

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 085**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/20</b>	(2006.01)	<b>C07K 14/52</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/02</b>	(2006.01)	<b>C07K 14/55</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 3/10</b>	(2006.01)		
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)		
<b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)		
<b>A61Q 5/00</b>	(2006.01)		
<b>C07K 7/06</b>	(2006.01)		
<b>C07K 7/08</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2012** **E 19206731 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024** **EP 3636274**

54 Título: **Composiciones para modular la actividad de citoquinas yc**

30 Prioridad:

**18.01.2011 US 201161433890 P**  
**24.08.2011 US 201161527049 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**25.11.2024**

73 Titular/es:

**BIONIZ THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**2223 Avenida de la Playa Suite 105**  
**La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**TAGAYA, YUTAKA y**  
**AZIMI, NAZLI**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

Observaciones:

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

ES 2 989 085 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones para modular la actividad de citoquinas yc

## CAMPO DE LA INVENCION

Las presentes realizaciones se refieren a antagonistas peptídicos de las citoquinas de la familia yc, un grupo de citoquinas de mamíferos que son producidas principalmente por células epiteliales, estromales e inmunitarias y que controlan la activación normal y patológica de una serie diversa de linfocitos. Las presentes realizaciones también se refieren a los usos terapéuticos de péptidos de este tipo para el tratamiento de determinadas enfermedades humanas. Las presentes realizaciones también se refieren a las aplicaciones cosmeceúticas de péptidos de este tipo. Se describe la descripción de enfermedades diana, aplicaciones cosmeceúticas, así como métodos de administración, producción y comercialización de los péptidos.

## ANTECEDENTES

Las citoquinas son un grupo diverso de factores solubles que median en diversas funciones celulares, tales como el crecimiento, la diferenciación funcional y la promoción o prevención de la muerte celular programada (muerte celular apoptótica). Las citoquinas, a diferencia de las hormonas, no son producidas por tejidos glandulares especializados, sino que pueden ser producidas por una amplia diversidad de tipos de células tales como las células epiteliales, estromales o inmunitarias.

Hasta ahora se han identificado más de 100 citoquinas y se considera que se han desarrollado por medio de duplicaciones genéticas a partir de una agrupación de genes primordiales (véase Bazan, J.F. 1990, Immunol. Today 11:350-354). En apoyo de esta opinión, es común que un grupo de citoquinas comparta un componente en su sistema de receptores de múltiples subunidades. La subunidad de citoquina compartida mejor documentada en las células T es la subunidad  $\gamma$  común (subunidad yc). La subunidad yc es compartida por 6 citoquinas conocidas (interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-7 (IL-7), interleuquina-9 (IL-9), interleuquina-15 (IL-15) e interleuquina-21 (IL-21), denominadas colectivamente "citoquinas yc" o "citoquinas de la familia yc") y desempeña un papel indispensable en la transducción de señales de activación celular para todas estas citoquinas. Además, para cada una de las citoquinas yc, hay una o dos subunidades receptoras específicas para citoquinas privadas que, cuando forman complejo con la subunidad yc, dan lugar a un receptor completamente funcional. (Véase Rochman et al., 2009, Nat Rev Immunol. 9: 480-90.)

Las citoquinas de la familia yc son un grupo de citoquinas de mamíferos que son producidas principalmente por células epiteliales, estromales e inmunitarias y controlan la activación normal y patológica de una amplia variedad de linfocitos. Estas citoquinas son de vital importancia para el desarrollo temprano de las células T en el timo, así como para su homeostasis en la periferia. Por ejemplo, en ausencia de la subunidad yc, las células T, B y NK no se desarrollan en ratones. (Véase Sugamura et al., 1996, Annu. Rev. Immunol 14:179-205).

**Patologías Asociadas a las Citoquinas yc**

Estudios recientes han indicado que la desregulación de la expresión y la disfunción de las citoquinas yc podrían conducir a una amplia diversidad de enfermedades inmunológicas y hematopoyéticas humanas.

**IL-2**

Si bien históricamente se consideró que IL-2 era un factor de crecimiento de células T prototipo, la generación de un ratón transgénico que carecía de expresión de IL-2 reveló que IL-2 no es crítica para el crecimiento o el desarrollo de células T convencionales in vivo. Sin embargo, la sobre-expresión de IL-2 conduce a una expansión preferencial de un subconjunto de células T; las células T reguladoras (T-regs). (Véase Antony et al., 2006, J. Immunol. 176:5255-66.) Las T-regs suprimen las respuestas inmunitarias de otras células y, por lo tanto, actúan para mantener la tolerancia periférica (revisado en Sakaguchi et al., 2008, Cell 133:775-87). Se cree que la ruptura de la tolerancia periférica provoca enfermedades autoinmunes en los seres humanos. Por lo tanto, se cree que la función inmunosupresora de las T-regs previene el desarrollo de enfermedades autoinmunes (véase Sakaguchi et al., 2008, Cell 133:775-87). Las T-regs también se han relacionado con el cáncer, en que los tumores sólidos y las neoplasias hematológicas se han asociado con un número elevado de T-regs (véase De Rezende et al., 2010, Arch. Immunol. Ther. Exp. 58:179-190).

**IL-4**

La IL-4 es una citoquina no redundante implicada en la diferenciación de células T auxiliares en el subconjunto Th2 (células T auxiliares de tipo 2), lo que fomenta la diferenciación de las células B prematuras en células plasmáticas productoras de IgE. Los niveles de IgE están elevados en el asma alérgico. Por lo tanto, la IL-4 está implicada en el desarrollo del asma alérgico. Anticuerpos que fijan como objetivo IL-4 se pueden utilizar para tratar o incluso prevenir la aparición del asma alérgico. (Véase Le Buanec et al., 2007, Vaccine 25:7206-16.)

## IL-7

La IL-7 es esencial para el desarrollo de las células B y el desarrollo temprano de células T en el timo. En ratones, la expresión anormal de IL-7 provoca leucemia asociada a las células T. (Véase Fisher et al., 1993, *Leukemia* 2:S66-68.) Sin embargo, en los seres humanos, la regulación incorrecta de IL-7 no parece provocar leucemia asociada a las células T. En seres humanos, la regulación positiva de IL-7, ya sea sola o en combinación con otro miembro de la familia de las citoquinas yc, IL-15, se ha relacionado con la leucemia de linfocitos grandes granulares (LGL, por sus siglas en inglés).

## IL-9

El papel de IL-9 aún no está muy bien caracterizado en comparación con otros miembros de la familia de citoquinas yc. Los ratones en los que se ha eliminado el gen IL-9 parecen normales y no carecen de subconjunto de células alguno en los compartimientos linfoides y hematopoyético. Sin embargo, estudios recientes revelan un papel in vivo de IL-9 en la generación de células Th17 (células T auxiliares inducidas por interleuquina-17) (Véase Littman et al., 2010, *Cell* 140(6):845-58; y Nowak et al., 2009, *J. Exp. Med.* 206: 1653-60).

## IL-15

IL-15 está críticamente implicada en el desarrollo de células NK, células NK-T, algunos subconjuntos de linfocitos intraepiteliales (IELs, por sus siglas en inglés), células  $\gamma\delta$ -T y células T CD8 de fenotipo de memoria (Véase Waldmann, 2007, *J. Clin. Immunol.* 27:1-18; y Tagaya et al., 1996, *EMBO J.* 15:4928-39.) La sobre-expresión de IL-15 en ratones conduce al desarrollo de leucemia de células T de tipo NK-T y CD8 (Véase Fehniger et al., 2001, *J. Exp. Med.* 193:219-31; Sato et al. 2011 *Blood* en prensa). Estas leucemias inducidas experimentalmente parecen similares a la leucemia LGL (linfocito grande granular) en seres humanos, ya que en ambos casos las células leucémicas expresan el antígeno CD 8.

También se sospecha que los mecanismos autocrinos mediados por IL-15 pueden estar implicados en la transformación leucémica de los linfocitos T CD4. (Véase Azimi et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2452-7; Azimi et al., 1999, *J. Immunol.* 163:4064-72; Azimi et al., 2000, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16:1717-22; y Azimi et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:14559-64). Por ejemplo, el HTLV-1 CD4-trópico, que provoca leucemia de células T adultas en seres humanos, induce el crecimiento autocrino de células T transformadas por el virus a través de la producción de IL-15 e IL-15R $\alpha$  (Azimi et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2452-7).

Además de la transformación leucémica, estudios recientes implican a la IL-15 en el desarrollo patológico de la enfermedad celíaca (CD, por sus siglas en inglés), una enfermedad autoinmune. Se sabe que la IL-15 estimula la diferenciación de las células NK, CD8 y de los linfocitos intraepiteliales intestinales (IEL, por sus siglas en inglés) en células asesinas activadas por linfocinas (LAK, por sus siglas en inglés) al inducir la expresión de enzimas citolíticas (es decir, granzima y perforina) así como de interferón- $\gamma$ . La enfermedad celíaca (denominada CD en adelante) es una enteropatía inmunomediada que se desencadena por el consumo de alimentos que contienen gluten en individuos que expresan alelos HLA-DQ específicos. La prevalencia de esta enfermedad es del 1 % en la población occidental. El único tratamiento actual para la CD es la eliminación completa del gluten de la dieta del paciente. La patología de la CD es provocada principalmente por un daño extenso a la mucosa intestinal, que es causado por células T CD8 activadas que se han infiltrado en la lámina propia intestinal. Estas células T CD8 parecen activarse a través de mecanismos que implican a la IL-15. Una publicación reciente demostró en ratones que la sobre-expresión ectópica de IL-15 por los enterocitos conduce al desarrollo de enteropatía, que se asemeja mucho a las lesiones en pacientes con CD. La neutralización de la actividad de IL-15 disminuyó drásticamente los cambios patológicos. Por lo tanto, una intervención que bloquee la activación de las células T CD8 por parte de IL-15 parece proporcionar una estrategia alternativa para la gestión de la CD a la dieta convencional sin gluten.

## IL-21

La IL-21 es el miembro más recientemente descubierto de la familia yc. A diferencia de otros miembros de la familia, la IL-21 no parece tener efectos potentes de fomento del crecimiento. En cambio, se cree que IL-21 funciona más como un factor de diferenciación que como un factor que controla la proliferación celular (véase Tagaya, 2010, *J. Leuk. Biol.* 87:13-15).

## Estrategias Actuales para el Tratamiento de Trastornos Mediados por la Citoquina yc

Debido a que se piensa que las citoquinas yc están implicadas en numerosas enfermedades humanas, se han propuesto varios métodos para tratar enfermedades implicadas en las citoquinas yc inhibiendo las actividades de la familia de las citoquinas yc. Estos métodos incluyen el uso de anticuerpos monoclonales específicos para citoquinas para neutralizar la actividad de la citoquina diana in vivo; el uso de anticuerpos monoclonales que fijan como objetivo las subunidades receptoras específicas para citoquinas privadas (subunidades distintas de la subunidad yc compartida) para inhibir selectivamente la actividad de las citoquinas; y el uso de inhibidores químicos

que bloquean la vía de transducción de señales de citoquinas intracelulares aguas abajo. Si bien los anticuerpos específicos para citoquinas son a menudo la primera opción al diseñar agentes terapéuticos, las citoquinas que comparten componentes receptores muestran funciones solapantes (Véase Paul, W.E., 1989, Cell 57:521-24) y más de una citoquina puede cooperar para provocar una enfermedad (véase el ejemplo descrito más adelante). Por lo tanto, los enfoques que implican la neutralización de una sola citoquina pueden no ser eficaces en el tratamiento de enfermedades humanas implicadas en las citoquinas.

También se han propuesto estrategias para diseñar terapias que inhiban la función de múltiples citoquinas a través de anticuerpos que reconocen un componente receptor compartido. Sin embargo, la naturaleza de múltiples subunidades de los sistemas de receptores de citoquinas y el hecho de que los receptores funcionales para una sola citoquina pueden asumir diferentes configuraciones dificultan este enfoque. Por ejemplo, un receptor de IL-15 funcional puede ser IL-15R $\beta$ /yc o IL-15R $\alpha$ / $\beta$ /yc. (Véase Dubois et al., 2002, Immunity 17:537-47.) Un anticuerpo contra el receptor de IL-15R $\beta$  (TM $\beta$ 1) es un inhibidor eficaz de la función de IL-15, pero solo cuando la molécula IL-15R $\alpha$  está ausente del complejo receptor. (Véase Tanaka et al., 1991, J. Immunol. 147:2222-28.) Por lo tanto, la eficacia de un anticuerpo anti-receptor monoclonal, ya sea generado contra una subunidad compartida o privada, puede depender del contexto y es impredecible in vivo.

Aunque el uso clínico de anticuerpos monoclonales contra factores biológicamente activos o receptores asociados con la patogénesis de enfermedades es una práctica establecida, existen pocas demostraciones de resultados exitosos. Además, el establecimiento de un tratamiento con anticuerpos monoclonales clínicamente adecuado es un proceso largo y difícil, y la generación exitosa de un anticuerpo neutralizante es en gran medida una cuestión de suerte. Por ejemplo, debido a la importancia crítica de la subunidad yc en la mediación de la señalización por parte de las citoquinas de la familia yc, se han realizado muchos intentos de generar anticuerpos policlonales y monoclonales contra la subunidad yc y existen muchos anticuerpos comerciales que reconocen la subunidad yc en ratones y en seres humanos. Sin embargo, curiosamente, ninguno de estos anticuerpos anti-subunidad yc bloquea la función de las citoquinas yc.

Otro problema con el uso terapéutico de los anticuerpos monoclonales es que los anticuerpos monoclonales se generan habitualmente inmunizando roedores con proteínas humanas, por lo que el anticuerpo generado es una proteína extraña y, por lo tanto, altamente inmunogénica. Para evitar este problema, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal se modifica molecularmente de modo que la molécula de anticuerpo se reconozca como una inmunoglobulina humana (un proceso denominado humanización), pero este proceso requiere tiempo y dinero.

### **La Fijación como Objetivo de JAK3 es un Ejemplo Alternativo Existente para la Inhibición de Múltiples citoquinas yc**

La interacción entre la subunidad yc y una citoquina yc conduce a la activación de una proteína tirosina quinasa intracelular denominada quinasa Janus 3 (Jak3). Jak3, a su vez, fosforila múltiples moléculas de señalización, incluyendo STAT5 y la quinasa PI3. La interacción de la subunidad yc y Jak3 es muy específica. De hecho, no existe otra molécula receptora que reclute a Jak3 para la transducción de señales. (Véase O'Shea, 2004, Ann. Rheum. Dis. 63:(supl. II):ii67-7.) Por lo tanto, la inhibición de la señalización de citoquinas a través de la subunidad yc se puede lograr bloqueando la actividad de la quinasa Jak3. Por consiguiente, se han introducido en el mercado múltiples inhibidores químicos que fijan como objetivo la actividad quinasa de Jak3. (Véase Pesu et al., 2008, Immunol. Rev. 223:132-142.) Un ejemplo de ello es CP690,550.

La principal deficiencia de estos inhibidores de la proteína quinasa es la falta de especificidad para la quinasa Jak3. Estos fármacos interceptan la unión de las moléculas de ATP (adenosina-trifosfato) a la quinasa Jak3, una reacción bioquímica común para muchas proteínas quinasas y, por lo tanto, tienden a bloquear la acción de múltiples proteínas quinasas intracelulares que no están relacionadas con la quinasa Jak3, cuyas acciones son críticamente necesarias para el bienestar de las células normales en diversos tejidos. Por lo tanto, se necesitan inhibidores más específicos de la señalización a través de la subunidad yc.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de una estrategia alternativa para tratar enfermedades implicadas en la citoquina yc.

## **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se define por las reivindicaciones.

La referencia a los métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o métodos de diagnóstico in vivo en los Ejemplos 12, 13 y 14 de esta descripción se han de interpretar como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en esos métodos.

Un aspecto de la invención se refiere a un péptido compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de la caja yc central D/E-F-L-E/Q/N-S/R-X-I/K-X-L/I-X-Q (SEQ ID NO: 2) que es de 11 aminoácidos de longitud, en donde el primer X es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, F y L, el segundo X es un

aminoácido seleccionado del grupo que consiste en H, T, E y S, y el tercer X es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V, F, C, L y M, en donde dicha secuencia de aminoácidos de la caja y central comprende un material compuesto artificial que combina las secuencias de aminoácidos de dos o más de los motivos de la caja y IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 humana y en donde los péptidos compuestos comprenden 19 aminoácidos.

Una realización se refiere a un péptido aislado o purificado, que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de 19 meros I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) (a la que se alude en esta memoria como "BNZ-y" (BNZ-gamma)).

Otra realización, que no forma parte de la invención, se refiere a un método in vitro para bloquear la señalización por uno o más miembros de la familia de citoquinas y, que comprende poner en contacto una célula con un péptido aislado o purificado que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1).

Otra realización, que no forma parte de la invención, se refiere a un método in vitro para bloquear la señalización por uno o más miembros de la familia de citoquinas y, que comprende poner en contacto una célula con un péptido aislado o purificado que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), en donde la célula es una célula inmune.

Otra realización, que no forma parte de la invención, se refiere a un método in vitro para bloquear la señalización por uno o más miembros de la familia de citoquinas y, que comprende poner en contacto una célula con un péptido aislado o purificado que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), en donde el miembro de la familia de citoquinas y se selecciona del grupo que consiste en: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 o IL-21.

Otra realización se refiere a péptidos derivados de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), en donde el péptido derivado tiene propiedades físico-químicas similares al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), pero el péptido derivado tiene una actividad biológica distinta.

Otra realización se refiere a un péptido personalizado, en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado difiere de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) por la sustitución conservadora de uno o más aminoácidos.

Otra realización se refiere a un péptido personalizado, que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de 19 meros I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1).

Otra parte de esta divulgación se refiere a un péptido personalizado en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado difiere de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) al sustituir otro aminoácido polar con la glutamina (Q) en la posición 6.

Otra parte de esta divulgación se refiere a un péptido personalizado en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado difiere de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) por la sustitución de uno o más aminoácidos con propiedades bioquímicas similares a los aminoácidos que comprenden la secuencia I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1).

Otra parte de esta divulgación se refiere a derivados peptídicos personalizados de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S, en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado tiene propiedades físico-químicas similares a un péptido de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), pero tiene una actividad biológica distinta, en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado comparte al menos un 50% de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1).

Otra realización, que no forma parte de la invención, se refiere a una conjugación de un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) con los extremos N, los extremos C y/o con los residuos laterales de proteínas/péptidos biológicos existentes para una administración eficiente y una estabilidad biológica mejorada in vivo. Ejemplos de conjugaciones de este tipo son BSA, albúmina, región Fc de IgG, otras proteínas biológicas que funcionan como armazón, polietilenglicol o (PEG) en diferentes pesos moleculares u otros restos similares.

Otra parte de esta divulgación, que no forma parte de la invención, se refiere a la conjugación de derivados peptídicos personalizados de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) con los extremos N, los extremos C y/o con los residuos laterales de proteínas/péptidos biológicos existentes, en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado tiene propiedades físico-químicas similares a un péptido de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), pero tiene una

actividad biológica distinta, en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado comparte al menos un 50 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1). Ejemplos de conjugaciones de este tipo son albúmina, región Fc de IgG, otras proteínas biológicas que funcionan como armazón o polietilenglicol o (PEG) en diferentes pesos moleculares u otros restos similares.

5

Otra realización, que no forma parte de la invención, se refiere a un método *in vitro* para inhibir la actividad de la citoquina yc, que comprende poner en contacto una citoquina yc con un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1).

10

Otra parte de esta divulgación, que no forma parte de la invención, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales generados contra un péptido inmunogénico que comprende la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1).

15

Otra parte de esta divulgación, que no forma parte de la invención, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales generados contra derivados peptídicos personalizados de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado tiene propiedades físico-químicas similares a un péptido de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), pero tiene una actividad biológica distinta, y en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado comparte al menos un 50 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1).

20

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25

La **Figura 1A** muestra un alineamiento de la región de la hélice D de miembros de la familia de citoquinas yc humanas.

La **Figura 1B** representa los motivos de la caja yc y de la caja IL-2/IL-15 que dan lugar a la secuencia de consenso alrededor de la región de la hélice D de las citoquinas yc.

30

La **Figura 2** muestra una representación diagramática de las propiedades bioquímicas de aminoácidos.

La **Figura 3A** muestra la inhibición de la actividad de IL-2, IL-15 e IL-9 por parte de BNZ-y en un ensayo de proliferación de PT-18.

35

La **Figura 3B** muestra un ensayo de proliferación de células CTTL2 cultivadas en presencia de IL-2 o IL-15 y 0, 0,1, 1 o 10 uM de BNZ-y.

La **Figura 3C** muestra la inhibición de la fosforilación de tirosina mediada por IL-15 de STAT5 por BNZ-y.

40

La **Figura 4A** muestra un ensayo de proliferación de células T *ex vivo* utilizando sangre periférica HAM/TSP. La proliferación de células T es inhibida mediante la adición de BNZ-y.

La **Figura 4B** muestra que la población de células CD4+CD25+ en un ensayo de proliferación de células T *ex vivo* utilizando sangre periférica HAM/TSP disminuye después de añadir BNZ-y al cultivo.

45

La **Figura 4C** muestra que la población de células CD4+Ki67 en un ensayo de proliferación de células T *ex vivo* utilizando sangre periférica HAM/TSP se reduce después de añadir BNZ-y al cultivo.

50

La **Figura 4D** muestra el porcentaje de células vivas mediante tinción de Guava en un ensayo de proliferación de células T *ex vivo* utilizando HAM/TSP. La sangre periférica no se ve afectada después de añadir BNZ-y al cultivo.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

55

### Descripción general

Las citoquinas yc son actores importantes en el desarrollo de las células linfoides que constituyen el sistema inmunológico, particularmente las células T, B y NK. Además, las citoquinas yc han sido implicadas en diversas enfermedades humanas. Por lo tanto, factores que inhiben la actividad de las citoquinas yc proporcionarían herramientas útiles para dilucidar el mecanismo de desarrollo de subconjuntos de linfocitos y para tratar trastornos inmunológicos y enfermedades mediadas por las citoquinas yc.

60

Se sabe que el agotamiento de la línea germinal de los genes que codifican la subunidad yc en ratones o mutaciones de la subunidad yc en seres humanos provocan inmunodeficiencia combinada grave (SCID, por sus siglas en inglés) al alterar la apariencia o función normal de las células NK, T y B. La importancia de la subunidad yc en la transducción de señales de las citoquinas yc, IL-2, -4, -7, -9, -15, -21, se indica en estudios que demuestran

65

la respuesta de los linfocitos de estos ratones y pacientes humanos a las citoquinas yc (revisado en Sugamura et al., 1995 Adv. Immunol 59:225-277). Esto indica que la alteración de la interacción entre la subunidad yc y una citoquina yc bloquearía de manera eficiente los eventos de señalización intracelular por parte de los miembros de la familia de citoquinas yc. Por lo tanto, se espera que los péptidos antagonistas de acuerdo con las presentes realizaciones bloqueen eficazmente los cambios patogénicos en seres humanos que padecen enfermedades mediadas por la desregulación de miembros de la familia de citoquinas yc.

Como alternativa a los enfoques mediados por anticuerpos para modular la actividad de citoquinas yc individuales, la solicitante ha ideado nuevos compuestos de bajo peso molecular denominados en esta memoria "Simul-Block", que suprimen la actividad de múltiples citoquinas yc. Estos compuestos de bajo peso molecular, que incluyen tanto sustancias químicas como péptidos, son menos inmunogénicos que los anticuerpos. Estas propiedades distinguen a Simul-Block como una estrategia más eficiente para mediar en la actividad de las citoquinas yc en intervenciones clínicas.

### **Descubrimiento de la caja yc**

El extremo C (la hélice D) de las citoquinas yc contiene el sitio propuesto para interactuar con la subunidad yc común de los receptores de citoquinas multiunitarias. (Bernard et al., 2004 J. Biol. Chem. 279:24313-21.) La comparación de las propiedades bioquímicas de los aminoácidos de todas las citoquinas yc identificadas en ratones y seres humanos reveló que la naturaleza química de los aminoácidos, por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliidad, naturaleza básica/ácida, se conserva, si no es idéntica, en muchas posiciones en la hélice D en todos los miembros de la familia de citoquinas yc. Por el contrario, la secuencia de IL-13, que está relacionada con la citoquina yc, IL-4, pero que no se une a la subunidad yc, no exhibe una homología significativa en la región de la hélice D con las citoquinas yc, lo que sugiere que la homología de secuencia en la región de la hélice D está correlacionada con la unión a la subunidad yc. Como se muestra en la Figura 1, el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región de la hélice D de los miembros de la familia de las citoquinas yc en seres humanos revela un motivo de homología de secuencia moderada en estas citoquinas, denominado en esta memoria "la caja yc".

La caja yc comprende 19 aminoácidos, en donde de las 19 posiciones, las posiciones 4, 5 y 13 están completamente conservadas como Fenilalanina, Leucina y Asparagina, respectivamente. Se observa una menor conservación en las posiciones 6, 7 y 11 de la caja yc, en donde el aminoácido es uno de dos o tres aminoácidos relacionados que comparten propiedades fisico-químicas: la posición 6 puede estar ocupada por los aminoácidos polares Glutamato, Asparagina o Glutamina; los aminoácidos no polares Serina o Arginina pueden ocupar la posición 7; y la posición 11 está ocupada por cualquiera de los aminoácidos alifáticos no polares Leucina o Isoleucina. Las posiciones 9 y 16 pueden estar ocupadas por el aminoácido no polar Isoleucina o el aminoácido polar Lisina. Véase la Figura 1B. Se observan algunas diferencias en la composición de los aminoácidos de la caja yc en las posiciones 9 y 6 entre las subfamilias de las citoquinas yc. La comparación de las citoquinas yc entre especies indica que la Isoleucina está presente en las posiciones 9 y 6 en la subfamilia IL-2/15, mientras que los otros miembros de la familia yc (p. ej., IL-4, IL-21) poseen Lisina en estas posiciones. Sin desear limitarnos a una teoría en particular, la Isoleucina y la Lisina son bioquímicamente diferentes y, por lo tanto, pueden impartir diferencias conformacionales específicas entre la subfamilia IL-2/15 y otras citoquinas yc.

La conservación del motivo de caja yc entre las citoquinas yc está respaldada por los hallazgos de que un residuo de Asparagina (Asn, Q) situado en la región de la hélice D es crítico para la unión de las citoquinas yc a la subunidad yc. (Bernard et al., 2004 J. Biol. Chem. 279: 24313-21.)

### **Inhibidores Peptídicos de la Actividad de la Citoquina yc**

La actividad de las citoquinas de la familia yc puede bloquearse alterando la interacción entre la citoquina yc y la subunidad yc, por ejemplo introduciendo un inhibidor competitivo que puede interactuar con la subunidad yc sin estimular la señalización a través de los receptores de citoquinas de múltiples subunidades. Sin limitarse a una teoría en particular, el motivo conservado de la caja yc, que participa en la unión de las citoquinas de la familia yc a la subunidad yc, presenta una secuencia de aminoácidos central que puede utilizarse para diseñar inhibidores peptídicos de la señalización de las citoquinas yc.

La secuencia de aminoácidos de la caja yc central comprende: D/E-F-L-E/Q/N-S/R-X-I/K-X-L/I-X-Q (SEQ ID NO: 2) (en que X designa cualquier aminoácido). Las realizaciones descritas en esta memoria se refieren a derivados peptídicos personalizados de la secuencia de aminoácidos de la caja yc central que pueden inhibir la actividad de una o más citoquinas yc. Derivados peptídicos personalizados incluyen cualquier péptido cuya secuencia de aminoácidos parcial muestra aproximadamente un 50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70-80 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,8 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la caja yc central. Los derivados peptídicos personalizados incluyen, además, cualquier péptido en el que una secuencia de aminoácidos parcial de ese derivado peptídico comprende aminoácidos con propiedades fisico-químicas similares a los aminoácidos de la caja yc central. Por ejemplo, los aminoácidos con propiedades fisico-químicas similares incluirían Fenilalanina, Tirosina, Triptófano e Histidina, que son aminoácidos aromáticos. La Figura 2 muestra una representación esquemática de

aminoácidos con propiedades físico-químicas similares que pueden sustituirse con los aminoácidos que comprenden la caja yc central. Los derivados peptídicos de la caja yc central pueden tener una longitud de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50 o más de 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, los derivados peptídicos personalizados pueden conjugarse con los extremos N, los extremos C y/o con los residuos laterales de proteínas/péptidos biológicos existentes.

Basándose en la identificación del motivo conservado de la caja yc en las citoquinas que se unen a la subunidad yc, la solicitante ha ideado un nuevo péptido derivado personalizado de 19 meros que es un péptido compuesto artificial que combina la secuencia de aminoácidos de la caja yc de IL-2 e IL-15 humana. El péptido de 19 meros, denominado en esta memoria BNZ-y, consiste en la secuencia de aminoácidos: **I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S** (SEQ ID NO: 1), en que los aminoácidos representados por caracteres en negrita se conservan entre IL-2 e IL-15 y los aminoácidos subrayados representan posiciones en las que se conservan las propiedades físico-químicas de los aminoácidos.

La solicitante descubrió que el BNZ-y de 19 meros suprime la proliferación celular inducida por IL-15 e IL-19, pero no la proliferación celular inducida por IL-2 o IL-4. Véase la Figura 3A y el Ejemplo 2. La solicitante demostró, además, que BNZ-y inhibe la fosforilación mediada por IL-15 de la molécula de transducción de señales de citoquinas intracelulares, STAT-5. Véanse la Figura 3C y el Ejemplo 5. Estos resultados demuestran que los derivados peptídicos personalizados del motivo caja yc conservado pueden inhibir la actividad de múltiples citoquinas yc.

Varias partes de la divulgación se refieren a péptidos derivados personalizados de la secuencia de aminoácidos BNZ-y de 19 meros, I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), que pueden inhibir la actividad de una o más citoquinas yc. Derivados peptídicos personalizados de la secuencia de aminoácidos BNZ-y de 19 meros incluyen cualquier péptido cuya secuencia parcial de aminoácidos muestra aproximadamente un 50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70-80 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,8 % de identidad con la secuencia de aminoácidos: I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1). Los derivados peptídicos personalizados incluyen, además, cualquier péptido en el que una secuencia de aminoácidos parcial de ese derivado peptídico comprende aminoácidos con propiedades físico-químicas similares a los aminoácidos de secuencia: I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1). En varias partes de la divulgación, los residuos de aminoácidos de los péptidos derivados personalizados conservan propiedades físico-químicas similares a los residuos de aminoácidos de BNZ-y, pero exhiben una especificidad de inhibición biológica diferente para los 6 miembros de la familia de citoquinas yc de la del péptido 19-mero original. Los derivados peptídicos de BNZ-y pueden tener una longitud de 19, 20, 21, 22, 24, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50 o más de 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, los derivados peptídicos personalizados pueden conjugarse con los extremos N, los extremos C y/o con los residuos laterales de proteínas/péptidos biológicos existentes.

Varias partes de esta divulgación se refieren a derivados peptídicos personalizados de los motivos de la caja yc de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 o IL-7, que se representan en la Figura 1A. Otras partes de esta divulgación se refieren a péptidos derivados personalizados que son péptidos compuestos artificiales que combinan la secuencia de aminoácidos de dos o más de los motivos de caja yc humanos de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 e IL-7. Varias partes de esta divulgación se refieren a derivados peptídicos personalizados de los motivos de caja yc de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 o IL-7 que tienen una secuencia de aminoácidos parcial que muestra aproximadamente un 50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70-80 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,8 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de los motivos de caja yc de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 o IL-7. Derivados peptídicos personalizados de los motivos de caja yc de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 o IL-7 incluyen, además, cualquier péptido en el que una secuencia de aminoácidos parcial de ese derivado peptídico comprende aminoácidos con propiedades físico-químicas similares a los aminoácidos de la secuencia de los motivos de caja yc de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 o IL-7.

Varias partes de esta divulgación se refieren a derivados peptídicos personalizados que inhibirían la función de uno, todos o miembros selectivos de las citoquinas yc. En algunas partes de esta divulgación, los derivados peptídicos personalizados se dirigen selectivamente a miembros individuales de la familia de citoquinas yc. Por ejemplo, un derivado peptídico personalizado puede inhibir selectivamente la función de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 o IL-21. En otras partes de esta divulgación, un derivado peptídico personalizado puede inhibir 2 o más miembros de la familia de citoquinas yc. Por ejemplo, los derivados peptídicos personalizados de las presentes partes de esta divulgación pueden inhibir selectivamente la función de IL-2 en combinación con una o más de IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21; IL-4 en combinación con uno o más de IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21; IL-7 en combinación con una o más de IL-9, IL-15 e IL-21; IL-9 en combinación con una o más de IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21; IL-15 en combinación con una o más de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-21; o IL-21 en combinación con una o más de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. En otras partes de esta divulgación, los derivados peptídicos personalizados pueden fijar como objetivo de manera integral a todos los miembros de la familia de citoquinas yc. Sin desear limitarnos a una teoría en particular, los derivados peptídicos personalizados pueden inhibir la función de todos o de miembros selectivos de las citoquinas yc al disminuir la unión de las citoquinas yc a la subunidad yc, por ejemplo, como un inhibidor competitivo. Derivados peptídicos personalizados de este tipo pueden utilizarse en diversas aplicaciones, incluyendo como un fármaco clínico.



Los términos "oligopéptido", "polipéptido", "péptido" y "proteína" se pueden utilizar indistintamente cuando se hace referencia a los derivados peptídicos personalizados proporcionados de acuerdo con las presentes realizaciones y se pueden utilizar para designar una serie de residuos de aminoácidos de cualquier longitud. Los péptidos de acuerdo con las presentes realizaciones también pueden contener aminoácidos no naturales. Elementos de enlazador se pueden unir a los péptidos de las presentes realizaciones a través de enlaces peptídicos o mediante enlaces químicos. Los péptidos de las presentes realizaciones pueden ser lineales o cíclicos, y pueden incluir aminoácidos (D) así como (L). Los péptidos de las presentes realizaciones también pueden contener uno o más aminoácidos raros (tales como 4-hidroxiprolina o hidroxilisina), ácidos orgánicos o amidas y/o derivados de aminoácidos comunes, tales como aminoácidos que tienen el carboxilato C-terminal esterificado (p. ej., éster bencílico, metílico o etílico) o amidado y/o que tienen modificaciones del grupo amino N-terminal (p. ej., acetilación o alcóxicarbonilamino), con o sin cualquiera de una amplia diversidad de modificaciones y/o sustituciones de la cadena lateral (p. ej., metilación, bencilación, t-butilación, tosilación, alcóxicarbonilamino y similares). Residuos distintos de los aminoácidos comunes que pueden estar presentes incluyen, pero no se limitan a penicilamina, tetrametileno cisteína, pentametileno cisteína, ácido mercaptopropiónico, ácido pentametileno-mercaptopropiónico, 2-mercaptopbenceno, 2-mercaptopanilina, 2-mercaptoprolina, ornitina, ácido diaminobutírico, ácido aminoadípico, ácido m-aminometilbenzoico y ácido diaminopropiónico.

Péptidos de las presentes realizaciones se pueden producir y obtener mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el péptido se puede producir mediante ingeniería genética, basándose en la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de las presentes realizaciones, o se puede sintetizar químicamente mediante síntesis de péptidos en fase sólida y similares, o puede producirse y obtenerse en su combinación. Un experto en la técnica puede sintetizar los derivados peptídicos personalizados basándose en la presente divulgación del motivo de caja yc conservado y el conocimiento de las propiedades bioquímicas de los aminoácidos como se describe en la Figura 2. Algunas realizaciones también se refieren a polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos de la presente invención. "Secuencia de nucleótidos", "polinucleótido" o "ácido nucleico" se pueden utilizar indistintamente, y se entiende que significan ADN de doble cadena, ADN de cadena sencilla o productos de transcripción de dichos ADN (p. ej., moléculas de ARN). Los polinucleótidos se pueden administrar a células o sujetos y se pueden expresar por las células o los sujetos, en lugar de administrar los propios péptidos. Varias realizaciones se refieren también a construcciones genéticas que comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica los péptidos de la presente invención. Las construcciones genéticas también pueden contener elementos reguladores adicionales tales como promotores y potenciadores y, opcionalmente, marcadores seleccionables.

#### **Métodos de tratamiento de enfermedades mediadas por citoquinas yc**

Varias realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas de yc en el tratamiento de enfermedades mediadas por citoquinas yc. El uso de un derivado peptídico personalizado de acuerdo con las presentes realizaciones permite flexibilidad en el diseño del agente terapéutico (diseño personalizado del péptido) y permite obtener resultados más completos, que no se lograrían con estrategias convencionales que emplean anticuerpos anti-citoquinas o anti-receptores de citoquinas.

Se describe en esta memoria un nuevo método de bloquear la acción de las citoquinas de la familia yc. Manipulaciones de este tipo pueden producir métodos eficaces de intervenciones clínicas para tratar enfermedades relacionadas con la desregulación o disfunción de las citoquinas yc. Ejemplos de enfermedades que pueden tratarse alterando la interacción entre la citoquina yc y la subunidad yc incluyen enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, granulomatosis de Wegener, enfermedad celíaca, tiroiditis de Hashimoto o autoinmune; enfermedades del colágeno que incluyen artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus, enfermedades autoinmunes de la piel tal como psoriasis; enfermedades neuronales degenerativas tal como esclerosis múltiple, uveítis o inflamación del ojo y oftalmía simpática, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD, por sus siglas en inglés) y miastenia grave.

En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas de yc descritos en esta memoria pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades asociadas con el virus linfotrópico humano 1 de células T de tipo I y II (HTLV-1 y HTLV-II), incluidas la leucemia de células T del adulto (ATL, por sus siglas en inglés), la mielopatía/paraparesia espástica tropical asociada con HTLV (HAM/TSP, por sus siglas en inglés) y otras enfermedades inflamatorias no neoplásicas asociadas con HTLV, tales como uveítis (HU), artropatía, neumopatía, dermatitis, exocrinopatía y miositis. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas de yc descritos en esta memoria pueden utilizarse en el tratamiento de otras enfermedades virales, tales como la gripe, el SIDA, el VHB y el herpes, o enfermedades parasitarias.

En varias realizaciones, los péptidos antagonistas de yc pueden administrarse antes, durante y/o después del trasplante de diversos órganos como un agente inmunosupresor.

En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas de yc descritos en esta memoria se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades inmunomediadas tales como asma y otras enfermedades respiratorias inflamatorias, tales como, pero no limitadas a sinusitis, fiebre del heno, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica

(COPD, por sus siglas en inglés), rinitis alérgica, otitis aguda y crónica, fibrosis pulmonar. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas de yc se pueden administrar para tratar o prevenir reacciones alérgicas debido a la exposición a alérgenos, agentes químicos u otras causas comunes de enfermedad respiratoria aguda. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas de yc se pueden administrar para tratar o prevenir respuestas inflamatorias provocadas por virus, bacterias, reactivos químicos y reactivos bioquímicos.

En varias realizaciones, los péptidos antagonistas de yc se pueden administrar para tratar algunos tipos de neoplasias malignas tales como leucemia LGL, linfoma intraepitelial y leucemia en enfermedad celiaca refractaria, leucemia/linfoma NK y leucemia/linfoma NK-T.

En algunas realizaciones, los derivados peptídicos personalizados de acuerdo con las realizaciones descritas en esta memoria se pueden utilizar para fines cosméticos, tales como el tratamiento del acné, la pérdida del cabello, las quemaduras solares y el mantenimiento de las uñas, incluidos en ungüentos como componente anti-envejecimiento debido a su naturaleza antiinflamatoria

Varias realizaciones se refieren a péptidos antagonistas terapéuticos que inhibirían la función de todos o de miembros selectivos de las citoquinas yc. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas terapéuticos inhiben selectivamente a miembros individuales de la familia de citoquinas yc (péptidos personalizados). En otras realizaciones, los péptidos antagonistas terapéuticos pueden inhibir de forma integral a todos los miembros de la familia de citoquinas yc (Simul-Block). En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas terapéuticos inhiben selectivamente subconjuntos de las citoquinas yc. Sin desear limitarnos a una teoría en particular, los antagonistas peptídicos pueden inhibir la función de todos o de miembros selectivos de las citoquinas yc disminuyendo la unión de las citoquinas yc a la subunidad yc, por ejemplo, como un inhibidor competitivo.

Varios miembros de la familia de citoquinas yc, IL-2, IL-7 e IL-15, pero no IL-4, han sido implicados en la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) en un modelo experimental de ratón. (Miyagawa et al., 2008 J. Immunol. 181:1109-19.) Una realización se refiere al uso de péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente la actividad de IL-2, IL-7 e IL-15 para el tratamiento de GvHD en seres humanos, permitiendo la supervivencia de los tejidos injertados o las células de la médula ósea. Otras realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente una combinación de IL-2 e IL-7, IL-2 e IL-15, o IL-7 e IL-15 para tratar la GvHD. Otras realizaciones se refieren al uso de una combinación de péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente IL-2, IL-7 o IL-15.

Algunas realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente la función de IL-2 para el tratamiento de trastornos autoinmunes en los que se ha implicado a las T-regs como agentes que desempeñan un papel. En algunas realizaciones, la inhibición mediada por péptidos de las T-regs puede potenciar la inmunidad anticancerígena natural en seres humanos, lo que proporciona un nuevo medio de terapia anticancerígena.

Varias realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente IL-4 para tratar el asma.

Algunas realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente IL-7, ya sea solos o en combinación con péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente el miembro de la familia de citoquinas yc, IL-15, como un agente terapéutico para la leucemia LGL. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente tanto la actividad de IL-7 como de IL-15 se pueden utilizar para tratar la leucemia LGL. Varias realizaciones se refieren al uso de BNZ-y para tratar la leucemia LGL. En algunas realizaciones, se utilizan péptidos antagonistas yc específicos que inhiben selectivamente IL-15 solos o péptidos antagonistas yc específicos que inhiben selectivamente IL-15 e IL-7 como un agente terapéutico para la leucemia asociada a linfocitos T CD4/CD8, incluida la provocada por el HTLV-1.

Varias realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas de yc que inhiben selectivamente la actividad de IL-9, ya sea solos o en combinación con otros miembros de la familia de citoquinas yc, como un agente terapéutico para enfermedades humanas que implican el desarrollo anormal de células Th17.

Varias realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente la actividad de IL-15 como agente terapéutico para el tratamiento de la CD. Una publicación reciente sugirió que IL-21, además de IL-15, puede desempeñar un papel en la patogénesis de la CD. (Véase Bodd et al., 2010, Mucosal Immunol. 3:594-601.) Esto sugiere que el tratamiento óptimo de la CD mediante anticuerpos anti-citoquina o anti-receptor de citoquina convencionales se beneficiaría de una combinación de al menos dos anticuerpos que reconozcan componentes que pertenecen a los sistemas IL-15 e IL-21. En algunas realizaciones, se utilizan péptidos antagonistas derivados personalizados que inhiben selectivamente tanto la actividad de IL-15 como de IL-21 como agente terapéutico para el tratamiento de la CD.

Además de tener aplicaciones terapéuticas, los péptidos antagonistas de yc también tienen aplicaciones en productos de consumo. Varias realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas de yc en productos para

el cuidado de la piel, tales como aplicaciones anti-envejecimiento, antiinflamatorias, anti-acné y otras aplicaciones relacionadas. Algunas realizaciones se refieren con el uso de péptidos antagonistas de yc en productos para el cabello como ingrediente anticaída del cabello para tratar la caída del cabello provocada por trastornos autoinmunes.

Otra parte de esta divulgación se refiere al desarrollo de compuestos químicos (no peptídicos, no proteicos) que tienen una estructura espacial que se asemeja a la secuencia de aminoácidos de 19 meros I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) y que pueden encajar en el bolsillo de la subunidad yc para impedir estructuralmente el acceso de una citoquina yc a la subunidad yc para la unión. Algunas realizaciones se refieren al uso de compuestos químicos estructuralmente similares como inhibidores de la actividad de la citoquina yc. Una estrategia de mimetismo molecular de este tipo para refinar adicionalmente el desarrollo de compuestos sintéticos que se asemejan en estructura a péptidos/proteínas biológicas existentes se describe en Orzaez et al., 2009 Chem. Med. Chem. 4:146-160. Otra parte de esta divulgación se refiere a la administración de compuestos químicos (no peptídicos, no proteicos) que tienen una estructura 3D similar a la secuencia de aminoácidos de 19 meros I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) para tratar enfermedades mediadas por citoquinas yc.

Varias partes de esta divulgación se refieren a la administración de un péptido de secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) para tratar enfermedades mediadas por citoquinas yc. Otra parte de esta divulgación se refiere a la administración de péptidos derivados de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), en donde la secuencia de aminoácidos del péptido derivado tiene propiedades físico-químicas similares a un péptido de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), pero tiene una actividad biológica distinta, para tratar enfermedades mediadas por citoquinas yc. Otra parte de esta divulgación se refiere a la administración de un péptido de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) conjugado con los extremos N y C o con los residuos secundarios de proteínas/péptidos biológicos existentes en pacientes para tratar enfermedades mediadas por citoquinas yc.

Varias partes de esta divulgación se refieren a la administración de anticuerpos policlonales y monoclonales generados contra un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) en pacientes como un inmunógeno para tratar enfermedades mediadas por citoquinas yc. Otra parte de esta divulgación se refiere a la administración de anticuerpos policlonales y monoclonales que se generaron contra péptidos derivados de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1) en donde la secuencia de aminoácidos del péptido derivado tiene propiedades físico-químicas similares a un péptido de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO: 1), pero tiene una actividad biológica distinta, en pacientes como un inmunógeno para tratar enfermedades mediadas por citoquinas yc.

#### **Administración de péptidos antagonistas de yc**

Las presentes realizaciones también abarcan el uso de péptidos antagonistas de yc para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad. Las presentes realizaciones también abarcan una composición farmacéutica que incluye péptidos antagonistas de yc en combinación con un soporte farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede incluir un soporte farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz no tóxica de péptidos antagonistas de yc, u otras composiciones de las presentes realizaciones.

Las presentes realizaciones proporcionan métodos para utilizar composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de antagonistas de las citoquinas yc en un diluyente o soporte adecuado. Un antagonista yc de las presentes realizaciones se puede formular de acuerdo con métodos conocidos utilizados para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Un antagonista yc se puede combinar en una mezcla, ya sea como único material activo o con otros materiales activos conocidos, con diluyentes farmacéuticamente adecuados (p. ej., fosfato, acetato, Tris-HCl), conservantes (p. ej., timerosal, alcohol bencílico, parabenos), compuestos emulsionantes, solubilizantes, adyuvantes y/o soportes tales como albúmina de suero bovino. Soportes adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed. 1980 Mack Publishing CO. Adicionalmente, composiciones de este tipo pueden contener un antagonista de yc complejoado con polietilenglicol (PEG), iones metálicos, o pueden incorporarse en compuestos poliméricos tales como ácido poliácético, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o pueden incorporarse en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoblastos. Composiciones de este tipo influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la tasa de liberación in vivo y la tasa de aclaramiento in vivo de un antagonista de yc. Un antagonista de yc puede conjugarse con anticuerpos contra antígenos, receptores y ligandos específicos para células, o puede acoplarse a ligandos para receptores específicos para tejidos.

Métodos de administrar antagonistas yc de las presentes realizaciones pueden seleccionarse según corresponda, dependiendo de factores tales como el tipo de enfermedades, el estado de los sujetos y/o el sitio a fijar como objetivo. Los antagonistas de yc pueden administrarse por vía tópica, oral, parenteral, rectal o por inhalación. El

término "parenteral" incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraperitoneales, intracisternales o técnicas de infusión. Estas composiciones incluirán típicamente una cantidad eficaz de un antagonista de yc, solo o en combinación con una cantidad eficaz de cualquier otro material activo. La cantidad del péptido contenido en las composiciones farmacéuticas de las presentes realizaciones, la forma de dosificación de las composiciones farmacéuticas, la frecuencia de administración y similares pueden seleccionarse según corresponda, dependiendo de factores tales como el tipo de enfermedades, el estado de los sujetos y/o el sitio a fijar como objetivo. Dosificaciones y concentraciones deseadas del fármaco de este tipo contenidas en las composiciones pueden variar en función de muchos parámetros, incluyendo el uso previsto, el peso corporal y la edad del paciente y la vía de administración. Primero se realizarán estudios piloto utilizando estudios con animales y luego se realizará el escalado para la administración en seres humanos de acuerdo con la práctica aceptada en la técnica.

En una parte de la divulgación, las células huésped que han sido modificadas genéticamente con un polinucleótido que codifica al menos un péptido antagonista de yc se administran a un sujeto para tratar un trastorno de proliferación y/o para reducir el crecimiento de células malignas. El polinucleótido es expresado por las células huésped, produciendo con ello los péptidos dentro del sujeto. Preferiblemente, las células huésped son alogénicas o autógenas para el sujeto.

En un aspecto adicional, los péptidos antagonistas de yc se pueden utilizar en combinación con otras terapias, por ejemplo, terapias que inhiben la proliferación y el crecimiento de células cancerosas. La expresión "terapia de combinación" abarca la administración de péptidos antagonistas de yc y un agente terapéutico adicional como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar un efecto beneficioso a partir de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo, típicamente, durante un período de tiempo definido (habitualmente minutos, horas, días o semanas, dependiendo de la combinación seleccionada).

Una terapia de combinación pretende abarcar la administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, es decir, en donde cada uno de los agentes terapéuticos se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea se puede lograr, por ejemplo, administrando al sujeto una sola cápsula que tenga una relación fija de cada uno de los agentes terapéuticos o en múltiples cápsulas individuales para cada uno de los agentes terapéuticos. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada uno de los agentes terapéuticos se puede efectuar por una vía apropiada que incluye, pero no se limita a, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de membranas mucosas. Estos agentes terapéuticos se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos no es estrictamente crítica.

La terapia de combinación también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos como se describió arriba en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos (tales como, pero no limitados a un segundo agente terapéutico diferente) y terapias no farmacológicas (tales como, pero no limitadas a cirugía o tratamiento de radiación). En los casos en los que la terapia de combinación comprende, además, tratamiento de radiación, el tratamiento de radiación puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se logre un efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento de radiación. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso se logra todavía cuando el tratamiento de radiación se retira temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás durante días o incluso semanas.

En determinadas partes de esta divulgación, los péptidos antagonistas de yc se pueden administrar en combinación con al menos un agente antiproliferativo seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico, un antimetabolito, y un agente antitumoral, y un agente antimitótico, y un agente antiviral, y un agente antineoplásico, un agente inmunoterapéutico y un agente radioterapéutico.

En determinadas partes de esta divulgación, los péptidos antagonistas de yc se pueden administrar en combinación con al menos un agente antiinflamatorio seleccionado del grupo que consiste en esteroides, corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroides.

También se describen aquí kits para llevar a cabo cualquiera de los métodos anteriores. Los kits pueden incluir un antagonista de yc de acuerdo con las presentes realizaciones. En algunas partes de esta divulgación, el kit puede incluir instrucciones. Las instrucciones pueden estar en forma escrita o pictográfica, o pueden estar en medios grabados que incluyen cintas de audio, CD de audio, cintas de video, DVD, CD-ROM o similares. Los kits pueden comprender un empaquetamiento.

### **Definiciones**

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "paciente" se refiere al receptor de un tratamiento terapéutico e incluye todos los organismos dentro del reino animal. En realizaciones preferidas, el animal pertenece a la familia

de los mamíferos, tales como seres humanos, bovinos, ovinos, porcinos, felinos, búfalos, caninos, cabras, equinos, burros, ciervos y primates. El animal más preferido es el ser humano.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "tratar" o cualquier variación del mismo (*p. ej.*, tratamiento, tratando, etc.), se refiere a cualquier tratamiento de un paciente a quien se ha diagnosticado una afección biológica, tal como leucemia CD4, CD8 y LGL, una enfermedad autoinmune, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, granulomatosis de Wegener, enfermedad celíaca, tiroiditis de Hashimoto, una enfermedad del colágeno, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus, psoriasis, una enfermedad neuronal degenerativa, esclerosis múltiple, uveítis, inflamación del ojo, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), miastenia grave, enfermedades asociadas con 1-virus linfotrópico de células T humanas de tipo I y II (HTLV-I y HTLV-II), leucemia de células T del adulto (ATL), mielopatía asociada a HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), uveítis (HU), artropatía, neumopatía, dermatitis, exocrinopatía, miositis, influenza, SIDA, VHB, herpes, asma, sinusitis, fiebre del heno, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), rinitis alérgica, otitis aguda y crónica, fibrosis pulmonar, leucemia/linfoma NK y leucemia/linfoma NK-T. El término tratar, tal como se utiliza en esta memoria, incluye: (i) prevenir o retrasar la presentación de síntomas asociados con la condición biológica de interés en un paciente en riesgo que aún no ha presentado síntomas asociados con la condición biológica; (ii) mejorar los síntomas asociados con la condición biológica de interés en un paciente a quien se ha diagnosticado la condición biológica; (iii) prevenir, retrasar o mejorar la presentación de síntomas asociados con complicaciones, afecciones o enfermedades asociadas con la condición biológica de interés en un paciente en riesgo o un paciente a quien se ha diagnosticado la condición biológica; (iv) ralentizar, retrasar o detener la progresión de la condición biológica; y/o (v) prevenir, retrasar, retardar, detener o mejorar los eventos celulares de la inflamación.

El término "síntoma(s)", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a signos o indicaciones comunes de que un paciente sufre una afección o enfermedad específica.

La expresión "cantidad eficaz", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la cantidad necesaria para provocar la respuesta biológica deseada. De acuerdo con las presentes realizaciones, una cantidad eficaz de un antagonista de yc es la cantidad necesaria para proporcionar un efecto observable en al menos un factor biológico para su uso en el tratamiento de una afección biológica.

"Tecnología de ADN recombinante" o "recombinante" se refiere al uso de técnicas y procesos para producir polipéptidos específicos a partir de células u organismos microbianos (*p. ej.*, bacterianos, de levadura), de invertebrados (insectos), de mamíferos (*p. ej.*, animales o plantas transgénicos) que han sido transformados o transfectados con secuencias de ADN clonadas o sintéticas para permitir la biosíntesis de péptidos heterólogos. El patrón de glicosilación nativo solo se logrará con un sistema de expresión de células de mamíferos. Los sistemas de expresión procariotas carecen de la capacidad de agregar glicosilación a las proteínas sintetizadas. Las células de levaduras e insectos proporcionan un patrón de glicosilación único que puede ser diferente del patrón nativo.

Una "secuencia de nucleótidos" se refiere a un polinucleótido en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ADN más grande que se ha derivado de ADN o ARN aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura, libre de materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación y recuperación de sus secuencias de nucleótidos componentes mediante métodos de biología molecular estándar (como se describe en Current Protocols in Molecular Biology).

"Vector de expresión recombinante" se refiere a un plásmido que comprende una unidad transcripcional que contiene un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, incluyendo promotores y potenciadores, (2) una estructura o secuencia codificante que codifica el polipéptido de acuerdo con las presentes realizaciones, y (3) una secuencia de iniciación de la transcripción y la traducción apropiada y, si se desea, secuencias de terminación. Elementos estructurales destinados a su uso en sistemas de levaduras y mamíferos incluyen preferiblemente una secuencia señal que permite la secreción extracelular de polipéptidos traducidos por células huésped de levaduras o mamíferos.

"Sistema de expresión microbiana recombinante" se refiere a un monocultivo sustancialmente homogéneo de microorganismos calientes adecuados, por ejemplo, bacterias tales como *E. coli*, o levaduras tales como *S. cerevisiae*, que han integrado de manera estable una unidad transcripcional recombinante en ADN cromosómico o portan la unidad transcripcional recombinante como un componente de un plásmido residual. Generalmente, las células huésped que constituyen un sistema de expresión microbiana recombinante son la progenie de una única célula ancestral transformada. Los sistemas de expresión microbiana recombinante expresarán polipéptidos heterólogos tras la inducción de los elementos reguladores vinculados a una secuencia de nucleótidos estructural que se ha de expresar.

Los siguientes Ejemplos se presentan con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitaciones.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### Método para Evaluar la Actividad Inhibidora del Péptido Antagonista de yc

La capacidad de cualquier péptido derivado personalizado preparado de acuerdo con las presentes realizaciones para inhibir la acción de un miembro de la familia de citoquinas yc se determina utilizando ensayos celulares de mamíferos para medir su respuesta proliferativa al miembro de la familia de citoquinas yc.

Para cada una de las seis citoquinas yc, las líneas de células indicadoras: CTLL-2, una línea de células T CD8 murinas disponible de American Type Culture Collection, y PT-18, una línea de mastocitos murinos y su subclón PT-18 $\beta$ , se transfectan con el gen IL-2R $\beta$  humano para hacer que las células respondan a IL-2 e IL-15 (Tagaya et al., 1996, EMBO J. 15:4928-39), y se utilizan para determinar cuantitativamente la actividad promotora del crecimiento de la citoquina yc (Véase Current protocols in Immunology de Wiley and Sons para una referencia metodológica). Las células indicadoras demuestran una respuesta dependiente de la dosis semilineal cuando se miden mediante un ensayo colorimétrico WST-1 en un intervalo de concentraciones (Véase Clontech PT3946-1 y el manual del usuario asociado, incorporado aquí como referencia, para obtener una descripción detallada de los reactivos y métodos). Una vez que se determinan las dosis adecuadas de la citoquina que producen la respuesta máxima del 50 % y del 95 % de la línea celular indicadora, se añaden diversas concentraciones (que varían de 1 pM a 10  $\mu$ M) del péptido derivado personalizado purificado o sintetizado a cada uno de los pocillos que contienen la citoquina y células indicadoras. La reducción en la absorbancia de la luz a 450 nm se utiliza como un indicador de la inhibición de la proliferación celular estimulada por citoquinas. Típicamente, las células son estimuladas por las citoquinas de modo que la absorbancia del pocillo que contiene la línea celular indicadora y la citoquina está entre 2,0 y 3,0, que se reduce a un intervalo de 0,1 a 0,5 mediante la adición de péptidos inhibidores.

### EJEMPLO 2

#### El péptido BNZ-y Inhibe Específicamente las Actividades Promotoras del Crecimiento de IL-9 e IL-15

Utilizando células PT-18 $\beta$  como se describió arriba, se determinó la capacidad del péptido BNZ-y de inhibir específicamente la actividad promotora del crecimiento de citoquinas yc seleccionadas (Figura 3A). IL-3, una citoquina no yc que sustenta el crecimiento de las células PT-18 $\beta$ , se utilizó como control negativo. Brevemente, células PT-18 $\beta$  se incubaron con dos diluciones diferentes del péptido BNZ-y producido por células HEK293T (dilución 1:20 o 1:50 del sobrenadante original de células HEK293T transfectadas con una construcción de expresión de BNZ-y) o sin el péptido BNZ-y en presencia de IL-3, IL-9, IL-15 o IL-4 (1 nM de cada citoquina en el cultivo). Las respuestas de crecimiento de las células se determinaron 2 días después de la introducción del péptido BNZ-y y la citoquina utilizando el ensayo WST-1. La actividad promotora del crecimiento de IL-3 (una citoquina distinta de yc) no fue inhibida por BNZ-y. En contraposición, la actividad de IL-15 e IL-9 fue significativamente reducida ( $p < 0,01$  test t de Student) por el péptido BNZ-y. La proliferación celular estimulada por IL-4, otra citoquina yc, no se vio afectada por la adición del péptido BNZ-y. Los resultados para IL-3, IL-9, IL-15 e IL-4 se muestran en la Figura 3A.

En un ensayo similar, se utilizó la línea celular murina CTLL2. En este ensayo, las células se cultivaron con IL-2 0,5 nM recombinante en RPMI suero fetal bovino al 10 %. Para preparar el ensayo de proliferación, las células se lavaron de las citoquinas 3 veces. Las células se sembraron a razón de  $1 \times 10^5$  células por pocillo de una placa de 96 pocillos con una concentración final de 50 pM de IL-2 o IL-15. Se añadieron diversas concentraciones de péptido BNZ-y (0,1, 1 y 10  $\mu$ g/ml) a cada uno de los pocillos. Las células se cultivaron durante 20 horas y en las últimas 4 horas, se añadió  $^3$ H-timidina a las placas. Las células se recogieron utilizando un lector de placas. Los datos se muestran en la Figura 3B.

### EJEMPLO 3

#### Método para Medir la Actividad Inhibidora de la Citoquina yc mediante el Análisis de 3H-timidina Incorporación como un Marcador de la Proliferación Celular

La inhibición de la proliferación inducida por citoquinas yc de una población de células indicadoras por péptidos derivados personalizados antagonistas se mide mediante el ensayo de incorporación de 3H-timidina. Brevemente, se administra timidina radiomarcada (1 microCi) a 20-50.000 células que experimentan proliferación en presencia de citoquinas. La radiactividad incorporada a las células se mide atrapando la radiactividad unida a las células en un filtro de fibras de vidrio utilizando máquinas cosechadoras convencionales (Ejemplo, Filtermate Universal Harvester de Perkin-Elmer), después de lo cual se mide la radiactividad utilizando un contador b (Ejemplo contador de centelleo de microplacas Trilux 1450).

### EJEMPLO 4

## **Método para Medir la Actividad de Inhibición de la Citoquina yc mediante el Análisis de la Incorporación de un**

### **Colorante Cell-Tracker como Marcador de la Proliferación Celular**

Células indicadoras se incuban en presencia de una citoquina yc seleccionada o en presencia de una citoquina yc seleccionada y un péptido derivado personalizado seleccionado. A continuación, la población celular se marca in vitro utilizando un colorante cell tracker, por ejemplo, CMFDA, C2925 de Invitrogen, y se controla la disminución de la fluorescencia verde celular en cada división celular utilizando un citómetro de flujo (por ejemplo, Beckton-Dickinson FACScalibur). Típicamente, en respuesta a la estimulación con citoquina yc, aparecerán en el canal de fluorescencia verde de 7~10 picos diferentes correspondientes al número de divisiones que han experimentado las células. La incubación de las células con la citoquina yc seleccionada y el péptido derivado personalizado antagonista reduce el número de picos a solo 1 a 3, dependiendo del grado de inhibición.

### **EJEMPLO 5**

#### **Inhibición de la Señalización Intracelular por BNZ-y y sus Antagonistas Derivados**

Además de estimular la proliferación celular, la unión de las citoquinas yc a sus receptores provoca una serie diversa de eventos intracelulares. (Rochman et al. 2009 Nat. Rev. Immunol. 9:480-90, Pesu et al. 2005 Immunol. Rev. 203:127-142.) Inmediatamente después de que la citoquina se une a su receptor, una tirosina quinasa denominada Jak3 (Janus-quinasa 3) es reclutada hacia el receptor en la membrana plasmática. Esta quinasa fosforila los residuos de tirosina de múltiples proteínas, incluyendo la subunidad yc, STATS (Transductor de Señal y Activador Transcripcional 5) y subunidades de la PI3 (Fosfatidilinositol 3) quinasa. Entre estos, la fosforilación de STATS ha sido implicada en muchos estudios como vinculada a la proliferación de células iniciada por la citoquina yc. (Revisado en Hennighausen y Robinson, 2008 Genes Dev. 22:711-21.) De acuerdo con estos datos publicados, se examinó si el péptido BNZ-y inhibe o no la fosforilación de tirosina de la molécula STATS en células PT-18 $\beta$  estimuladas por IL-15 (los resultados se muestran en la Figura 3C).

Las células PT-18 $\beta$  fueron estimuladas por IL-15 en presencia o ausencia del péptido BNZ-y. Las proteínas citoplasmáticas se extrajeron de las células de acuerdo con un método convencional como se describe en Tagaya et al. 1996 EMBO J. 15:4928-39. Las proteínas citoplasmáticas extraídas se resolvieron utilizando una SDS-PAGE (siglas inglesas de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) estándar y el estado de fosforilación se confirmó mediante un anticuerpo anti-fosfo-STATS (Cell Signaling Technology, Catálogo n° 9354, Danvers MA) utilizando inmunotransferencia (véase la Figura 3C, panel superior). Para confirmar que cada pista representaba una carga proteica total similar, se desprendió la membrana y se volvió a sondear con un anticuerpo anti-STATS (Cell Signaling Technology, Catálogo n° 9358) (véase la Figura 3C, panel inferior).

Estos resultados demostraron que la fosforilación de tirosina de STATS, un marcador de la transducción de señales, fue inducida por IL-15 en células PT-18 $\beta$ , y la fosforilación de tirosina de STATS fue marcadamente reducida por el péptido BNZ-y.

### **EJEMPLO 6**

#### **Diseño Racional de Péptidos Antagonistas Derivados de BNZ-y**

Los péptidos derivados se preparan a partir de la secuencia central D/E-F-L-E/Q/N-S/R-X-I/K-X-L/I-X-Q (SEQ ID NO: 2) (en que X designa cualquier aminoácido) sustituyendo los aminoácidos definidos de la secuencia central con aminoácidos que tienen propiedades físico-químicas idénticas como se designa en la Figura 2.

### **EJEMPLO 7**

#### **Método para Identificar la Especificidad Inhibitoria de Péptidos Derivados Personalizados Antagonistas**

La especificidad inhibidora de la citoquina yc de los péptidos derivados personalizados antagonistas se determina ensayando la capacidad de un péptido derivado personalizado de inhibir la respuesta proliferativa de una línea celular sensible a las citoquinas a cada una de las 6 citoquinas yc. Por ejemplo, se utiliza una línea celular de ratón, CTLL-2, para determinar si un péptido candidato inhibe la función de IL-2 e IL-15. Se utilizan células PT-18( $\beta$ ) para determinar si un péptido candidato inhibe la función de IL-4 e IL-9. Se utilizan células PT-18(7 $\alpha$ ) para determinar si un péptido candidato inhibe la función de IL-7, y se utilizan células PT-18(21 $\alpha$ ) para determinar si un péptido candidato inhibe la función de IL-21. PT-18( $\beta$ ) designa un subclón de células PT-18 que expresan exógenamente IL-2R $\beta$  humano mediante transfección génica (Véase Tagaya et al. 1996), PT-18(7 $\alpha$ ) designa un subclón que expresa IL-7R $\alpha$  humano mediante transfección génica y las células PT-18(21R $\alpha$ ) expresan IL-21 R $\alpha$  humano.

Otra alternativa es utilizar otras líneas celulares que respondan a una serie de citoquinas. Un ejemplo de esta línea celular es una línea celular NK humana NK92 que está disponible comercialmente por ATCC (catálogo n° CRL-2407). Esta línea celular es una línea celular dependiente de IL-2 que responde a otras citoquinas, incluyendo IL-9, IL-7, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 (Gong et al. 1994 Leukemia 8: 652-658, Kingemann et al., 1996, Biol Blood Marrow Transplant 2:68;75, Hodge DL et al., 2002 J. Immunol. 168:9090-8)

## **EJEMPLO 8**

### **Preparación de Péptidos Antagonistas de yc**

Los péptidos antagonistas de yc derivados personalizados se sintetizan químicamente mediante procesos manuales y automatizados.

Síntesis manual: se emplea la síntesis clásica en fase líquida, que implica acoplar el grupo carboxilo o el extremo C de un aminoácido al grupo amino o el extremo N de otro. Alternativamente, se utiliza la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, por sus siglas en inglés).

Síntesis automatizada: Muchas compañías comerciales proporcionan la síntesis automatizada de péptidos a cambio de un coste. Estas compañías utilizan diversos sintetizadores de péptidos comerciales, incluyendo los sintetizadores proporcionados por Applied Biosystems (ABI). Los péptidos antagonistas de yc derivados personalizados se sintetizan mediante sintetizadores de péptidos automatizados.

## **EJEMPLO 9**

### **Producción Biológica de Péptidos Antagonistas yc Derivados Personalizados**

#### **Utilizando Tecnología Recombinante**

Un péptido antagonista yc derivado personalizado se sintetiza biológicamente como un pro-péptido que consiste en un péptido marcador apropiado, un péptido señal o un péptido derivado de una proteína humana conocida que potencia o estabiliza la estructura del péptido BNZ-y y mejora su actividad biológica. Si se desea, se debe diseñar una secuencia de escisión enzimática apropiada que proceda al extremo N del péptido para eliminar la etiqueta o cualquier parte del péptido de la proteína final.

Se inserta una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido derivado personalizado con un codón de terminación en el extremo 3' en un vector comercial con una porción de etiqueta derivada de tiorredoxina de E. coli y una secuencia de péptido especial que es reconocida y digerida por una enzima proteolítica apropiada (por ejemplo, enteroquinasa) que interviene entre la porción de etiqueta y la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido derivado personalizado y el codón de terminación. Un ejemplo de un vector adecuado es el plásmido pThioHis disponible de Invitrogen, CA. Se pueden utilizar otros vectores de expresión.

## **EJEMPLO 10**

### **Conjugación de BNZ-y y Derivados con Proteínas Portadoras para Fines de Inmunización y Generación de anticuerpos anti-BNZ-y**

BNZ-y y otros péptidos derivados personalizados se utilizan para inmunizar animales para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales. Los péptidos se conjugan con el extremo N o C de las proteínas portadoras apropiadas (por ejemplo, albúmina de suero bovino, hemocianina de lapa bocallave (KLH, por su siglas en inglés), etc.) mediante métodos convencionales utilizando glutaraldehído o éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida. Los péptidos conjugados junto con un adyuvante apropiado se utilizan luego para inmunizar animales tales como conejos, roedores o burros. Los anticuerpos resultantes se examinan para determinar su especificidad utilizando métodos convencionales. Si los anticuerpos resultantes reaccionan con el péptido inmunogénico, se testan luego para determinar su capacidad de inhibir la actividad de citoquinas yc individuales de acuerdo con los ensayos de proliferación celular descritos en los Ejemplos 1-3. Debido a la naturaleza compuesta de los péptidos derivados, es posible generar un único anticuerpo que reconozca dos citoquinas diferentes simultáneamente, debido a la naturaleza compuesta de estos péptidos.

## **EJEMPLO 11**

### **Método para la Producción a Gran Escala de Péptidos Antagonistas de yc Derivados Personalizados**

Las proteínas recombinantes se producen a gran escala mediante el uso de un sistema libre de células como se describe en otra parte. (Véase Takai et al., 2010 Curr. Pharm. Biotechnol. 11(3):272-8.) Brevemente, los ADNc que codifican el péptido antagonista de yc y una etiqueta se subclonan en un vector apropiado (Véase Takai et al., 2010 Curr. Pharm. Biotechnol. 11(3):272-8), que se somete a transcripción in vitro, seguida inmediatamente por



una traducción *in vitro* para producir el péptido marcado. El pro-polipéptido se purifica entonces utilizando un anticuerpo inmovilizado que reconoce el epítipo marcado, se trata con la enzima proteolítica y el material eluido (que contiene principalmente el péptido derivado personalizado de interés) se testa en cuanto a su pureza utilizando Tricine-SDS-PAGE al 18 % convencional (Invitrogen) y tinción de Comassie convencional. Si no se alcanza la pureza deseada del péptido (> 98 %), la mezcla se somete a HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) convencional para una purificación adicional.

## **EJEMPLO 12**

### **Uso de Péptidos Antagonistas de yc Derivados Personalizados para Bloquear la Función de las Citoquinas en HAM/TSP**

La mielopatía asociada a HTLV-1 (HAM, por sus siglas en inglés)/paraparesia espástica tropical (TSP, por sus siglas en inglés) es una mielopatía progresiva crónica que se observa en algunas personas infectadas con el virus linfotrópico humano de células T de tipo 1 (HTLV-1). La infiltración de linfocitos en la médula espinal está asociada con la respuesta inmunitaria al HTLV-1 y da como resultado la liberación de determinadas citoquinas. Algunas de estas citoquinas también pueden dañar los nervios.

Los pacientes con HAM/TSP muestran un estado elevado del sistema inmunitario que es similar al observado en enfermedades autoinmunes (Oh et al. 2008 Neurol Clin. 26:781-785). Este estado elevado se demuestra por la capacidad de las células T de pacientes con HAM/TSP de experimentar una proliferación espontánea en un cultivo *ex vivo* durante aproximadamente una semana en ausencia de citoquinas añadidas exógenamente. La proliferación espontánea de células T en pacientes con HAM/TSP se atribuye, al menos en parte, a los bucles autocrinos/paracrinos de IL-2, IL-9 e IL-15. Se ha demostrado que la adición de anticuerpos bloqueadores contra los receptores de IL-2 o IL-15 puede inhibir la proliferación espontánea de células T en un sistema de cultivo *ex vivo* de HAM/TSP. Estas observaciones, junto con otros datos derivados de estudios *ex vivo*, han proporcionado la justificación para llevar dos anticuerpos monoclonales (una cadena alfa del receptor anti-IL-2 o anti-Tac y una cadena beta del receptor anti-IL-15) a la clínica para el tratamiento de HAM/TSP (Azimi et al. 2001 Proc. Natl. Acad. Sci. 98:14559-64., Azimi et al., 1999 J. Immunol 163:4064-72). Antagonistas del receptor anti-citoquina de acuerdo con las realizaciones descritas en esta memoria, no solo serían valiosos como un agente inmunomodulador terapéutico para el tratamiento de HAM/TSP, sino que la modulación de la respuesta inmune en HAM/TSP por antagonistas del receptor anti-citoquina de acuerdo con las presentes realizaciones actúa como una prueba de concepto para el uso de los antagonistas del receptor anti-citoquina de acuerdo con las presentes realizaciones en el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes.

Para demostrar la eficacia de los péptidos antagonistas de yc derivados personalizados de acuerdo con las realizaciones descritas en esta memoria, los autores de la invención testaron la capacidad del péptido BNZ-y de bloquear la respuesta inmunitaria a HTLV-I en un ensayo de proliferación espontánea de células T utilizando un sistema de cultivo *ex vivo* de HAM/TSP. Se realizaron ensayos de proliferación en muestras de sangre de pacientes con HAM/TSP con y sin la adición de BNZ-y. Estos ensayos evaluaron la capacidad de BNZ-y de bloquear la función de las citoquinas, tales como IL-2 e IL-15, presentes en el cultivo de sangre de pacientes con HAM/TSP *ex vivo* y prevenir la proliferación espontánea de células T en estas muestras.

En un ensayo de proliferación espontánea de células T *ex vivo*, se cultivaron PBMC de pacientes con HAM/TSP a tazon de  $1 \times 10^6$  células por pocillo de una placa de 96 pocillos en RPMI-FCS al 10 %. Se añadieron concentraciones crecientes de péptido BNZ-y a cada uno de los pocillos. Como control, se utilizó un péptido irrelevante de manera similar. Las células se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 3, 4 y 6 días. Se añadió la cantidad de 1 uCi de <sup>3</sup>H-timidina a las células. Después de una incubación adicional de 6 horas, se recogieron las células y se midió su tasa de proliferación. Los datos de un paciente con HAM/TSP representativo se muestran en la Figura 4A-D. Como se indica en la Figura 4, el péptido BNZ-y inhibe la proliferación espontánea de células T en el cultivo de HAM/TSP a una concentración de aproximadamente 1 ug/ml.

En este ensayo se midieron además otros marcadores inmunológicos. El porcentaje de células CD8 específicas para el virus se midió durante el cultivo *ex vivo* utilizando tetrámeros de proteínas virales. La población de células CD4+CD25+, un marcador de activación de células T, así como la tinción de Ki67, un marcador de la proliferación de células T, se monitorizaron en un ensayo de citometría de flujo.

Se pueden utilizar otras formas del derivado peptídico BNZ-y conjugado en un ensayo futuro similar. Incluyen albúmina, BSA, PEG que se pueden conjugar con el péptido después de la síntesis química. Otras formas biológicas del conjugado peptídico BNZ-y pueden incluir regiones de entidades proteicas conocidas (incluyendo, pero no limitadas a la región Fc de IgG humana) que se condensan al derivado peptídico BNZ-y.

## **EJEMPLO 13**

**Método de tratamiento de la Leucemia de células T del Adulto (ATL) en un Paciente Humano mediante la Administración de Péptido Antagonista de yc Derivado Personalizado**

- 5 Se identifica un paciente humano que padece Leucemia de células T del Adulto. Se administra al paciente una dosis eficaz, determinada por el médico, de un péptido antagonista de yc derivado personalizado, por ejemplo, BNZ-y, durante un período de tiempo determinado por el médico. Se determina que el tratamiento es eficaz si el paciente entra en remisión.

10 **EJEMPLO 14**

**Método de tratamiento de HAM/TSP en un Paciente Humano mediante la Administración de un Péptido Antagonista de yc Derivado Personalizado**

- 15 Se identifica un paciente humano que padece HAM/TSP. Se administra al paciente una dosis eficaz, determinada por el médico, de un péptido antagonista de yc derivado personalizado, por ejemplo, BNZ-y, durante un período de tiempo determinado por el médico. Se determina que el tratamiento es eficaz si los síntomas del paciente mejoran o si se ha detenido o ralentizado la progresión de la enfermedad.

20 **REFERENCIAS**

- Antony, P.A., Paulos, C.M., Ahmadzadeh, M., Akpınarli, A., Palmer, D.C., Sato, N., Kaiser A., Heinrichs, C.S., Klebanoff, C.A., Tagaya, Y. y Restifo, NP., Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo 2006 J. Immunol. 176:5255-66.
- 25 Azimi, N., Nagai, M., Jacobson, S., Waldmann, T.A., IL-15 plays a major role in the persistence of Tax-specific CD8 cells in HAM/TSP patients. 2001 Proc. Natl. Acad. Sci. 98:14559-64.
- Azimi, N., Mariner J., Jacobson S., Waldmann T.A., How does interleukin 15 contribute to the pathogenesis of HTLV type-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? 2000 AIDS Res. Hum. Retroviruses 16:1717-22.
- 30 Azimi, N., Jacobson, S., Leist, T., Waldmann, T.A., Involvement of IL-15 in the pathogenesis of human T lymphotropic virus type-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: implications for therapy with a monoclonal antibody directed to the IL-2/15R beta receptor. 1999 J. Immunol. 163:4064-72.
- 35 Azimi, N., Brown, K., Bamford, R.N., Tagaya, Y., Siebenlist, U., Waldmann, T.A., Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. 1998 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2452-7.
- 40 Bazan, J.F., Hematopoietic receptors and helical cytokines. 1990 Immunol. Today 11:350-354.
- Bettini, M. y Vignali, D.A., Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. 2009 Curr. Opin. Immunol. 21:612-8.
- 45 Bodd, M., Raki, M., Tollefsen, S., Fallang, L.E., Bergseng, E., Lundin, K.E., Sollid, L.M., HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. 2010 Mucosal Immunol. 3:594-601.
- De Rezende, L.C., Silva I.V., Rangel, L.B., Guimaraes, M.C., Regulatory T cells as a target for cancer therapy. 2010 Arch. Immunol. Ther. Exp. 58:179-90.
- 50 Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A., Tagaya, Y., IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. 2002 Immunity 17:537-47.
- 55 Dodge DL. Et al., IL-2 and IL-12 alter NK cell responsiveness to IFN-gamma-inducible protein 10 by down-regulating CXCR3 expression.J. Immun. 168:6090-8.
- Fehniger, T.A., Suzuki, K., Ponnappan, A., VanDeusen, J.B., Cooper, M.A., Florea, S.M., Freud, A.G., Robinson, M.L., Durbin, J., Caligiuri, M.A., Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. 2001 J. Exp. Med. 193:219-31.
- 60 Fisher, A.G., Burdet, C., LeMeur, M., Haasner, D., Gerber, P., Cerediq, R., Lymphoproliferative disorders in an IL-7 transgenic mouse line. 1993 Leukemia 2:S66-68.
- 65 Gong JH, et al. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. Leukemia 8: 652-658, 1994.

- Hennighausen, L., Robinson, G.W., Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. 2008 *Genes Dev.* 22:711-21.
- 5 Klingemann HG, et al. A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2: 68-75, 1996.
- Krause, C.D. y Pestka, S., Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. 2005 *Pharmacol. and Therapeutics* 106:299-346.
- 10 Kundig, T.M., Schorle, H., Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., Horak, I., Immune Responses of the interleukin-2-deficient mice. 1993 *Science* 262:1059-61.
- Le Buanec, H., Paturance, S., Couillin, I., Schnyder-Candrian, S., Larcier, P., Ryffel, B., Bizzini, B., Bensussan, A., Burny, A., Gallo, R., Zagury, D., Peltre, G., Control of allergic reactions in mice by an active anti-murine IL-4 immunization. 2007 *Vaccine* 25:7206-16.
- 15 Littman, D.R., Rudensky, AY., Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. 2010 *Cell* 140(6):845-58.
- 20 Miyagawa, F., Tagaya, Y., Kim, B.S., Patel, H.J., Ishida, K., Ohteki, T., Waldmann, T.A., Katz, S.I., IL-15 serves as a costimulator in determining the activity of autoreactive CD8 T cells in an experimental mouse model of graft-versus-host-like disease. 2008 *J. Immunol.* 181:1109-19.
- 25 Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H.M., Filipovich, A.H., Adelstein, S., Modi, W.S., McBride, O.W., Leonard, W.J., Interleukin 2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. 1993 *Cell* 73:147-157.
- OH, U., Jacobson S., Treatment of HTLV-I-Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis: Towards Rational Targeted Therapy 2008 *Neurol Clin.* 2008 26: 781-785.
- 30 Orzaez, M., Gortat, A., Mondragon, L., Perez-Paya, E., Peptides and Peptide Mimics as Modulators of Apoptotic Pathways. 2009 *Chem. Med. Chem.* 4:146-160.
- 35 O'Shea, J.J., Targeting the Jak/STAT pathway for immunosuppression. 2004 *Ann. Rheum. Dis.* 63:(supl II): ii67-71.
- Paul, W.E., Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. 1989 *Cell* 57:521-4.
- 40 Pesu M, Candotti F, Husa M, Hofmann SR, Notarangelo LD y O'Shea JJ. Jak3, severe combined immunodeficiency, and a new class of immunosuppressive drugs. 2005 *Immunol. Rev.* 203:127-142.
- Pesu, M., Laurence, A., Kishore, N., Zwillich, S., Chan, G., O'Shea, J.J., Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunol.* 2008 *Rev.* 223:132-142.
- 45 Rochman, Y., Spolski, R., Leonard, W.J., New Insights into the regulation of T cells by gamma c family cytokines. 2009 *Nat. Rev. Immunol.* 9:480-90.
- 50 Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Regulatory T cells and immune tolerance. 2008 *Cell* 133: 775-87.
- Sato, N., Sabzevari, H., Fu, S., Ju, W., Bamford, R.N., Waldmann, T.A. y Tagaya, Y., Development of an IL-15-Autocrine CD8 T-cell Leukemia in IL-15 Transgenic mice requires the cis-expression of IL-15R alpha. *Blood* 2011 en prensa.
- 55 Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Nakamura, M., Takeshita, T., The common gamma-chain for multiple cytokine receptors. 1995 *Adv. Immunol.* 59: 225-277.
- 60 Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Ohbo, K., Nakamura, M., Takeshita, T., The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. 1996 *Annu. Rev. Immunol.* 14:179-205.
- Tagaya, Y., Burton, J.D., Miyamoto, Y., Waldmann, TA., Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. 1996 *EMBO J.* 15:4928-39.
- 65 Tagaya, Y., Memory CD8 T cells now join "Club 21". 2010 *J. Leuk. Biol.* 87:13-15.

Takai, K., Sawasaki, T. y Endo. Y. The Wheat-Germ Cell-Free Expression System, 2010 Curr. Pharm. Biotechnol. 11:272-8.

5 Tanaka, T., et al., A novel monoclonal antibody against murine IL-2 receptor beta-chain. Characterization of receptor expression in normal lymphoid cells and EL-4 cells. 1991 J. Immunol. 147:2222-28.

Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Manukata, H., Nakamura, M., Sugamura, K., Cloning of the Gamma chain of the Human IL2 receptor. 1992 Science 257:379-382.

10 Waldmann, T.A., Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey. 2007 J. Clin. Immunol. 27: 1-18.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de la caja y central D/E-F-L-E/Q/N-S/R-X-I/K-X-L/I-X-Q (SEQ ID NO: 2) que es de 11 aminoácidos de longitud, en donde el primer X es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, F y L, el segundo X es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en H, T, E y S, y el tercer X es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V, F, C, L y M, en donde dicha secuencia de aminoácidos de la caja y central comprende un material compuesto artificial que combina las secuencias de aminoácidos de dos o más de los motivos de la caja y IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 humana y en donde los péptidos compuestos comprenden 19 aminoácidos.
- 10 2. El péptido compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido compuesto comprende una secuencia de aminoácidos de la caja y central que muestra al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de un motivo de caja y seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-7 IL-9, IL-15 e IL-21.
- 15 3. El péptido compuesto de la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido compuesto inhibe la actividad de al menos dos citoquinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-2, IL-9 e IL-15.
- 20 4. El péptido compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el péptido compuesto está conjugado en los extremos N, los extremos C o el residuo lateral de una proteína o péptido biológico existente.
- 25 5. El péptido compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en mejorar o tratar una enfermedad mediada por citoquina y, seleccionada del grupo que consiste en: leucemia CD4, leucemia CD8, leucemia LGL, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, miastenia grave, granulomatosis de Wegener, enfermedad celíaca, tiroiditis de Hashimoto, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus, psoriasis, esclerosis múltiple, uveítis, inflamación del ojo, miastenia grave y enfermedad de injerto contra huésped (GvHD).
- 30 6. El péptido compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en mejorar o tratar una mielopatía asociada a HTLV (HAM)/paraparesia espástica tropical (TSP).
- 35 7. El péptido compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en leucemia de células T del adulto (ATL) y otras enfermedades inflamatorias no neoplásicas asociadas con HTLV, tales como uveítis (HU), artropatía, neumopatía, dermatitis, exocrinopatía y miositis.
- 40 8. El péptido compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en mejorar o tratar una enfermedad respiratoria inflamatoria.
9. El péptido compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad respiratoria inflamatoria se selecciona del grupo consistente en: asma, sinusitis, fiebre del heno, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), rinitis alérgica, otitis aguda y crónica y fibrosis pulmonar.
- 45 10. Un uso no médico del péptido compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para un fin cosmético.
11. El uso no médico de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el fin cosmético se selecciona del grupo consistente en acné, pérdida del cabello, quemaduras solares, mantenimiento de las uñas y apariencia de envejecimiento.

Alineamiento de la secuencia de la región de la hélice D de citoquinas de la familia yc humana

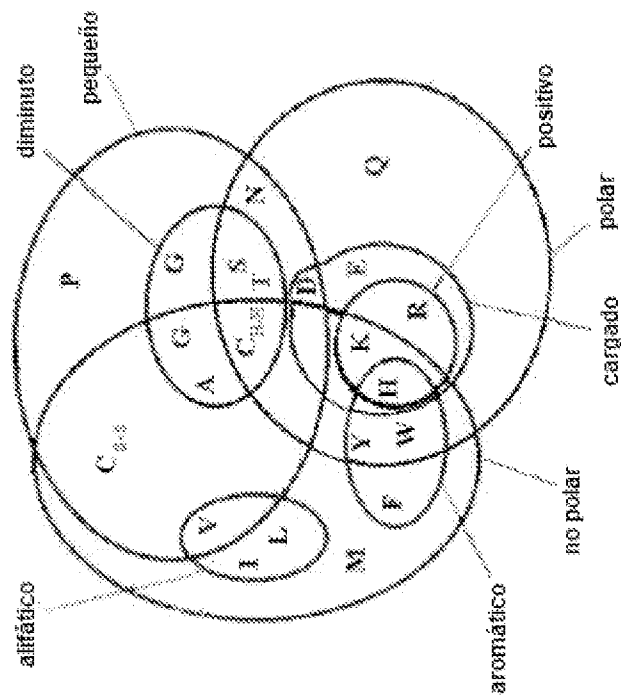
HL-15 SEQ ID NO. 3	I	K	E	F	L	Q	S	F	V	H	I	V	Q	M	F	I	N	T	S			
HL-2 SEQ ID NO. 4	I	V	E	F	L	N	R	W	I	T	F	C	Q	S	I	I	S	T	L	T	parada	
HL-21 SEQ ID NO. 5	P	K	E	F	L	E	R	F	K	S	L	L	Q	K	M	I	H	Q	H	L	S	
HL-4 SEQ ID NO. 6	L	E	N	F	L	E	R	L	K	T	I	M	R	E	K	Y	S	K	C	S		
HL-9 SEQ ID NO. 7	A	L	T	F	L	E	S	L	L	E	L	F	Q	K	E	K	M	R	G	M	R	
HL-7 SEQ ID NO. 8	D	L	C	F	L	K	R	L	.	.	L	.	Q	E	I	K	T	C	W	N	K	I

*Fig. 1A.*

La secuencia consenso para la caja  $\gamma$  y la caja IL-2/IL-15.

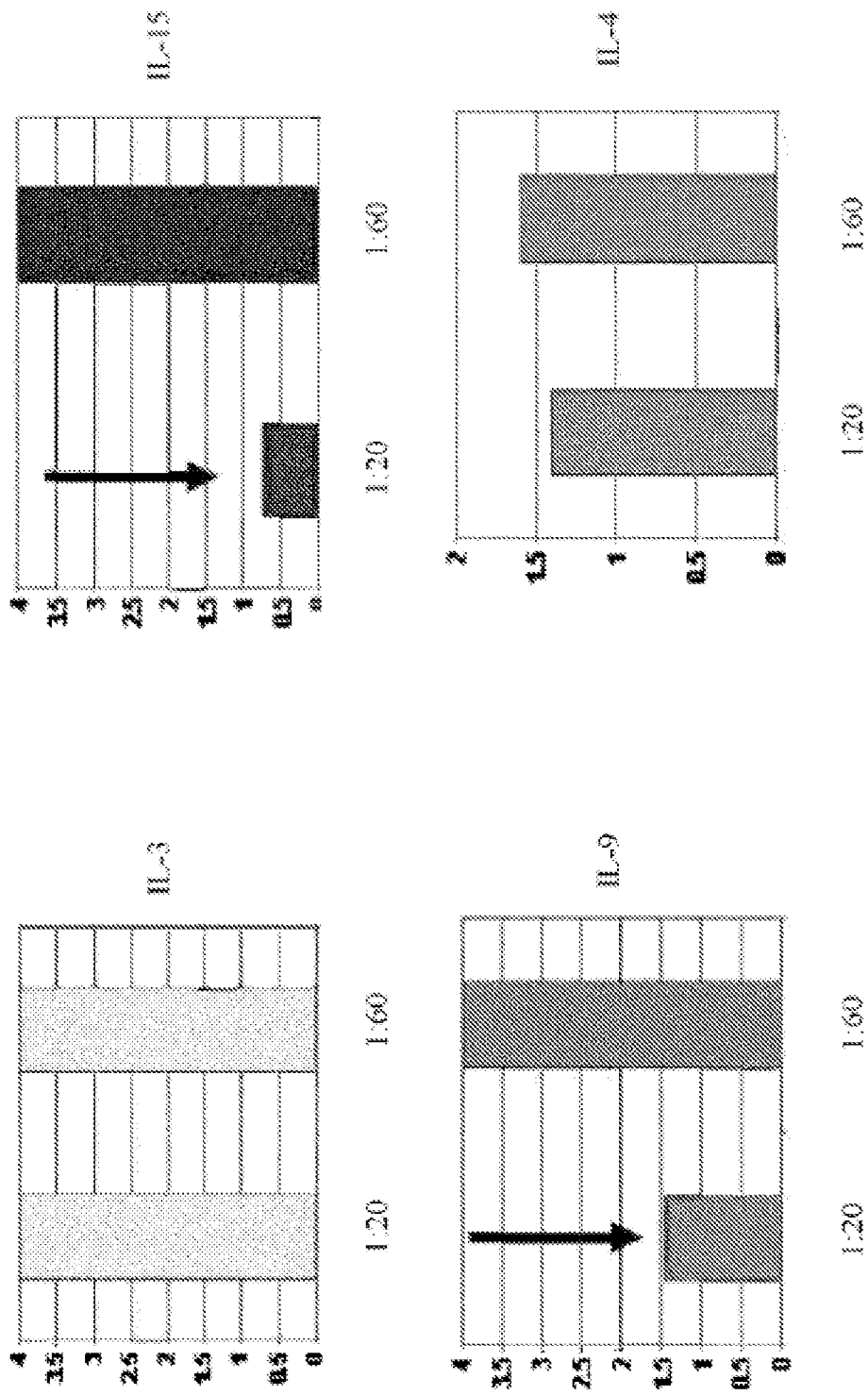
[illegible]

**Fig. 1B.**

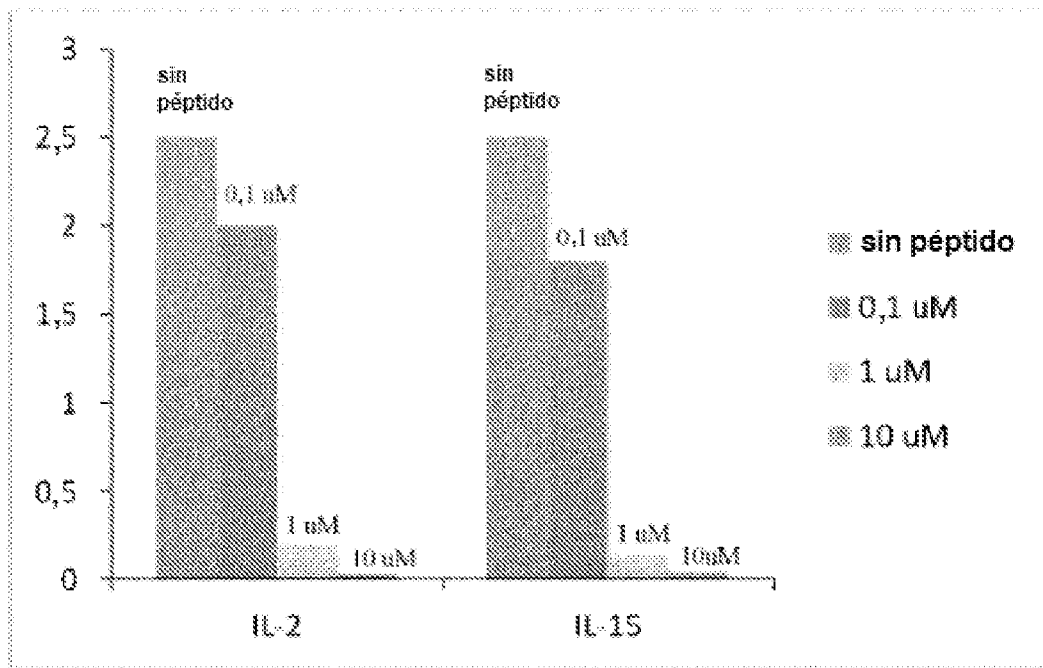


**Fig.2.**

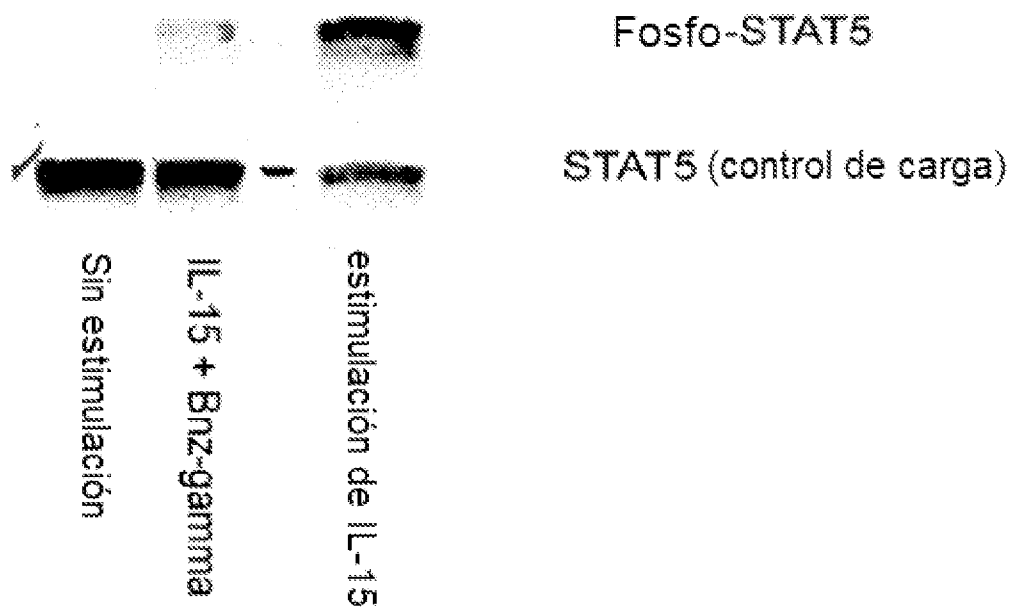




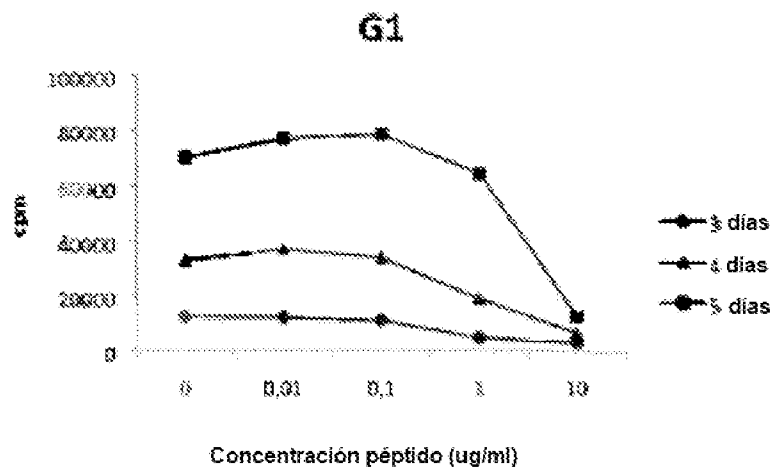
**Fig.3A.**



***Figura 3B***

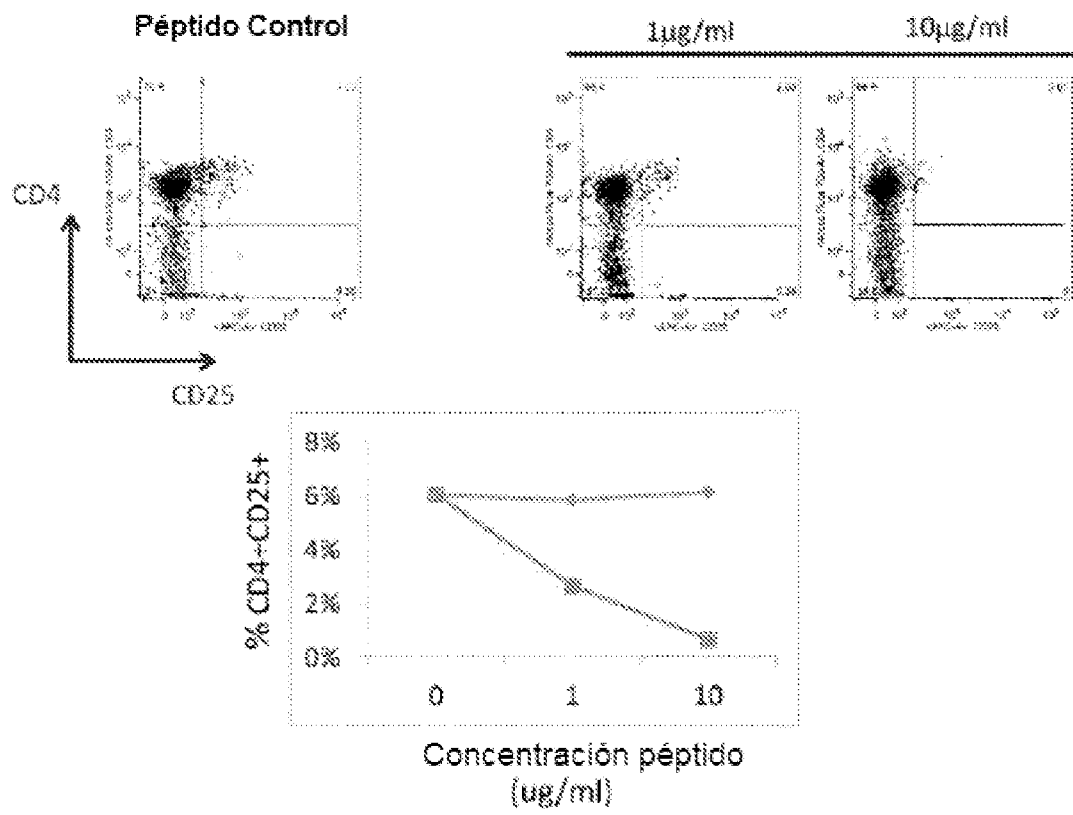


*Figura 3C*

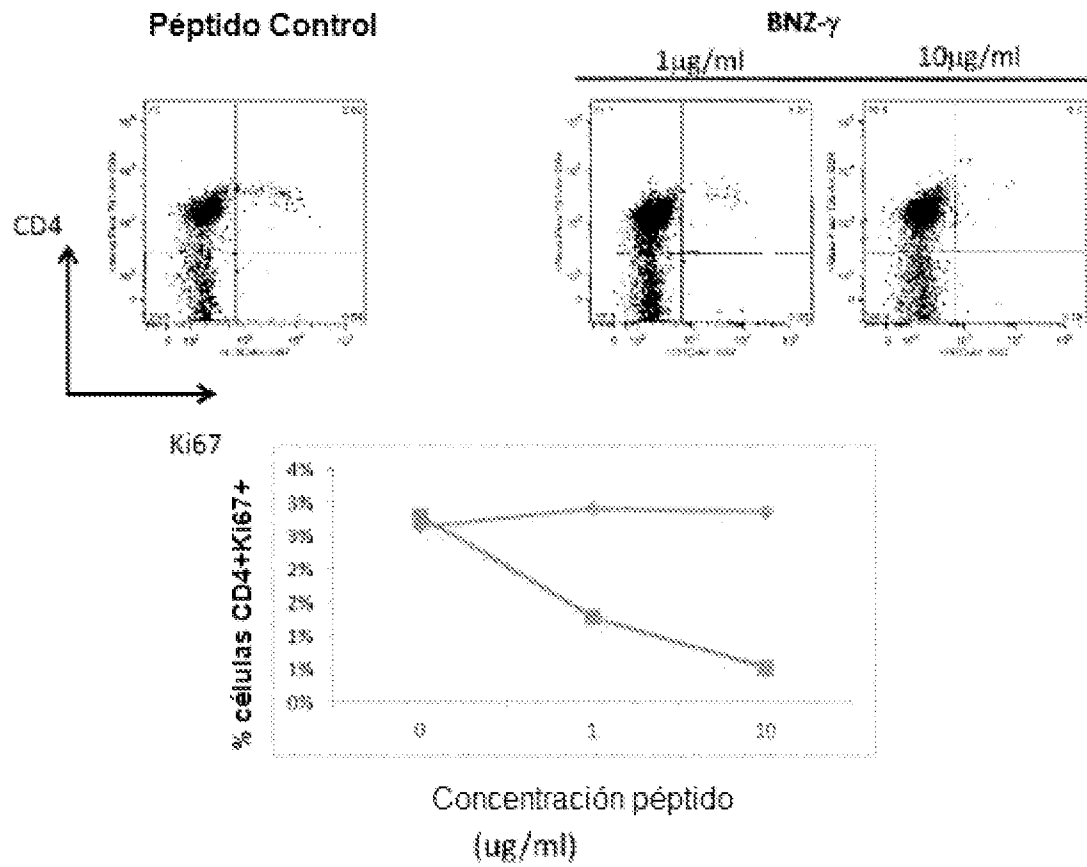


***Figura 4A***

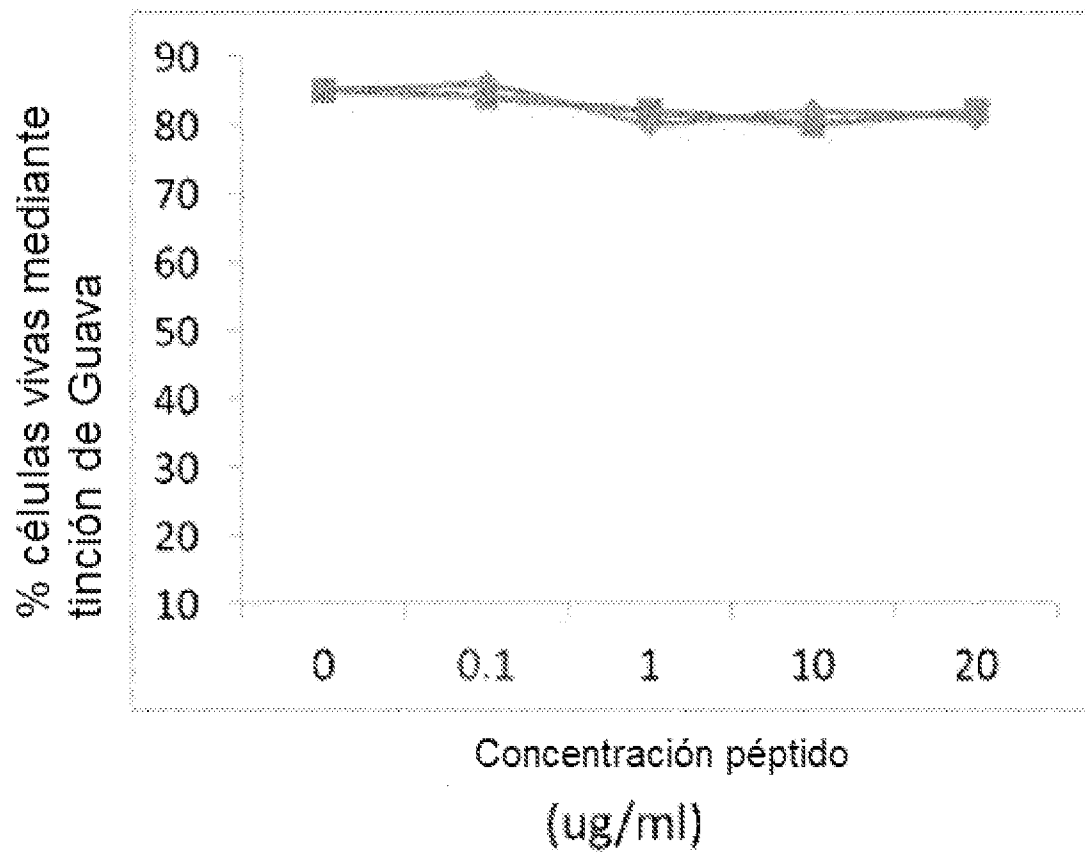
15.9 cm



**Figura 4B**



**Figura 4C**



***Figura 4D***