), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*: — Number of items

1. ☒ fee calculation sheet : 1
2. ☐ original separate power of attorney :
3. ☐ original general power of attorney :
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: .....
5. ☐ statement explaining lack of signature :
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): .....
7. ☐ translation of international application into *(language)*: .....
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :
9. ☐ sequence listing in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*
   - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application)
   - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter*
   - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column
10. ☒ tables in computer readable form related to sequence listing *(indicate type and number of carriers)*
    - (i) ☒ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*) only (and not as part of the international application)
    - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*)
    - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column
11. ☒ other *(specify)*: Express Mail Certificate of Mailing dated: Jan. 142004, bearing Express Mail Label No.EV3056417150S

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Adrian Gilbert — DATE

Ety Klidger — Feb 8, 2004 — DATE

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:
2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /
6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

266

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05079328 00000000 Folios: 265
Fecha (AMD): 2005-08-10 17:20:45
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO(COPIA)
Radicacion : 05079328 00000000 Folios: 265
Fecha (AMD): 2005-08-10 17:20:45
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 PASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ✓ MODELO DE UTILIDAD ( ) ( )

- 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 solcitante 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:

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

267

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRÍGUEZ D´ALEMAN DILIA MARÍA

REFERENCIA	Radicación No.	5 79328
	Solicitud internacional	US2004/000948
	Fecha inicio fase nacional	14/08/2005
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	9475

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 Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

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 No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 29 OCT. 2015
adpal