

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 464**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2004 PCT/US2004/000948**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.08.2004 WO04064787**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2004 E 04702215 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 1594434**

54 Título: **Formulaciones parenterales de péptidos para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico**

30 Prioridad:

14.01.2003 US 439918 P

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

24.03.2017

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.
(100.0%)
P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**COHEN-VERED, SHARON;
NAFTALI, ESMIRA;
WEINSTEIN, VERA;
GILBERT, ADRIAN y
KLINGER, ETY**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 606 464 T3

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

Formulaciones parenterales de péptidos para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico**Descripción**

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 **[0001]** El lupus eritematoso sistémico (LES), o lupus, es una enfermedad autoinmune debilitante caracterizada por la presencia de un despliegue de autoanticuerpos, incluyendo anticuerpos contra el dsDNA, contra los antígenos nucleares y contra las ribonucleoproteínas. El LES afecta aproximadamente a 1 de cada 2000 individuos (en EEUU 1 de cada 700 mujeres). La enfermedad afecta principalmente a las mujeres jóvenes, con una relación mujer a hombre de aproximadamente 9:1.

15 **[0002]** El lupus sistémico puede afectar casi a cualquier órgano o sistema del cuerpo. El lupus sistémico puede incluir períodos en los cuales pocos síntomas, si los hay, son evidentes ("remisión") y otras veces cuando la enfermedad se hace más activa ("brote"). Más a menudo cuando las personas mencionan el "lupus", se están refiriendo a la forma sistémica de la enfermedad.

20 **[0003]** Los corticosteroides son la piedra angular para tratar los trastornos autoinmunes sistémicos. Las manifestaciones del LES severamente discapacitantes que amenazan la vida son tratadas con altas dosis de glucocorticoides (1-2 mg/kg/día). Los efectos indeseables de los glucocorticoides crónicos incluyen una variedad de efectos adversos prominentes tales como el hábito cushingoides, obesidad central, hipertensión, infección, fragilidad capilar, hirsutismo, osteoporosis acelerada, cataratas, diabetes mellitus, miopatía y psicosis. Además de la toxicidad de los corticosteroides, el cumplimiento del paciente con un régimen de dosificación también representa un serio problema.

25 **[0004]** También se usan agentes citotóxicos para controlar la enfermedad activa, reduciendo la tasa de brotes de la enfermedad y reduciendo los requerimientos de esteroides. Los efectos colaterales indeseables de estos últimos incluyen la depresión de la médula ósea, aumento de las infecciones por organismos oportunistas, insuficiencia ovárica irreversible, alopecia y aumento de riesgo de neoplasias.

30 **[0005]** El LES es una enfermedad inflamatoria para la cual hasta la fecha no hay un tratamiento o cura definitiva. La enfermedad resulta en complicaciones agudas y crónicas. Los únicos tratamientos disponibles son paliativos, con la intención de aliviar los síntomas agudos y prevenir las complicaciones crónicas, a menudo con profundos efectos colaterales. Por tanto existe una necesidad no cubierta en este campo, y tanto los médicos como los pacientes agradecerían nuevos tratamientos que pudieran eliminar potencialmente o reducir las manifestaciones indeseadas de la enfermedad.

35 **[0006]** A pesar de la extensa investigación sobre los mecanismos subyacentes a la inducción del LES, la información sobre la etiología de la enfermedad es muy limitada. Los estudios sobre el LES se han realizado hasta hace poco usando linfocitos de sangre periférica (PBL) de pacientes en diferentes etapas clínicas y bajo varios protocolos de tratamiento. Alternativamente, se investigaron cepas murinas que desarrollan una enfermedad espontánea semejante al LES como un modelo para el LES. Este tipo de análisis condujo a interpretaciones incompletas y confusas del papel de varios factores inmunológicos y no inmunológicos en la inducción o mantenimiento de la enfermedad, principalmente debido a la heterogeneidad de los pacientes por una parte y la incapacidad de controlar la fase de inducción de la enfermedad en las cepas murinas del LES por la otra.

40 **[0007]** Hace varios años se estableció un modelo animal de LES. Este modelo, basado en el concepto de la red idiotípica, desarrolló un amplio espectro de autoanticuerpos relacionados con el lupus y manifestaciones clínicas (Mendlovic, S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2260 (1988)). La inducción fue llevada a cabo por la inmunización de cepas murinas que no desarrollan trastornos autoinmunes espontáneos, con un anticuerpo monoclonal (mAb) humano anti-DNA el cual comparte un idiotipo común denominado 16/6 Id (Shoenfeld, Y. et al., J. Exp. Med. 158: 718 (1983)).

45 **[0008]** El mAb humano 16/6 es un anticuerpo anti-DNA originalmente del isotipo IgM y cambiado en cultivo a IgG1. El mAb se derivó de un paciente y expresa un idiotipo común, el 16/6 Id (Shoenfeld et al., 1983; Mendlovic et al., 1988). Las células de hibridoma que secretan este mAb crecen de rutina en cultivo, y el anticuerpo se aísla a partir de los sobrenadantes del cultivo usando una columna de afinidad de Proteína G acoplada a Sepharose™. El mAb 16/6 humano anti-DNA (IgG1/□) 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).

50 **[0009]** Luego de la inmunización, los ratones produjeron anticuerpos específicos contra el 16/6 Id, anticuerpos que comparten el 16/6 Id y anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos nucleares (dsDNA, ssDNA, Sm, ribonucleoproteína (RNP), Ro, La y otros). Los hallazgos serológicos se asociaron con leucopenia, elevación de la tasa de sedimentación globular, proteinuria, abundancia de complejos inmunes en los riñones y esclerosis de los glomérulos (Mendlovic et al., 1988), las cuales son manifestaciones típicas del LES. Luego se demostró que la enfermedad experimental podía ser inducida por un mAb murino anti-16/6 Id (Mendlovic, S. et al., Eur. J. Immunol.

60

65

19: 729, (1989)) y por el mAb anti-anti 16/6 Id de ratón (16/6 Id+) (Waisman, et al., *Internatl. Immunol.* 5:1293 (1993); Waisman, A. y Mozes, E. *Eur. J. Immunol.* 23: 1566, (1993)). La inducción de la enfermedad está controlada genéticamente, y así depende de la cepa (Mendlovic, S. et al., *Immunology* 69: 228 (1990)). Este modelo único para la inducción del LES experimental proporciona las herramientas apropiadas para diseccionar claramente los diferentes pasos y los parámetros inmunes implicados en la inducción y desarrollo del LES.

[0010] El LES es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por la formación de autoanticuerpos contra los antígenos propios, como el DNA, Sm, Ro, La, RNP, cardiolipina e histonas. La etiología del LES es desconocida, y comprender el mecanismo por el cual surgen estos autoanticuerpos proporcionó información. Se encontró que los autoanticuerpos monoclonales que eran capaces de inducir anticuerpos que comparten el 16/6 Id o reaccionan contra él eran patogénicos y así podían inducir LES experimental (Fricke, H. et al., *Internatl. Immunol.* 2: 225 (1990); Sthoeger, Z.M. et al., *J. Clin. Immunol.* 13: 127 (1993)). Se secuenciaron las regiones variables (V) de nueve autoanticuerpos que se unían al DNA o al extracto nuclear (NE) del HeLa, aislados a partir de los ratones C3H.SW con LES experimental (Waisman and Mozes, 1993). Los anticuerpos monoclonales con diferente especificidad se analizaron con la intención de determinar las conexiones entre los diferentes autoanticuerpos. Se encontró que tres mAb se unían al DNA, y se demostró que exhibían características de secuencia de anticuerpos anti-DNA patógenos. Se demostró que uno de estos mAb, designado 2C4C2, usa un gen (VH) de la región V de la cadena pesada (H) idéntico al VH del mAb anti-DNA aislado de otros ratones propensos al lupus, es decir (NZB xNZW)F₁. El gen (VL) V de la cadena ligera (L) del mAb 2C4C2 es 98% homólogo con el VL de otro mAb anti-DNA, aislado también de ratones (NZB xNZW)F₁. Los otros dos mAb anti-DNA, designados 5G12-4 y 5G12-6, comparten 93% de sus secuencias VH con las del mAb 2C4C2. Seis mAb se unían a proteínas de NE del HeLa. Los nueve mAb usan un total de cinco genes de línea germinal VH y cuatro VL, demostrando que los autoanticuerpos inducidos en los ratones con LES experimental no se originan de un clon de linfocito B. Tres de los nueve VH y VL eran idénticos en secuencia a los genes de línea germinal, mientras que al menos otros tres tenían mutaciones somáticas. Esto último sugiere que estos autoanticuerpos surgen en los ratones por el uso de linfocitos B preexistentes (pre-inmunes), y a través de un proceso anantigénico. Asimismo, parece que los autoanticuerpos encontrados en los ratones con LES experimental usan elementos genéticos similares a los usados por mAb que fueron aislados de cepas murinas que desarrollan lupus espontáneamente.

[0011] Los linfocitos T tienen un importante papel en la inducción y desarrollo del LES experimental. Así, se demostró que las líneas de linfocitos T y los clones específicos del 16/6 Id inducen LES experimental en receptores singénicos similarmente al anticuerpo 16/6. Por tanto, luego de la inoculación de las células activadas de las líneas, los ratones desarrollaron la serología y el daño renal típicos del LES (Fricke, H. et al., *Immunology* 73: 421 (1991)). Asimismo, una línea de linfocito T 16/6 Id específica de origen C3H.SW indujo LES en ratones C57BL/6 que se demostró eran resistentes a la inducción de la enfermedad luego de inyecciones con el mAb 16/6 Id o el anti-16/6Id (Mendlovic et al., 1990).

[0012] En un intento por identificar la región patogénica del 16/6 Id, se prepararon fragmentos (Fab')₂ del mAb 16/6 Id y se encontró que retenían la especificidad y capacidad patogénica de toda la molécula 16/6 Id (Ruiz, P.J. et al., *Immun. Let.* 41: 79 (1994)).

[0013] El mAb 5G12 que se aisló de ratones con LES experimental y se demostró que se une al DNA y comparte el 16/6. Id, es capaz de inducir LES experimental en ratones (Waisman, A. et al., *Internatl. Immunol.* 5:1293 (1993)). Los linfocitos T que reaccionan específicamente al mAb por proliferación, probablemente están reaccionando a péptidos que representan secuencias de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR). Es muy probable que los linfocitos T reconozcan las regiones V de los anticuerpos anteriores debido a que no reaccionan con otros anticuerpos que portan la misma región constante pero tienen diferentes especificidades. Dentro de la región variable, las regiones con la mayor probabilidad de ser reconocidas son las CDR, debido a que esas son las regiones que difieren más entre los anticuerpos. Las regiones CDR de las secuencias VH de los nueve mAb murinos patogénicos mencionados antes que inducen LES en los ratones se enumeran en la Fig. 1 de Waisman y Mozes, 1993, en la cual se presentan las secuencias completas de nucleótidos y deducidas de aminoácidos para la VH de los nueve mAb.

[0014] En modelos del LES experimental -ratones Balb/c y ratones propensos al LES, es decir, ratones (NZBxNZW)F₁- el tratamiento con péptidos basados en mCDR o el Compuesto 1 redujo significativamente los hallazgos relacionados con el LES, notablemente depósitos de complejo inmune (ICD) en el riñón, proteinuria y leucopenia. El tratamiento no tuvo efecto sobre la respuesta de anticuerpo específica de 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): 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).

[0015] CDR1 humano. El compuesto 1 mostrado en la Figura 1 es un péptido sintético de 19 aminoácidos basado en la región 1 determinante de complementaridad (CDR1) del mAb anti-dsDNA 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." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1997), 94(4): 4620-4625).

[0016] WO02/067848 A2 muestra una composición farmacéutica que comprende los péptidos sintéticos de al menos 12 y cuando mucho 30 residuos de aminoácidos, incluyendo los péptidos que tienen las secuencias denotadas por la SEQ ID NO: 6-10, 16, 17, con un portador farmacéuticamente aceptable para administración parenteral. También muestra el uso de ello para tratar el Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

[0017] WO9630057 A1 muestra una composición farmacéutica que comprende los péptidos sintéticos de al menos 12 y cuando mucho 30 residuos de aminoácidos, incluyendo los péptidos que tienen las secuencias denotadas por la SEQ ID NO: 1-5, 11, -15, con un portador farmacéuticamente aceptable para administración parenteral. También muestra el uso de ello para tratar el Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

[0018] Estos péptidos, como muchos péptidos, no son muy solubles. Por tanto, aquí se proporcionan formulaciones que mejoran la solubilidad de los péptidos.

Resumen de la invención

[0019] La invención a registrar proporciona una composición farmacéutica que comprende: un portador acuoso;

de 0.1 mg/ml a 20 mg/ml de la composición de una sal farmacéuticamente aceptable de un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia

- (i) TGYXX₁X₂X₃X₄X₅QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11) donde X₁ es Met, Ala o Val; X₂ es Gln, Asp, Glu o Arg; X₃ es Trp o Ala; X₄ es Val o Ser; y X₅ es Lys, Glu o Ala;
- (ii) EINPSTGGX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂KAKAT (SEQ ID NO:12) donde X₆ y X₇ son cada uno Thr, Val o Ala;
- (iii) X₈ es Tyr o Phe; X₉ es Asn o Asp; X₁₀ es Gln o Glu; X₁₁ es Lys o Glu, y X₁₂ es Phe o Tyr;
- (iv) YYCARX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆PYAX₁₇X₁₈YWGQGS (SEQ ID NO:13) Ser; X₁₅ es Trp o Ala; X₁₆ es Glu o Lys; X₁₇ es Met o Ala, y X₁₈ es Asp, Lys o Ser;
- (v) GYNX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄SHGX₂₅X₂₆LEWIG (SEQ ID NO:14) donde X₁₉ es Met o Ala; X₂₀ es Asn, Asp o Arg; X₂₁ es Trp o Ala; X₂₂ es Val o Ser; X₂₃ es Lys o Glu; X₂₄ es Gln o Ala; X₂₅ es Lys o Glu, y X₂₆ es Ser o Ala;
- (vi) YYCARX₂₇X₂₈X₂₉YGX₃₀X₃₁X₃₂GQTL (SEQ ID NO:15) donde X₂₇ es Ser o Phe; X₂₈ es Gly o Ala; X₂₉ es Arg, Ala o Glu; X₃₀ es Asn o Asp; X₃₁ es Tyr o Phe, y X₃₂ es Trp, His o Ala;
- (vii) X₃₃YYWSWIX₃₄QX₃₅PX₃₆X₃₇GX₃₈EWIG (SEQ ID NO:16) donde X₃₃ es Gly o Thr Gly; X₃₄ es Arg o Lys; X₃₅ es Pro o Ser; X₃₆ es Gly o Glu; X₃₇ es Lys o Asp; y X₃₈ es Glu, Leu o Ser;
- (viii) FSGYYWS (SEQ ID NO:8);
- (ix) EINHSGSTNYKTSLS (SEQ ID NO:9); o
- (x) GLLRGGWNDVDYGGMDV (SEQ ID NO:10),

y una β-ciclodextrina sustituida como un potenciador de solubilidad y, donde tanto el péptido como el potenciador de solubilidad se disuelven en el portador acuoso; y donde la composición tiene un pH entre 4 y 9.

[0020] La invención a registrar también proporciona un método para aliviar los síntomas del lupus eritematoso sistémico (LES) en un ser humano comprendiendo administrar al ser humano cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención en una cantidad efectiva para aliviar los síntomas del LES en el ser humano.

Breve descripción de las figuras

[0021]

Figura 1. CDR1 humano (Compuesto 1) como una sal de acetato -mostrando las fórmulas molecular y estructural 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 solución Captisol® luego que las células fueron activadas posteriormente con una solución del Compuesto 1 en PBS.

-■-Compuesto 1 (RS) 50µg/ratón

- ▲- Compuesto 1 (RS) 200µg/ratón
- DP 50µg/ratón
- Δ- DP 200µg/ratón
- Captisol® ampulizado

5 **Figura 3.** Secreción de IFN-γ a partir de las células tomadas de ratones tratados con solución del Compuesto 1 luego que las células fueron posteriormente activadas con una solución del compuesto 1 en EM-1 (2.5×10^6 células/platillo).

- 10 -□- Placebo
- Compuesto 1 50 µg/ratón (dosis de tratamiento)
- Δ- Compuesto 1 100 µg/ratón (dosis de tratamiento)
- X- Compuesto 1 200 µg/ratón (dosis de tratamiento)

15 **Figura 4.** Secreción de IFN-γ a partir de las células tomadas de ratones tratados con solución del Compuesto 1 luego que las células fueron posteriormente activadas con una solución del compuesto 1 en EM-1 (5×10^6 células/platillo).

- 20 -□- Placebo
- Compuesto 1 25 µg/ratón
- Δ- Compuesto 1 50 µg/ratón
- X- Compuesto 1 100 µg/ratón
- *- Compuesto 1 200 µg/ratón

25 **Figura 5.** Anticuerpos anti-dsDNA en ratones (NZBxNZW)F1 luego de 10 inyecciones con el Compuesto 1 en Captisol® [OD=Densidad Óptica; Compound 1 (C)=Compuesto 1 disuelto en Captisol®]

- 30 -□- Placebo
- Compuesto 1 50 µg/ratón
- Compuesto 1 25 µg/ratón

35 **Figura 6.** Secciones renales de ratones (NZBxNZW)F1 mostrando la intensidad de los depósitos de inmunocomplejos. 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 Compuesto 1 50 µg/ratón y las secciones de la fila inferior son de un ratón tratado con Compuesto 1 25 µg/ratón. *Magnificación:* Izquierda: x100, Derecha: x400. Inmunohistología por FITC.

40 **Figura 7.** Títulos de anticuerpo en el suero de pacientes con SLE y humanos sanos control evaluando en sus sueros la capacidad de unirse a los péptidos Ia, IIa y IIIa, o el mAb 5G12 o un péptido control.

45 **Figura 8.** Concentraciones del mAb humano anti-DNA 16/6 Id requeridas para una estimulación óptima de los PBL de pacientes con SLE y de controles sanos. Los PBL fueron estimulados con varias concentraciones (0.1-40 µg/platillo) del mAb 16/6 Id. La concentración que produjo el mayor índice de estimulación se definió como óptima para inducir una respuesta proliferativa.

50 **Figura 9.** Proliferación de PBL de un paciente con SLE estimulado con la fitohemaglutinina (PHA) mitogénica en ausencia o presencia de hCDR1 o hCDR3.

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

60 **Figura 11.** Proliferación de PBL de un paciente con SLE estimulado con mAb humano 16/6I en ausencia o presencia de los péptidos humanos hCDR1 o hCGR3 o los péptidos murinos invertidos revmCDR1 y revmCDR3.

65 **Figura 12.** Inhibición de la secreción de IL-2 en PBL de pacientes con SLE inducidos por el mAb humano 16/6Id en ausencia o presencia de hCDR1 o hCDR3.

Figura 13. Regulación en más de la secreción de TGF-β en los PBL de un paciente representativo de SLE estimulado con el mAb humano 16/6Id en ausencia o presencia de hCDR1 o hCDR3.

Figura 14. Gel representativo que muestra la actividad de la MMP-2 y MMP-9 en el suero de pacientes con SLE y controles sanos. Se analizaron los sueros (5 µl) de 40 pacientes con SLE y 25 controles sanos buscando la actividad de la MMP-2 o MMP-9 por zimografía en gel. La figura muestra los resultados representativos con muestras de suero de los dos grupos.

Figura 15. Gráfico que muestra el análisis cuantitativo de las actividades de MMP-2 y MMP-9 en el suero de pacientes con SLE (columnas oscuras) y controles sanos (columnas claras). En treinta y tres muestras de suero de

pacientes con SLE y 15 muestras de suero de controles sanos se evaluó la actividad MMP-2 y MMP-9 usando kits de ensayo específicos de actividad. Los resultados se expresan como la media \pm s.e.m. *P = 0.0302.

5 **Figuras 16A-B.** Gráficos que muestran los niveles de actividad de MMP-9 y los índices de actividad de la enfermedad (SLEDAI) en pacientes con SLE. En treinta y tres muestras de suero de 8 pacientes masculinos (Fig. 16A) y 27 pacientes femeninas (Fig. 16B) con SLE se valuó la actividad de MMP-9 con un kit de ensayo específico de la actividad. Se presenta la distribución de la actividad de MMP-9 de acuerdo con el SLEDAI de los pacientes. La línea punteada representa la actividad de MMP-9 en los controles sanos.

10 **Figures 17A-B.** Gráficos que muestran el patrón de actividad de MMP-2 (círculos claros) y MMP-9 (círculos oscuros) en el suero de dos pacientes con SLE con muestras durante 4-6 años de enfermedad. En los sueros se evaluaron las actividades de MMP-2 y MMP-9 con kits de ensayo específicos de actividad. Los ensayos se realizaron por duplicado.

15 Descripción detallada

[0022] La invención a registrar proporciona una composición farmacéutica que comprende:

20 un portador acuoso;
de 0.1 mg/ml a 20 mg/ml de la composición de una sal farmacéuticamente aceptable de un péptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia

- (i) TGYXX₁X₂X₃X₄X₅QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11)
donde X₁ es Met, Ala o Val; X₂ es Gln, Asp, Glu o Arg; X₃ es Trp o Ala; X₄ es Val o Ser; y X₅ es Lys, Glu o Ala;
- 25 (ii) EINPSTGGX₆X₇X₅X₉X₁₀X₁₁X₁₂KAKAT (SEQ ID NO:12) donde X₆ y X₇ son cada uno Thr, Val o Ala; X₈ es Tyr o Phe; X₉ es Asn o Asp; X₁₀ es Gln o Glu; X₁₁ es Lys o Glu, y X₁₂ es Phe o Tyr;
- (iii) YYCARX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆PYAX₁₇X₁₈YWGQGS (SEQ ID NO:13) donde X₁₃ es Phe, Thr o Gly; X₁₄ es Leu, Ala o Ser; X₁₅ es Trp o Ala; X₁₆ es Glu o Lys; X₁₇ es Met o Ala, y X₁₈ es Asp, Lys o Ser;
- 30 (iv) 15 (iv) GYNX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄SHGX₂₅X₂₆LEWIG (SEQ ID NO:14) donde X₁₉ es Met o Ala; X₂₀ es Asn, Asp o Arg; X₂₁ es Trp o Ala; X₂₂ es Val o Ser; X₂₃ es Lys o Glu; X₂₄ es Gln o Ala; X₂₅ es Lys o Glu, y X₂₆ es Ser o Ala;
- (v) YYCARX₂₇X₂₈X₂₉YGX₃₀X₃₁X₃₂GQTL (SEQ ID NO:15) donde X₂₇ es Ser o Phe; X₂₈ es Gly o Ala; X₂₉ es Arg, Ala o Glu; X₃₀ es Asn o Asp; X₃₁ es Tyr o Phe, y X₃₂ es Trp, His o Ala;
- 35 (vi) X₃₃YYWSWIX₃₄QX₃₅PX₃₆X₃₇GX₃₈EWIG (SEQ ID NO:16) donde X₃₃ es Gly o Thr Gly; X₃₄ es Arg o Lys;
- (vii) X₃₅ es Pro o Ser; X₃₆ es Gly o Glu; X₃₇ es Lys o Asp; y X₃₈ es Glu, Leu o Ser;
- (viii) FSGYYWS (SEQ ID NO:8);
- (ix) EINHSGSTNYKTSLKS (SEQ ID NO:9); o
- 40 (x) GLLRGGWNDVDYGGMDV (SEQ ID NO:10),

y una β -ciclodextrina sustituida como un potenciador de solubilidad y, donde tanto el péptido como el potenciador de solubilidad se disuelven en el portador acuoso; y donde la composición tiene un pH entre 4 y 9.

45 **[0023]** En un contexto, al menos 0.5 mg/ml de la composición es la sal farmacéuticamente aceptable del péptido.

[0024] En otro contexto, el péptido tiene una secuencia seleccionada a partir del grupo consistente en:

- 50 NH₂- Thr Gly Tyr Tyr Met Gin Trp Val Lys Gin Ser Pro Glu Lys Ser Leu Glu-Trp Ile Gly-COOH (SEQ ID NO:1); NH₂- 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); NH₂- 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);
- NH₂- Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly-COOH (SEQ ID NO:4); NH₂- Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Arg Tyr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Thr Leu -COOH (SEQ ID NO:5);
- 55 NH₂ - Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly-COOH (SEQ ID NO:6); NH₂- Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser-COOH (SEQ ID NO: 8);
- NH₂- Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Lys Thr Ser Leu Lys Ser-COOH (ID SEQ NO:9); y
- 60 NH₂- Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val-COOH (SEQ ID NO:10).

[0025] En un contexto, el péptido comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia

ES 2 606 464 T3

X₃₃YYWSWIX₃₄QX₃₅PX₃₆X₃₇GX₃₈EWIG (SEQ ID NO:16)

donde X₃₃ es Gly o Thr Gly; X₃₄ es Arg o Lys; X₃₅ es Pro o Ser; X₃₆ es Gly o Glu; X₃₇ es Lys o Asp; y X₃₈ es Glu, Leu o Ser.

5 [0026] En un contexto, la β -ciclodextrina sustituida es una β -ciclodextrina sustituida por hidroxipropil, un éter sulfobutilo o un éter asulfopropil.

[0027] En otro contexto, la β -ciclodextrina sustituida es una β -ciclodextrina sustituida por un éter sulfobutil.

10 [0028] En otro contexto más de cualquiera de las composiciones anteriores, la concentración del péptido en solución es al menos 1 mg/ml.

[0029] En otro contexto, la concentración del péptido en solución es al menos 2.5 mg/ml.

15 [0030] En un contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 0.5 mg/ml y 10 mg/ml.

[0031] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 0.5 mg/ml y 2.5 mg/ml.

[0032] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 2.5 mg/ml y 5 mg/ml.

20 [0033] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 5 mg/ml y 7 mg/ml.

[0034] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 7 mg/ml y 8.5 mg/ml.

25 [0035] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 8.5 mg/ml y 10 mg/ml.

[0036] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 9 mg/ml y 10 mg/ml.

[0037] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 10 mg/ml y 15 mg/ml.

30 [0038] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 15 mg/ml y 20 mg/ml.

[0039] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es 1.0 mg/ml.

35 [0040] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es 2.5 mg/ml.

[0041] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es 5 mg/ml.

[0042] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es 10 mg/ml.

40 [0043] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es 15 mg/ml.

[0044] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 0.1 mg/ml y 0.5 mg/ml.

45 [0045] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 0.1 mg/ml y 0.2 mg/ml.

[0046] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 0.2 mg/ml y 0.3 mg/ml.

[0047] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 0.3 mg/ml y 0.4 mg/ml.

50 [0048] En otro contexto, la concentración de la sal del péptido es entre 0.4 mg/ml y 0.5 mg/ml.

[0049] En otro contexto más, la composición tiene un pH entre 6.5 y 8.5.

55 [0050] En otro contexto más, la composición tiene un pH entre 7.5 y 8.5.

[0051] En otro contexto más, la composición tiene un pH entre 4 y 5.

[0052] En otro contexto más, la composición tiene un pH entre 5 y 6.

60 [0053] En otro contexto más, la composición tiene un pH entre 6 y 7.

[0054] En otro contexto más, la composición tiene un pH entre 7 y 8.

65 [0055] En otro contexto más, la composición tiene un pH entre 8 y 9.

[0056] En otro contexto de cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de acetato.

5 **[0057]** En otro contexto más, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de acetato, y la β -ciclodextrina sustituida es hepta-(sulfobutil éter)- β -ciclodextrina.

10 **[0058]** En otro contexto, la composición comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable en una cantidad y tipo idóneos para hacer que el pH de la composición farmacéutica esté en el rango de 4-9. El amortiguador puede ser amortiguador de acetato, amortiguador de citrato o carbonato de sodio.

15 **[0059]** La invención a registrar también proporciona un método para aliviar los síntomas del lupus eritematoso sistémico (LES) en un ser humano comprendiendo administrar al ser humano cualquiera de las composiciones farmacéuticas en una cantidad efectiva para aliviar los síntomas del SLE en el ser humano.

[0060] La invención a registrar también proporciona cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores para su uso en el tratamiento del SLE en un ser humano.

20 **[0061]** La invención a registrar también proporciona un proceso para elaborar cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores que comprende los pasos de:

- a) preparar una solución de β -ciclodextrina sustituida en un portador acuoso a una concentración predeterminada;
- b) añadiendo una cantidad predeterminada de una sal farmacéuticamente aceptable de un

25 péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia

30 (i) TGYXX₁X₂X₃X₄X₅Q SPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11) donde X₁ es Met, Ala o Val; X₂ es Gln, Asp, Glu o Arg; X₃ es Trp o Ala; X₄ es Val o Ser; y X₅ es Lys, Glu o Ala;

(ii) E1NPSTGGX₆X₇X₉X₁₀X_nX₁₂KAKAT (SEQ ID NO:12) donde X₆ y X₇ son cada uno Thr, Val o Ala; X₈ es Tyr o Phe; X₉ es Asn o Asp; X₁₀ es Gln o Glu; X₁₁ es Lys o Glu, y X₁₂ es Phe o Tyr;

35 (iii) YYCARX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆PYAX₁₇X₁₈YWGQGS (SEQ ID NO:13) donde X₁₃ es Phe, Thr o Gly; X₁₄ es Leu, Ala o Ser; X₁₅ es Trp o Ala; X₁₆ es Glu o Lys; X₁₇ es Met o Ala, y X₁₈ es Asp, Lys o Ser;

(iv) GYNX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄SHGX₂₅X₂₆LEWIG (SEQ ID NO:14) donde X₁₉ es Met o Ala; X₂₀ es Asn,

(v) Asp o Arg; X₂₁ es Trp o Ala; X₂₂ es Val o Ser; X₂₃ es Lys o Glu; X₂₄ es Gln o Ala; X₂₅ es Lys o Glu, y X₂₆ es Ser o Ala;

40 (vi) YYCARX₂₇X₂₈X₂₉YGX₃₀X₃₁X₃₂GQTL (SEQ ID NO:15) donde X₂₇ es Ser o Phe; X₂₈ es Gly o Ala; X₂₉ es Arg, Ala o Glu; X₃₀ es Asn o Asp; X₃₁ es Tyr o Phe, y X₃₂ es Trp, His o Ala;

(vii) X₃₃YYWSWIX₃₄QX₃₅PX₃₆X₃₇GX₃₈EWIG (SEQ ID NO:16) donde X₃₃ es Gly o Thr Gly; X₃₄ es Arg o

45 (viii) Lys; X₃₅ es Pro o Ser; X₃₆ es Gly o Glu; X₃₇ es Lys o Asp; y X₃₈ es Glu, Leu o Ser;

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

(x) EINHSGSTNYKTSLKS (SEQ ID NO:9); o

50 (xi) GLLRGGWNDVDYGGMDV (SEQ ID NO:10),

- c) ajustando el pH de la solución del paso b) hasta que el péptido se disuelve en la solución; y
- d) si es necesario, ajustando el pH de la solución del paso c) a un pH de 4-9, elaborando así la composición farmacéutica.

55 **[0062]** En un contexto, la cantidad predeterminada de péptido es tal que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica de al menos 0.1 mg/ml.

60 **[0063]** En otro contexto, la cantidad predeterminada de péptido es tal que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica de al menos 0.5 mg/ml.

[0064] En otro contexto más, la cantidad predeterminada de péptido es tal que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica de 2.5mg/ml, 2.0mg/ml, 1.0mg/ml, 0.5 mg/ml o 0.1 mg/ml.

65 **[0065]** En otro contexto, la cantidad predeterminada de péptido es tal que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml.

- [0066] En un contexto del proceso, la concentración final resultante de la β -ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica está entre 70 mg/ml y 170 mg/ml.
- 5 [0067] En un contexto del proceso, la concentración predeterminada de la β -ciclodextrina sustituida es tal que resulta en una concentración final de β -ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica entre 80 mg/ml y 170 mg/ml.
- 10 [0068] En un contexto del proceso, la cantidad predeterminada de β -ciclodextrina sustituida es tal que resulta en una concentración final de β -ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica entre 90 mg/ml 20 y 170 mg/ml.
- 15 [0069] En un contexto del proceso, la cantidad predeterminada de β -ciclodextrina sustituida es tal que resulta en una concentración final de β -ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica entre 100 mg/ml y 170 mg/ml.
- [0070] En un contexto del proceso, la concentración predeterminada de la β -ciclodextrina sustituida es tal que resulta en una concentración final de β -ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica entre 110 mg/ml y 170 mg/ml.
- 20 [0071] En un contexto del proceso, la cantidad predeterminada de β -ciclodextrina sustituida es tal que resulta en una concentración final de β -ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica entre 120 mg/ml a 170 mg/ml.
- [0072] En un contexto del proceso, la cantidad predeterminada de β -ciclodextrina sustituida es tal que resulta en una concentración final de β -ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica entre 130 mg/ml to 170 mg/ml.
- 25 [0073] En un contexto del proceso, la cantidad predeterminada de β -ciclodextrina sustituida es tal que resulta en una concentración final de β -ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica entre 140 mg/ml y 170 mg/ml.
- [0074] En un contexto del proceso, la cantidad predeterminada de β -ciclodextrina sustituida es tal que resulta en una concentración final de β -ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica entre 150 mg/ml y 170 mg/ml.
- 30 [0075] En un contexto del proceso, la concentración predeterminada de la β -ciclodextrina sustituida es tal que resulta en una concentración final de β -ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica entre 160 mg/ml y 170 mg/ml.
- 35 [0076] En un contexto del proceso, la cantidad predeterminada de β -ciclodextrina sustituida es tal que resulta en una concentración final de β -ciclodextrina sustituida en la composición farmacéutica es 120 mg/ml.
- [0077] En otro contexto, el paso b) comprende mezclar la solución por 1 hora.
- 40 [0078] En otro contexto, en el paso c) el pH se ajusta usando HCl o NaOH 1.0N.
- [0079] En otro contexto, el proceso comprende filtrar la solución del paso b) a través de un filtro de acetato de celulosa.
- 45 [0080] En otro contexto,
- la cantidad predeterminada de péptido es tal que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica de 2.5mg/ml, 2.0mg/ml, 1.0mg/ml, 0.5 mg/ml o 0.1 mg/ml;
- 50 el paso b) comprende mezclar la solución por 1 hora; y
 en el paso c) el pH se ajusta usando HCl o NaOH 1.0N, comprendiendo filtrar la solución del paso d) a través de un filtro de acetato de celulosa.
- [0081] La invención a registrar también proporciona una composición preparada por cualquiera de los procesos anteriores.
- 55 [0082] La invención a registrar también proporciona una composición farmacéutica liofilizada que comprende entre 0.1 mg/ml a 20 mg/ml de la composición de una sal farmacéuticamente aceptable de un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia
- 60 (i) TGYX₁X₂X₃X₄X₅QSPKSLWIG (SEQ ID NO:11) donde X₁ es Met, Ala o Val; X₂ es Gln, Asp, Glu o Arg; X₃ es Trp o Ala; X₄ es Val o Ser; y X₅ es Lys, Glu o Ala;
- (ii) EINPSTGGX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂KAKAT (SEQ ID NO:12) donde X₆ y X₇ son cada uno Thr, Val o Ala; X₈ es Tyr o Phe; X₉ es Asn o Asp; X₁₀ es Gln o Glu; X₁₁ es Lys o Glu, y X₁₂ es Phe o Tyr;
- 65 (iii) YYCARX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆PYAX₁₇X₁₈YWQQGS (SEQ ID NO:13) donde X₁₃ es Phe, Thr o

Gly; X₁₄ es Leu, Ala o Ser; X₁₅ es Trp o Ala; X₁₆ es Glu o Lys; X₁₇ es Met o Ala, y X₁₈ es Asp, Lys o Ser;

(iv) GYNX₁₉X₂₉X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄SHGX₂₅X₂₆LEWIG (SEQ ID NO:14) donde X₁₉ es Met o Ala; X₂₀ es Asn, Asp o Arg; X₂₁ es Trp o Ala; X₂₂ es Val o Ser; X₂₃ es Lys o Glu; X₂₄ es Gln o Ala; X₂₅ es Lys o Glu, y X₂₆ es Ser o Ala;

(v) YYCARX₂₇X₂₈X₂₉YGX₃₀X₃₁X₃₂GQTL (SEQ ID NO:15) es Arg, Ala o Glu; X₃₀ es Asn o Asp; X₃₁ es Tyr o Phe, y X₃₂ es Trp, His o Ala;

(vi) X₃₃YYWSWIX₃₄QX₃₅PX₃₆X₃₇GX₃₈EWIG (SEQ ID NO:16) donde X₃₃ es Gly o Thr Gly; X₃₄ es Arg o Lys; X₃₅ es Pro o Ser; X₃₆ es Gly o Glu; X₃₇ es Lys o Asp; y X₃₈ es Glu, Leu o Ser;

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

(ix) EINHSGSTNYKTSLS (SEQ ID NO:9); o

(x) GLLRGGWNDVDYGGMDV (SEQ ID NO:10),

y un potenciador de solubilidad siendo una β-ciclodextrina sustituida.

[0083] En un contexto de la composición farmacéutica liofilizada, al menos 0.5 mg/ml de la composición es la sal farmacéuticamente aceptable del péptido.

[0084] La invención a registrar también proporciona un proceso de liofilizar cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores comprendiendo los pasos de:

a) disminuir la temperatura de la composición farmacéutica a -40°C;

b) mantener la temperatura a -40°C por un tiempo predeterminado;

c) elevar la temperatura de la solución a 20°C;

d) mantener la temperatura a 20°C por un tiempo predeterminado; y

e) reducir la presión y mantener la temperatura a 20°C por un tiempo predeterminado, liofilizando así la composición farmacéutica.

[0085] En un contexto, el paso a) se realiza en 2 horas.

[0086] En otro contexto, el paso b) se realiza en 3 horas.

[0087] En otro contexto, el paso c) se realiza en 13 horas.

[0088] En otro contexto, el paso c) se realiza a una presión de 110mbar.

[0089] En otro contexto, el paso d) se realiza en 13 horas.

[0090] En otro contexto, el paso d) se realiza a una presión de 110mbar.

[0091] En otro contexto, en el paso e) la presión se reduce a 10mbar.

[0092] En otro contexto, el paso e) se realiza en 5 horas.

[0093] En otro contexto,

el paso a) se realiza en 2 horas;

el paso b) se realiza en 3 horas;

el paso c) se realiza en 13 horas y a una presión de 110mbar; el paso d) se realiza en 13 horas y a una presión de 110mbar; y

el paso e) se realiza en 5 horas y la presión se reduce a 10mbar.

[0094] La invención a registrar también proporciona una composición farmacéutica liofilizada preparada por cualquiera de los procesos anteriores.

[0095] La invención a registrar también proporciona un proceso para liofilizar cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores que comprende los pasos de:

a) disminuir la temperatura de la composición farmacéutica a -45°C;

b) mantener la temperatura a -45°C por un tiempo predeterminado;

c) elevar la temperatura de la solución a -20°C;

- d) elevar la temperatura de la solución a 25°C; y
- e) mantener la temperatura a 25°C por un tiempo predeterminado, liofilizando así la composición farmacéutica.

[0096] En un contexto, el paso a) se realiza en 6 horas.

[0097] En otro contexto, el paso b) se realiza en 3 horas.

[0098] En otro contexto, el paso c) se realiza en 19 horas.

[0099] En otro contexto, el paso c) se realiza a una presión de 150mbar.

[0100] En otro contexto, el paso d) se realiza en 13 horas.

[0101] En otro contexto, el paso d) se realiza a una presión de 150mbar.

[0102] En otro contexto, el paso e) se realiza en 8 horas.

[0103] En otro contexto, el paso e) se realiza a una presión de 150mbar.

[0104] En otro contexto,

el paso a) se realiza en 6 horas; el paso b) se realiza en 3 horas;
 el paso c) se realiza en 19 horas y a una presión de 150µbar; el paso d) se realiza en 13 horas y a una presión de 150µbar; y el paso e) se realiza en 8 horas y a una presión de 150mbar.

[0105] La invención a registrar también proporciona una composición farmacéutica liofilizada preparada por cualquiera de los procesos anteriores.

[0106] La invención a registrar también proporciona la composición farmacéutica liofilizada donde el contenido de agua de la composición es menor de 5%.

[0107] En un contexto, el contenido de agua de la composición es menor de 4.0%.

[0108] En otro contexto, el contenido de agua de la composición es menor de 3.5%.

[0109] La invención a registrar proporciona una composición farmacéutica empaquetada que comprende:

un material de empaque; y
 una cantidad predeterminada de cualquiera de las composiciones farmacéuticas liofilizadas anteriores.

[0110] En otro contexto, el péptido tiene la fórmula

NH₂-Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly-COOH (ID SEQ NO:6).

[0111] Los péptidos sintéticos de esta invención se basan en la CDR de autoanticuerpos patogénicos monoclonales aislados de ratones con SLE experimental. Estos anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de los sobrenadantes de hibridomas producidos por fusión, por ejemplo, de las células esplénicas de ratones C3H.SW inmunizados con un mAb anti-16/6 Id, con células de plasmacitoma X63.653 (Waisman and Mozes, 1993).

[0112] Ejemplos de tales péptidos son los de las fórmulas Ia a Va aquí, basados, respectivamente en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del mAb 5G12 y las regiones CDR1 y CDR3 de la cadena pesada del mAb 2C4C2 (Waisman y Mozes, 1993), y sus análogos.

[0113] Los péptidos de la presente invención intentan incluir análogos de los péptidos Ia-Va incluyendo análogos de sustitución, deleción y adición como se describe aquí. Los análogos de sustitución tienen sustituciones de aminoácidos en diferentes posiciones, basándose estas sustituciones en el volumen, patrón hidrofóbico-hidrofílico y carga de los aminoácidos.

[0114] Los aminoácidos pueden dividirse a lo largo de las líneas de volumen, patrón hidrofóbico-hidrofílico y carga. Con respecto al volumen, los que tienen un conocimiento en la materia comprenden que los aminoácidos con el mayor volumen son Trp, Tyr, Phe, Arg, Lys, Ile, Leu, Met y His, mientras que los que tienen los menores volúmenes son Gly, Ala, Ser, Asp, Thr y Pro, estando los otros entre ellos.

[0115] Con respecto al patrón hidrofóbico-hidrofílico, es bien conocido que los aminoácidos Gly, Ala, Phe, Val, Leu, Ile, Pro, Met y Trp son hidrofóbicos, mientras que todos los aminoácidos restantes son hidrofílicos. Entre los

aminoácidos hidrofílicos, Ser, Thr, Gln, y Tyr no tienen carga, mientras que Arg, Lys, His y Asn tienen una carga positiva y Asp y Glu tienen cargas negativas.

5 **[0116]** Al seleccionar los péptidos por su potencial al inhibir la respuesta proliferativa de los linfocitos T de los ratones que son altos respondedores a los autoanticuerpos inductores de SLE, es importante que las sustituciones se seleccionen a partir de los que acumulativa mente no cambien de forma sustancial en volumen, patrón hidrofóbico-hidrofílico y carga de la porción correspondiente del péptido parental no sustituido. Así, un residuo hidrofóbico puede ser sustituido por un residuo hidrofílico, o viceversa, en tanto el efecto total no cambie sustancialmente el volumen, patrón hidrofóbico-hidrofílico y carga del péptido parental no sustituido correspondiente.

15 **[0117]** Debe comprenderse que otras modificaciones de los péptidos también están contempladas por la presente invención. Así, el péptido de la presente invención pretende incluir un “derivado químico” el cual retiene al menos una porción de la función del péptido la cual permite su utilidad previniendo o inhibiendo las respuestas proliferativas de los linfocitos T y la enfermedad autoinmune.

20 **[0118]** Un “derivado químico” de un péptido de la presente invención contiene fracciones químicas adicionales que no son normalmente parte del péptido. Las modificaciones covalentes del péptido se incluyen dentro del alcance de esta invención. Tales modificaciones pueden ser introducidas en la molécula al reaccionar los residuos aminoácidos dirigidos del péptido con un agente orgánico que puede reaccionar con las cadenas laterales o residuos terminales seleccionados. Muchos de tales derivados químicos y métodos para hacerlos son conocidos por los expertos en el área.

25 **[0119]** También se incluyen en el alcance de la invención las sales de los péptidos de la invención. Tal como se usa aquí, el término “sales” se refiere tanto a las sales de los grupos carboxilo como a las sales de adición ácida de los grupos amino de la molécula del péptido. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos por los expertos e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sodio, calcio, amonio, sales férricas o de zinc, y semejantes, y las sales con bases orgánicas tales como las formadas por ejemplo, con aminas, como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína, y semejantes. Las sales de adición ácida incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, como por ejemplo ácido acético u oxálico. Tales derivados químicos y sales se usan preferiblemente para modificar las propiedades farmacéuticas del péptido en cuanto a lo que a estabilidad, solubilidad, etc., conciernen.

35 **[0120]** Los péptidos sintéticos y análogos aquí de acuerdo con esta invención pueden seleccionarse a partir del grupo consistente en los péptidos que tienen las secuencias I a V aquí, donde:

(i) el péptido de la secuencia I tiene la fórmula (SEQ ID NO:11):

40 **T G Y Y X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ Q S P E K S L E W I G [I]**

donde X₁ es Met, Ala o Val; X₂ es Gln, Asp, Glu o Arg; X₃ es Trp o Ala; X₄ es Val o Ser; y X₅ es Lys, Glu o Ala. En un contexto, el péptido de la secuencia I tiene la fórmula (Ia)(SEQ ID NO: 1):

45 **TGYMQWVKQ S P E K S L E W I G (Ia)**

(ii) el péptido de la secuencia II tiene la fórmula (SEQ ID NO:12):

50 **E I N P S T G G X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ A₁₁ X₁₂ K A K A T [II]**

donde X₆ y X₇ son cada uno Thr, Val o Ala; X₈ es Tyr o Phe; X₉ es Asn o Asp; X₁₀ es Gln o Glu; X₁₁ es Lys o Glu, y X₁₂ es Phe o Tyr.

En un contexto, el péptido de la secuencia II tiene la fórmula (IIa)(SEQ ID NO:2):

55 **EINPST GGT T YN Q KF KA K A T (IIa)**

(iii) el péptido de la secuencia III tiene la fórmula (SEQ ID NO:13):

60 **Y Y C A R X₁₃ X₁₄ X₁₅ X₁₆ P Y A X₁₇ X₁₈ Y W G Q G S [III]**

donde X₁₃ es Phe, Thr o Gly; X₁₄ es Leu, Ala o Ser; X₁₅ es Trp o Ala; X₁₆ es Glu o Lys; X₁₇ es Met o Ala, y X₁₈ es Asp, Lys o Ser.

En un contexto, el péptido de la secuencia III tiene la fórmula (IIIa)(SEQ ID NO:3):

Y Y C A R X₁₃ X₁₄ X₁₅ X₁₆ P Y A X₁₇ X₁₈ Y W G Q G S [IIIa]

(iv) el péptido de la secuencia IV tiene la fórmula (SEQ ID NO:14):

5 **G Y N X₁₉ X₂₀ X₂₁ X₂₂ X₂₃ X₂₄ S H G X₂₅ X₂₆ L E W I G [IV]**

donde X₁₉ es Met o Ala; X₂₀ es Asn, Asp o Arg; X₂₁ es Trp o Ala; X₂₂ es Val o Ser; X₂₃ es Lys o Glu; X₂₄ es Gln o Ala; X₂₅ es Lys o Glu, y X₂₆ es Ser o Ala.

En un contexto, el péptido de la secuencia IV tiene la fórmula (IVa)(SEQ ID NO:4):

10 **GYNMNWWVKQ S H G K S L E W I G (IVa)**

(v) el péptido de la secuencia V tiene la fórmula (SEQ ID NO:15):

15 **Y Y C A R X₂₇ X₂₈ X₂₉ Y G X₃₀ X₃₁ X₃₂ G Q T L [V]**

donde X₂₇ es Ser o Phe; X₂₈ es Gly o Ala; X₂₉ es Arg, Ala o Glu; X₃₀ es Asn o Asp; X₃₁ es Tyr o Phe, y X₃₂ es Trp, His o Ala.

[0121] En un contexto, el péptido de la secuencia V tiene la fórmula (V) (SEQ ID NO:5):

20 **YYCARSGRYG N Y W G Q T L (Va).**

[0122] Los péptidos la a IIIa se basan en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la cadena V_H del mAb5G12 y los péptidos IVa y Va se basan en las regiones CDR1 y CDR3, respectivamente, de la cadena V_H del mAb 2C4C2 (Waisman and Mozes, 1993).

[0123] Una vez que se produce un péptido de acuerdo con la presente invención, su capacidad para inhibir la respuesta proliferativa de los linfocitos T de los ratones que son altos respondedores a los autoanticuerpos inductores de SLE puede ser determinada fácilmente por los expertos en la materia sin la experimentación indebida usando pruebas tales como las descritas aquí. Una prueba que puede conducirse fácilmente es la capacidad de los péptidos sustituidos de inhibir *in vitro* las respuestas proliferativas de ciertas líneas de linfocitos T y clones específicos de autoanticuerpos inductores de SLE. Las líneas de linfocitos T y clones pueden, por ejemplo, ser las líneas de linfocitos T y clones específicos del mAb 16/6 Id (Fricke et al., 1991) establecidos a partir de células de ganglios linfáticos inmunizados de ratones por la metodología previamente descrita (Axelrod, O. and Mozes, E.

[0124] Immunobiology 172: 99 (1986)). Las células son expuestas al anticuerpo estimulante presentado sobre células esplénicas singénicas irradiadas en presencia de medio enriquecido cada dos semanas. Las líneas de linfocitos T son clonadas por la técnica estándar de dilución limitante. Las respuestas proliferativas de estas líneas de linfocitos T y clones se evalúan, por ejemplo, por el método descrito en Materiales y Métodos aquí.

[0125] Otra prueba que puede conducirse para seleccionar los péptidos que tienen la actividad deseada es evaluar la capacidad de los péptidos sustituidos de inhibir la capacidad de las líneas de linfocitos T y clones de proporcionar ayuda a linfocitos B específicos del péptido en presencia del péptido parental. En los péptidos sustituidos también puede evaluarse su capacidad de unirse directamente, luego de biotinilación, a productos de la Clase II del MMC sobre células presentadoras de antígenos de las cepas relevantes. Para este propósito, se realiza la biotinilación N-terminal de los péptidos relevantes a 0°C con un exceso de biotin-N-hidroxisuccinimida en solución acuosa (Mozes, E. et al., EMBO J. 8: 4049 (1989)). Células adherentes esplénicas murinas o células adherentes a linfocitos de sangre periférica humana (PBL) (1x10⁶/muestra) se incuban con péptidos biotinilados en PBS que contiene 0.1% albúmina sérica bovina (PBS/BSA) a 37°C por 20 h, seguido por incubación con ficoeritrina-estreptavidina por 30 min a 4°C. Luego de cada incubación, las células son enjuagadas dos veces con la solución anterior. Luego de ello, las células son analizadas por citometría de flujo usando FACScan. En cada análisis se examina un mínimo de 5000 células (para los procedimientos anteriores ver, por ejemplo, Mozes et al., 1989; Zisman et al., 1991).

[0126] Otra prueba que puede conducirse es evaluar la capacidad de los péptidos de inhibir la secreción de citoquinas por la línea de linfocitos T o por los linfocitos T de ratones que son altos respondedores a los autoanticuerpos inductores de SLE. Las citoquinas se detectan como sigue: La actividad IL-1 se evalúa por ELISA usando un par de anticuerpos de captura y detección (como se describe más adelante para IL-4, IL-6, IL-10) o usando el ensayo LBRM-33(1A5) (Conlon, P.J. J. Immune. 134:1280 (1983)) en el cual se estimulan células 1A5 en presencia de fitohemaglutinina (PHA), con sobrenadantes o IL-1 recombinante a varias concentraciones para secretar IL-2. Luego de una incubación toda la noche, los sobrenadantes de las células 1A5 se transfieren a la línea de linfocito T citotóxico dependiente de IL-2 (CTLL). La estimulación de la línea CTLL por la IL-2 se mide luego de 24 h por incorporación de ³[H]-timidina. La IL-2 se detecta directamente usando la línea CTLL dependiente de IL-2 o por ELISA. Los niveles de IL-4, IL-6, IL-10, INFγ y TNFα en los sobrenadantes se determinan por ELISA usando

anticuerpos contra las citoquinas (Pharming, San Diego, Ca., USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 **[0127]** Los péptidos que resultan positivos en una o más de estas pruebas *in vitro* proporcionarán una expectativa razonable de actividad *in vivo*. Sin embargo, también pueden conducirse pruebas *in vivo* sin la experimentación indebida. Así, por ejemplo, pueden inyectarse ratones adultos con el péptido candidato el día -3 o el día 0. Los ratones son inmunizados luego con el autoanticuerpo inductor de la enfermedad o con el péptido. Diez días después, se evalúa en las células de los ganglios linfáticos de los ratones su capacidad de proliferar al inmunógeno para encontrar la capacidad inhibitoria del péptido candidato.

10 **[0128]** Otra prueba animal *in vivo* consiste en medir la actividad terapéutica directamente en el modelo murino *in vivo* para la producción de SLE como se describe antes. Los péptidos pueden inyectarse en los ratones en los cuales se induce el SLE experimental por diferentes rutas a diferentes dosis y a diferentes esquemas de tiempo. Para determinar los parámetros farmacocinéticos de los péptidos, incluyendo el volumen de distribución, captación en las células presentadoras de antígenos y depuración, pueden usarse derivados biotinilados de los péptidos. La concentración de la fracción soluble de los péptidos en los fluidos corporales puede determinarse por ELISA usando bandejas cubiertas con avidina y anticuerpos anti-péptidos específicos. Los péptidos unidos a células pueden analizarse por FACS, usando avidina o estreptavidina fluorocromoconjugada. Asimismo, los ratones tratados pueden ser evaluados periódicamente para determinar el efecto de los péptidos sobre las respuestas del autoanticuerpo y sobre las manifestaciones de la enfermedad inducidas en los ratones por el autoanticuerpo inductor de SLE.

15 **[0129]** Otro procedimiento *in vivo* consiste en tolerizar ratones neonatos con el péptido candidato seguido por inmunización de los ratones con el autoanticuerpo patogénico, como 16/6 Id+, o con el mismo péptido, y luego de las manifestaciones de la enfermedad, como los hallazgos serológicos asociados con leucopenia, tasa de sedimentación globular elevada, proteinuria, abundancia de inmunocomplejos en los riñones y esclerosis de los glomérulos. Puede verse así que, además de los contextos preferidos que han demostrado ser operables en los ejemplos aquí, los expertos en la materia podrán determinar péptidos adicionales que también serán operables siguiendo las guías presentadas aquí sin experimentación exagerada.

20 **[0130]** También puede conducirse una prueba relativamente simple *in vitro* para evaluar la eficacia terapéutica esperada de cualquier péptido sustituido dado sobre cualquier paciente dado con SLE. Para evaluar la meta final de producir péptidos que se unan con alta afinidad a las moléculas apropiadas de Clase II del MHC pero que no conduzcan a la activación posterior de los linfocitos T y por tanto tengan un efecto terapéutico sobre los pacientes con SLE, puede evaluarse en los péptidos, luego de su biotinilación, su capacidad de unirse directamente a productos de Clase II del HL sobre células presentadoras de antígenos en los linfocitos de sangre periférica de los pacientes con SLE. Pueden usarse donantes control sanos y péptidos control en tales ensayos para verificar su especificidad.

25 **[0131]** En un contexto, el agente terapéutico de la invención es un péptido seleccionado a partir del grupo de péptidos de las fórmulas I a V aquí, incluyendo péptidos la a Va y la sustitución y/o delección de sus análogos.

30 **[0132]** En otro contexto, el agente terapéutico de acuerdo con la presente invención es la forma de un solo péptido multiépítopes. Así, en un contexto preferido, péptidos duales consistentes en dos péptidos diferentes seleccionados a partir del grupo de péptidos de las fórmulas I-V aquí, se unen de forma covalente entre sí, por un grupo corto de residuos de alanina o por un sitio putativo para la proteólisis por cathepsina. Ver, por ejemplo, la Patente U.S. 5,126,249 y la Patente Europea 495,049 con respecto a tales sitios. Esto inducirá la proteólisis específica del sitio de la forma preferida en los dos análogos deseados. Alternativamente, algunos de los mismos péptidos o diferentes péptidos de la presente invención pueden formarse en un polímero peptídico, tal como, por ejemplo, la polimerización de los péptidos con un agente de polimerización idóneo, como 0.1% glutaraldehído (Audibert et al. (1981), Nature 289:593). El polímero preferiblemente contendrá de 5 a 20 residuos peptídicos. Tales polímeros peptídicos también pueden formarse con enlaces cruzados de los péptidos o uniendo múltiples péptidos a portadores macromoleculares. Los portadores macromoleculares idóneos son, por ejemplo, proteínas tales como el toxoide tetánico, y copolímeros lineales o ramificados de aminoácidos, tales como un 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 poli-DLalanina multicadena (M. Sela et al. 1955, J. Am. Chem. Soc. 77:6175). Los conjugados se obtienen, por ejemplo, acoplado primero el péptido con una carbodiimida hidrosoluble, como clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida, y luego realizando la conjugación con el portador macromolecular como describen Muller, G.M. et al. (1982) Proc. Natl.Acad. Sci. USA 79:569. Los contenidos del péptido acoplado en cada conjugado se determinan por análisis de aminoácidos, en comparación con la composición del portador solamente.

35 **[0133]** De acuerdo con un contexto de la presente invención, uno o más péptidos activos pueden unirse a un portador macromolecular idóneo o pueden polimerizarse en presencia de glutaraldehído.

[0134] Los péptidos, polímeros o sus conjugados con portadores macromoleculares idóneos, se le administrarán a los pacientes en una forma que asegure su biodisponibilidad, haciéndolos idóneos para tratamiento. Si se encuentra que más de un péptido tiene actividad inhibitoria significativa, estos péptidos se administrarán a los pacientes en una formulación que contenga una mezcla de los péptidos.

5 **[0135]** La invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un péptido sintético de acuerdo con la invención, un conjugado con un portador macromolecular idóneo o un polímero opcionalmente con un portador farmacéuticamente aceptable.

10 **[0136]** Cualquier ruta idónea de administración es incluida por la invención, incluyendo la vía oral, intravenosa, subcutánea, intrarticular, intramuscular, inhalatoria, intranasal, intratecal, intraperitoneal, intradérmica, trasdérmica u otras vías conocidas, incluyendo la vía enteral.

15 **[0137]** Los rangos de dosis para la administración de las composiciones de la presente invención deben ser lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado, donde, por ejemplo, una respuesta inmune al autoanticuerpo inductor de SLE, medida por la proliferación de linfocitos T in vitro, es sustancialmente prevenida o inhibida, y donde la enfermedad se trate significativamente.

20 **[0138]** Las dosis no deben ser tan grandes como para causar efectos colaterales adversos, tales como reacciones cruzadas indeseadas, inmunosupresión generalizada, reacciones anafilácticas, etc.

25 **[0139]** Las dosis efectivas de los péptidos de esta invención para su uso tratando el SLE están en el rango de 1 µg/kg a 1 mg/kg peso corporal. La dosis administrada dependerá de la edad, sexo, estatura y peso del receptor, tipo de tratamiento concomitante, si lo hay, frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

30 **[0140]** Los péptidos sintéticos de la invención, particularmente los de las secuencias I a V aquí, pretenden inhibir o suprimir respuestas antigénicas específicas de los pacientes con SLE, sin afectar las otras respuestas inmunes. Este abordaje es de la mayor importancia debido a que muchos pacientes diagnosticados son mujeres jóvenes que deben ser tratadas por muchos años y el tratamiento actualmente aceptado para el SLE implica la administración de inmunosupresores, tales como corticosteroides y/o citotóxicos, que son inespecíficos y tienen múltiples efectos colaterales adversos.

35 **[0141]** Las preparaciones de la presente invención pueden administrarse por vía parenteral, tópica o rectal. Se administran por formas idóneas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran por inyección, inhalación, ungüento, supositorio, etc. administración por inyección, infusión o inhalación; tópico por loción o ungüento; y rectal por supositorios.

40 **[0142]** Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tales como se usan aquí significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección e infusión intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, trastraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intramedular e intrasternal.

45 **[0143]** Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" tal como se usan aquí significan la administración de un compuesto, medicamentos u otro material distinto al sistema nervioso central, de forma que entra al sistema del paciente, y así se somete al metabolismo y otros procesos semejantes, por ejemplo, la administración subcutánea.

50 **[0144]** Los detalles de los procedimientos de formulación general y la información sobre los excipientes adicionales pueden encontrarse en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition.

[0145] Los péptidos sintéticos pueden producirse como se describe en PCT International Publication No. WO 02/067848, o en PCT International Publication No. WO 96/30057.

55 **[0146]** Esta invención se comprenderá mejor a partir de los Detalles Experimentales a continuación. Sin embargo, un experto en la materia apreciará fácilmente que los métodos y resultados discutidos son simplemente ilustrativos de la invención tal como se describen más completamente en las declaraciones que siguen luego.

Detalles experimentales

60 **[0147]** La síntesis de los péptidos I a V y las pruebas que muestran la efectividad de los péptidos sintetizados para tratar el SLE en modelos en animales se describen en PCT International Publication No. WO 96/30057. Las pruebas adicionales en animales se describen en PCT International Publication No. WO 02/067848.

Ejemplo 1: Desarrollo de la formulación para el Compuesto 1

65

[0148] Los péptidos de la aplicación a registrar se describen en PCT International Publication No. WO 02/067848, publicada el 6 de setiembre de 2002, y pueden prepararse por métodos conocidos por los expertos en la materia, (ver, por ejemplo, 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).

[0149] El Compuesto 1 es un polipéptido sintético compuesto por 19 aminoácidos. Se proporciona como una sal de acetato. Se ha determinado que la solubilidad acuosa del péptido es menor de 0.5 mg/ml. La Figura 1 muestra el compuesto 1 como una sal de acetato.

[0150] Para desarrollar una formulación con una concentración de péptido que exceda 2 mg/ml preferiblemente hasta 10 mg/ml se realizaron experimentos con varios potenciadores de solubilidad. Los experimentos preliminares indicaron que no puede conseguirse fácilmente una concentración de 2 mg/ml. Para desarrollar una formulación para inyección subcutánea, también es deseable que el pH esté en el rango de 4 a 9 y que la solución sea isosmótica.

[0151] Luego de una extensa búsqueda en la literatura, se adoptaron algunos abordajes principales para producir una formulación con máxima solubilidad. Los factores considerados fueron:

- ajuste de pH y amortiguadores

- Solventes

- Cosolventes

- Agentes solubilizantes

Métodos

[0152] El compuesto 1 se disolvió en la solución potenciadora de solubilidad escogida separadamente o combinada con otros excipientes y las soluciones se agitaron al menos por una hora. El pH se ajustó si era necesario. Las soluciones se examinaron visualmente para estimar la solubilidad y se enviaron a la determinación analítica del ensayo. Para algunas formulaciones escogidas, también se evaluó la actividad biológica.

Resultados

[0153] La tabla 1 presenta el tipo de potenciadores de solubilidad usados para el desarrollo de la formulación. Las tablas 2 y 3 resumen los experimentos que se realizaron con los potenciadores de solubilidad. La tabla 2 resume la evaluación inicial realizada con concentraciones de péptido en el rango de 5 a 10 mg/ml. El trabajo experimental que se realizó con una mayor concentración de péptido se repitió luego con las dosis menores (ver tabla 3).

[0154] Las pruebas iniciales indicaban que el compuesto 1 era más soluble en los límites de los niveles deseados de pH, tanto ácidos como alcalinos, pero era menos estable en el rango alcalino de pH. Así, se evaluaron varios amortiguadores y agentes de ajuste de pH, incluyendo el amortiguador de acetato, amortiguador de citrato y carbonato de sodio. Ninguno de los amortiguadores inicialmente evaluados alcanzó el nivel deseado de solubilidad del péptido.

[0155] Solo se observaron los niveles de solubilidad de 2 mg/ml por encima de pH 9.2 y por debajo de pH 3.0. No obstante, en la etapa inicial, se seleccionaron las formulaciones con amortiguador de acetato y amortiguador de citrato (con manitol como agente de tonicidad) para los estudios iniciales de toxicología. Se evaluó la actividad biológica de estas formulaciones y resultaron activas

[0156] Se evaluaron solventes no acuosos (ver tabla 1) tales como etanol, glicerina, propilenglicol, cremóforo y sus combinaciones pero no aumentaron la solubilidad del Compuesto 1. Una solución de 30% DMA (dimetilacetamida) produjo una solubilidad en los rangos deseados (5 a 9 mg/ml), pero no era idónea para una formulación farmacéutica debido a su perfil de toxicidad. También se observó una mayor solubilidad usando 30% (p/p) PEG 400 (5 a 9 mg/ml). Esta última formulación se escogió para los estudios de toxicología, pero resultó ser inactiva en el ensayo biológico, y puede haber sido la causa de algunos efectos adversos o en un estudio de toxicidad en el ratón. Así, se decidió no continuar evaluando esta formulación. En vista de los experimentos preliminares no se usaron solventes no acuosos en las formulaciones a registrar.

[0157] Se evaluaron varios aminoácidos (ver tabla 1) incluyendo L-arginina, ácido L-glutámico, L-glicina y L-lisina para mejorar la solubilidad de la proteína. La solubilidad del péptido en L-arginina estaba al nivel deseado pero el pH resultante estaba por encima de 9. Un intento por disminuir el pH o usar una sal HCl de arginina resultó en la precipitación del péptido. También se evaluó la albúmina sérica humana y mejoró la solubilidad del péptido a

concentraciones bajas del péptido (1 mg/ml) (ver tabla 3). Sin embargo, debido a su inmunogenicidad potencial y la baja solubilidad del péptido, no se utilizó en experimentos posteriores.

[0158] Se evaluaron agentes espesantes (ver tabla 1) incluyendo manitol, sorbitol y dextrano solos y combinados con otros excipientes, pero no mejoraron la solubilidad del péptido en solución.

[0159] Se evaluaron cosolventes (ver tabla 1) incluyendo polisorbato 20 y polisorbato 80 solos y combinados con otros excipientes. Aunque concentraciones menores de polisorbatos (hasta 6%) no mejoraron la solubilidad del péptido, concentraciones mayores (hasta 10% - ver tabla 2) mejoraron la solubilidad del péptido hasta 2 mg/ml. Sin embargo, tales concentraciones altas de los polisorbatos no se consideraron idóneas para las formulaciones farmacéuticas.

[0160] También se evaluaron dos tipos de ciclodextrinas, ambas aprobadas para su uso en productos parenterales comercializados: Hidroxipropil- β -ciclodextrina y Sulfobutiléter- β -ciclodextrina (Captisol). Ambas aumentaron notablemente la solubilidad del péptido (concentraciones en los niveles de 10 mg/ml para Hidroxipropil- β -ciclodextrina y 2.5 para Captisol). Se evaluó la actividad biológica de las dos formulaciones de ciclodextrina y se encontró que era igual a la actividad del péptido solo.

[0161] CAPTISOL® es un derivado de β -ciclodextrina polianiónica comercial con una sal de sulfonato de sodio separada de la cavidad hidrofóbica por un grupo espaciador butil éter, o sulfobutiléter (SBE). CAPTISOL® es el nombre comercial para la preparación sulfobutiléter β -ciclodextrina hepta-sustituida (SBE7- β -CD) de CyDex Inc. (www.captisol.com). La estructura de CAPTISOL® permite que las moléculas del medicamento se ajusten en la cavidad hidrofóbica, aislando así la molécula del medicamento del solvente acuoso. Debido a que la superficie exterior de CAPTISOL® es hidrofílica, la solubilidad de la molécula del medicamento en el complejo aumenta de esta forma. El uso de ciclodextrinas para aumentar la solubilidad de las moléculas de medicamentos se muestra en la Patente U.S. Nos. 5,134,127 y 5,376,645.

[0162] De acuerdo con la literatura de CyDex Inc., CAPTISOL® es seguro cuando se administra por vía parenteral y no exhibe la nefrotoxicidad asociada con la beta-ciclodextrina. En relación con la beta-ciclodextrina, CAPTISOL® proporciona características comparables o mayores de complejación y superior solubilidad en agua en exceso de 90 gramos/100 ml - una mejoría de 50 veces.

Conclusiones

[0163] Se encontró que varios potenciadores de solubilidad alcanzaban el rango de solubilidad deseado: 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 potenciadores de solubilidad ambas ciclodextrinas han resultado ser superiores con respecto a la solubilidad, actividad biológica y estabilidad. Así, se decidió seleccionar Captisol® como el potenciador de solubilidad para su uso en las formulaciones del Ejemplo 5 y estudiar ambas formulaciones de ciclodextrina. La formulación final para los estudios clínicos del Ejemplo 5 consiste en: 120 mg/ml de Captisol en agua con la cantidad deseada de péptido (0.5, 1.0 o 2.5 mg/ml), y HCl y NaOH para ajuste del pH.

Tabla 1: Potenciadores de solubilidad usados para el desarrollo de la formulación del Compuesto 1

Clasificación del potenciador de solubilidad	Potenciadores de solubilidad
Solventes	Cremóforo EL, CMC Etanol, DMA, Glicerina, Propilenglicol, PEG 400, Monotioglicerol
Cosolventes	Polisorbato 20, polisorbato 80
Agentes solubilizantes	Arginina, HSA, Glicina, Creatinina, ácido Glutámico, Lisina (sal de acetato y base libre), Captisol, Hidroxipropil- β -ciclodextrina,
Agentes espesantes	Manitol, Sorbitol, Dextrosa, Lactosa Dextrano
Agentes de ajuste de pH	Amortiguador de citrato, amortiguador de acetato, carbonato de sodio

Tabla 2. Lista de cosolventes y estabilizadores evaluados en las formulaciones de péptidos del Compuesto 1.

	Potenciador de solubilidad *	% Usado	% de la cantidad estándar a partir de la literatura	Cantidad de péptido añadido (mg/ml)	Ensayo, %	pH de la formulación	Notas
5							
10	Albúmina (HSA), Dextrosa	1.5 1.5	0.4-5.0	5		6.0 Ajustar, a 4.1	Insoluble
15	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 clara
20	Arginina HCl	2.0	0.8-1.6	5	-	3.5	Insoluble
25	Arginina Lactosa	1.5 1.5	0.8-1.6	15	93	9.8	Quando el pH se disminuyó por debajo péptido precipitó y la solución se convirtió en gel
30	Captisol	10.0 20.0	Hasta 30.0	10	86 89	4.9 Ajustar, a 4.4	Solución turbia
35	CMC (carboximetilcelulosa) en acetato	0.2 0.05M		5	90	5.0	Para los estudios toxicológicos
40	Creatinina	0.8	Hasta 0.6	5	-	6.1 Ajuste a 4.1	Insoluble
	Cremóforo EL Etanol Dimetilacetamida	15.0 10.0 6.0	-10.0 0.6-32.9 0.012-6.0	5	-	4.0	Muy turbio
45	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

50

55

60

65

ES 2 606 464 T3

	Solubilidad Potenciador*	% Usado	% de Estándar cantidad	Cantidad de péptido agregado (mg/ml)	Ensayo, %	pH de formulación	Notas
5							
	Dimetilacetamida (DMA)	25.0	0.012-6.0	5	87	5.1	Solución clara
10	Dimetilacetamida (DMA)	30.0	0.012-6.0	10	93	5.1	Solución clara
	Etanol	10.0	0.6-32.9	5	-	-	Insoluble
15	Ácido glutámico	2.0	precipitó	5	-	3.7	Quando el pH se elevó por encima de 4 el péptido precipitó y la solución se convirtió en gel
20	Glicerina	1.5	1.6-32.5	5	37	4.5	Insoluble
	Glicerina	30.0	1.6-32.5	5	-	3.7	Insoluble
25	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
30	Hidroxipropil β-ciclodextrinas	20.0	Hasta 30.0	10	99	4.6	Solución clara
	Sal de acetato de lisina	2.0		5	-	3.8	Insoluble
35	Base libre de lisina	2.0		5	-	9.2	Quando el pH se elevó por encima de 8 el péptido precipitó y la solución se convirtió en gel
40							
	Manitol en citrato amortiguador	4.0 0.035M	2.0-10.0	5	38	3.4	Para los estudios
45	Manitol en amortiguador de acetato	4.0 0.05M	2.0-10.0	5	32	4.3	Para los estudios toxicológicos
	Manitol, Glicina	20.0 0.4	2.0-10.0 0.2-2.1	5	14	6.4 Ajustar, a 4.5	Insoluble
50	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

55

60

ES 2 606 464 T3

	PEG 400	30.0	Hasta 30.0	5	88	4.2	Ligeramente opalescente
5	Potenciador de solubilidad *	% Usado	% de Estándar cantidad a partir de literatura	Cantidad de péptido agregad (mg/ml)	Ensayo, %	pH de formulación	Notas
	PEG 400	30.0	Hasta 30.0	10	89	4.2	Solución turbia
10	PEG 400	30.0	Hasta 30.0	5	94	4.2	Solución clara

15	Potenciador de solubilidad *	% Usado	% de la cantidad estándar a partir de la	Cantida d de péptido añadido (mg/ml)	Ensayo, %	pH de la formulación	Notas
	con DMA	6.0	0.012-0.6				
20	PEG 400	10.0	6.0-18.0	5	58	4.2	Insoluble
	PEG 400 DMA	10.0 10.0	Hasta 30.0 0.012-0.6	5	-	4.3	Insoluble
25	PEG 400 Propilenglicol PG	10.0 10.0	Hasta 30.0 10.0	5	-	4.1	Insoluble
	PEG 400 Propilenglicol	18.0 50.0	Hasta 30.0 10.0	5	100	4.2	Solución clara
30	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
35	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
40	Carbonato de sodio	1.5		5	-	11.4	Cuando el pH se elevó por encima de 8.5 el péptido precipitó y la solución se convirtió en gel
45	Sorbitol	5.0	10.0-25.0	5	-	6.9 Ajustar, a 4.5	Solución turbia

50

Tabla 3: Formulaciones del Compuesto 1 a bajas concentraciones de péptidos

5	Potenciador de solubilidad *	% Usado	% de la cantidad estándar a partir de la	Cantidad de péptido añadido (mg/ml)	Ensayo, %	pH de la formulación	Notas
10	Albúmina (HSA),	5.0	0.4-5.0	1.0	90	6.9	Solución clara
				2.5	-	Ajustar, a 4.5	Solución turbia
15	Arginina	1.5	0.8-1.6	1.0	24	10.6	Cuando el pH se elevó por encima de 8.5 el péptido precipitó y la solución se convirtió en gel
20	Captisol	12.0	Hasta 30.0	1.0	106	5.3	Solución clara
25	Potenciador de solubilidad *	% Usado	% de la cantidad estándar a partir de la	Cantidad de péptido añadido (mg/ml)	Ensayo, %	pH de la formulación	Notas
30	Dextrano	20.0	3.0-30.0	1.0	69	4.8	Solución turbia
						Ajustar, a 4.0	
30	Glicerina	30.0	1.6-32.5	1.0	-	4.8	Solución turbia
						Ajustar, a 4.0	
35	Manitol	4.0	0.8-4.0	1.0	64	4.7	Solución turbia
						Ajustar, a 4.0	
40	Polisorbato 20	10.0	-	1.0	95	5.8	Solución clara
				2.5	88	Ajustar, a 4.8	Claro con una pequeña cantidad de
45	Polisorbato 20	10.0	-	2.5	115	5.1	Solución clara
	Manitol	2.0	2.0-10.0			Ajustar, a 4.3	
50	Polisorbato 80	4.0	0.8-4.0	1.0	91	5.5	Solución clara
		6.0-10.0		2.5	89	Ajustar, a 5.0	Solución ligerament
55	Polisorbato 80	4.0	0.8-4.0	2.5	88	5.1	Solución ligerament e turbia
	Manitol	2.0	2.0-10.0			Ajustar, a 4.4	
60	Propilenglicol PG	10.0	10.0	1.0	78	5.0	Solución turbia
						Ajustar, a 4.4	
	Sorbitol	20.0	10.0-25	1.0	52	4.5	Solución turbia

Ejemplo 2: Protocolo de preparación para la solución del Compuesto 1 en Captisol®

[0164] Los métodos de disolución estándar, tales como mezclar Compuesto 1 seco y Captisol® seco en agua o añadir el Compuesto 1 a una solución preparada de Captisol® y agua no resultaron en la disolución completa a las concentraciones deseadas. Se evaluaron varias concentraciones diferentes de Compuesto 1 y Captisol® a varios niveles de pH. Sin embargo, el siguiente método para producir una solución de Compuesto 1 en Captisol® resultó en la disolución completa a las concentraciones deseadas.

Materiales: Captisol®, Compuesto 1 y agua

[0165] 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 y mezclar 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 o 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 clara (en la formulación de 2.0 mg/ml podría ser necesario elevar el pH ligeramente por encima de 9). El pH debe ajustarse usando HCl 1.0 N y NaOH 1.0 N. Mezclar por 10 minutos.
6. Corregir el pH al rango de 7.5 a 8.5 si es necesario (usando HCl o NaOH 1.0 N).
7. Agregar agua al volumen final.
8. Filtrar la solución a través de un filtro de 0.2m de acetato de celulosa.
9. Registrar el pH final.
10. Dispensar en alícuotas y almacenar a la temperatura apropiada.

Ejemplo 3: Liofilización de la solución de Compuesto 1 y Captisol®

[0166] El presente proceso de liofilización difiere de otros procesos de liofilización en que el porcentaje de sólidos en la formulación es alto (12%) mientras que los productos liofilizados normalmente contienen entre 5 a 10% de sólidos.

Equipo

[0167] El liofilizador usado fue un liofilizador Edwards Lyoflex 0.6. Se realizó y chequeó el cumplimiento del IQ/OQ del equipo por aseguramiento de calidad antes del desarrollo del proceso.

[0168] Se prepararon soluciones del Compuesto 1 y Captisol® a concentraciones de 0.5 mg/ml, 1.0mg/ml y 2.5mg/ml del Compuesto 1. El volumen de llenado se ajustó 1 ml (1.05 gr).

Pasos principales del proceso:

[0169]

1. Congelamiento
2. Control (a bajas temperaturas)
3. Secado al vacío en dos etapas:
 - 3.1. Secado primario - calentando la paleta a una temperatura control superior, controlando la temperatura de la paleta al nivel superior de control.
 - 3.2. Secado secundario - Reducción de presión a un valor mínimo a la temperatura control superior de la paleta.

Lotes 1-3

ES 2 606 464 T3

[0170] Congelamiento - El congelamiento fue desde temperatura ambiente a -40°C en 2 horas. Las bandejas se mantuvieron a -40°C por 3 horas.

5 [0171] Secado - El secado se realizó a una presión de 110 mbar. La temperatura de la paleta se aumentó a 20°C por 13 horas y se mantuvo a esa temperatura por 13 horas más.

[0172] El tiempo del proceso total fue 31 horas.

Resultados:

10

[0173] Los resultados del contenido de agua fueron:

Lote no. 1: 3.8%
Lote no. 2: 4.0% y
Lote no. 3: 4.9%

15

Lotes 4 y 5

20 [0174] Debido a que los resultados del contenido de agua de los procesos que conducen a los lotes 1, 2 y 3 fueron mayores que el valor deseado, se decidió agregar un paso de secado secundario a la misma temperatura y a presión baja.

[0175] Secado - El secado se realizó a una presión de 110 mbar. La temperatura de la paleta se aumentó a 20°C por 13 horas y se mantuvo a esa temperatura por 13 horas más (Lote 4) u 8 horas (Lote 5). La presión se disminuyó a 10mbar por 5 horas más.

25

[0176] El tiempo del proceso total fue 36 horas.

Resultados:

30 [0177] Los resultados del contenido de agua fueron

Lote 4: Placebo: 3.0%,
1 mg/ml: 3.9%.

35

Lote 5: Placebo: 4.1%

Conclusiones

40 [0178] Como se muestra, se desarrolló un proceso satisfactorio de liofilización para el Compuesto 1 con Captisol®. Debido al alto porcentaje de sólidos y de aquí la torta condensada, el proceso desarrollado es más largo que los ciclos de liofilización actualmente disponibles para los péptidos y exhibe una etapa de secado secundario adicional. La tabla 4 resume el proceso desarrollado.

Tabla 4

45

Paso	Compuesto 1 (Péptido) con Captisol®
Carga	5°C
Congelamiento	2 horas a -40°C
Mantener a temp	3 horas a -40°C
Secado primario:	13 horas presión 110 μbar
Calentar a	13 horas presión 110 μbar
Secado secundario:	5 horas presión 10 μbar
Almacenamiento a	-20°C
Tiempo de proceso	36 horas

50

55

60

65

Secreción IL-2 de ratones tratados con Compuesto 1 (DP) luego de activación in vitro con RS del Compuesto 1 (pg/ml)

Grupo		Tratados con:									
Activador	Concentración del activador (pg/ml)	F	A	B	C	D	F	A	B	C	D
		12% captisol® Ampulizado	Compd. 1 RS 50 µg/ratón	Compd. 1 RS 200 µg/ratón	DP 50 µg/ratón	DP 200 µg/ratón	% inhib.	% inhib.	% inhib.	% inhib.	% 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	BQL	6	6	51	NA	61	6	62
Compd. 1 RS	5	20	9	8	10	7	55	60	48	10	63
Compd. 1 RS	10	25	16	11	13	8	38	58	48	13	67
Compd. 1 RS	25	29	15	11	16	13	48	63	45	16	56
Compd. 1 RS	50	40	21	15	20	12	47	62	50	20	69
Compd. 1 RS	100	42	25	18	24	15	41	58	43	24	64
	Inhibición promedio (%) (al rango de 5-100 µg/ml)						45.6	60.4	46.8		63.7
	BQL = por debajo del límite de cuantificación NA = no aplica Las filas 1-4 no se incluyen en la curva										

Ejemplo 5: Evaluación de la dosis óptima para tratamiento

[0181] Las siguientes abreviaturas se usan en la siguiente descripción:

- 5 CFA Coadyuvante completo de Freund Con A Concanavalina A
- DP Producto farmacológico
- DS Sustancia farmacológica
- EM-1 Medio enriquecido DCCM-1
- EM-3 Medio enriquecido de RPMI-1640 + suero fetal de becerro
- 10 FCS Suero fetal de becerro
- IFN-γ Interferón-gamma
- LN Ganglio linfático
- PBS Solución fisiológica amortiguada con fosfato
- RS Estándar de referencia
- 15 s.c. Subcutáneo
- TB Azul tripán
- TGF-β Factor beta de crecimiento trasformante
- WFI Agua para inyección

20 Introducción

[0182] Un grupo de 20 ratones fueron inmunizados con 50 µg/ratón de RS del Compuesto 1. Los ratones inmunizados fueron asignados a cinco grupos de tratamiento como sigue: placebo, 25, 50, 100 y 200µg/ratón de DP del Compuesto 1 (administración subcutánea). Diez días post inmunización y tratamiento, se extrajo el ganglio linfático y se preparó una suspensión de una sola célula. Luego se midió la secreción *in-vitro* de IFN-γ y TGF-β por las células cultivadas en respuesta a la activación con varias concentraciones de la RS del Compuesto 1.

Diseño experimental

30 **[0183]**

- 1. Inmunización -Día 0
- 2. Tratamiento con el DP del Compuesto 1 -Día 0
- 3. Activación in vitro de células del LN de ratones tratados -Día 10
- 35 4. Recolección de medios de cultivo (para la determinación de IFN-γ) -Día 12
- 5. Recolección de medios de cultivo (para la determinación de TGF-β) -Día 13
- 6. ELISA para IFN-γ
- 7. ELISA para TGF-β

Tabla 7: Grupos experimentales

Exp. Grupo	Tratamiento		Activación in vitro	
	Artículo	Ratones/grupo	Células/pla-tillo	Concentración de RS del Compuesto 1
A1	Control 12% Captisol®	4	2.5 3 10 ⁶	RS del Compuesto 1 0-100 µg/ml
			5 3 10 ⁶	
A2	25 5 µg/ratón	4	2.5 3 10 ⁶	
			5 3 10 ⁶	
A3	50 µg/ratón	4	2.5 3 10 ⁶	
			5 3 10 ⁶	
A4	100 µg/ratón	4	2.5 3 10 ⁶	
			5 3 10 ⁶	
A5	200 µg/ratón	4	2.5 3 10 ⁶	
			5 3 10 ⁶	

Materiales y reactivos

Animales

5

[0184]

10 Ratones: 20 ratones BALB/c hembras, suplidos por el centro de reproducción e animales Harlan, Rehovot. Edad al momento de la inmunización (semanas+días): 10

Peso promedio de ratones incluidos en el experimento: 19.01 gr.

Materiales

15

Reactivos generales

[0185] 70% etanol se preparó a partir de 96% etanol diluyendo con H₂O purificada.

20

Preparación de soluciones de Compuesto 1 para inmunización

[0186] La emulsión de RS de CFA-Compuesto 1 (500 µg/ml, 50 µg/ratón) se preparó como sigue:

25

1. Se disolvieron 1.874 mg del Compuesto 1 en 1.87 ml de WFI para rendir una solución de 1 mg/ml.
2. La solución se evaluó con una tira indicadora de pH y se encontró que tenía un pH de 5.
3. 1.5 ml de la solución se emulsificaron con 1.5 ml CFA resultando en una concentración final de 500 µg/ml.

30

Preparación de soluciones para tratamiento

[0187] El tratamiento fue por una inyección s.c. de 200 µl de solución.

35

Preparación de solución de 12% captisol® [0188]

Se disolvieron 1.2 gr de captisol® en 10 ml de WFI para rendir una solución de 12% captisol®.

Pesado de los ratones para el procedimiento experimental

40

[0189] Los ratones se pesaron antes de la inmunización. Peso promedio de los ratones: 19.01 ± 0.97 gr

Inmunización

45

[0190] La inmunización se realizó inyectando 100 microlitros de la emulsión de inmunización (50 microlitros en cada almohadilla de la pata).

Tratamiento

50

[0191] Luego del paso de inmunización los ratones fueron tratados por inyección s.c. de 200 µl de DP del Compuesto 1 designado o soluciones de tratamiento de 12% captisol®, en la parte trasera de su cuello.

Cultivo in-vitro

55

[0192] Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Los LN se extrajeron de las patas traseras y fueron transferidos a un plato de Petri estéril que contenía unos 5 mL RPMI. Las células se extrajeron apretando suavemente el tejido contra una red de acero inoxidable de 200 micrometros de diámetro. Las células se recolectaron y centrifugaron a 300 G por 10 minutos a RT.

[0193] Las suspensiones de una sola célula se prepararon a partir de LN agrupados de cada grupo experimental.

60

[0194] Las suspensiones de 2.5 y 5.0 millones de células/ml/platillo se cultivaron con el RS del Compuesto 1 (0-100 µg/ml) en EM-1.

[0195] La secreción de IFN-γ y TGF-β, como indicación de respuesta celular, se determinó por ELISA de los medios de cultivo (48h para IFN-γ y 72h para TGF-β).

65

Tabla 8: Los grupos experimentales *in-vitro*

5	Grupo experimental	Tratamiento	Activación in vitro	
		Artículo	Células/platillo	Concentración de la sustancia de activación
10	A1-2.5	Control 12% Captisol®	2.5 x 10 ⁶	RS del Compuesto 1 RS 0; 3.125; 6.25; 12.5; 50 y 100 mg/ml con A 2.5 µg/ml
	A1-5		5 x 10 ⁶	
15	A2-2.5	DP 25 µg/ratón	2.5 x 10 ⁶	
	A2-5		5 x 10 ⁶	
20	A3-2.5	DP 50 µg/ratón	2.5 x 10 ⁶	
	A3-5		5 x 10 ⁶	
25	A4-2.5	DP 100 µg/ratón	2.5 x 10 ⁶	
	A4-5		5 x 10 ⁶	
	A5-2.5	DP 200 µg/ratón	2.5 x 10 ⁶	
	A5-5		5 x 10 ⁶	

Preparación de las suspensiones celulares

[0196]

Tabla 9: Resultados del conteo celular y preparación de las suspensiones de células (10 x 10⁶/ml)

Grp	Vol. (ml)	Factor de Dilución	Células viables	Células muertas	% Células viables	% Células muertas	Promedio de células viables	Total de células viables (x 10 ⁶)	EM-1 a agregar (ml) para suspensión de 10 ³ 10 ⁶ células/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			

Preparación de las suspensiones de células (5 x 10⁶/ml)

[0197] Las suspensiones de 10 x 10⁶ células/ml se diluyeron 1:2 agregando 5 ml EM-1 a 5 ml de suspensión de células.

Incubación de los cultivos de células de LN en bandejas de 48 platillos

[0198] Se prepararon 3 bandejas de cultivo celular. Lo siguiente se agregó a cada bandeja.

Control de fondo (células incubadas con medio de cultivo)

5 [0199] 0.5 ml de suspensión de células

0.5 ml de medio de cultivo (EM-1)

10 Control positivo del sistema (células estimuladas con Con A)

[0200]

15 0.5 ml de suspensión de células
0.5 ml de Con A 5 mg/ml en EM-1 (conc. final 2.5 µg/platillo)

Células incubadas con soluciones de activación del Compuesto 1 (muestras)

20 [0201] 0.5 ml de suspensión de células
0.5 ml de RS del Compuesto 1 6.25 - 200 µg/ml (conc. final 3.125 - 100 µg/ml/platillo)

Incubación de los cultivos de células de LN en bandejas de 96 platillos

25 [0202] Luego que se prepararon las bandejas de 48 platillos, se prepararon bandejas de 96 platillos aplicando 100 µl de la suspensión celular y 100 µl de las soluciones de activación.

[0203] Las bandejas de cultivo se incubaron a 37° C en un incubador humidificado de 5% CO₂, por 48 o 72 h.

Recolección de los sobrenadantes

30 [0204] Las bandejas cultivadas se centrifugaron a 300 g por 10 minutos a RT. Los sobrenadantes (850 µl de cada platillo) se transfirieron a bandejas espejo o a tubos. El sobrenadante se dividió luego en alícuotas de trabajo (dos alícuotas de 200 y una alícuota de 450 µl), para evitar repetir el congelamiento/descongelamiento de las muestras. Cada tubo se etiquetó con los siguientes detalles:

1. Código experimental y tiempo post incubación.
2. Grupo y número de muestra
3. Activador y concentración
4. Fecha de recolección del sobrenadante

[0205] Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta que se usaron para ELISA.

Resultados

[0206]

Tabla 10: Resumen de grupos

Grupos experimentales				
Inmunización		Tratamiento		Activación
Grupos Exp.	Dosis Inuminz.	Sub grupo	Artículo	In-vitro
		A1	12% Captisol®Placebo controle	
		A2	Compuesto 1 25µg/M	Compuesto 1
A	50 µg/ratón	A3	Compuesto 1 50µg/M	RS
		A4	Compuesto 1 100µg/M	3.125-100µg/ml
		A5	Compuesto 1 200µg/M	

Tabla 11-A: Concentraciones finales de citoquina

Citoquina final (pg/ml) (2.5 millones de células/platillo)				
Concentración del Compuesto 1	Placebo	50µg/M	100µg/M	200µg/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 µ/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

Tabla 11-B: Concentraciones finales de citoquina

Citoquina final (pg/ml) (5 millones de células/platillo)					
Concentración del Compuesto 1	Placebo	25µg/M	50µg/M	100µg/M	200µg/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

Citoquina final (pg/ml) (5 millones de células/platillo)					
Concentración del Compuesto 1	Placebo	25µg/M	50µg/M	100µg/M	200µg/M
25 µ/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

[0207] Los resultados también se presentan en las Figuras 3-4.

Observaciones

Secreción de IFN-γ

[0208]

1. En el grupo placebo se demostró una relación dosis respuesta lineal a la activación del Compuesto 1 in vitro. Este gráfico se asemeja al gráfico obtenido para el modelo ex-vivo con la misma dosis de inmunización (50µg/ratón) y medio de cultivo (EM-1).
2. Hubo una relación dosis respuesta a la activación con el Compuesto 1 in vitro dentro de todos los grupos evaluados.
3. Se vio una inhibición significativa de la secreción de IFN-γ con todas las dosis usadas para el tratamiento (un promedio de inhibición del 95% con la dosis tratada de 25µg/ratón). Puede encontrarse una correlación inversa entre la dosis servida para el tratamiento y el % inhibición principalmente cuando se usaron 5x10⁶ células/platillo. Cuando se usaron 2.5x10⁶ células/platillo, el tratamiento de los animales con 50mg/ratón dio una mejor inhibición que 100 o 200µg. El punto de 25µg fue obviado (falta de células).
4. Se vio una mejor inhibición cuando se usaron 5x10⁶ células/platillo en vez de 2.5x10⁶ células/platillo.
5. En el rango lineal de los gráficos, la SD del % de inhibición fue baja.
6. Se aprecia un problema técnico con Con A cuando se usaron 2.5x10⁶ células/platillo.

Secreción de TGF-β

[0209]

5 1. En el grupo placebo no se vio una relación dosis respuesta a la activación in vitro con el compuesto 1. El nivel de TGF-β secretado estuvo por debajo del límite de detección de ELISA en los otros grupos de tratamiento.

10 **Ejemplo 6: Optimizaciones del ciclo de liofilización con el Compuesto 1 y Captisol® para inyección (0, 0.5, 1.0 y 2.5 mg/vial)**

Propósito

15 [0210] El propósito de este estudio era optimizar el ciclo de liofilización para el Compuesto 1 con captisol® para inyección para mejorar la forma de la torta de liofilización y evitar el colapso y ruptura. Así se decidió mejorar y optimizar el ciclo de liofilización. Este ciclo es trasferido a los liofilizadores de producción para la fabricación de los lotes de fase I.

20 Optimización del proceso

[0211] Se prepararon lotes de péptido a concentraciones de 0.5 mg/ml 1.0mg/ml, 2.5mg/ml y Placebo y se realizaron varios ciclos de liofilización. El liofilizador usado fue un liofilizador Edwards Lyoflex 0.6.

25 [0212] Se evaluó la solubilidad, contenido de agua y apariencia de la torta. De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionó un nuevo ciclo de liofilización para el Compuesto 1. Debido al alto porcentaje de sólidos (12%) y de aquí la torta condensada, el nuevo proceso es más largo que el ciclo de liofilización en el Ejemplo 3 y exhibe una etapa de secado primario adicional. La Tabla 12 resume las diferencias entre los procesos.

30 Tabla 12

Paso	Ciclo de liof. para el Compuesto 1 y Captisol® del Ejemplo 3	Nuevo ciclo de liof. para el Compuesto 1 y Captisol® del Ejemplo 3
Carga	5°C	5°C
Congelamiento	2 horas a -40°C	6 horas a -45°C
Mantener a temp baja.	3 horas a -40°C	3 horas a -45°C
Secado primario:	a 20°C	a -20°C
Etapa I	13 horas presión 110mbar	19 horas presión 150mbar
Etapa II	-	a 25°C
Mantener a 20°C (25°C)	13 horas presión 110mbar	13 horas presión 150mbar
Secado secundario:	-	-
Mantener a 20°C	5 horas presión 10mbar	-
Almacenamiento a	5°C	5°C
Tiempo de proceso	36 horas	49 horas

55 **Ejemplo 7: Efecto del Compuesto 1 (administrado en Captisol®) sobre los síntomas del lupus en el ratón (NZ-BxNZW)F1 hembra propenso a SLE**

60 [0213] Los pacientes que participan en los ensayos clínicos van a ser tratados con Compuesto 1 usando Captisol® (sulfobutil éter beta ciclodextrina sódica) como el excipiente. Por esta razón, era importante determinar si el tratamiento de ratones (NZBxNZW)F1 con la formulación del Compuesto 1 en Captisol® tendría los mismos efectos beneficiosos sobre los síntomas del lupus observados cuando esta cepa de ratones era tratada con el Compuesto 1 en PBS.

[0214] Con este fin, se dividieron ratones (NZBxNZW)F1 hembras (cerca de 8 meses de edad) en 3 grupos que fueron tratados por vía subcutánea una vez a la semana con Captisol® solo (n=8) o con 25 o 50 µg/ratón de Compuesto 1 en Captisol® (n=9 y 10, respectivamente). Estas dosis se seleccionaron debido a que estudios previos indicaban que esas dosis en este rango eran más efectivas mejorando los síntomas del SLE que las dosis mayores evaluadas (100 y 200 µg/ratón). El mismo lote de sustancia farmacológica se usó en este estudio y en el primer ensayo clínico de Fase I con el Compuesto 1.

[0215] En los ratones se evaluaron los anticuerpos anti-dsDNA y proteinuria. Cuando los ratones fueron sacrificados, se determinó la intensidad de ICD en los riñones.

[0216] Como puede verse en la Figura 5, no pudieron observarse diferencias significativas entre los grupos en los niveles de anticuerpos dsDNA-específicos luego de 10 inyecciones de tratamiento.

[0217] La tabla 13 también muestra que el efecto beneficioso del tratamiento con el Compuesto 1 pudo observarse comenzando desde la 5ta inyección y se sostuvo hasta la 10ma inyección. Los niveles medios de proteinuria en el grupo control con Captisol® eran consistentemente mayores que en los grupos tratados con el Compuesto 1. La tabla 13 también muestra que se observó una reducción en la intensidad de ICD en los riñones de los grupos con la dosis del Compuesto 1. Hubo una tendencia global demostrando que la dosis menor (25 mg/ratón) era más efectiva que la dosis mayor (50 mg/ratón) reduciendo los síntomas clínicos del SLE en estos ratones.

Tabla 13. Síntomas clínicos del SLE en ratones (NZBxNZW)F1 tratados con 25 o 50 mg/ratón del Compuesto 1 (en Captisol®)

Grupo de estudio	Proteinuria media ± SEM (g/L)				ICDa (Media ± SEM)
	Número de semanas luego de iniciar el tratamiento				
	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)

Grupo de estudio	Proteinuria media ± SEM (g/L)				ICD ^a (Media ± SEM)
	Número de semanas luego de iniciar el tratamiento				
	5	7	8	10	
Compuesto 1 (25 mg/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 ICD=Depósitos de inmunocomplejo. Escala de intensidad de ICD: 0=ninguna; 1=moderada; 2=severa; 3=severa/extremadamente intensa.
 b La muerte de un animal con un alto nivel de proteinuria resultó en una media menor del grupo.
 c p<0.05 (comparado con los ratones control tratados con Captisol®; Mann-Whitney).

[0218] 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 50 mg/ratón de Compuesto 1 y las secciones de la fila inferior son de un ratón tratado con 25 mg/ratón de Compuesto 1. Puede verse que la intensidad de los depósitos de inmunocomplejo observados en las secciones de riñón de los ratones tratados con el Compuesto 1 (disuelto en Captisol®) a cualquier nivel de dosis era mucho menor que la observada en el grupo control.

Ejemplo 8: Estudio Clínico de Fase I

Un estudio de Fase I multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo de dosis única de cuatro brazos para evaluar la tolerabilidad y seguridad de la inyección subcutánea del Compuesto 1 en Captisol® en sujetos con SLE.

[0219] Éste fue el primer estudio clínico con el Compuesto 1 en captisol® en humanos, conducido en Francia. Su objetivo principal era evaluar la tolerabilidad y seguridad del Compuesto 1 en Captisol®, administrado como una sola inyección sc a sujetos con SLE. Su objetivo secundario era evaluar las respuestas inmunológicas luego de una sola dosis sc del Compuesto 1 en captisol® en estos sujetos.

[0220] En el estudio participaron treinta y seis (36) sujetos. Para ser elegibles para la inclusión en el estudio, los pacientes con SLE debían cumplir al menos cuatro criterios usados para el diagnóstico de lupus por el Colegio Estadounidense de Reumatología. Los pacientes también deben haber tenido una enfermedad estable leve/moderada y una puntuación menor o igual a 10 en el Índice de Actividad de la Enfermedad del SLE, SLEDAI.

5 **[0221]** Cada paciente recibió una sola inyección sc de Compuesto 1 reconstituido para inyección o su placebo apareable (Captisol®) de acuerdo con la siguiente asignación al grupo:

1 **Grupo A:** Placebo (Captisol®)

10 1 **Grupo B:** 0.5 mg Compuesto 1 en Captisol®

1 **Grupo C:** 1 mg Compuesto 1 en Captisol®

1 **Grupo D:** 2.5 mg Compuesto 1 en Captisol®

15 **[0222]** Se realizó una batería estándar de pruebas de seguridad, incluyendo la recolección de sangre y orina para pruebas de laboratorio en la visita de pesquisa, durante el día de la dosificación a las 24 horas post-dosis y a las 2,4 y 8 semanas posterior a la dosificación. Antes de la dosificación, y en las visitas de seguimiento programadas, se extrajeron las muestras de sangre para pruebas inmunológicas relacionadas con el SLE, anticuerpos anti-Compuesto 1 y ensayo de proliferación de PBL. Se realizaron las siguientes pruebas inmunológicas:

20 1 Coombs (directa e indirecta)

1 C3, C4 y CH50

1 IgG, IgM e IgA total

1 ANA, anti-dsDNA (ensayo de Farr), anti-ssDNA

1 Anti-ENA (incluyendo anti-La, anti-Ro, anti-RNP, anti-Sm)

25 1 Anticuerpos Anti-cardiolipina

1 VDRL

1 Anticuerpos FTA

1 Factor reumatoideo

30 **[0223]** Se evaluó la seguridad y tolerabilidad del Compuesto 1 en captisol® en la población de registro según los siguientes criterios:

Ocurrencia de AEs, incluyendo brote de SLE

1 Signos vitales

35 1 EKG de 12 derivaciones

1 Cambios en el examen físico

1 Pruebas de laboratorio clínico de rutina

1 Puntuación SLEDAI

1 Resultados de las pruebas inmunológicas

40

Detalles del Estudio Clínico de Fase I

45 **[0224] Investigadores principales del estudio y centros respectivos del estudio:** Seis (6) centros de estudios en Francia: 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).

Compuesto 1 (en captisol®), placebo, ampollas de agua para inyección, dosis y modo de administración:

50 **[0225]** Los viales del Compuesto 1 en Captisol® (120mg/vial) se inyectaron por vía subcutánea como una sola dosis por sujeto en las siguientes dosis:

0.5 mg Compuesto 1/vial en Captisol®, 1mg Compuesto 1/vial en Captisol® y 2.5 mg Compuesto 1/vial en Captisol®.

55

[0226] Placebo para el Compuesto 1: 120 mg Captisol®/vial (idéntico en apariencia a los viales del Compuesto 1 en Captisol®).

Metodología

60

[0227] Éste era un estudio multicéntrico al azar doble ciego controlado con placebo de cuatro brazos, usando una sola inyección subcutánea del Compuesto 1 o placebo. Los pacientes con SLE fueron evaluados hasta 21 días antes de los procedimientos basales. Cada sujeto elegible fue asignado al azar a uno de los 4 grupos de tratamiento: inyección subcutánea de 0.5, 1 o 2.5 mg del Compuesto 1 o su placebo apareable. Todos los sujetos

ingresaron a la clínica el día previo a la dosificación. Cada sujeto recibió una sola dosis de uno de los tratamientos enumerados antes. Los sujetos egresaron de la clínica 24 horas después de la dosificación. Los sujetos fueron

monitorizados a las semanas 2, 4 y 8 luego de la dosificación. Las muestras de sangre (suero y sangre completa) para las pruebas de seguridad en laboratorio se extrajeron en la visita de evaluación, Día de Dosificación (pre-dosis), Día 2 (post dosis), en las Semanas 2, 4 y 8 (visita de culminación). Las muestra de sangre para las pruebas inmunológicas se extrajeron en: Evaluación, Día de dosificación (pre-dosis) y en las Semanas 4 y 8. La proliferación de los linfocitos en sangre periférica (PBL) se evaluó el Día de Dosificación (pre-dosis) y en las Semanas 2, 4 y 8.

Número de sujetos (total y para cada tratamiento):

[0228] Se asignaron al azar a treinta y seis (36) sujetos en este estudio como sigue: 9 sujetos en el grupo de tratamiento de 0.5 mg, 9 sujetos en el grupo de tratamiento de 1 mg, 10 sujetos en el grupo de tratamiento de 2.5 mg y 8 sujetos en el grupo de tratamiento con placebo.

Diagnóstico y criterios principales para inclusión:

[0229] Los sujetos elegibles para este estudio eran pacientes con SLE que cumplían al menos cuatro criterios diagnósticos del Colegio Estadounidense de Reumatología (ACR). Su condición tenía que estar estable, leve a moderada con una puntuación igual o menor a 10 en el índice de actividad de la enfermedad del SLE, actualizado para el año 2000 (SLEDAI 2K).

[0230] Se excluyeron de la participación a los pacientes con SLE que reportaron asma inestable o severa, ictus, infarto miocárdico agudo, angina inestable, hemorragia cerebral y embolismo pulmonar durante los seis meses previos a la evaluación en el estudio. También se excluyeron de su participación en el estudio a los pacientes con SLE que tenían cualquier condición clínicamente significativa o médica o quirúrgica inestables, diabetes mellitus, hepatopatía (cirrosis, hepatitis activa, hipertensión portal y/o ascitis), hipertensión clínicamente significativa, historia médica de cualquier neoplasia, diálisis o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

[0231] También se excluyeron de su participación en el estudio a los pacientes con SLE que eran sometidos a plasmaféresis o eran tratados durante los tres meses previos a la evaluación con uno de los medicamentos enumerados a continuación: prednisona 30 mg/día o más (o una dosis equivalente de otro corticosteroide), corticosteroides intravenosos, inmunoglobulina G (IgG) intravenosa, anticoagulantes orales y cualquier agente citotóxico (p.ej., azatioprina, clorambucil, ciclofosfamida, micofenolato mofetil, metotrexate, tacrolimus).

[0232] Además, se excluyeron del estudio a los pacientes con SLE que iniciaron tratamiento con corticosteroides (más de \pm 10 mg/día prednisona, o una dosis equivalente de otro corticosteroide) y/o antimaláricos, durante los últimos 3 meses previos a la evaluación.

[0233] Aunque se hizo el esfuerzo de retener los tratamientos médicos basales del SLE a lo largo del curso del estudio, los investigadores no obstante podían cambiar el tratamiento médico del participante en cualquier momento durante el estudio para mantener y optimizar el bienestar del paciente.

Criterios para evaluación

Seguridad:

[0234] Los siguientes parámetros de seguridad se evaluaron en la Pesquisa, durante la hospitalización y en las visitas de seguimiento incluyendo la visita de Terminación: signos vitales (presión sistólica, presión diastólica, pulso, saturación de oxígeno, temperatura y peso), EKG de 12 derivaciones, cambio en el examen físico y pruebas de laboratorio de rutina para seguridad. Los eventos adversos se registraron el Día de la dosificación y en cada visita luego de ello.

Inmunología:

[0235] Las pruebas inmunológicas relacionadas con el SLE se realizaron en la visita de Pesquisa, durante la hospitalización y en las visitas de seguimiento incluyendo la visita de Terminación.

[0236] Las respuestas inmunológicas relacionadas con el medicamento fueron seguidas usando el ensayo de proliferación de PBL y ensayo de anticuerpos contra el Compuesto 1 el Día de la dosificación y en las visitas de seguimiento incluyendo la visita de Terminación.

Actividad de la enfermedad:

[0237] La evaluación de la actividad de la enfermedad usando la puntuación del índice de actividad de enfermedad del SLE, actualizado el año 2000 (SLEDAI 2K) se realizó en la visita de Pesquisa, durante la hospitalización y en las visitas de seguimiento incluyendo la visita de Terminación.

5 Métodos estadísticos:

[0238] Se usó el software SAS® versión 9.0 para analizar y presentar los datos recolectados durante este estudio. No se realizaron cálculos de poder y no se condujeron pruebas formales de hipótesis para este estudio de Fase Ia.

10 Experiencias adversas

[0239] La incidencia y frecuencia de experiencias adversas se presentó por Clase de Órgano y Sistema y terminología preferida de acuerdo con el diccionario MedDRA versión 5.0. Los datos se tabulan por grupo de tratamiento.

15 Datos de laboratorio clínico

[0240] Se determinaron las estadísticas descriptivas de los valores de laboratorio incluyendo el número de observaciones, media, desviación estándar, mínimo y máximo para la Pesquisa, Día 1 (pre-dosis), Día 2, Semana 2, 4 y 8 se presentan por grupo de tratamiento. También se presentan los cambios desde la basal a cada punto de tiempo/visita para cada visita por asignación a tratamiento. El porcentaje de resultados anormales (bajos y altos, donde aplique) se presentan sobre una base de parámetro, por grupo de tratamiento y visita/punto de tiempo. Se realizaron análisis de cambio desde la basal a 24 horas post-dosis y desde la basal a la visita de terminación.

25 Signos vitales

[0241] Se determinaron las estadísticas descriptivas para los signos vitales incluyendo el número de observaciones, media, desviación estándar, mediana, valores mínimos y máximos para la Pesquisa, Día 1 (pre y post-dosis, y en cada punto de tiempo), Día 2, Semanas 2, 4 y 8 y se tabulan por el tratamiento asignado. También se presentan los cambios desde la basal a cada punto de tiempo/visita para cada visita por asignación a tratamiento.

Peso

35 **[0242]** Las estadísticas descriptivas de peso (kg) al inicio, terminación y cambio desde la basal se presentan por grupo de tratamiento.

EKG

40 **[0243]** Las estadísticas descriptivas de los parámetros del EKG al inicio, terminación y cambio desde la basal se presentan. El análisis de cambio se presenta como tablas de cambio desde la basal a la terminación entre normal/anormal o presente/ausente Parámetros del EKG. Las mediciones del QTc de significancia potencialmente clínica (PCS) (Bazett) se identificaron de acuerdo con los criterios predefinidos. Se presentan las tablas del análisis de cambio entre el QTc PCS y no PCS absoluto (Bazett) y la tabla de incidencia del cambio PCS en el QTc (Bazett) desde la basal a cualquier visita.

Examen físico

50 **[0244]** Los resultados del examen físico se analizaron por incidencia de sujetos con hallazgos anormales o normales por cada sistema del cuerpo en la visita basal y de terminación. También se aplicó el análisis de cambio entre normal y anormal y viceversa. Cuando no ocurrieron cambios desde la basal, se definió como "otros".

Pruebas inmunológicas relacionadas con el Compuesto 1

55 **[0245]** Para los parámetros inmunológicos, se calcularon las estadísticas descriptivas, incluyendo el número de observaciones, media, desviación estándar, mediana, valores mínimos y máximos y se presentan por grupo de tratamiento y visita. El cambio desde la basal a cada visita de seguimiento también se presenta por grupo de tratamiento. Donde aplicaba, el número y porcentaje de sujetos con resultados positivos/negativos se presenta por grupo de tratamiento y visita.

60 SLEDAI 2K

[0246] Se presentan las estadísticas descriptivas, incluyendo media, desviación estándar, mediana, valores mínimos y máximos del SLEDAI 2K.

65

Resultados del estudio clínico de Fase Ia:

Disposición del sujeto y características del SLE

5 **[0247]** Treinta y seis (36) sujetos del estudio entraron y completaron este estudio según el protocolo. La mayoría de los sujetos (34) en todos los grupos de tratamiento eran del sexo femenino (94.4%) y caucásicos (30, 83.3%). La media de la edad para todos los grupos de tratamiento fue 35.6 años (rango de medias entre 32 y 39 años). La mayoría de los sujetos (91.7%) tenían entre 4 y 6 criterios diagnósticos del Colegio Estadounidense de Reumatología (ACR) y una media de puntuación de grupo del SLEDAI 2K entre 2.1 y 4.1.

10 Resultados de seguridad

15 **[0248]** No hubo una diferencia prominente entre los grupos de tratamiento con el medicamento en estudio y el grupo placebo en la incidencia de AEs. Los AEs más comunes en los grupos fueron cefalea, clasificada como de naturaleza leve o moderada y reacción en el sitio de inyección clasificada como de naturaleza leve. No se vio una respuesta a la dosis. No ocurrió un evento adverso severo (SAE) o AE clasificado como severo durante el estudio.

20 **[0249]** No se vieron efectos clínicamente significativos atribuibles al medicamento en estudio para los valores de hematología, bioquímica o del examen de orina.

25 **[0250]** No se vieron efectos clínicamente significativos atribuibles al medicamento en estudio para los parámetros de los signos vitales (presión sistólica presión diastólica, pulso, saturación de oxígeno).

30 **[0251]** No se vieron efectos clínicamente significativos atribuibles al medicamento en estudio para la temperatura y el peso.

35 **[0252]** No se vieron diferencias de significancia clínica entre los grupos tratados con el Compuesto 1 y placebo para las mediciones categóricas del EKG y los parámetros digitalizados del EKG. No se registró un valor absoluto de QTc PCS y ningún cambio de QTc desde la basal >60 msec. Un número similar de sujetos en los grupos tratados con el Compuesto 1 y placebo tenían un cambio de QTcB desde la basal entre 30 y 60 msec.

40 **[0253]** No se notaron efectos clínicamente significativos del Compuesto 1 sobre el examen físico.

45 Resultados inmunológicos

50 **[0254]** La evaluación de las muestras de suero de todos los sujetos indicó 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 anti-Compuesto 1. Siete sujetos tuvieron una respuesta al Compuesto 1 por encima del punto de corte. Estos niveles elevados de anticuerpos ya estaban presentes antes de la dosificación. No se observó un aumento en los niveles de anticuerpos en el período de seguimiento (dos meses) del estudio. En el suero de estos sujetos se analizó el isotipo de los anticuerpos reactivos. La respuesta en dos de los sujetos se asoció con el isotipo IgM y con el isotipo IgG en otros dos. Ninguno de los siete tenían anticuerpos IgE específicos.

55 **[0255]** El ensayo de linfocitos en sangre periférica (PBL) demostró que 50% de los sujetos (18) se clasificaban como respondedores (SI>2) con distribución similar en todos los grupos de tratamiento. La respuesta de linfocito T fue relativamente baja y no pudo detectarse una asociación entre la dosis o concentración de tratamiento del Compuesto 1 usada en el ensayo y el estatus de respondedor no respondedor, tomando en cuenta que solo se administró una dosis SC del medicamento en estudio. Tampoco se observó una indicación de incidencia elevada de estatus de respondedor en el tiempo. El ensayo del toxoide tetánico (TTX) que sirve como control de seguridad muestra que la respuesta al TTX se preservó a lo largo del período del estudio en todos los grupos de tratamiento indicando que el Compuesto 1 en captisol® no cambió la respuesta inmunológica al antígeno de recuerdo del TTX.

60 **[0256]** Los hallazgos inmunológicos son el resultado de la administración de una sola dosis del medicamento en estudio del Compuesto 1.

65 Resultados de actividad de la enfermedad

70 **[0257]** No se notaron efectos clínicamente significativos del Compuesto 1 sobre la puntuación SLEDAI (cambio de □□3, □□12 puntos) durante el estudio excepto por un sujeto en el grupo de tratamiento de 0.5 mg para quien se registró un cambio en la puntuación SLEDAI de 2 a 10 puntos entre la basal y la semana 4 según un examen de orina que mostraba piuria. Este hallazgo en el examen de orina no fue confirmado por el investigador como un brote lúpico según la definición del protocolo y se resolvió sin cambio de tratamiento.

Conclusiones

[0258] Este estudio de Fase Ia demostró que una sola dosis inyectada por vía subcutánea del Compuesto 1 de 0.5, 1 o 2.5 mg en 120 mg de Captisol® fue segura y bien tolerada y permite la continuación a un estudio de Fase Ib de dosis múltiples.

5 Ejemplo 9: Estudio Clínico de Fase Ib

Un estudio de Fase I multicéntrico, binacional, al azar, doble ciego, a cuatro brazos, controlado con placebo de dosis múltiples para evaluar la tolerabilidad y seguridad de las inyecciones subcutáneas del Compuesto 1 en Captisol® en sujetos con SLE

10 [0259] Este estudio se está realizando para evaluar la seguridad y tolerabilidad de la administración sc repetida del Compuesto 1 a sujetos con SLE. El objetivo secundario del estudio es evaluar las respuestas inmunológicas luego de la administración sc repetida del Compuesto 1 en Captisol® en sujetos con SLE.

15 [0260] El Compuesto 1 se administra en dosis de 0.5, 1.0 o 2.5 mg en Captisol®. El producto en investigación se administra un día sí un día no (excluyendo los fines de semana) por un total de 12 inyecciones sc, es decir, 3 dosis a la semana por 4 semanas. Los sujetos son monitorizados en las visitas planificadas programadas a las 2, 4, 8 y 12 semanas después del inicio de la dosificación. La seguridad y tolerabilidad se evalúan usando pruebas similares a las descritas en el Estudio Clínico de Fase Ia anterior.

20 Resultados

[0261] Este estudio de Fase Ib demuestra que múltiples dosis inyectadas por vía subcutánea del Compuesto 1 de 0.5, 1 o 2.5 mg en 120 mg de Captisol® son seguras y bien toleradas.

25 Ejemplo 10. Detección de anticuerpos contra los péptidos Ia, IIa y IIIa, y anticuerpos anti-1616 Id en los sueros de pacientes con SLE y controles sanos

30 [0262] Se extrajo la sangre de pacientes humanos con SLE (32 pacientes) y en su suero se examinó por ELISA la capacidad de unirse a los péptidos Ia, IIa y IIIa, un péptido control p195-212 (un péptido miastogénico descrito en la PCT publication No. WO 94/00148) o el mAb 5G12.

35 [0263] La detección de los anticuerpos se condujo en las bandejas que fueron cubiertas con 10mg/ml de los péptidos Ia, IIa, IIIa, p195-212 o mAb 5G12, en PBS por 2 h, enjuagadas y bloqueadas con 1% ovalbúmina en PBS por 2 h más. El ELISA se continuó como se describió luego del bloqueo en el Ejemplo 2 de PCT International Publication No. 96/30057, usando anticuerpo policlonal de carnero anti-IgG humana conjugado a peroxidasa.

40 [0264] Como se muestra en la Fig. 7, los pacientes con SLE exhibieron niveles significativamente mayores que se unieron al péptido Ia (cuadrados abiertos), IIa (diamantes abiertos), IIIa (círculos abiertos) o mAb 5G12 (triángulos abiertos), en comparación con controles sanos (péptido Ia-sanos = diamantes cerrados; péptido IIa-sanos = círculos cerrados; péptido IIIa-sanos = triángulos abiertos invertidos; 5G12-sanos = cuadrados rellenos a la mitad). No pudo observarse unión cuando el suero de los pacientes o los controles se evaluaron en las bandejas cubiertas con el péptido no relevante p195-212 (p195-212-SLE = cuadrados cruzados; p195-212-sanos = diamantes rellenos a la mitad). Los resultados indican una correlación entre la molécula de anticuerpo completo y los péptidos basados en CDR sobre el nivel de títulos de anticuerpos.

45 Ejemplo 11. Proliferación de PBL de los pacientes con SLE y controles sanos en presencia de mAb 16/6Id humano y péptidos

50 [0265] Se aislaron linfocitos en sangre periférica (PBL) de la sangre de pacientes con SLE o controles sanos usando gradiente de ficol. Luego, los PBL se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos Ia, IIa o IIIa, o el mAb humano 16/6 Id por 24 h, cuando se tomó una muestra para la medición de IL-2. El ensayo se continuó por un total de 7 días, y se agregó 3H-timidina por las últimas 16 h. La proliferación se detectó leyendo la cantidad de radiactividad incorporada en el DNA de las células.

55 [0266] Como se ve en la Tabla 14, una menor proporción de los PBL tomados de los pacientes con SLE reaccionaron con los péptidos o con el mAb 16/6 Id, cuando se compararon con los controles sanos. Los resultados se expresan en porcentaje de respondedores (34% en la primera línea) y el número real de pacientes (11 de 32: 11/32).

60 15 [0267] Se obtuvieron resultados similares cuando se evaluaron los niveles de la IL-2 producida por los PBL en presencia de los péptidos o el mAb 16/6 Id, como se muestra en el siguiente ejemplo.

65

5

Tabla 14. Proliferación de PBL de los pacientes con SLE y controles sanos en presencia de mAb 16/6Id humano y péptidos la-IIIa EM29.1

	Pacientes con SLE		Controles sanos		
10	16/6 Id	34%	11/32	72%	5
	pep Ia	21%	7/32	44%	11/25
15	pep IIa	9%	3/32	28%	7/25
	pep IIIa	31%	10/32	60%	15/25

Ejemplo 12. Proliferación de PBL de los pacientes con SLE y controles sanos en presencia de mAb 16/6Id humano y péptidos

[0268] Se aislaron PBL de la sangre de pacientes con SLE o controles sanos usando gradiente de ficol, y se incubaron como en el Ejemplo 11. Se removió una muestra de 50µl luego que inició el ensayo, y se incubó en presencia de células sensibles a IL-2 (CTL2) por 24 h, luego de lo cual se agregó 3H-timidina por 16 h, y las bandejas se cosecharon y contaron en un contador beta.

[0269] Como en la Tabla 14 también puede verse en la Tabla 15 que una menor proporción de los PBL tomados de los pacientes con SLE reaccionaron con los péptidos o con el mAb 16/6 Id, cuando se compararon con los controles sanos, indicando así que la respuesta al péptido corresponde a la de los linfocitos T del paciente al autoanticuerpo humano patogénico.

Tabla 15: Producción por los PBL de los pacientes con SLE y controles sanos en presencia de mAb 16/6Id humano y péptidos la-IIIa

	Pacientes con SLE		Controles sanos		
35	16/6 Id	31%	10/32	66%	17/25
	pep Ia	16%	5/32	56%	14/25
40	pep IIa	90/o	3/32	32%	8/25
	pep IIIa	16%	5/32	64%	16/25

Ejemplo 13.

45

Síntesis de los péptidos humanos hCDR1 y hCDR3

[0270] La hCDR1 humana (SEQ ID NO: 6) y hCDR3 (SEQ ID NO: 7) se muestran a continuación.

50 GYYWSWIRQPPGKGEWIG (hCDR1)
YYCARGLLRGGWNDVDYDGMDV (hCDR3)

[0271] Los péptidos se prepararon por métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, por fase sólida química o síntesis en fase de solución usando un sintetizador automático usando los protocolos del fabricante para t-butiloxicarbonil (t-Boc), fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) u otro grupo protector aminoácido alfa esencialmente como se describe (ver, por ejemplo, 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. 40: 180-193,1992).

60

Ejemplo 14

Los péptidos humanos hCDR1 y hCDR3 inhiben la respuesta proliferativa de los PBL de pacientes con SLE al mAb 16/6Id humano.

65

[0272] En el estudio participaron sesenta y dos pacientes, 9 hombres (14.5%) y 53 mujeres (85.5%) con SLE. La edad promedio al momento del diagnóstico era 32.95 ± 12.92 (rango 12-61) años y el período promedio de seguimiento fue 10.98 ± 10.76 (rango 1-32) años. Todos los pacientes cumplían al menos 4 de los criterios diagnósticos revisados del Colegio Estadounidense de Reumatología (ACR) para SLE (Tan E.M. et al., Arthritis Rheum 25: 1271-77 (1982)). Los pacientes fueron reclutados en tres Centros Médicos israelitas (Kaplan, Rehovot; Ichilov, Tel Aviv; Asaf-Harofeh, Rishon Lezion). La actividad de la enfermedad se determinó de acuerdo con el índice de actividad lúpica SLEDAI (Bombardier C. et al., Arthritis Rheum 35: 630-40 (1992)). Un grupo control de 36 voluntarios controles sanos apareables en sexo y edad se estudiaron concomitantemente con los pacientes con SLE. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Médico.

[0273] Era interesante investigar si los péptidos hCDR1 y hCDR3, los cuales se basaban en la CDR1 y CDR3 del mAb 16/6Id humano, son capaces de inhibir las respuestas proliferativas específicas de los PBL de los pacientes con SLE al mAb 16/6Id humano. A este fin, primero teníamos que identificar a los pacientes cuyos PBL podían ser estimulados a proliferar por el mAb 16/6Id humano (respondedores).

[0274] Por tanto, se cultivaron los PBL de 62 pacientes consecutivos con SLE en presencia del 16/6 Id humano y se determinaron sus respuestas proliferativas y capacidad de secretar IL-2. Los PBL de 24 del total de 62 (39%) y de 23 de los 55 (42%) pacientes con SLE evaluados respondieron (SI ≥ 2 , rango 2-5.6) por proliferación y por secreción de IL-2 (SI ≥ 2 , rango 2-60), respectivamente. La frecuencia de respondedores en el grupo de pacientes con SLE fue menor que en el grupo de donantes sanos que se evaluaron como controles. Así, los PBL de 21 de un total de 36 (58%) donantes sanos respondieron por proliferación al 16/6 Id. La extensión de la proliferación (niveles de SI) fue similar para los pacientes con SLE y para los controles sanos que respondieron al 16/6 Id. Sin embargo, como se muestra en la Figura 8, la respuesta óptima al 16/6 Id de los PBL de los donantes control se observó a concentraciones mayores de 16/6 Id en comparación con los pacientes con SLE.

[0275] No pudieron observarse diferencias entre sexo y edad de los pacientes con SLE que respondieron al 16/6 Id y del grupo de pacientes que no respondieron. Sin embargo, los pacientes cuyos PBL proliferaron en respuesta al 16/6 Id estaban enfermos por un menor período de tiempo (un promedio de 9.78 ± 8.36 vs. 11.73 ± 12.06 años para los respondedores y no respondedores, respectivamente; $p = 0.036$). La tabla 16 resume la caracterización clínica de los grupos respondedores y no respondedores al 16/6 Id de pacientes con SLE. Como puede verse en la Tabla, ambos grupos eran similares en la mayoría de las manifestaciones clínicas relacionadas con el SLE. La puntuación de la actividad de la enfermedad del SLE (SLEDAI) y el número de criterios diagnósticos de SLE también eran similares en los dos grupos. No obstante, se notó una mayor frecuencia de afectación neurológica (convulsiones y psicosis) y hematológica y una menor tasa de afectación renal en el grupo de respondedores de los pacientes en comparación con los no respondedores. Sin embargo, probablemente debido al bajo número de pacientes en los subgrupos relevantes, las diferencias anteriores no alcanzaron significancia estadística. Asimismo, relativamente menos pacientes respondedores se determinaron entre los tratados con esteroides o citotóxicos al momento del estudio. ES de hacer notar que significativamente más pacientes que nunca recibieron esteroides respondieron al 16/6 Id en comparación con el grupo de no respondedores (54% vs 21% ; $P=0.023$).

[0276] Es de hacer notar que la eficacia de los péptidos basados en la CDR para inhibir las respuestas proliferativas de los PBL de los donantes sanos al 16/6 Id era mucho menor a la observada para los PBL de los pacientes con SLE (no mostrado).

Tabla 16. Caracterización clínica y de laboratorio de los pacientes con SLE.

A: Criterios diagnósticos*

	Todos los pacientes	Responded ores 24(39)	No Respondedores
Número de pacientes (%)			
Erupción malar	19/62 (30.1)	8/24 (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 mucosales	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)
Neurológicos	5/62(8.1)	4/24 (16.7)	1/38 (2.7)

5

A: Criterios diagnósticos*		Todos los pacientes	Respondedores	No respondedores
	trastornos‡			
	Trastorno Renal †	24/62 (38.8)	7/24 (29.2)	17/38 (44.8)
15	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-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)
20	B: Actividad de la Enfermedad			
	Puntuación SLEDAI	6.65 ± 5.12	7.29 ± 1.06	6.24 ± 0.84
25	Número de ACR criterios diagnósticos	5.44 ± 1.39	5.54 ± 0.33	5.34 ± 0.2
	C: Tratamiento actual			
	AINES	17/62 (27.4)	6/24 (25)	11/38 (29)
	Antimaláricos	37/62 (59.7)	15/24 (62.5)	22/38 (57.9)
30	Esteroides‡	33/62 (53.2)	11/24 (45.8)	22/38 (57.9)
	Citotóxicos‡	10/62 (16.1)	2/24 (8.3)	8/38(21)

*La afectación clínica se definió de acuerdo con los criterios ACR revisados. Los anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos anti-dsDNA se determinaron por células Hep2 y *Crithidia lucilliae*, respectivamente. Los anticuerpos antifosfolípido (APLA) se definieron como actividad en uno o más de los siguientes ensayos: VDRL falso positivo, anticoagulante lúpico (LAC) o ELISA para anticuerpos anticardiolipina.

† El antimalárico hidroxiquina se usó a una dosis de 200-400 mg/día ; el tratamiento con esteroides se definió como una dosis diaria: 5mg de prednisona; los citotóxicos usados fueron ciclofosfamida (0.75-1.0g/m² ; mensual) o azatioprina (100-150 mg/día).

‡ Parámetros para los cuales se observó una tendencia hacia diferencias entre los dos grupos de pacientes con SLE respondedores y no respondedores.

[0277] Para examinar la capacidad de los péptidos hCDR1 y hCDR3 para inhibir la respuesta proliferativa de los PBL de los pacientes con SLE al mAb 16/6Id, los PBL (2x10⁵/platillo) de los pacientes con SLE se estimularon in vitro por triplicado con diferentes concentraciones (0.1-20µg/platillo) del mAb 16/6Id humano en ausencia o presencia de los péptidos hCDR1 y hCDR3 (o 50 o 100 µg/platillo). Luego de 6 días de incubación, se agregó 3H-timidina (0.5 µCi de 5 Ci/mmol) a cada platillo por 18 horas más de incubación. Las células fueron luego cosechadas y se contó la radiactividad usando un β-contador. Los resultados se expresaron como cuentas medias por minuto (cpm) de los cultivos triplicados. Luego se calcularon los índices de estimulación (el cociente del promedio de cpm a la concentración óptima de 16/6Id al promedio de cpm sin 16/6Id). Un índice de estimulación (SI) > 2 se consideraba positivo.

[0278] Se encontró que los PBL de 24 del total de 62 pacientes con SLE (39%) proliferaban con el mAb 16/6Id. Se examinó la capacidad de los péptidos hCDR1 y hCDR3 para inhibir las respuestas proliferativas a toda la molécula del autoanticuerpo 16/6Id en los PBL de 19 pacientes respondedores con SLE.

[0279] La tabla 17 muestra los resultados de estos experimentos. La inhibición de más del 50% de la capacidad proliferativa se consideró positiva. La Tabla representa la mayor capacidad de inhibición positiva para cada péptido. Puede verse que el hCDR1 y hCDR3 humano inhibían la proliferación de los PBL de 16/19 (84.2%) y 15/19 (78.9%), respectivamente, de los 19 respondedores examinados. Ambos péptidos inhibieron la proliferación de los PBL de 18/19(95%) de respondedores examinados. También puede verse en la Tabla que las magnitudes de las inhibiciones eran similares para ambos péptidos. Así, puede concluirse que los péptidos basados en la

CDR1 y CDR3 del mAb 16/6Id humano son inhibidores eficientes de la proliferación de los PBL de los pacientes con SLE al mAb 16/6Id humano.

5

10

Tabla 17

Inhibición de la proliferación de los PBL de pacientes con SLE por los péptidos hCDR1 y hCDR3.

Número	hCDR1	Porcentaje de Inhibición hCDR3
1.	62	<50
2.	70	75
3.	69	<50

20

Inhibición de la proliferación de los PBL de pacientes con SLE por los péptidos hCDR1 y hCDR3.

Número	hCDR1	Porcentaje de Inhibición hCDR3
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

45

Ejemplo 15

50

Especificidad de la capacidad inhibitoria de hCDR1 y hCDR3

[0280] Es importante demostrar que los efectos inhibitorios de los péptidos basados en la hCDR son específicos de las respuestas asociadas al SLE. A este fin se agregaron los péptidos hCDR1 y hCDR3 a los cultivos de PBL de pacientes con SLE que se estimularon con el mitógeno fitohemaglutinina (PHA, 2 µg/ml). Los resultados de tal experimentado realizado con los PBL de un paciente con SLE se muestran en la Figura 9. Los péptidos hCDR1 y hCDR3 no pudieron inhibir las respuestas proliferativas (expresadas en cpm) de los PBL al mitógeno PHA y las respuestas proliferativas fueron similarmente altas en ausencia (columna oscura) o presencia de hCDR1 o hCDR3.

[0281] En otro experimento, los cultivos de PBL de pacientes con SLE se estimularon con el mAb 16/6Id humano y luego se incubaron con los péptidos humanos hCDR1 y hCDR3 o con el péptido IIIa como control. Los resultados de tal experimentado realizado con los PBL de un paciente con SLE se muestran en la Figura 10. Como se muestra en la Figura 10, mientras que ambos péptidos hCDR1 y hCDR3 basados en el autoanticuerpo humano inhibieron eficientemente las respuestas proliferativas de los PBL al mAb 16/6Id humano, el péptido mCDR3 basado en la CDR3 del anticuerpo murino (es decir, el péptido IIIa) no inhibió la proliferación.

[0282] Se usaron dos péptidos control adicionales en estos experimentos, es decir péptidos sintetizados al orden inverso de los péptidos Ia y IIIa, y los resultados se muestran en la Figura 11. Puede verse que los dos péptidos

inversos no inhibieron significativamente las respuestas proliferativas de los PBL del paciente con SLE al mAb 16/6ld humano mientras que los péptidos hCDR1 y hCDR3 inhibieron eficientemente la proliferación, demostrando que la inhibición de la proliferación por los péptidos basados en la hCDR humana es específica de los péptidos y de las respuestas de los linfocitos T asociados al SLE.

Ejemplo 16

Regulación en menos de la secreción de IL-2 por los PBL de los pacientes con SLE en presencia de los péptidos hCDR1 y hCDR3

[0283] Era interesante encontrar si los péptidos hCDR son capaces de inhibir la secreción de IL-2 por los PBL de los pacientes con SLE luego de la estimulación con el mAb 16/6ld humano. Tal inhibición también podría sugerir que los péptidos humanos basados en la CDR inhiben las respuestas proliferativas al mAb 16/6ld al menos parcialmente al regular en menos la secreción de IL-2. Para este fin, se incubaron PBL de pacientes con SLE con el mAb 16/6ld humano en ausencia o presencia de los péptidos humanos hCDR1 o hCDR3. Los sobrenadantes de los cultivos se recolectaron 48 horas después de la incubación. Se realizaron ensayos para determinar los niveles de IL-2 en los sobrenadantes usando la línea dependiente de IL-2 CTLL. En resumen, células de la línea CTLL (2x10⁴/platillo) se incubaron en presencia de los diferentes sobrenadantes por 24 horas, seguido por la adición de 3H-timidina por un período de incubación adicional de 18 horas. Las células fueron luego cosechadas y se contó la radiactividad usando un β-contador. Los resultados se calcularon basados en la IL-2 humana recombinante usada como un estándar. Se examinó la capacidad de los péptidos de inhibir la secreción de IL-2 de los PBL de 23 respondedores estimulados por el 16/6 ld. Los resultados, resumidos en la Tabla 18, demuestran que hCDR1 y hCDR3 inhibieron la secreción de IL-2 por los PBL de 21/23 y 19/23 pacientes, respectivamente. La inhibición de las respuestas proliferativas de los PBL se correlacionó directamente con la inhibición de IL-2 por los péptidos basados en la CDR. Así, se observó la inhibición de la secreción de IL-2 en todos los casos donde se determinó la inhibición de la proliferación.

[0284] Los resultados obtenidos con los PBL de un paciente con SLE representados en la Figura 12 (la secreción de IL-2 se expresa en pg/ml) muestran que hCDR1 y hCDR3 inhibieron 100% de la secreción de IL-2 por los PBL de un paciente con SLE inducida por el mAb 16/6ld humano.

Tabla 18. Inhibición de la secreción de IL-2 por hCDR1 y hCDR3

Péptido	Actividad inhibitoria %	Inhibición máxima %
hCDR1	91 (21/23)	84 ± 31
hCDR3	83 (19/23)	78 ± 34

*La secreción de IL-2 en presencia de 16/6 ld solamente se consideró como inhibición del 100%. La inhibición de 50% o más se consideró significativa.

Ejemplo 17

Regulación en más de la secreción de la citoquina inmunosupresora TGF-β por los péptidos basados en la CDR

[0285] En intentos por arrojar luces sobre los mecanismos por los cuales los péptidos basados en la CDR humana inhiben las respuestas proliferativas al anticuerpo monoclonal anti-DNA 16/6ld humano, se determinaron los niveles de la citoquina inmunosupresora TGF-β en los sobrenadantes de los cultivos celulares. El racional detrás de estos experimentos se basa en nuestros hallazgos previos de niveles elevados de TGF-β en cultivos de esplenocitos de ratones con SLE inducidos con el mAb anti-DNA 16/6ld humano o espontáneos {ratones (NZB x NZW) F1} luego del tratamiento con los péptidos basados en la CDR murina (Eilat, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 98, 1148 (2001)). La elevación en los niveles de TGF-β se correlacionaban con la mejoría de las manifestaciones de la enfermedad en los ratones tratados.

[0286] Con este propósito, los sobrenadantes se removieron de los cultivos de los PBL de varios pacientes con SLE luego de 48 horas de incubación con el mAb 16/6ld humano en ausencia o presencia de los péptidos hCDR1 o hCDR3. El TGF-β se determinó por ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se cubrieron bandejas Maxisorb (Nunc) con quimeras TGFβsRII/Fc humanas recombinantes (R & D Systems) diluidas en PBS (100 ng/ml). Luego del bloqueo, se agregaron los sobrenadantes celulares. Luego de 18 horas de incubación se agregó el anticuerpo anti-TGF-β humano biotinilado detectante (R & D Systems). La solución de

sustrato usada fue el Reactivo de Color TMB (Helix Diagnostics) y se evaluó la actividad enzimática por el lector MRX ELISA usando los filtros de 570 nm y 630 nm. Los resultados se resumen en la Tabla 19.

5 [0287] Los resultados en la Figura 13 demuestran que los péptidos hCDR1 y hCDR3 indujeron una regulación en más significativa en la secreción de TGF-ss (expresada en pg/ml) por los PBL de un paciente con SLE representativo que fueron estimulados con el mAb 16/6Id humano patogénico.

Tabla 19

10 **Regulación en más de la secreción de TGF-β de la estimulación de PBL inducidos por la secreción de 16/6 Id de pacientes con SLE con los péptidos de hCDR1 y hCDR3.**

	Péptido	Regulación en más de TGF-β%	Regulación máxima en más %
15	hCDR1	100(19/19)	305±221
	hCDR3	100(19/19)	338±242

20 [0288] La secreción de TGF-β en presencia de 16/6 Id solamente (media 63625 pg/ml) se consideró como 100%. Los resultados se expresan como porcentaje de secreción por encima de los que estaban en presencia de 16/6Id solamente.

Ejemplo 18

25 **La actividad de la MMP-9 (pero no de MMP-2) se eleva en el suero de los pacientes con SLE**

[0289] En el presente ejemplo, determinamos los niveles de MMP-9 y MMP-2 en el suero de 40 pacientes con SLE y demostramos que la actividad de MMP-9 pero no MMP-2 se eleva significativamente en el suero de los pacientes con SLE comparados con los controles sanos. La actividad elevada de MMP-9 se correlacionaba con la presencia de erupción discoide, fenómeno de Raynaud, neumonitis, úlceras mucosales y la presencia de anticuerpos antifosfolípido (APLA). Además, los niveles elevados de MMP-9 se correlacionaban con la actividad de SLE en el grupo de pacientes masculinos.

Materiales y métodos

35 [0290] **Pacientes.** Cuarenta pacientes, 32 del sexo femenino y 8 del sexo masculino con SLE participaron en este estudio. Todos los pacientes revelaban al menos cuatro de los criterios diagnósticos revisados del Colegio Estadounidense de Reumatología (ACR) para el diagnóstico de SLE (Winchester RJ. Systemic lupus erythematosus pathogenesis. In: Koopman WJ, ed. Birmingham. Alabama: William and Wilkins, pp. 1361-91 (1996)). Veinticinco voluntarios sanos apareables en sexo y edad sirvieron como grupo control en nuestros estudios. La edad promedio al momento del diagnóstico era 29 ±9.7 (rango 15-48) años y el período promedio de seguimiento fue 11 6 10 (rango 1-32) años. La actividad de la enfermedad se determinó de acuerdo con el índice de actividad lúpica 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, Rehovot, Israel.

40 [0291] **Medición de la actividad de MMP-2 and MMP-9 por kits de ensayo de actividad.** Las actividades de MMP-2 y MMP-9 se midieron con kits específicos de ensayo de actividad de MMP-2 o MMP-9 Biotrak (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, UK) 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 las MMPs, se realizó la activación de la proforma de las MMPs usando acetato p-aminofenilmercúrico (APMA).

55 [0292] **Medición de las actividades de las MMP-2 y MMP-9 por zimografía en gel.** Se examinaron las actividades de MMP-2 y MMP-9 por zimografía en gel. Se separó una muestra de 5ml de suero por un gel 8% SDS-PAGE polimerizado con 1 mg/ml de gelatina. Los geles se enjuagaron una vez por 30 min en 2.5% Triton X-100 para remover el SDS y una vez por 30 min en el amortiguador de reacción que contiene 50 mM de Tris-HCl 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ y 0.02%(p/v) Brij 35 (pH 7.5). El amortiguador de reacción se cambió a uno fresco, y los geles se incubaron a 37°C por 24 h. La actividad gelatinolítica se visualizó tiñendo los geles con 0.5% azul brillante Coomasi y se cuantificó por densitometría.

60 [0293] **Análisis estadísticos.** Los datos se evaluaron usando chi-cuadrada o pruebas exactas de Fisher, prueba t no apareada y valores de p de doble cola. También se usaron Pearson, Spearman y análisis multivariados.

65 Ejemplo 18 (i)

La actividad de la MMP-9 (pero no de MMP-2) se eleva en el SLE

[0294] Como se describe antes y en PCT International Publication No. WO 02/067848, se demostró que la MMP-9 está involucrada en varias enfermedades autoinmunes así como en modelos en animales de SLE. Así, estábamos interesados en estudiar si la MMP-9 también está elevada en el suero de pacientes con SLE. Con este propósito, examinamos el suero de 40 pacientes con SLE y de 25 controles sanos por zimografía en gel, en los cuales pueden visualizarse actividades de MMP-9 y MMP-2. Un gel representativo se muestra en la Figura 14. Como puede verse en esta figura, los niveles de MMP-9 se elevan en el suero de los pacientes con SLE cuando se comparan con controles sanos. El análisis densitométrico de los zimogramas del suero de 40 pacientes con SLE y de 25 controles sanos indicó que la actividad media de la MMP-9 para los pacientes con SLE fue 109 ± 5.6 unidades densitométricas y para los controles sanos, 76.5 ± 4.2 unidades densitométricas ($p=0.0001$). Los valores de actividad por enzima de 85 unidades densitométricas (media de controles sanos + 2 s.e.) se consideraron altos. Los resultados demostraron altos niveles de actividad de MMP-9 en 68% de los pacientes con SLE. Solo 3% de los controles sanos exhibieron una alta actividad de MMP-9 ($p=0.001$). El análisis densitométrico de los niveles de MMP-2 en las mismas muestras de suero reveló que las diferencias en la actividad de MMP-2 entre el suero de pacientes con SLE y de controles sanos no eran significativas. Así, los valores de 10967 y de 123 ± 5 . (media de unidades densitométricas 6 s.e.) se determinaron para controles sanos y pacientes con SLE, respectivamente ($p=0.0531$). Para cuantificar los niveles de actividad de MMP-9 y MMP-2 en el suero, usamos kits de ensayo de actividad.

[0295] La figura 15 muestra que la actividad de MMP-9 se eleva tres veces en el suero de los pacientes con SLE comparada con el suero de los controles sanos, y esta elevación es estadísticamente significativa ($p=0.0302$). Por el contrario, las diferencias en los niveles de MMP-2 entre los dos grupos no son significativas ($p=0.1254$).

[0296] Debido a que nosotros, así como otros (Ebihara I. et al., Am J Kidney Dis 32: 544-50 (1998); Ebihara I. et al., Nephron 83: 169 (1999) detectamos altos niveles de MMP-9 en el suero de pacientes con insuficiencia renal crónica sin SLE (p.ej., diabetes mellitus, hipertensión) probablemente debido a la retención de la enzima, analizamos la correlación entre los niveles de MMP-9 y la función renal en el grupo de pacientes con SLE examinados. No se observó correlación entre los niveles de creatinina y los niveles de MMP-9 ($r^2=0.01$), indicando que los niveles elevados de MMP-9 en pacientes con SLE no eran el resultado de retención de la enzima debido a la alteración renal.

Ejemplo 18 (ii)

Correlación de actividad de MMP-9 con los parámetros clínicos y de laboratorio

[0297] La elevación en los niveles de actividad de MMP-9 en el suero de pacientes con SLE nos indujo una posible correlación entre los parámetros clínicos y de laboratorio, y los niveles séricos de MMP-9. El análisis estadístico (chi cuadrada o prueba exacta de Fisher) se realizó investigando el número de pacientes con niveles altos y normales de MMP-9 por cada manifestación clínica (Tabla 20) así como tomando en cuenta los niveles medios reales de actividad de MMP-9 para pacientes con o sin cierto síntoma clínico. Los resultados fueron similares por ambos análisis. Es de hacer notar que para todos los síntomas clínicos, el porcentaje de pacientes con niveles elevados de MMP-9 es mucho mayor que en el grupo de controles sanos. Los niveles de MMP-9 no se correlacionaron con el sexo, duración de la enfermedad o la edad de inicio (Pearson, Spearman).

[0298] La tabla 20 muestra las características clínicas y de laboratorio de los pacientes con SLE de acuerdo con sus niveles de actividad de MMP-9 (menor o igual a los controles sanos=normal). Los niveles elevados de MMP-9 se correlacionaba significativamente con la presencia del fenómeno de Raynaud ($p=0.0138$) y APLA ($p=0.041$). Pudo observarse una fuerte correlación con neumonitis, erupción discoide, trastornos neurológicos y úlceras mucosales. Sin embargo, el número de pacientes con estas últimas manifestaciones fue demasiado pequeño para realizar un análisis estadístico. El análisis multivariado reveló que el fenómeno de Raynaud y los niveles de complemento (C3, C4) bajos se correlacionan positivamente con altos niveles de MMP-9 ($p=0.0001$ y $p=0.0137$, respectivamente). Por el contrario, la fotosensibilidad, artritis y trastornos hematológicos se correlacionan negativamente con los niveles de actividad del MMP-9 ($p=0.0381$, 0.0014 y 0.0065 , respectivamente).

Tabla 20

Características clínicas de los pacientes con SLE con niveles altos y normales de MMP-9 de acuerdo con sus niveles de MMP-9.

		NIVELES DE MMP-9 (%)	
		Altos	Normales
5			
10	Número de pacientes (%)	40(100)	27 (68)
	Fotosensibilidad	13	8 (62)
	Úlceras mucosales	9	8(89)
	Erupción malar	9	7(78)
15	Erupción discoide	5	5(100)
	Fenómeno de Raynaud	8	8(100)
	Vasculitis	18	14 (78)
	Artritis	31	21 (68)
	Serositis	9	7(78)
20	Neumonitis	4	4(100)
	Trastornos neurológicos	4	4 (100)
	Trastorno Renal	16	11(69)
	Trastornos Hematológicos	29	18 (62)
25	ANA	40	27 (68)
	αds-DNA	36	24 (67)
	APLA	25	20 (80)
30	Complemento bajo (C3, C4)	30	21 (70)

[0299] La afectación clínica se definió de acuerdo con los criterios ACR revisados (Winchester, 1996). Los anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos anti-dsDNA se determinaron por células Hep2 y *Crihthidia luciliae*, respectivamente. Los anticuerpos antifosfolípido (APLA) se definieron como reactividad con uno o más de los siguientes ensayos: VDRL falso positivo, anticoagulante lúpico (LAC) o ELISA para anticuerpos anticardiolipina.

[0300] También buscamos una posible correlación entre el SLEDAI y la actividad de MMP-9 en pacientes del sexo masculino (Figura 16A) y del sexo femenino (Figura 16B). Es interesante que el coeficiente de correlación fue significativo y positivo para los hombres ($r^2 = 0.6333$) pero insignificante y negativo para las mujeres ($r^2 = 0.0571$). Se obtuvieron resultados similares usando el sistema de puntuación BILAG. Así, se observó un coeficiente de correlación positivo entre la actividad de MMP-9 y las puntuaciones BILAG para los hombres ($r^2 = 0.6442$) y uno insignificante para las mujeres.

[0301] También era interesante determinar si existe una correlación entre el uso de varias modalidades de tratamiento por los pacientes y la actividad de MMP-9. Como puede verse en la Tabla 21(A), no había una correlación significativa entre el tratamiento actual de los pacientes y la actividad de MMP-9. Sin embargo, cuando buscamos el tratamiento de los pacientes en cualquier momento durante el curso de su enfermedad (Tabla 21(B)), los niveles altos de MMP-9 se asociaron con el uso de citotóxicos (82%).

Tabla 21

Modalidades de tratamiento de los pacientes con SLE de acuerdo con sus niveles de MMP-9.

Número total de Pacientes		Niveles de MMP-9 (%)	
Alto		Normal	
55	A. Tratamiento actual.		
	Citotóxicos	8	6 (75)
	Esteroides	23	17 (74)
	Antimaláricos	21	14 (67)
	AINES	7	5 (71)
60	B. Tratamiento a lo largo del período de seguimiento.		
	Citotóxicos	17	14 (82)
	Esteroides	29	19 (66)
	Antimaláricos	26	16 (62)
65	AINES	18	12 (67)

[0302] El antimalárico hidroxiclороquina se usó a una dosis de 200-400 mg/día. El tratamiento con esteroides se definió como una dosis \geq mg de prednisona. Los citotóxicos usados fueron ciclofosfamida (0.5-1g/m² mensuales) o azatioprina (100-150 mg/día).

5 Ejemplo 18 (iii)

Variaciones en la actividad de MMP-9 en las muestras de suero tomadas de pacientes con SLE en diferentes puntos de tiempo

10 [0303] Debido a que la actividad de la enfermedad varía en el tiempo, medimos los niveles de actividad de MMP-9
y MMP-2 en el suero de pacientes a quienes se les tomaron muestras durante 4-6 años de seguimiento. Se analizó
el suero de nueve pacientes tomados en diferentes puntos de tiempo. Los niveles de MMP-2 no variaron
significativamente entre los pacientes y los controles sanos. En 5 de los 9 pacientes examinados, pudieron
15 observarse variaciones en la actividad de la MMP-9 en las muestras de suero de los pacientes en el tiempo. Los
resultados para 2 pacientes representativos con SLE se muestran en las Figuras 17A-B. Como puede verse, la
actividad de la MMP-9, pero no la actividad de la MMP-2, ha estado cambiando con el tiempo en los mismos
pacientes. Estos cambios no se asociaron con los índices de actividad de la enfermedad determinados por los
sistemas SLEDAI o BILAG. No se detectaron cambios en la actividad de la MMP-9 en el suero de 5 controles
20 sanos a quienes se les tomaron muestras en diferentes puntos de tiempo (datos no mostrados). En otros 4
pacientes con SLE, no se observaron cambios sustanciales en la actividad de la MMP-9 o MMP-2 con el tiempo, y
los niveles de actividad de la MMP-9 permanecieron altos o bajos, dependiendo de cada paciente.

Discusión

25 [0304] El presente estudio demuestra por primera vez la implicación de la MMP-9 en el SLE humano.
Demostramos que la actividad de la MMP-9 pero no de la MMP-2 se eleva significativamente en el suero de 68%
de los pacientes con SLE comparados con los controles sanos. Los niveles altos de MMP-9 se correlacionaron con
el fenómeno de Raynaud, neumonitis, trastornos neurológicos, erupción discoide y la presencia de APLA. Los
cambios en la actividad de la MMP-9 se observaron en el suero del mismo paciente en diferentes períodos de la
30 enfermedad. Los niveles de actividad de la MMP-9 no se correlacionaron con el índice de actividad de la
enfermedad (SLEDAI, BILAG) en las pacientes del sexo femenino, pero se correlacionaron con la actividad del
SLE en el grupo de pacientes del sexo masculino.

35 [0305] El presente estudio muestra que los niveles de actividad de MMP-2 no se elevan significativamente en el
suero de los pacientes con SLE. Estos resultados son compatibles con los reportados previamente (Zucker, S. J
Rheumatol. 26:78 (1999)) que los niveles de MMP-2 no aumentaron en el SLE. Los niveles de MMP-2 también
eran constitutivos y no cambiaron en otras condiciones patológicas (como la neuritis óptica y esclerosis múltiple)
en las cuales los niveles de MMP-9 se elevaron relativamente con los controles sanos (Gijbels K et al., J.
Neuroimmunol. 41: 29-34 (1992).; Paemen, L. et al., Eur. J. Neurol. 1: 55-63 (1994)).

40 [0306] Se sugirió la implicación de una MMP adicional, es decir, la MMP-3, en la patogénesis del SLE, debido a
que aumentaba significativamente en el suero de los pacientes con SLE (Kotajima, L. et al., Clin. Exp. Rheum. 16:
409-415 (1998)). La frecuencia de pacientes con SLE con actividad elevada de MMP-9 (68%) mostrada en el
45 presente ejemplo, se asemeja a las frecuencias reportadas (Kotajima et al., 1998) para los niveles altos de MMP-3
en el SLE (76%) y en pacientes con RA (82%). Asimismo, se demostró que el transcrito de MMP-3 aumenta
significativamente con la progresión de la nefritis en ratones (NZB x NZW) F1 (Nakamura, T. et al., Clin. Sci.
85:295-301 (1993)).

50 [0307] El origen de las MMPs elevadas en el suero de los pacientes con SLE no se conoce. SE ha demostrado que
la MMP-9 es secretada por las células de sangre periférica tales como linfocitos T, neutrófilos y macrófagos (para
una revisión, ver Goetzl, E. J. et al., J. Immunol. 156: 1-4 (1996)). El hecho de que no se encontró una correlación
entre los niveles de actividad de la MMP-9 y el número de células de sangre periférica en los pacientes puede
55 sugerir que la MMP-9 no era secretada por las células inmunes de sangre periférica sino más bien por los órganos
afectados por el SLE como los riñones o pulmones/pleura. La observación que todos los pacientes con SLE con
neumonitis exhibían niveles elevados de MMP-9 puede sugerir que el pulmón enfermo es una fuente de niveles
altos de MMP-9. Asimismo, la asociación entre el tratamiento con citotóxicos, lo cual representa la severidad de la
afectación del órgano relacionado con el SLE, y los altos niveles de MMP-9 en el suero también puede apoyar la
60 noción que los órganos enfermos son la fuente de la actividad de la MMP-9 en los pacientes con SLE. No
obstante, aún existe la posibilidad que menos linfocitos de sangre periférica secretaran niveles mayores de
actividad de MMP-9.

[0308] Se demostró que el TNF- α y la IL-1 participan en la patogénesis del SLE en la enfermedad humana
(Dean G.S. et al., Ann Rheum Dis 59: 243-51 (2000)) y en modelos murinos (Segal R. et al., J Immunol 158: 3009-
65 16 (1997); Theofilopoulos A.N. et al., Ann Rheum Dis 58 (suppl): 149-55 (1999); Eilat et al., 2001). Se ha
demostrado en varios sistemas que estas citoquinas inducen la producción de MMP-9 (Guedez, L. et al., Crit. Rev.

Oncogenesis 7: 205-225 (1996)), y así, es posible que la inducción de estas últimas MMPs sea parte del efecto patogénico de estas citoquinas en el SLE. Se ha reportado que los niveles de MMP-9 secretados espontáneamente por los monocitos de sangre periférica de los individuos sanos, se regularon en más a la exposición al TNF- α y a IL-1 β (Saren P. et al., J Immunol 157: 4159-65 (1996)). Además, las MMPs de los linfocitos T y macrófagos facilitan la secreción de TNF- α por el clivaje de la forma unida a la membrana (Gearing A.J.H. et al., Nature 370:555-7 (1994)). Así, estos ejemplos demuestran los efectos regulatorios mutuos de la MMP sobre las citoquinas proinflamatorias y viceversa. No obstante, el hecho que el suero de algunos de los pacientes los niveles de actividad de MMP-9 permanecieron dentro del rango normal durante el período de seguimiento, mientras que se midieron altos niveles de actividad de MMP-9 en el suero de muchos pacientes, puede sugerir la participación de factores genéticos en la regulación de estos últimos.

[0309] Los resultados aquí indican que la MMP-9 participa en la patogénesis del SLE y que la medición que los niveles plasmáticos/séricos de actividad de esta metaloproteinasas pueden proporcionar información importante cuando se monitoricen pacientes tratados con medicamentos que interfieren con la actividad de la MMP-9.

15 LISTADO DE SECUENCIA

[0310]

20 <110> Cohen-Vered, et al., Sharon

<120> FORMULACIONES PARENTERALES DE PÉPTIDOS PARA EL TRATAMIENTO DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

25 <130> 2609/68811-A

<140> 10/758,397
<141> 2004-01-14

30 <160> 18

<170> PatentIn version 3.1

35 <210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino

<400> 1

45 **Thr Gly Tyr Tyr Met Gln Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Lys Ser Leu**
1 5 10 15

Glu Trp Ile Gly
20

50 <210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino

<400> 2

60 **Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys**
1 5 10 15

Ala Lys Ala Thr
20

65 <210> 3

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino

<400> 3

10 **Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Leu Trp Glu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp**
1 5 10 15

Gly Gln Gly Ser
20

15 <210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino

<400> 4

25 **Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu**
1 5 10 15

Trp Ile Gly

30 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino

<400> 5

40 **Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Arg Tyr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Thr**
1 5 10 15

45 **Leu**

50 <210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino

<400> 6

60 **Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu**
1 5 10 15

Trp Ile Gly

65 <210> 7

<211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino
 <400> 7

10 **Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp**
 1 5 10 15

15 **Tyr Tyr Gly Met Asp Val**
 20

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino
 <400> 8

25 **phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser**
 1 5

<210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 1<220>
 <223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino
 <400> 9

35 **Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Lys Thr Ser Leu Lys Ser**
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino
 <400> 10

50 **Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met**
 1 5 10 15

Asp Val

55 <210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (14)..(14)
 5 <223> X= Lys o Glu

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (15)..(15)
 10 <223> X= Phe o Tyr

<400> 12

15 **Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys**
1 5 10 15

20 **Ala Lys Ala Thr**
20

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino

30 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> X= Phe, Thr o Gly

35 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> X= Leu, Ala o Ser

40 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (8)..(8)
 <223> X= Trp o Ala

45 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (9)..(9)
 <223> X= Glu o Lys

50 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (13)..(13)
 <223> X= Met o Ala

55 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (14)..(14)
 <223> X= Asp, Lys o Ser

<400> 13

60 **Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Tyr Ala Xaa Xaa Tyr Trp**
1 5 10 15

65 **Gly Gln Gly Ser**
20

<222> (13)..(13)
 <223> X= Lys o Asp

<220>
 5 <221> RASGO_MISC
 <222> (15)..(15)
 <223> X= Glu, Leu o Ser

<400> 16
 10 **Xaa Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Xaa Gln Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Glu**
1 5 10 15

15 **Trp Ile Gly**
 <210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> péptido sintético basado en la CDR del autoanticuerpo murino

25 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> X= Gly o Phe

30 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (9)..(9)
 <223> X= Arg o Ala

35 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> X= Gly o Ala

40 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (11)..(11)
 <223> X= Gly o Ala

45 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (12)..(12)
 <223> X= Trp o Ala

50 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (13)..(13)
 <223> X= Asn o Ala

55 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (18)..(18)
 <223> X= Tyr o Trp

60 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (20)..(20)
 <223> X= Met o Gln

<400> 17
 65

Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Leu Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Val Asp
1 5 10 15

5 **Tyr Xaa Gly Xaa Asp Val**
20

<210> 18

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético de 19 aminoácidos basado en la región determinante de complementaridad (CDR1) del mAb anti-dsDNA humano denotado 16/6 Id

<400> 18

20 **Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu**
1 5 10 15

Trp Ile Gly

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones**1. Una composición farmacéutica que comprende;**

5 un portador acuoso;
de 0.1 mg/ml a 20 mg/ml de la composición de una sal farmacéuticamente aceptable de un péptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia

- 10 (i) TGYX₁X₂X₃X₄X₅Q SPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11) donde X₁ es Met, Ala o Val; X₂ es Gln, Asp, Glu o Arg; X₃ es Trp o Ala; X₄ es Val o Ser; y X₅ es Lys, Glu o Ala;
- (ii) EINPSTGGX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂KAKAT (SEQ ID NO:12) donde X₆ y X₇ son cada uno Thr, Val o Ala; X₈ es Tyr o Phe; X₉ es Asn o Asp; X₁₀ es Gln o Glu; X₁₁ es Lys o Glu, y X₁₂ es Phe o Tyr;
- 15 (iii) YYCARX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆PYAX₁₇X₁₈YWGQGS (SEQ ID NO:13) donde X₁₃ es Phe, Thr o Gly; X₁₄ es Leu, Ala o Ser; X₁₅ es Trp o Ala; X₁₆ es Glu o Lys; X₁₇ es Met o Ala, y X₁₈ es Asp, Lys o Ser;
- (iv) GYNX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄SHGX₂₅X₂₆LEWIG (SEQ ID NO:14) donde X₁₉ es Met o Ala; X₂₀ es Asn, Asp o Arg; X₂₁ es Trp o Ala; X₂₂ es Val o Ser; X₂₃ es Lys o Glu; X₂₄ es Gln o Ala; X₂₅ es Lys o Glu, y X₂₆ es Ser o Ala;
- 20 (v) YYCARX₂₇X₂₈X₂₉YGX₃₀X₃₁X₃₂GQTL (SEQ ID NO:15) donde X₂₇ es Ser o Phe; X₂₈ es Gly o Ala; X₂₉ es Arg, Ala o Glu; X₃₀ es Asn o Asp; X₃₁ es Tyr o Phe, y X₃₂ es Trp, His o Ala;
- (vi) X₃₃YYWSWIX₃₄QX₃₅PX₃₆X₃₇GX₃₈EWIG (SEQ ID NO:16) donde X₃₃ es Gly o Thr Gly; X₃₄ es Arg o Lys; X₃₅ es Pro o Ser; X₃₆ es Gly o Glu; X₃₇ es Lys o Asp; y X₃₈ es Glu, Leu o Ser;
- 25 (viii) FSGYYWS (SEQ ID NO:8);
(ix) EINHSGSTNYKTSLS (SEQ ID NO:9); o
(x) GLLRGGWNDVDYGGMDV (SEQ ID NO:10), y

30

y una β -ciclodextrina sustituida como un potenciador de solubilidad seleccionado y,

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

2. La composición farmacéutica de la declaración 1, donde al menos 0.5 mg/ml de la composición es la sal farmacéuticamente aceptable del péptido.

40 **3. La composición farmacéutica de la declaración 1 o 2, donde el péptido tiene una secuencia seleccionada a partir del grupo consistente en:**

- NH₂- 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) ;
- 45 NH₂- 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) ; NH₂- Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Leu Tip Glu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser-COOH (SEQ ID NO:3) ; NH₂- Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly-COOH (SEQ ID NO:4) ; NH₂- Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Arg Tyr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Thr Leu - COOH (SEQ ID NO:5) ;
- 50 NH₂-Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu Trp Ile Gly-COOH (ID SEQ NO:6);
NH₂- Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser-COOH (ID SEQ NO:8) ;
NH₂- Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Lys Thr Ser Leu Lys Ser-COOH (ID SEQ NO:9); y
NH₂- Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val-COOH (ID SEQ NO:10).

55 **4. La composición farmacéutica de la declaración 1, donde el péptido comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia**

X₃₃YYWSWIX₃₄QX₃₅PX₃₆X₃₇GX₃₈EWIG (ID SEQ NO:16)

60 donde X₃₃ es Gly o Thr Gly; X₃₄ es Arg o Lys; X₃₅ es Pro o Ser; X₃₆ es Gly o Glu; X₃₇ es Lys o Asp; y X₃₈ es Glu, Leu o Ser.

5. La composición farmacéutica de cualquiera de las declaraciones 1-4, donde el péptido es SEQ ID NO.6.

6. La composición farmacéutica de cualquiera de las declaraciones 1-5, donde la β -ciclodextrina es una hidroxipropil, sulfobutiléter o sulfopropiléter β -ciclodextrina sustituida.
7. La composición farmacéutica de la declaración 16, donde la β -ciclodextrina sustituida es una sulfobutiléter β -ciclodextrina sustituida.
8. La composición farmacéutica de cualquiera de las declaraciones 1-7, donde el péptido en solución es al menos 1 mg/ml.
9. La composición farmacéutica de cualquiera de las declaraciones 1-7, donde el péptido en solución es al menos
10. La composición farmacéutica de cualquiera de las declaraciones 1-9, donde la composición tiene un pH entre 6.5 y 8.5.
11. La composición farmacéutica de la declaración 10, donde la composición tiene un pH entre 7.5 y 8.5.
12. La composición farmacéutica de cualquiera de las declaraciones 1-11, donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de acetato.
13. La composición farmacéutica de la declaración 1, donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de acetato, y la β -ciclodextrina sustituida es hepta-(sulfobutil éter)- β -ciclodextrina.
14. Un proceso para elaborar la composición farmacéutica de cualquiera de las declaraciones 1-13 comprendiendo los pasos de:
- preparar una solución de β -ciclodextrina sustituida en un portador acuoso a una concentración predeterminada;
 - añadir una cantidad predeterminada de una sal farmacéuticamente aceptable de un péptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia
 - TGYYX₁X₂X₃X₄X₅QSPEKSLEWIG (SEQ ID NO:11) donde X₁ es Met, Ala o Val; X₂ es Gln, Asp, Glu o Arg; X₃ es Trp o Ala; X₄ es Val o Ser; y X₅ es Lys, Glu o Ala;
 - EINPSTGGX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂KAKAT (SEQ ID NO:12) donde X₆ y X₇ son cada uno Thr, Val o Ala; X₈ es Tyr o Phe; X₉ es Asn o Asp; X₁₀ es Gln o Glu; X₁₁ es Lys o Glu, y X₁₂ es Phe o Tyr;
 - YYCARX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆PYAX₁₇X₁₈YWGQGS (SEQ ID NO:13) donde X₁₃ es Phe, Thr o Gly; X₁₄ es Leu, Ala o Ser; X₁₅ es Trp o Ala; X₁₆ es Glu o Lys; X₁₇ es Met o Ala, y X₁₈ es Asp, Lys o Ser;
 - GYNX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄SHGX₂₅X₂₆LEWIG (SEQ ID NO:14) donde X₁₉ es Met o Ala; X₂₀ es Asn, Asp o Arg; X₂₁ es Trp o Ala; X₂₂ es Val o Ser; X₂₃ es Lys o Glu; X₂₄ es Gln o Ala; X₂₅ es Lys o Glu, y X₂₆ es Ser o Ala;
 - YYCARX₂₇X₂₈X₂₉YGX₃₀X₃₁X₃₂GQTL (SEQ ID NO:15) donde X₂₇ es Ser o Phe; X₂₈ es Gly o Ala; X₂₉ es Arg, Ala o Glu; X₃₀ es Asn o Asp; X₃₁ es Tyr o Phe, y X₃₂ es Trp, His o Ala;
 - X₃₃YYWSWIX₃₄QX₃₅PX₃₆X₃₇GX₃₈EWIG (SEQ ID NO:16) donde X₃₃ es Gly o Thr Gly; X₃₄ es Arg o Lys; X₃₅ es Pro o Ser; X₃₆ es Gly o Glu; X₃₇ es Lys o Asp; y X₃₈ es Glu, Leu o Ser;
 - FSGYYWS (SEQ ID NO:8);
 - EINHSGSTNYKTSLS (SEQ ID NO:9); o
 - GLLRGGWNDVDYGGMDV (SEQ ID NO:10),
 - ajustando el pH de la solución del paso b) hasta que el péptido se disuelve en la solución; y
 - si es necesario, ajustando el pH de la solución del paso c) a un pH de 4-9, elaborando así la composición farmacéutica.
15. El proceso de la declaración 14, donde la cantidad predeterminada de péptido es tal que resulta en una concentración final de péptido en la composición farmacéutica de 2.5mg/ml, 2.0mg/ml, 1.0mg/ml, 0.5 mg/ml o 0.1 mg/ml.
16. El proceso de cualquiera de las declaraciones 14 o 15, donde el paso b) comprende mezclar la solución por 1 hora.
17. El proceso de cualquiera de las declaraciones 4-16, donde en el paso c) el pH se ajusta usando HCl o

NaOH 1.0N.

5 **18.** El proceso de cualquiera de las declaraciones 14-17, comprendiendo filtrar la solución del paso d) a través de un filtro de acetato de celulosa.

19. Un proceso de liofilización de la composición farmacéutica de cualquiera de las declaraciones 1-13 comprendiendo los pasos de:

- 10 a) disminuir la temperatura de la composición farmacéutica a -40°C;
b) mantener la temperatura a -40°C por un tiempo predeterminado;
c) elevar la temperatura de la solución a 20°C;
d) mantener la temperatura a 20°C por un tiempo predeterminado; y
15 e) reducir la presión y mantener la temperatura a 20°C por un tiempo predeterminado, liofilizando así la composición farmacéutica.

20. El proceso de la declaración 19, donde

- 20 el paso a) se realiza en 2 horas;
el paso b) se realiza en 3 horas;
el paso c) se realiza en 13 horas y a una presión de 110µbar;
el paso d) se realiza en 13 horas y a una presión de 110µbar; y
el paso e) se realiza en 5 horas y la presión se reduce a 10µbar.

25 **21.** Un proceso de liofilización de la composición farmacéutica de cualquiera de las declaraciones 1-13 comprendiendo los pasos de:

- 30 a) disminuir la temperatura de la composición farmacéutica a -45°C;
b) mantener la temperatura a -45°C por un tiempo predeterminado;
c) elevar la temperatura de la solución a -20°C;
d) elevar la temperatura de la solución a 25°C; y
e) mantener la temperatura a 25°C por un tiempo predeterminado, liofilizando así la composición farmacéutica.

35 **22.** El proceso de la declaración 21, donde

- 40 el paso a) se realiza en 6 horas;
el paso b) se realiza en 3 horas;
el paso c) se realiza en 19 horas y a una presión de 150µbar;
el paso d) se realiza en 13 horas y a una presión de 150µbar; y
el paso e) se realiza en 8 horas y a una presión de 150µbar.

23. Una composición farmacéutica liofilizada preparada por el proceso de cualquiera de las declaraciones 19-22.

45 **24.** La composición farmacéutica liofilizada de la declaración 23, donde el contenido de agua de la composición es menor de 5%.

25. La composición farmacéutica liofilizada de la declaración 24, donde el contenido de agua de la composición es menor de 4.0%.

50 **26.** La composición farmacéutica liofilizada de la declaración 25, donde el contenido de agua de la composición es menor de 3.5%.

55 **27.** El uso de la composición farmacéutica de cualquiera de las composiciones farmacéuticas 1-13 o 23-26 en la fabricación de un medicamento para aliviar los síntomas del lupus eritematoso sistémico (SLE) en un ser humano.

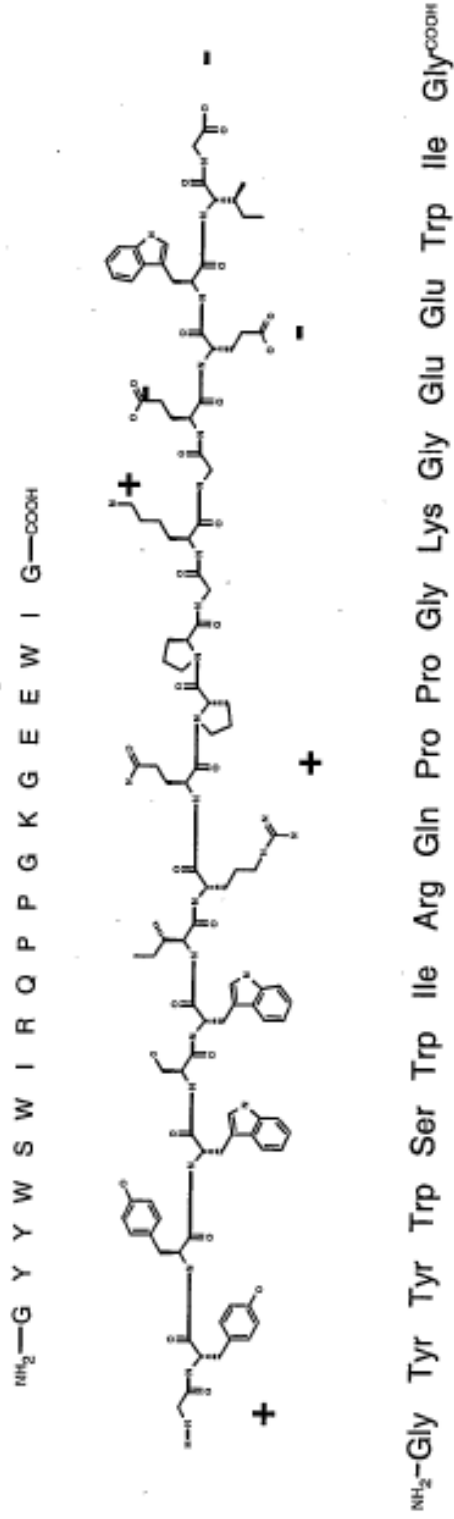
28. La composición farmacéutica de cualquiera de las declaraciones 1-13 o 23-26 para su uso tratando el SLE en un ser humano.

60 **29.** Una composición farmacéutica empaquetada que comprende:

- un material de empaçado; y
una cantidad predeterminada de la composición farmacéutica liofilizada de la declaración 23.

65

Figura 1



Peso Molecular = 2309.59

Massa Exacta = 2307

Fórmula molecular=C₁₁₁H₁₄₉N₂₇O₂₈

Composición molecular=C 57.73% H 6.50% N 16.37% O 19.40%

Ácido acético a ser añadido : CH₃CO₂H = C₂H₄O₂

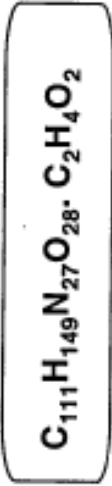


Figura 2

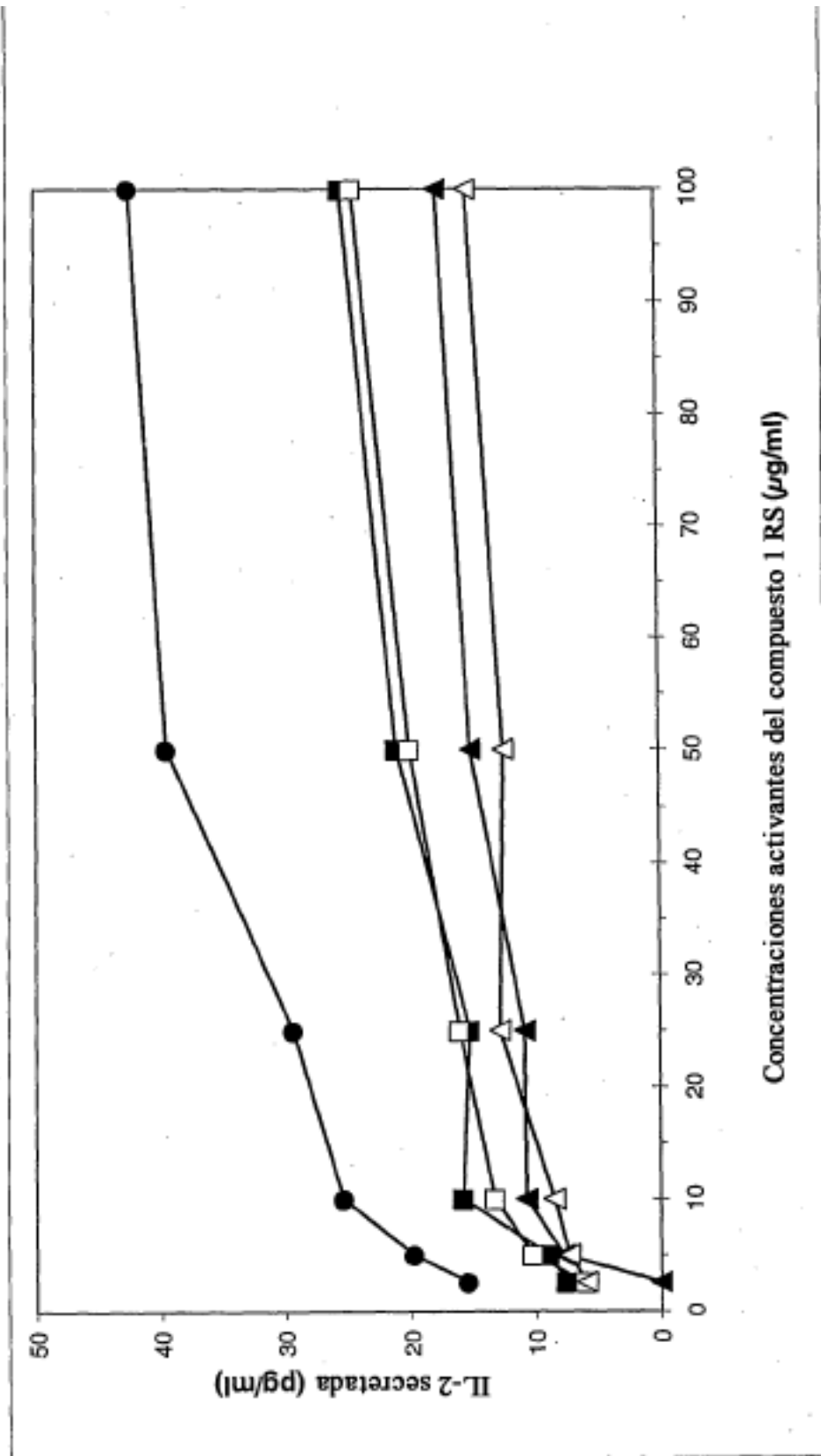


Figura 3

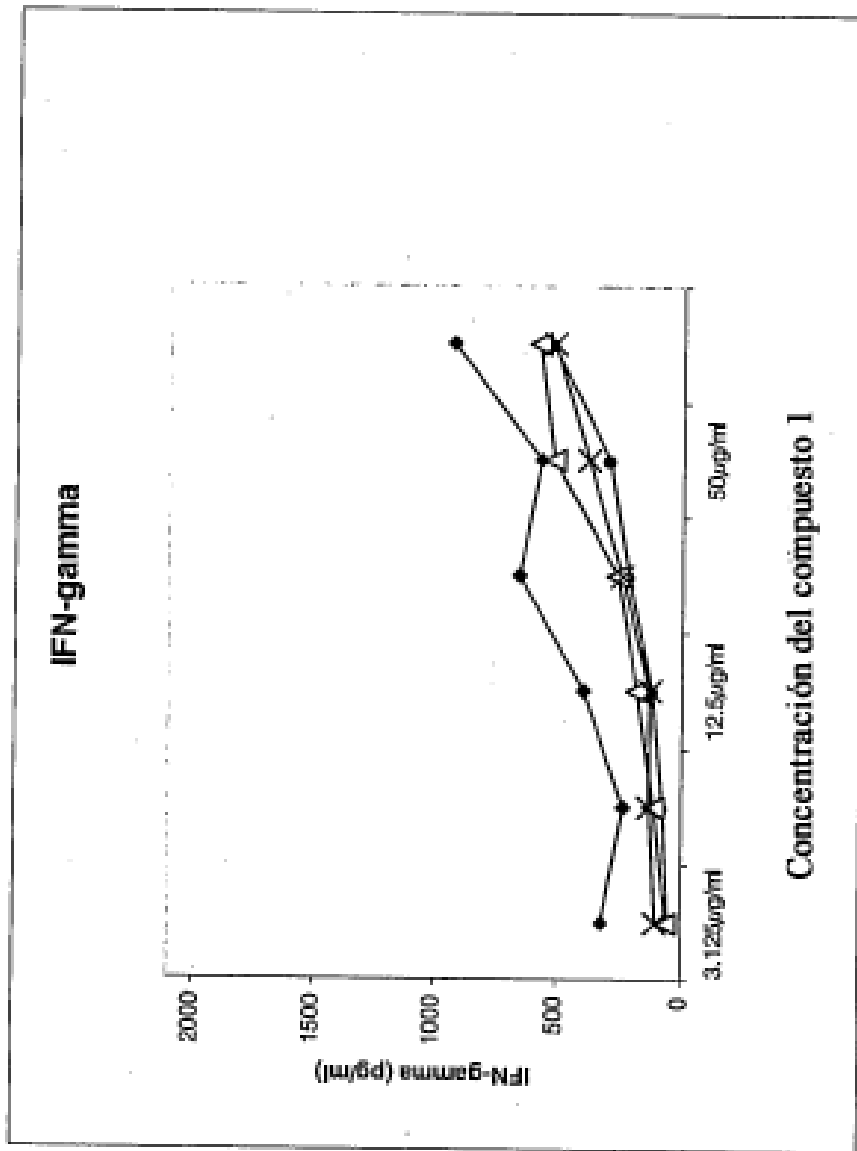


Figura 4

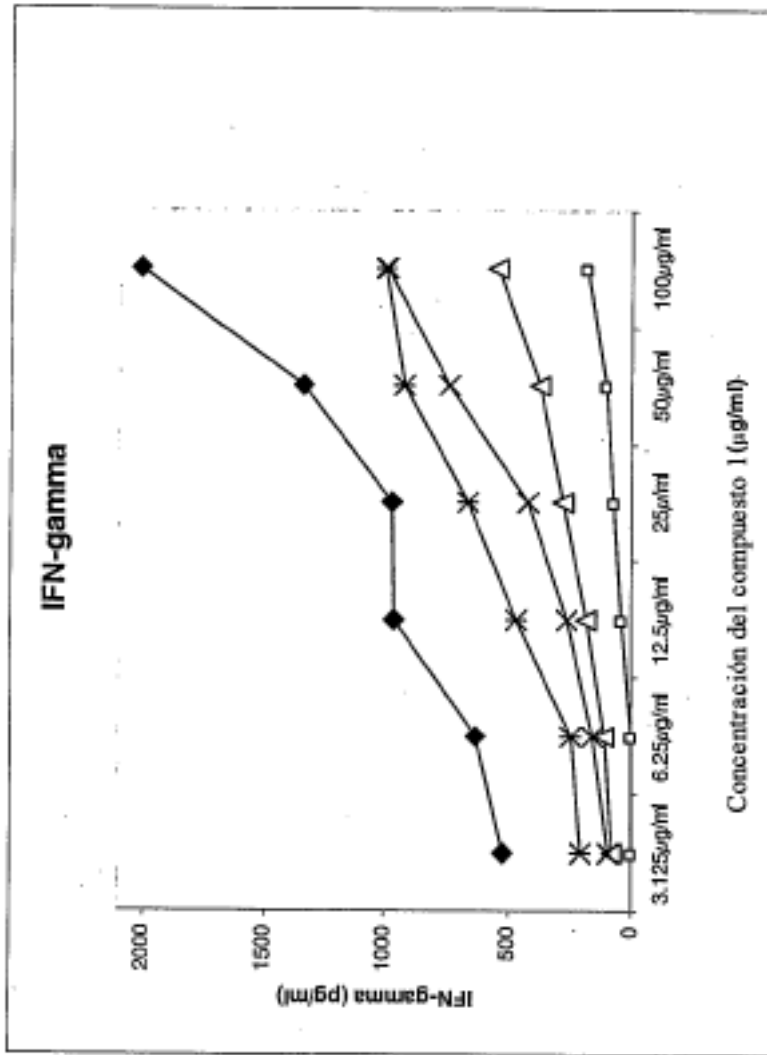


Figura 5

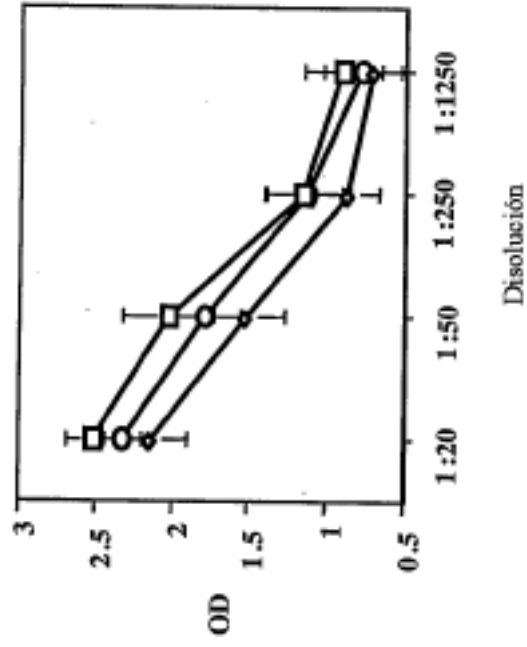


Figura 6

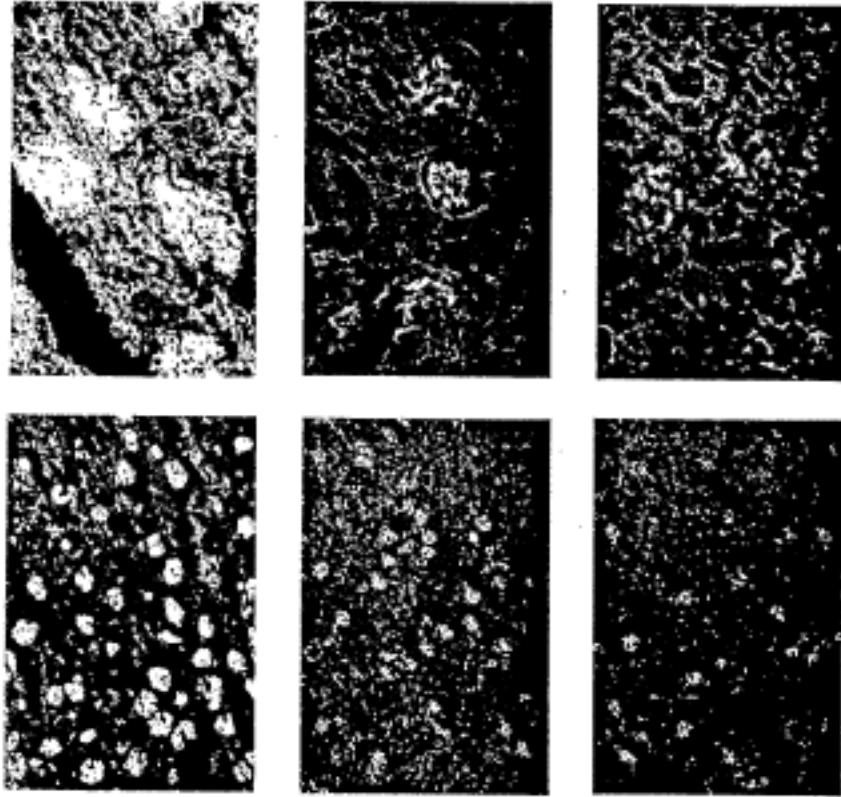
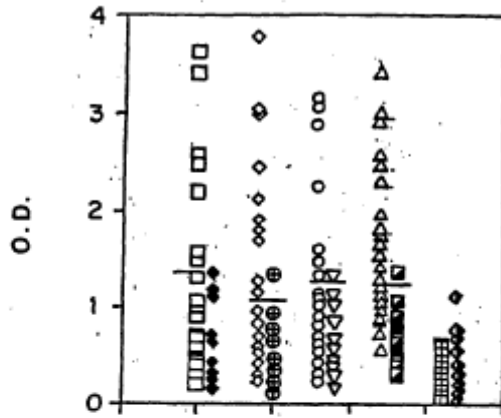


Fig. 7



- 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

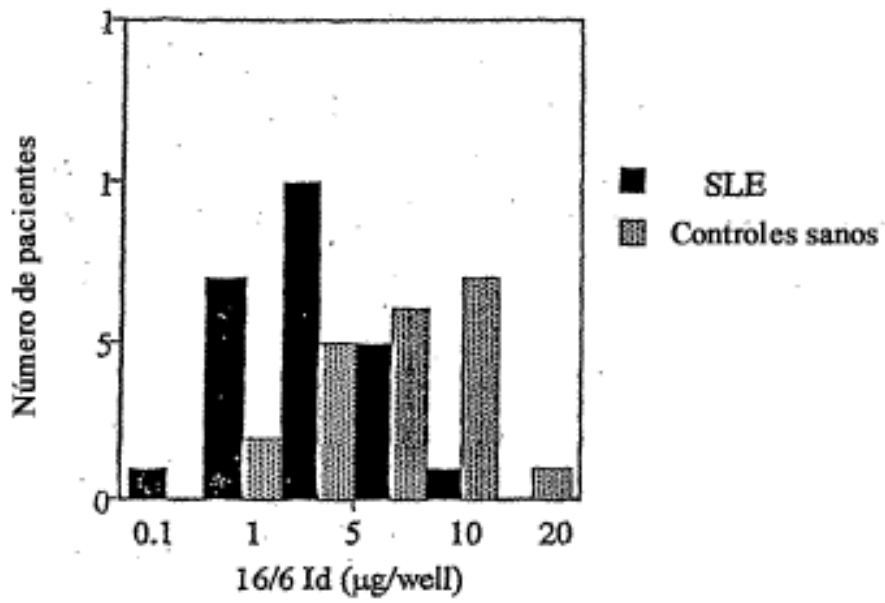


Fig. 8

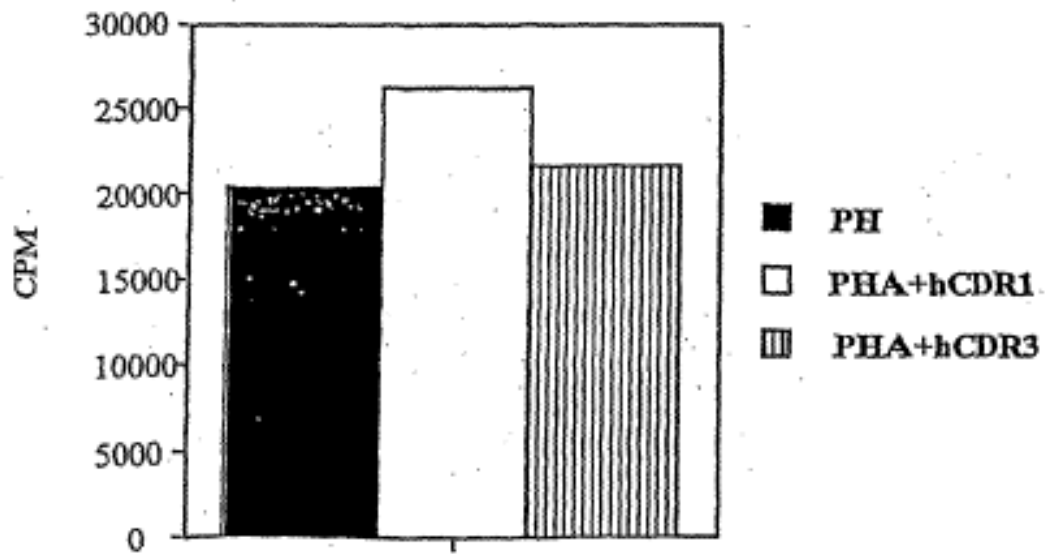


Fig. 9

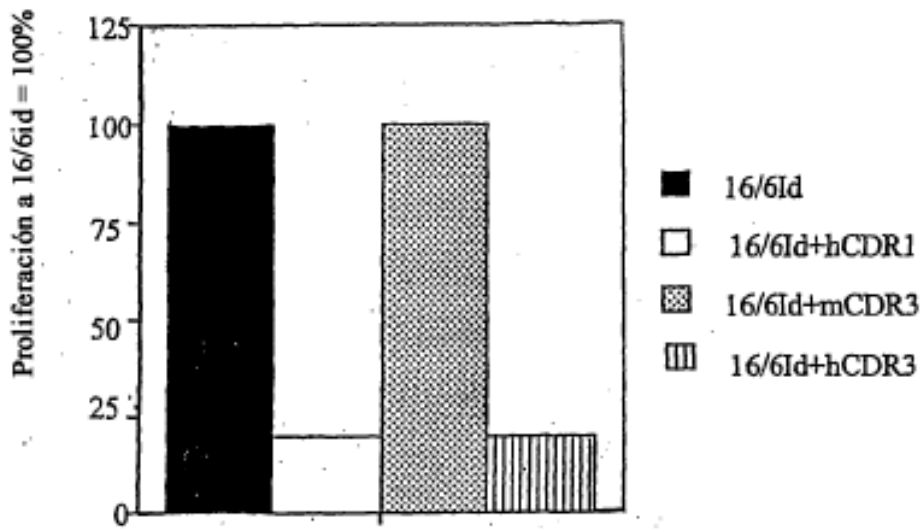


Fig. 10

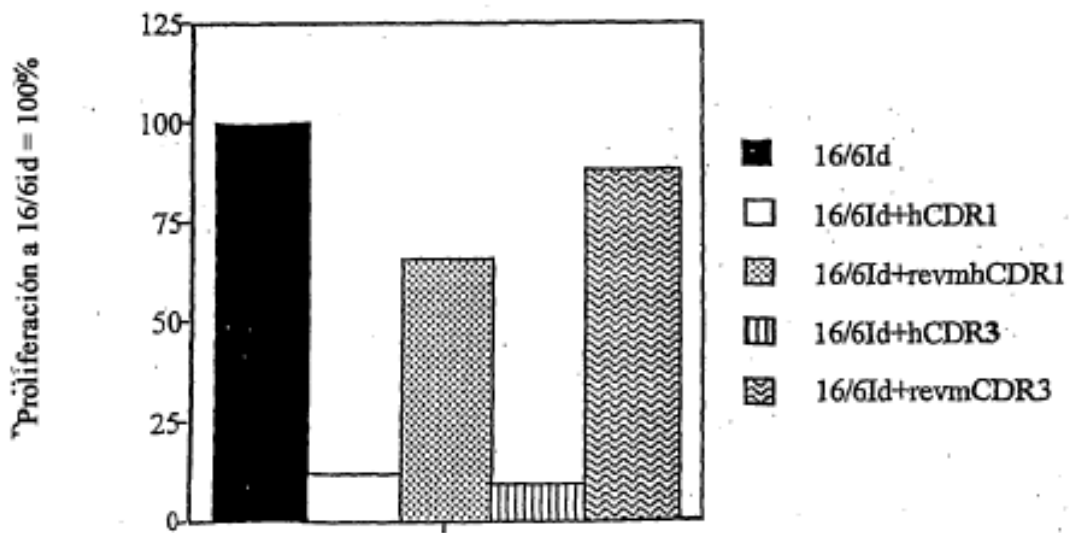


Fig. 11

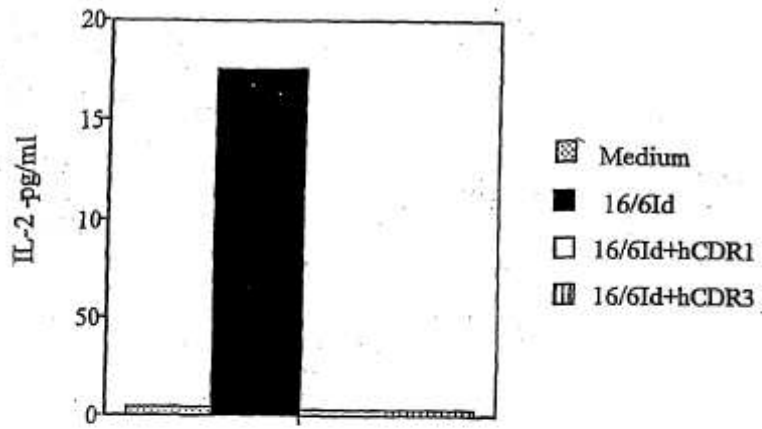


Fig. 12

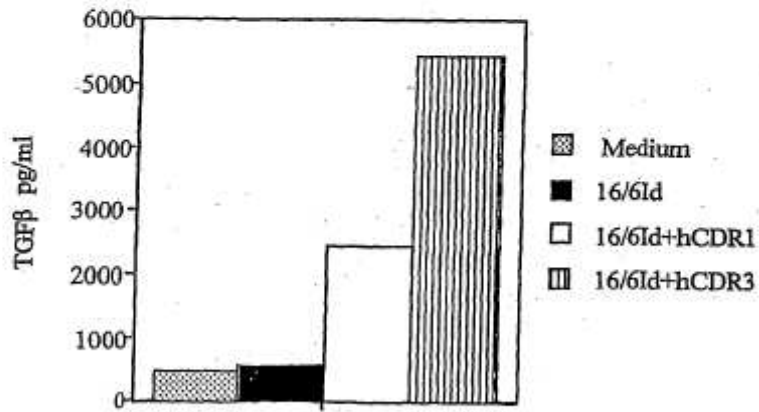


Fig. 13

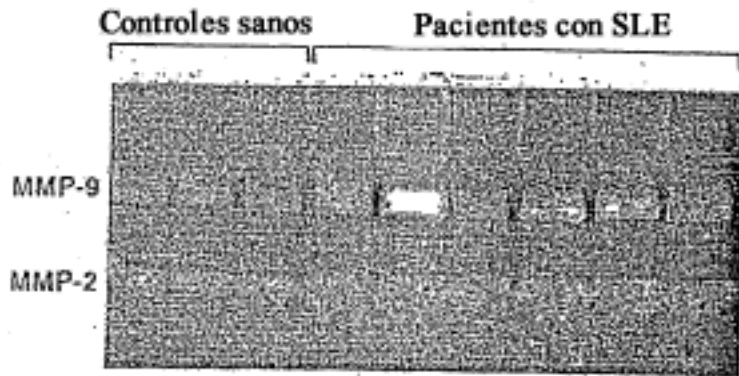


Fig. 14

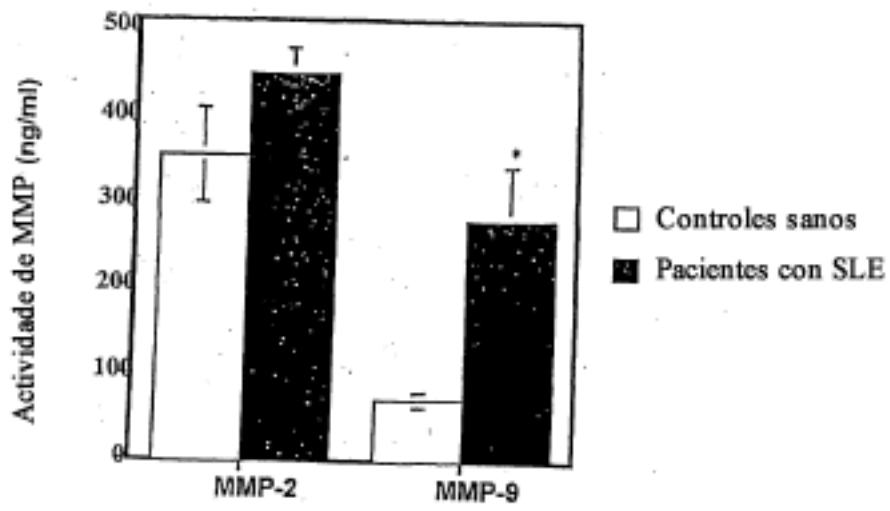


Fig. 15

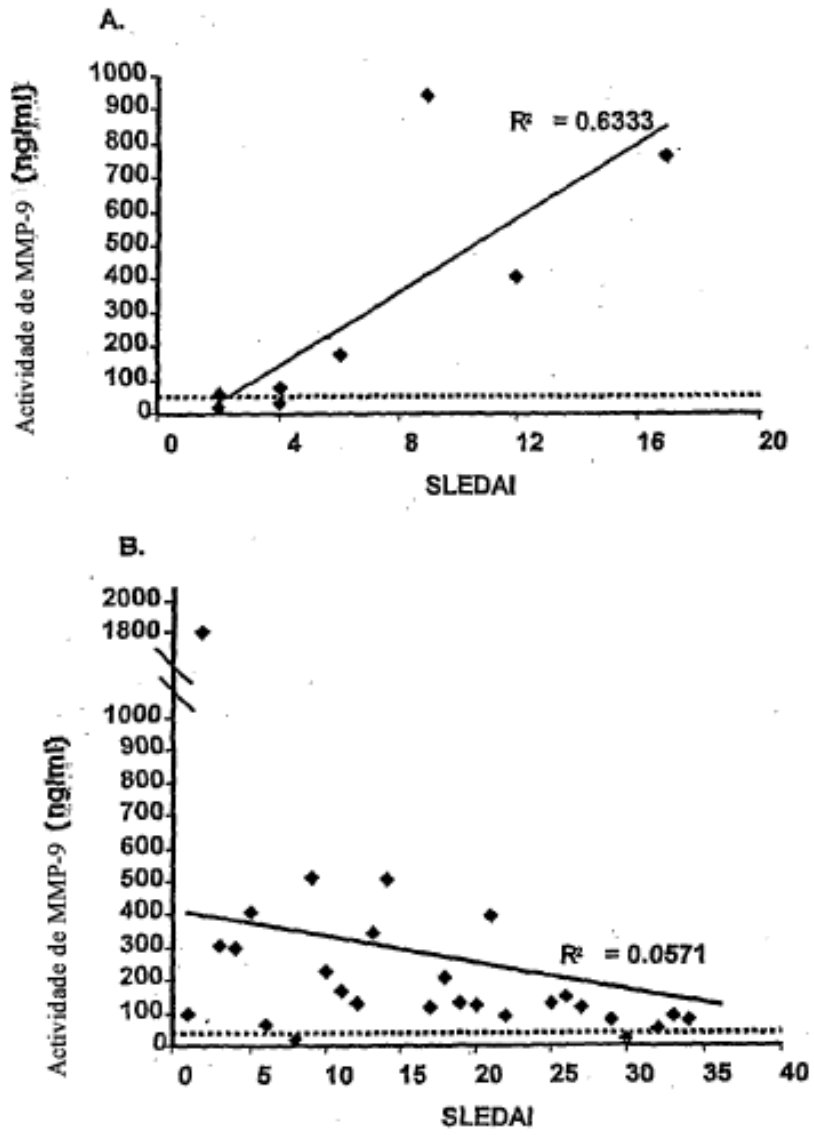


Fig. 16

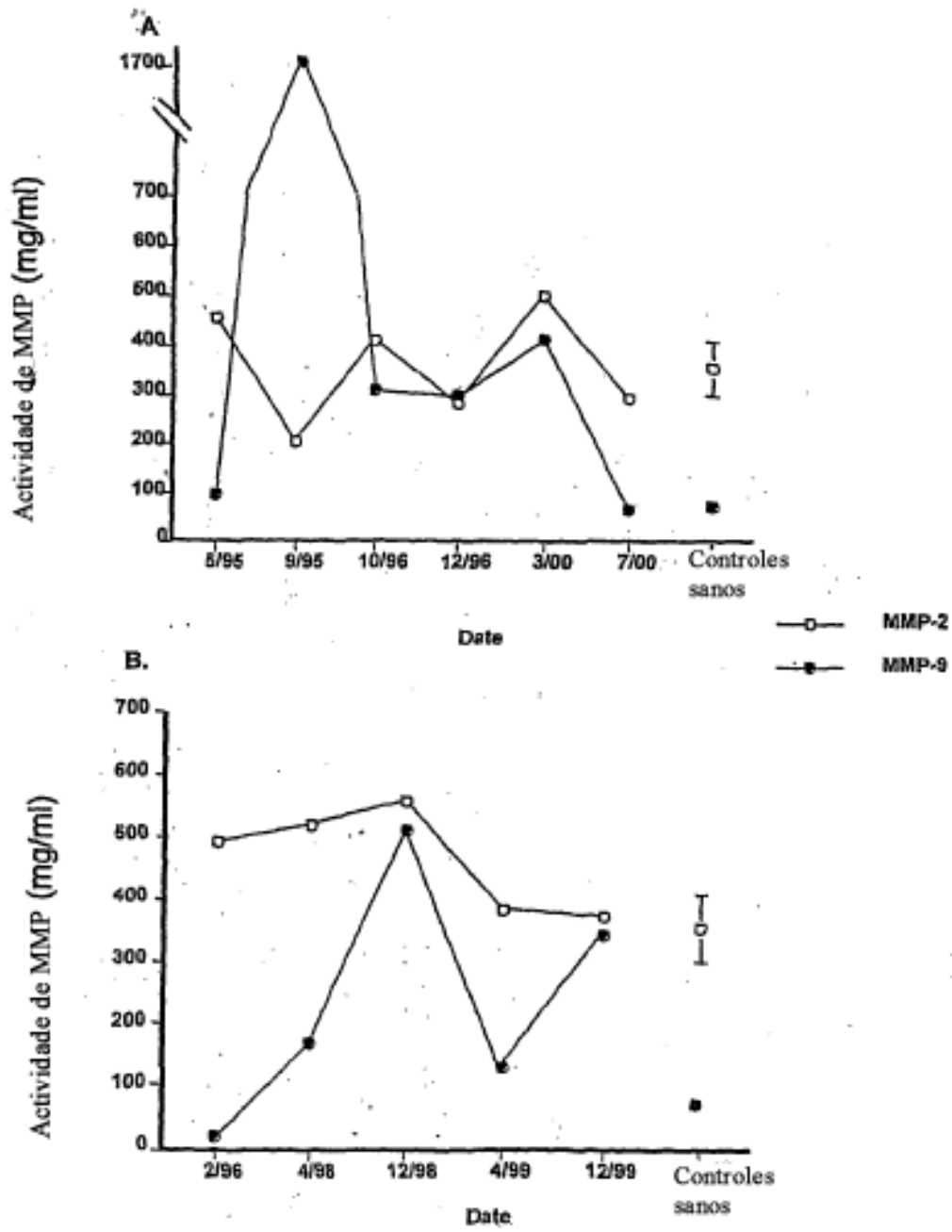


Fig. 17